



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

**ISOFORMAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE OVINA (oLH) Y SU  
INTERACCIÓN CON LA EXPRESIÓN, SÍNTESIS Y SECRECIÓN DEL  
FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) EN  
CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA**

**T E S I S**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

**ARNULFO MONTERO PARDO**

TUTOR PRINCIPAL

DR. JOSÉ GERARDO PERERA MARÍN (FMVZ-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. EVERARDO GONZÁLEZ PADILLA (FMVZ-UNAM)

DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES (FMVZ-UNAM)

CD. MX., MARZO

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIAS**

### **A mis papás:**

Que me enseñaron el logro, la tenacidad y la perseverancia. Gracias por creer en mí y por el apoyo brindado durante mi formación académica.

### **A mis hermanos:**

Por su cariño y apoyo

### **A mis hijos:**

Que han sido una gran motivación en las metas académicas y personales que he tenido

### **A Marla:**

Que vivió de cerca todo este proceso formativo y me brindó su apoyo incondicional en los momentos de adversidad

### **Al Dr. Gerardo Perera:**

Por ofrecerme toda su experiencia y conocimientos

### **Al Dr. Everardo González padilla:**

Por toda la paciencia, por su apoyo brindado y por exigirme un trabajo de calidad

### **A mis amigos del Departamento de Reproducción:**

Anita Rodríguez, Daniel Díaz, Carolina Torres, Alvaro Ortega, Ubaldo Aguilar.

### **A mis amigos del INDRE:**

Dra. Yolanda, Dra. Edith, Dra. Olga, Sr. Mario, Gonzalo, Anabelle, Juan Carlos, Connie, Amanda, Aaron, Marisol

### **Al Señor Flavio Contreras:**

Que amablemente nos facilitó las condiciones requeridas para las ovejas

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme lograr un gran sueño.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Fondo para el Desarrollo de Recursos Humanos (FIDERH) del Banco de México por la beca crédito otorgada para llevar a cabo mis estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de doctorado.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el número de proyecto 78811.

A los miembros de mi comité tutorial, los doctores José Gerardo Perera Marín, María Teresa Sánchez Torres Esqueda, Jaime Gallegos Sánchez, Miguel Ángel cornejo Cortes, Mario Pérez Martínez. Les agradezco las valiosas aportaciones al presente trabajo.

A la M. en C. Ana Delia Rodríguez Cortez, por su ayuda incondicional para la determinación del VEGF y en el cultivo primario de células de la granulosa.

A la Dra. Clara Murcia, por su ayuda en la determinación hormonal por radioinmunoanálisis.

A la Dra. Margarita Chavarin, por su ayuda en el cultivo primario de células de la granulosa.

A la Dra. Aleida Olivares, por su apoyo en el cultivo de la línea celular HEK-293.

Al Dr. Rogelio Alonso y a Pablo Pintor, por su apoyo en la realización de la técnica de PCR en tiempo real.

A Álvaro Ortega, por su apoyo técnico y moral durante la realización de la purificación de las isoformas de la oLH y el cultivo primario.

A Daniel Díaz, por su valiosa ayuda en el análisis de los datos y por mostrarme otra perspectiva de la investigación científica.

## RESUMEN

Aunque se ha establecido un incremento en la expresión y síntesis del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en asociación con la LH, se desconoce si esta asociación es similar entre isoformas de carga de la misma hormona. El presente trabajo doctoral se encaminó a evaluar el efecto de distintas isoformas de la LH ovina en la expresión y síntesis del VEGF. Para ello, se obtuvo a la LH a partir del extracto glicoprotéico del lóbulo anterior de la hipófisis ovina y las isoformas de la hormona se aislaron de esta fracción rica en LH mediante el cromatoenfoque. El grupo de isoformas aisladas se agruparon de acuerdo al rango de pH de elución en: básicas (A, pH 10.56-10.14; B, pH 9.91-9.02 y C, pH 8.97-7.83), neutra (D, pH 7.73-6.98 ) y ácidas (E, pH 6.83-6.19; F, pH 5.98-3.65 y G, pH 3.55-3.66). La actividad biológica de cada isoforma se midió con base en la producción de AMPc y de VEGF en el bioensayo in vitro con las células HEK-293 transfectadas con el cDNA para el receptor de LH de rata y en las células de la granulosa de folículos dominantes, respectivamente. La actividad inmunológica de cada isoforma se midió con un RIA homólogo y específico para LH. La expresión de VEGF se analizó con un PCR cuantitativo. La actividad inmunológica y biológica de cada isoforma se comparó contra el patrón NIDDK-oLH-I-2, estimando en cada curva dosis-respuesta la concentración inhibitoria ( $IC_{50}$ ) o estimuladora ( $EC_{50}$ ), respectivamente. Las isoformas básicas (B y C) fueron significativamente más inmunoactivas que el patrón de referencia, en tanto que la isoforma neutra (D) y la medianamente ácida (E) resultaron similares al patrón de referencia. Por su parte, la isoforma F resultó la menos inmunoreactiva. La producción de AMPc como un indicativo de actividad biológica fue similar entre el patrón de referencia y las isoformas básicas y la medianamente ácida (E); en contraste, la isoforma neutra (D) y la ácida F fueron las menos bioactivas. La producción de VEGF fue diferente ( $p < 0.05$ ) al grupo testigo solo a la dosis de 10 ng/ml tanto en el patrón de referencia como con la isoforma básica (B) y neutra (D). Así mismo, la isoforma F mostró una respuesta dependiente de la dosis, aunque no fue diferente al grupo testigo. La expresión del VEGF en los extractos de células de la granulosa después del tratamiento con las isoformas de la LH no fue posible determinar. En conclusión, el grupo de isoformas aisladas de la hipófisis mostró un patrón diferencial en sus actividades inmunológicas y biológicas, siendo la isoforma de tipo básico la que generó la mayor producción de AMPc y VEGF similar al estándar de referencia y la isoforma ácida fue siempre la menos activa.

Palabras clave: VEGF; Granulosa; Hormona luteinizante; Isoformas; Ovino; in vitro AMPc.

## ABSTRACT

Although an increase in VEGF expression and synthesis in association with LH has been established, it is unknown if this is similar among charge isoforms of LH. This study evaluated the production of cAMP and VEGF among LH isoforms in two *in vitro* bioassays. The LH was obtained from sheep adenohypophysis glycoproteic extract and the group of isoforms was isolated by means of chromatofocusing. Isoforms were grouped according to the range of pH elution: basic (A, B and C), neutral (D) and acidic (E, F and G). cAMP production was assessed using the *in vitro* bioassay in HEK-293 cells transfected with the cDNA for the rat LH receptor and VEGF production was evaluated in sheep dominant follicle granulosa cells. Immunological activity was measured with a homologous RIA for LH, in a manner relative to the NIDDK-1-2-oLH standard. Immunoactivity and bioactivity for each isoform were compared against the standard, by estimating in the dose-response curves the  $IC_{50}$  and the  $EC_{50}$ , respectively. The basic isoforms (B and C) were more immunoactive than the standard. The neutral isoform (D) and the moderately acidic one (E) had an immunological activity similar to the standard. The F isoform was the least immunoreactive. cAMP production at the  $EC_{50}$  dose was similar among the basic isoforms, the moderately acidic one (E) and the standard; by contrast, for the neutral D isoform and the acidic F one, the  $EC_{50}$  dose was higher. It was observed that compared with the control (0 ng/ml), VEGF production at the lowest LH dose (1 ng/ml) was no different in the standard and each isoform. In the case of the intermediate dose (10 ng/ml), a positive response was caused in the standard and the neutral and basic isoforms. Although the F isoform showed a dose-dependent response, it was not significant relative to the control. In conclusion, the basic isoform generated the greatest cAMP and VEGF production, similar to the reference standard and the acid isoform was always the least active.

Keywords: VEGF; Granulosa; Luteinizing Hormone; Isoforms; Ovine; *in vitro*; cAMP.

INDICE GENERAL	PÁGINA
RESUMEN .....	IV
ABSTRACT .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE CUADROS .....	XIV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 <i>Origen y función de las gonadotropinas: participación de la LH en la gónada femenina</i> .....	4
2.2 <i>Características de la LH: composición molecular y heterogeneidad bioquímica</i> .....	5
2.3 <i>La heterogeneidad de la LH como un factor determinante en la actividad inmuno-biológica diferencial: estudios in vitro e in vivo</i> .....	7
2.4 <i>Las isoformas de la LH como herramientas para detectar cambios funcionales</i> .....	10
2.5 <i>El folículo dominante y la producción de VEGF por las células de la granulosa</i> .....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVO GENERAL .....	15
6. PURIFICACIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE OVINA (oLH) Y OBTENCIÓN DE SUS ISOFORMAS.....	17
6.1 Introducción.....	17
6.2 Materiales y métodos.....	18
6.2.1 <i>Colección de las hipófisis</i> .....	18

6.2.2	<i>Obtención del extracto glicoprotéico de las adenohipófisis</i> .....	19
6.2.3	<i>Purificación del extracto glicoprotéico</i> .....	19
6.2.4	<i>Obtención de las isoformas de carga de la LH</i> .....	20
6.2.5	<i>Cuantificación de proteínas</i> .....	22
6.2.6	<i>Determinación del peso molecular</i> .....	23
6.2.7	<i>Identificación de proteínas inmunoreactivas a LH</i> .....	23
6.2.8	<i>Cuantificación de la LH inmunoreactiva</i> .....	24
6.3	Resultados.....	26
6.4	Discusión .....	28
6.5	Conclusión .....	30
6.6	Referencias .....	31
7.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE CADA ISOFORMA DE LA $\alpha$ LH.....	52
7.1	Introducción.....	52
7.2	Materiales y métodos.....	53
7.2.1	<i>Cultivo celular</i> .....	54
7.2.2	<i>Medición de AMPc</i> .....	54
7.2.3	<i>Análisis estadístico</i> .....	55
7.3	Resultados.....	55
7.4	Discusión .....	56
7.5	Conclusión.....	59
7.6	Referencias .....	60
8.	EFFECTO DE LAS ISOFORMAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE OVINA (OLH) SOBRE LA EXPRESIÓN, SÍNTESIS Y SECRECIÓN DEL VEGF EN EL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE FOLÍCULOS DOMINANTES .....	69
8.1	Introducción.....	69
8.2	Materiales y métodos.....	71
8.2.1	<i>Animales y diseño experimental</i> .....	71
8.2.2	<i>Cultivo primario de células de la granulosa</i> .....	72
8.2.3	<i>Efecto del trilostano en la producción de VEGF</i> .....	73

8.2.4 Efecto de las isoformas de la oLH en la producción de VEGF en células de la granulosa no luteinizadas .....	74
8.2.5 Efecto de las isoformas de la oLH en la producción de VEGF en células de la granulosa luteinizadas de forma espontánea .....	74
8.2.6 Análisis de expresión del VEGF .....	75
8.2.6.1 Obtención del RNA.....	75
8.2.6.2 Cuantificación del RNA y retrotranscripción.....	76
8.2.6.3 PCR en tiempo real.....	76
8.2.6.4 Análisis de muestras.....	78
8.2.7 Cuantificación de estradiol, progesterona y VEGF .....	79
8.2.8 Análisis estadístico .....	79
<b>8.3 Resultados.....</b>	<b>80</b>
8.3.1 Porcentaje de sobrevivencia y secreción de VEGF por las células de la granulosa cultivadas con o sin trilostano.....	80
8.3.2 Secreción de VEGF y progesterona en el cultivo de células de la granulosa luteinizadas de forma espontánea.....	81
8.3.3 Secreción de VEGF y progesterona en el cultivo de células de la granulosa no luteinizadas .....	82
8.3.4 Experimentos de expresión del VEGF .....	82
<b>8.4 Discusión .....</b>	<b>83</b>
<b>8.5 Conclusión.....</b>	<b>87</b>
<b>8.6 Referencias.....</b>	<b>88</b>
<b>9. Artículo científico.....</b>	<b>105</b>
<b>10. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>118</b>
<b>11. CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>124</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>DIAGRAMA 6.1.</b> Pasos de la extracción, purificación y caracterización de la LH y sus isoformas a partir de la adenohipófisis ovina.	22
<b>FIGURA 6.1.</b> Patrón de elución del extracto glicoprotéico (EGP) del lote A en la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). La columna se eluyó con un gradiente de acetato de amonio ( $\text{AcNH}_4$ ) a diferente pH. Cada pico de proteína se monitoreó a 280 nm.	35
<b>FIGURA 6.2.</b> Patrón de elución del extracto glicoprotéico (EGP) del lote B en la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). La columna se eluyó con un gradiente de acetato de amonio ( $\text{AcNH}_4$ ) a diferente pH. Cada pico de proteína se monitoreó a 280 nm.	36
<b>FIGURA 6.3.</b> Lote A. Curvas dosis-respuesta obtenidas en el RIA homólogo y específico para LH para cada fracción recuperada durante la purificación del extracto glicoprotéico (EGP) en CM-Sepharosa.	38
<b>FIGURA 6.4.</b> Lote B. Curvas dosis-respuesta obtenidas en el RIA homólogo y específico para LH para cada fracción recuperada durante la purificación del extracto glicoprotéico (EGP) en CM-Sepharosa.	39
<b>FIGURA 6.5.</b> Perfil de elución de la fracción CM-3ab en el cromatoenfoco para la obtención de isoformas de la oLH. El contenido total de proteína (22.9 mg) de CM-3ab se resuspendió en amortiguador de pharmalyte y fue eluida en una columna con PBE-118 que sirvió como intercambiador iónico. La columna fue equilibrada con 0.025M de trietilamina-HCl, pH 11.0 y fracciones de 2 ml se colectaron. Cada fracción de proteína fue identificada a 280 nm y codificado con una letra, comenzando con la proteína que eluyó a pH más básico (isoforma A) y se finalizó con la proteína de elución a pH más ácido (isoforma G). El pico de proteína recuperado con NaCl 1M se denominó S. La línea negra continua denota el gradiente de pH.	41
<b>FIGURA 6.6.</b> Patrón electroforético en SDS-PAGE al 12.5%, pH 8.6 en ausencia (I) y en presencia (II) de $\beta$ -mercaptoetanol para el estándar de oLH (NIDDK-oLH-I-2), el extracto glicoprotéico (EGP) y para las distintas fracciones de proteína obtenidas	43

durante la cromatografía de intercambio catiónico. En cada panel los marcadores de peso molecular (PM) son indicados y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y sus subunidades. Una vez concluida la electroforesis los geles se tiñeron con nitrato de plata (Bio-Rad).

- FIGURA 6.7.** Patrón de inmunotransferencia de cada fracción de proteína recuperada durante la purificación del extracto glicoprotéico (EGP) en el intercambiador catiónico (CM-Sepharosa). Cada carril corresponde a 100 ng de proteína para cada fracción. Las bandas de proteínas inmunoreactivas a LH se revelaron por quimioluminiscencia. Se indican los marcadores de peso molecular (PM) y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y la subunidad beta (23.4 kDa) se indican a la derecha. Este patrón se desarrolló en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (No Reductoras). 44
- FIGURA 6.8.** Patrón electroforético en SDS-PAGE al 12.5%, pH 8.6 en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Reductoras) para el estándar de oLH y las isoformas de carga aisladas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. En el panel los marcadores de peso molecular (PM) son indicados y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y sus subunidades (23.4 kDa, 20.8). Adicionalmente se indica la presencia de la proteína de 15.0kDa. La tinción se realizó con nitrato de plata (Bio-Rad). 45
- FIGURA 6.9.** Patrón de inmunotransferencia del estándar de la oLH y de las isoformas de carga obtenidas durante la purificación de la fracción CM-3ab en el cromatoenfoco. La corrida electroforética se realizó en SDS-PAGE al 12.5%, pH 8.6 en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Reductoras). La concentración de cada carril correspondió a 100 ng de proteína. El revelado se realizó por quimioluminiscencia. En el panel los marcadores de peso molecular (PM) son indicados con una línea negra y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y sus subunidades (23.4 y 20.8 kDa). 46
- FIGURA 6.10.** Re-análisis específico del patrón por inmunotransferencia en condiciones no reductoras y reductoras para las isoformas que representaron el gradiente de pH del cromatoenfoco: isoforma básica (B), neutra (D) y la ácida (F) y el patrón de referencia (oLH). Cada isoforma se analizó a una 47

concentración de 200 ng de LH inmunoreactiva. El revelado se realizó con el estuche comercial AP *conjugate substrate* Kit (Bio-Rad). En cada panel los marcadores de peso molecular (PM) son indicados con una línea negra y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y sus subunidades (23.4 y 20.8 kDa).

- FIGURA 6.11.** Curvas dosis-respuesta inhibitorias en un RIA específico y homólogo para LH estándar (oLH) y para las isoformas de carga básicas obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. B, pH 9.91-9.02 y C, pH 8.97-7.83. Cada punto de la curva representa el promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas. 48
- FIGURA 6.12.** Curvas dosis-respuesta inhibitoria en un RIA específico y homólogo para LH estándar (oLH) y para las isoforma de carga neutra (D, pH 7.73-6.98) de la LH ovina obtenida después de la purificación de la fracción CM-3ab en el cromatoenfoco. Cada punto de la curva representa el promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas. 49
- FIGURA 6.13.** Curvas dosis-respuesta inhibitorias en un RIA específico y homólogo para LH estándar (oLH) y para las isoformas de carga ácidas obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. E, pH 6.83-6.19; F, pH 5.98-3.65; G, pH 3.55-3.66. Cada punto de la curva representa el promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas. 50
- FIGURA 7.1.** Curva dosis-respuesta estimuladora de las isoformas de carga de la oLH para inducir la producción de AMPc por las células HEK-293 cuando se estimularon con el estándar de oLH (NIDDK-oLH-I-2) y las isoformas básicas (A, 10.56-10.14; B, 9.91-9.02; C, 8.97-7.83) obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. Cada punto de la curva corresponde al promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas. 65
- FIGURA 7.2.** Curva dosis-respuesta estimuladora de las isoformas de carga de la oLH para inducir la producción de AMPc por las células HEK-293 cuando se estimularon con el estándar de oLH (NIDDK-oLH-I-2) y la isoforma neutra (D, 7.73-6.98) obtenida de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. Cada punto de la curva corresponde al promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas. 66

- FIGURA 7.3.** Curva dosis-respuesta estimuladora de las isoformas de carga de la oLH para inducir la producción de AMPc por las células HEK-293 cuando se estimularon con el estándar de oLH (NIDDK-oLH-I-2) y las isoformas neutras (E, 6.83-6.19; F, 5.98-3.65; G, 3.55-3.66) obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatofoco. Cada punto de la curva corresponde al promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas. 67
- FIGURA 8.1.** Sobrevivencia de las células de la granulosa después del estímulo con la LH y sus isoformas, en el medio de cultivo sin TRL o con TRL (Trilostano 250 ng/ml). La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2, panel I; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02, panel II); la neutra (D, pH, 7.73-6.98, panel III) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65, panel IV). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de un cultivo con tres sub-réplicas. <sup>a,b</sup>En cada dosis indica diferencias significativas entre el grupo Sin TRL y Con TRL al nivel de  $p < 0.05$ . 97
- FIGURA 8.2.** Secreción de VEGF (pg/ml) por las células de la granulosa después del estímulo con la oLH y sus isoformas, en el medio de cultivo sin TRL o con TRL (Trilostano 250 ng/ml). La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2, panel I; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02, panel II); la neutra (D, pH, 7.73-6.98, panel III) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65, panel IV). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de un cultivo con tres sub-réplicas. \*En cada dosis indica diferencias significativas entre el grupo Sin TRL y Con TRL al nivel de  $p < 0.05$ . 98
- FIGURA 8.3.** Secreción de VEGF (pg/ml) por las células de la granulosa después del estímulo con 10 ng de la oLH y sus isoformas, en el medio de cultivo sin TRL o con TRL (Trilostano 250 ng/ml). La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2, panel I; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02, panel II); la neutra (D, pH, 7.73-6.98, panel III) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65, panel IV). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de un cultivo con tres sub-réplicas. \*En cada dosis indica diferencias significativas entre el grupo Sin TRL y Con TRL al nivel de  $p < 0.05$ . 99
- FIGURA 8.4.** Secreción de VEGF (pg/ml) por células de la granulosa luteinizadas después del estímulo con LH y sus isoformas. La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02); la neutra (D, pH, 7.73-6.98) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65). Se presenta el promedio  $\pm$  el error 100

estándar de un cultivo con cuatro sub-réplicas. <sup>a,b</sup>Distintas literales en cada dosis indican diferencias al nivel de  $p < 0.05$ .

- FIGURA 8.5.** Secreción de VEGF (pg/ml) por las células de la granulosa después del estímulo con LH y sus isoformas. La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02); la neutra (D, pH, 7.73-6.98) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de tres cultivos independientes con cuatro sub-réplicas cada cultivo. a,b Distintas literales entre dosis para cada isoforma indican diferencias al nivel de  $p < 0.05$ . \* En cada dosis indica diferencias significativas al nivel de  $p < 0.05$  entre la isoforma vs. el estándar. 102
- FIGURA 8.6.** Expresión del gene de VEGF<sub>164</sub> y  $\beta$ -actina por la PCR en tiempo real 104

## ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
<b>CUADRO 6.1.</b> Cantidad de proteína y concentración de LH inmunoreactiva por mg de proteína de las distintas fracciones recuperadas durante la purificación del extracto glicoprotéico en CM-Sepharosa.	37
<b>CUADRO 6.2.</b> Parámetros de la actividad inmunológica específica a LH y dependiente de la dosis para el estándar oLH y para los diferentes productos obtenidos del EGP durante su purificación mediante intercambio iónico en CM-Sepharosa. Los parámetros fueron obtenidos de las curvas no lineales ajustadas del %B/B0 vs. log de la dosis. IC <sub>50</sub> , corresponde a la dosis (ng/ml) obtenida al 50% de la curva. h, corresponde a la pendiente de Hill (h) y R <sup>2</sup> se refiere al coeficiente de determinación para cada fracción analizada.	40
<b>CUADRO 6.3.</b> Rango de pH de elución, cantidad de LH inmunoreactiva y el porcentaje de recuperación de cada isoforma durante la purificación de la fracción CM-3ab en el cromatoenfoco.	42
<b>CUADRO 6.4.</b> Parámetros de la actividad inmunológica específica de LH y dependiente de la dosis para el estándar oLH y para las diferentes isoformas de carga de la oLH obtenidas de la fracción CM-3ab durante su purificación en el cromatoenfoco. Los parámetros fueron obtenidos de las curvas no lineales ajustadas del %B/B0 vs. log de la dosis. IC <sub>50</sub> , corresponde a la dosis (ng/ml) obtenida al 50% de la curva. h, corresponde a la pendiente de Hill y R <sup>2</sup> se refiere al coeficiente de determinación para cada fracción analizada.	51
<b>CUADRO 7.1.</b> Resumen de la actividad biológica dependiente de la dosis del estándar de la oLH y las isoformas de carga obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. Los parámetros fueron obtenidos de las curvas no lineales ajustadas para cada hormona. EC <sub>50</sub> dosis obtenida al 50% de la curva ajustada; h pendiente de Hill; R <sup>2</sup> coeficiente de determinación.	68

<b>CUADRO 8.1.</b>	Componentes de la reacción para la PCR en tiempo real.	77
<b>CUADRO 8.2.</b>	Los oligonucleótidos y las sondas utilizadas para la PCR-tiempo real	78
<b>CUADRO 8.3.</b>	Promedio ( $\pm$ EE) del tamaño, concentración de esteroides, relación E/P y concentración de VEGF en líquido folicular de folículos dominantes de ovinos con estro sincronizado.	96
<b>CUADRO 8.4.</b>	Secreción de progesterona (ng/ml) por células de la granulosa luteinizadas de forma espontánea tratadas con la oLH o sus isoformas. La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02); la neutra (D, pH, 7.73-6.98) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65). Se presenta el promedio $\pm$ el error estándar de un cultivo con cuatro sub-réplicas.	101
<b>CUADRO 8.5.</b>	Secreción de progesterona por las células de la granulosa después del estímulo con LH o sus isoformas. La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02); la neutra (D, pH, 7.73-6.98) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65). Se presenta el promedio $\pm$ el error estándar de tres cultivos independientes con cuatro sub-réplicas en cada cultivo.	103

## 1. INTRODUCCIÓN

En rumiantes, durante cada ciclo estral se producen varias oleadas de crecimiento folicular. Este proceso se inicia con el reclutamiento de una cohorte o grupo de folículos, dentro de los cuales los folículos seleccionados continuarán su desarrollo hasta volverse dominantes, momento en el cual disminuye su dependencia a FSH y se incrementa para LH (Campbell et al., 2003; Zeleznik, 2004; Webb y Campbell, 2007).

La LH en esta etapa final del crecimiento folicular resulta esencial, ya que la expresión de receptores para esta gonadotropina en las células de la granulosa le permite al folículo responder al pico preovulatorio de LH y continuar con el proceso de ovulación (Hunter et al., 2004; Espinoza-Villavicencio et al., 2007; Uribe-Velásquez et al., 2009). En el folículo dominante se ha asociado la secreción de LH con el proceso angiogénico sobre la vasculatura perifolicular preexistente (Tamanini y De Ambrogi, 2004; Berisha y Schams, 2005; Chowdhury et al., 2010).

La angiogénesis intrafolicular está regulada en parte por factores de crecimiento, siendo el principal actor, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El VEGF es un homodímero de 45kDa que en el proceso de corte y empalme de su mRNA da origen a cinco isoformas, siendo la isoforma VEGF-A<sub>164</sub> la predominante y más estudiada (Kaczmarek et al., 2005). La actividad biológica del VEGF-A depende de la expresión diferencial de los receptores de membrana del tipo tirosina-cinasa; el receptor 2 (VEGF-R2 o KDR) que media su actividad pro-angiogénica, mientras que el receptor 1 (VEGF-R1 o Flt-1) determina su actividad anti-angiogénica (Park et al., 1993; Zimmermann et al., 2003; Ferrara, 2004). A nivel folicular el VEGF participa en la proliferación, la sobrevivencia y los cambios en la permeabilidad del endotelio vascular (Taylor et al., 2007; McFee y Cupp, 2013), eventos que en conjunto impactan el aporte sanguíneo al folículo y que proveen los elementos necesarios para asegurar el desarrollo final y el tránsito de folículo dominante a folículo preovulatorio, necesario para la reproducción de las hembras (Rocha-Araujo et al., 2011).

En rumiantes, la isoforma predominante corresponde al VEGF-A<sub>164</sub> cuya expresión y síntesis se lleva a cabo principalmente en las células de la granulosa de folículos dominantes (Berisha et al., 2000; Greenaway et al., 2004; Chowdhury et al., 2010). La participación de la LH en la producción de VEGF, ha sido reportada, en estudios *in vitro*, en donde la síntesis y expresión del VEGF por las células de la granulosa se incrementa después del tratamiento con hCG (Lee et al., 1997), LH humana (Guimera et al., 2009) y LH bovina (Babitha et al., 2013; Babitha et al., 2014); *in vivo*, el incremento de VEGF en el líquido folicular de folículos dominantes se presentó después de un bolo de hCG (Hazzard et al., 1999).

Por otra parte, en ovinos, analizando las estructuras ováricas mediante estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ*, se ha demostrado que la expresión de VEGF en los folículos depende de la etapa del ciclo estral así como del tamaño folicular; aunque siempre es mayor la cantidad de VEGF en los folículos grandes, hay un incremento en los pequeños y medianos durante y después del pico preovulatorio de LH, observándose una asociación con el receptor 2 del VEGF (Chowdhury et al., 2010). En bovinos con celos sincronizados, e hiperestimulados con FSH y tratados con GnRH, se ha observado que las células de la granulosa de folículos preovulatorios presentan una mayor expresión del gene para VEGF durante el pico preovulatorio de la LH (Berisha et al., 2008). Por otro lado, en monos marmoset (*Callithrix jacchus*) tratados con un antagonista a GnRH para evitar la secreción preovulatoria de LH se mostró reducción en la proliferación de células endoteliales, densidad vascular y en la expresión del VEGF en las células granulosas de los folículos preovulatorios (Taylor et al., 2004).

A pesar de contar con este cuerpo de evidencias que muestran claramente que la LH está involucrada en la regulación del VEGF dentro de las células de la granulosa de folículos dominantes, y que la LH está integrada por una familia de proteínas cuya diferencia de cada miembro se ha atribuido a la estructura de sus oligosacáridos que se refleja en sus propiedades físico-químicas, biológicas e inmunológicas (Baenziger y Green, 1988; Cooke et al., 1996; Manzella et al., 1996;

Perera-Marín et al., 2007) y que el polimorfismo de la LH se ha observado bajo distintas condiciones fisiológicas tanto en extractos de hipófisis (Zalesky et al., 1992; Helj et al., 1992; Perera-Marín et al., 2008) como en el suero (Perera-Marín et al., 2005; Arrieta et al., 2006; Rojas-Maya et al., 2007), con resultados que indican que el patrón de distribución y la secreción de las isoformas cambia con cada condición. En la actualidad, no se ha informado si las diferentes isoformas de LH muestran distintos efectos en la regulación de la expresión, síntesis y secreción del VEGF. Por lo tanto, el presente trabajo se encaminó a probar bajo condiciones *in vitro* el efecto de las isoformas de la LH ovina sobre la producción y síntesis del VEGF en células de la granulosa obtenidas de folículos dominantes de ovejas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Origen y función de las gonadotropinas: participación de la LH en la gónada femenina*

La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son hormonas gonadotrópicas que pertenecen a una familia de glicoproteínas que se sintetizan, almacenan y secretan dentro de un tipo particular de células basófilas llamadas gonadotropos. Dichos gonadotropos comprenden del 10 al 20% de las células de la adenohipófisis (Childs et al., 1980) y se dividen en pequeñas (monohormonales) y grandes (bihormonales). Las células grandes representan aproximadamente el 62% de la población de los gonadotropos; se caracterizan por tener un diámetro aproximado de 400  $\mu\text{m}$  y contienen ambas gonadotropinas, mientras que los gonadotropos pequeños presentan un diámetro aproximado de 200  $\mu\text{m}$  y contienen LH o FSH (Childs et al., 1994). Ambas gonadotropinas se sintetizan y secretan en respuesta a la estimulación de la hipófisis con GnRH producida por el hipotálamo y cumplen un papel fundamental en la fisiología reproductiva.

La LH y la FSH se encargan de estimular y mantener el funcionamiento de las gónadas, tanto masculina como femenina (Senger, 2003; Hunter et al., 2004; Webb y Campbell, 2007). Particularmente en el ovario, ambas gonadotropinas inducen de manera secuencial el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos, la secreción de estrógenos, la ovulación, el desarrollo del cuerpo lúteo y la consecuente secreción de progesterona (Niswender et al., 2000; Murphy, 2000; Senger, 2003; Hunter et al., 2004). A pesar de que ambas gonadotropinas actúan de manera concertada en la fisiología reproductiva femenina, es destacable la función de la LH dentro de la etapa final del desarrollo folicular y durante la formación y funcionamiento del cuerpo lúteo (Niswender et al., 2000; Murphy, 2000; Berisha y Schams, 2005; Webb y Campbell, 2007). Como el objeto de estudio en la presente investigación es la LH, de aquí en adelante trataremos de presentar únicamente las características y funciones de esta gonadotropina.

Durante las fases tempranas de crecimiento folicular, la FSH estimula el incremento del diámetro folicular así como la secreción de estrógenos (Senger, 2003; Hunter et al., 2004; Webb y Campbell, 2007). Además, la FSH induce la aparición de receptores para la LH en las células de la granulosa, con lo cual continúa la maduración final del folículo en respuesta a la estimulación con LH (Campbell et al., 2003; Webb y Campbell, 2007). Posteriormente, en la etapa tardía de crecimiento folicular la producción de estrógenos es suficiente para retroalimentar positivamente a los núcleos hipotalámicos responsables de la secreción de GnRH que conlleva al pico preovulatorio de LH. Es justamente durante esta fase donde la LH desencadena, a nivel folicular, una serie de cambios que concluyen en la ovulación (Richards et al., 1998; Berisha y Schams, 2005). Durante la luteogénesis, y en respuesta a la estimulación con la LH, se inicia el proceso de luteinización de las células de la granulosa, siendo esta la razón por la cual se mantiene únicamente la secreción tónica de LH que resulta fundamental para completar la formación del cuerpo lúteo y estimular la secreción de progesterona en las nuevas células luteales (Niswender et al., 2000; Murphy, 2000; Berisha y Schams, 2005).

## *2.2 Características de la LH: composición molecular y heterogeneidad bioquímica*

Desde el punto de vista estructural la LH se compone de dos cadenas polipeptídicas llamadas subunidades. La unión de la subunidad alfa ( $\alpha$ ) con la subunidad beta ( $\beta$ ) a través de fuerzas no covalentes y en conjunto con distintos oligosacáridos ayudan a conformar un heterodímero biológicamente activo. La subunidad  $\alpha$  es idéntica para las diferentes gonadotropinas que se producen en la hipófisis de cada especie de mamífero; está codificada por un sólo gen que se encuentra en el cromosoma seis en la especie ovina, humana, bovina y de rata (Pierce y Parsons, 1981; Goodwin et al., 1983). Presenta dos sitios de glicosilación del tipo N-unidos, localizados en el residuo del aminoácido 56 y 83 en el bovino, ovino, porcino y equino (Cooke et al., 1996; Perera-Marín et al., 2007). En contraste, la subunidad  $\beta$  es única para cada hormona y le confiere su especificidad biológica. Esta subunidad está codificada por diferentes genes, que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 19 (Pierce y Parsons, 1981;

Cooke et al., 1996; Perera-Marín et al., 2007). Presenta un sólo sitio de glicosilación del tipo N-unido localizado en el residuo 13 del aminoácido asparagina en las especies bovina, ovina y porcina (Cooke et al., 1996; Perera-Marín et al., 2007).

La estructura primaria de la LH se caracteriza por una secuencia de residuos de aminoácidos altamente homóloga entre especies, con la posición idéntica de los residuos de cisteína (Combarnous, 1988). La estructura secundaria se encuentra principalmente en conformación beta, que es generada por el alto contenido de prolina, con muy bajo contenido de  $\alpha$ -Hélice (Garnier et al., 1975). La estructura terciaria está caracterizada por los puentes disulfuro intracadena; cinco para la subunidad  $\alpha$  y seis para la subunidad  $\beta$  (Gharib et al., 1990), los cuales disminuyen la susceptibilidad a enzimas proteolíticas. Finalmente, la estructura cuaternaria resulta de la unión de ambas subunidades por medio de fuerzas no covalentes y de ella se deriva la actividad biológica particular en cada glicoproteína (Combarnous, 1988).

La síntesis de la LH se inicia en el retículo endoplasmático y durante este proceso se originan diversas modificaciones post-traduccionales como la pérdida del péptido señal, ensamblaje de las subunidades y la co-traslación del fosfolípido de membrana, dolicol-pirofosforilo, precursor del oligosacárido Glu3Man9GlcNAc2, que se incorpora en el sitio de glicosilación Asn-X-Ser/Thr (Asn: Asparagina, S: Serina, T: Treonina y X representa a cualquier otro aminoácido) de la secuencia primaria de la proteína recién formada. Una vez incorporado este precursor del oligosacárido, en el aparato de Golgi será modificado por exoglucosidasas (exoglucosidasas I y II) y por una manosidasa, generando un núcleo común compuesto por dos residuos de N-acetil glucosamina unidos a tres residuos de manosa (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Baenziger et al., 1992; Cooke et al. 1996; Perera-Marín et al. 2007; Mullen et al. 2013). A partir de este núcleo común, con la participación de diferentes enzimas como la N-acetil-galactosamina transferasa, N-acetil-glucosamina transferasa, Sulfo-transferasa, Galactosil-transferasa y Sialil-transferasa se dará origen al patrón heterogéneo de oligosacáridos

presentes en este grupo de glicoproteínas y que se considera como la base bioquímica de clasificación de esta familia de proteínas (Green y Baenziger, 1988; Cooke et al., 1996; Perera-Marín et al., 2007; Mullen et al., 2013).

### *2.3 La heterogeneidad de la LH como un factor determinante en la actividad inmuno-biológica diferencial: estudios in vitro e in vivo*

Como se mencionó previamente, las gonadotropinas son heterogéneas debido, en parte, al tipo del oligosacáridos ramificados que están presentes en la molécula y que, además, se encuentran sulfatados o sializados en sus residuos terminales (Baenziger y Green, 1988; Cooke et al. 1996; Manzella et al., 1996; Perera-Marín et al. 2007). Esta propiedad de carga particular en cada gonadotropina se refleja en las diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales (Cooke et al., 1996), y ha servido para aislar a los diferentes miembros de cada familia. En el caso de la LH, las formas predominantemente se han obtenido a un pH básico (>80%) y el resto de los miembros de la familia se han obtenido con la disminución del pH (Keel et al., 1987; Zalesky et al., 1992; Arrieta et al., 2006). En la LH ovina, ésta característica de elución se ha atribuido a la presencia de un alto porcentaje de oligosacáridos (69%) con residuos terminales sulfatados (Sairam y Schiller, 1979; Green et al., 1988; Cooke et al., 1996; Perera-Marín et al., 2007). Con base en esta característica fisicoquímica y mediante el uso del cromatofoco como herramienta analítica de purificación de proteínas, se ha identificado el polimorfismo de la LH en ratas (Hattori et al., 1983; Olivares et al., 2009), caballos (Matteri y Papkoff, 1987), humanos (Castro-Fernandez et al., 2000), bovinos (Stumpf et al., 1992; Perera-Marín et al., 2004), caprinos (Rojas-Maya et al., 2007) y ovinos (Zalesky et al., 1992; Nakamura et al., 1993; Arrieta et al., 2006).

Diversos estudios han demostrado que el tipo de carbohidrato además de participar en las características fisicoquímicas de cada proteína, participa en el impacto en la biopotencia, en la vida media en circulación, en el cambio de la afinidad por su receptor y en la capacidad para estimular la vía de señalización (Hattori et al., 1983; Robertson et al., 1991; Nakamura et al., 1993; Burgon et al., 1996; Burgon et al., 1997; Olivares et al., 2009). Esta serie de resultados muestran

que la actividad biológica de las diferentes isoformas de la LH que eluyen a pH básico (alcalinas), presentan la mayor actividad en bioensayos *in vitro* y una mayor afinidad por el receptor; sin embargo, su tasa de eliminación de la circulación es más rápida (Burgon et al., 1996). En el caso de la LH que eluye a un pH ácido (ácidas), se observa una menor actividad en bioensayos *in vitro*, pero tienen una menor tasa de depuración de la circulación (Burgon et al., 1997; Hattori et al., 1983; Olivares et al., 2009). De forma particular, Nakamura et al., (1993), al probar tres isoformas de la oLH de carga básica, encontraron que la isoforma con un pH de 9.99 a 9.84 tuvo una mayor vida media en circulación y evocó la mayor producción de testosterona *in vivo*.

La actividad biológica para distintas isoformas de la LH de origen hipofisario de mamíferos se ha determinado por medio de bioensayos *in vivo* e *in vitro*. De forma particular, en rumiantes, la actividad biológica *in vivo* de la LH y sus isoformas han generado resultados poco reproducibles. Ejemplo de ello, son los resultados descritos por Perera-Marín et al., (1996) que evaluaron la bioactividad de isoformas de origen caprino mediante el bioensayo de la depleción del ácido ascórbico en el ovario de la rata, en donde la isoforma de origen ácido presentó la mayor actividad biológica cuando se comparó con la isoforma de la LH de origen neutro. Por otra parte, el mismo grupo reportó con este mismo bioensayo que la isoforma de la LH bovina de origen básico presentó la mayor bioactividad, seguida de las isoformas de origen ácido (Perera-Marín et al., 2004). Por otra parte, Chaudhary y Muralidhar (2007), reportaron la bioactividad de isoformas de la LH de origen caprino mediante la evaluación del incremento en la próstata ventral de la rata, con resultados que indicaron una mayor bioactividad en isoformas de origen ácido de la LH. Esta discrepancia entre los diferentes bioensayos se ha atribuido a que en estos modelos biológicos *in vivo* no consideran a la tasa de depuración de cada isoforma; adicionalmente, en estos bioensayos se requieren microgramos de cada isoproteína, lo que demuestra una baja sensibilidad de estos bioensayos, y la respuesta biológica dependiente de cada animal.

El empleo del bioensayo *in vitro* basado en la producción de andrógenos por las células de Leydig de roedores después del tratamiento con distintas

isoformas de carga de la LH de diferentes especies, ha generado una serie de resultados que coinciden en que las isoformas básicas son las más biológicamente activas que su contraparte ácida (Robertson y Diczfalusy, 1977; Hattori et al., 1983); sin embargo, no siempre es un resultado consistente, debido a que el origen de las células de Leydig (rata) plantea la cuestión de la especificidad de especie cuando se utilizan ligandos de otras especies. Para el desarrollo de este tipo de bioensayo se requiere de un cultivo primario, proceso costoso, laborioso y poco reproducible; la cuantificación de estradiol o testosterona es una medida indirecta de la actividad biológica de cada isoforma.

Una alternativa relativamente reciente a los bioensayos clásicos ha sido el desarrollo de bioensayos basados en la clonación de receptores para gonadotropinas. En estudios pioneros utilizando células transfectadas con el cDNA para el receptor de LH humana se observó que la hCG induce una producción de AMPc dependiente de la dosis con una constante de asociación de la hCG y el receptor similar a valores descritos con receptores testiculares cuando se expusieron a la misma hormona McFarland et al., 1989; Loosfelt et al., 1989).

Posteriormente, con la transfección del plásmido para el cDNA del receptor de la LH humana en una línea celular fija derivada de células de riñón de feto humano (HEK-293), se logró evaluar cambios en la bioactividad de la gonadotropina coriónica durante el inicio de la preñez en mujeres y primates no humanos (Jia et al., 1993). En estudios recientes, utilizando a las células HEK-293 transfectadas con el cDNA para el receptor de LH de rata se han permitido identificar cambios en la producción de AMPc después del tratamiento con distintos aislados de la LH de la hipófisis de la rata obsesa o diabética con diferente punto isoeléctrico, que mostró que el aislado de origen básico fue más bioactivo al compararlo con el aislado ácido (Olivares et al., 2009; Olivares et al., 2010). Finalmente, con este modelo biológico de las células HEK-293 se ha determinado la constante de afinidad de la LH bovina al receptor de la LH de rata (Galet y Ascoli, 2005).

El uso de este tipo de bioensayos ha ofrecido una serie de ventajas, ya que se trata de líneas celulares estables, en donde las células clonadas expresan un

número definido y una población homogénea de receptores; lo que permite evaluar de forma directa la hormona biológicamente activa a través de la producción del segundo mensajero, AMPc; presentan una sensibilidad y una variación interensayo e intraensayo similar a bioensayos *in vitro* clásicos (Christin-Maitre et al., 2000; Galet y Ascoli, 2005).

#### *2.4 Las isoformas de la LH como herramientas para detectar cambios funcionales*

Como se describió en los párrafos previos, la LH es una proteína heterogénea, con un patrón de vida media en circulación de cada isoforma y diferente afinidad por su receptor. Adicionalmente, la proporción de las isoformas circulantes cambia durante distintas etapas fisiológicas y/o el medio endocrino dominante en la hembra, incluyendo efectos asociados con la edad, la pubertad, la etapa de gestación, la concentración circulante de estradiol, los niveles de GnRH y el estado de nutrición (Stumpf et al., 1992; Zalesky et al., 1993; Kojima et al., 1995; Perera-Marín et al., 2005; Arrieta et al., 2006; Perera-Marín et al., 2008; Olivares et al., 2009).

En virtud de este escenario los estudios *in vivo* representan una limitante para investigar si las isoformas de la LH presentan una capacidad diferencial para inducir una respuesta funcional (bioactividad) en sus células blanco dentro del ovario, es por ello que el uso de modelos o sistemas *in vitro* proveen las condiciones ideales para evaluar respuestas cuantitativas que asocien a las isoformas de la LH con una capacidad de bioactividad diferencial. Dichos resultados son importantes para establecer estudios sobre la regulación diferencial que tienen las isoformas de la LH en los procesos fisiológicos del ovario, los cuales dependen de la regulación por parte de las gonadotropinas. Un caso particular de dicha regulación lo representa la estimulación de la síntesis de factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

En este contexto un sistema ideal para probar *in vitro* la actividad biológica de las distintas isoformas, son las células de la granulosa obtenidas de folículos en

las etapas finales de crecimiento, ya que estas células expresan los receptores a la LH y se pueden mantener en condiciones controladas.

### *2.5 El folículo dominante y la producción de VEGF por las células de la granulosa*

La maduración de los folículos preovulatorios, como una preparación para la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, requiere del desarrollo de una microvasculatura adecuada para llevar los niveles necesarios de hormonas y lipoproteínas unidas al colesterol (Davis et al., 2003). Por lo que, la adquisición de un aporte vascular adecuado es posiblemente un paso limitante en la selección y maduración del folículo dominante destinado a ovular (Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010). Para ese fin, es necesaria una producción coordinada de factores angiogénicos por las células de la teca y de la granulosa del folículo en desarrollo.

El factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF por sus siglas en inglés, es un actor principal durante el proceso angiogénico en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. El ARNm y la proteína del VEGF en el ovario de primates, ovinos, porcinos, bovinos, humanos, búfalos y ratas, se han localizado en las células de la teca y granulosa de folículos antrales y escasamente en granulosa de folículos primordiales o preantrales (Koos, 1995; Barboni et al., 2000; Berisha et al., 2000; Geva y Jaffe, 2000; Stouffer et al., 2001; Chowdhury et al., 2010; Babitha et al., 2013). Las células de la granulosa del folículo dominante expresan receptores para la LH y es allí donde se da la mayor producción de VEGF por efecto de la LH (Geva y Jaffe, 2000; Stouffer et al., 2001; Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010; Babitha et al., 2014).

El VEGF es una glicoproteína homodímera con un peso molecular de 45 kDa; durante el corte y empalme del ARN mensajero da origen a isoformas con distinto número de aminoácidos; VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> (Kaczmarek et al., 2005). Su actividad biológica es mediada a través de dos receptores de membrana del tipo tirosina-cinasa: VEGF-R1 o Flt-1, VEGF-R2 o

KDR (Park et al., 1994; Nishimura et al., 2002; Ferrara et al., 2003; Zimmermann et al., 2003; Carmeliet, 2005).

En rumiantes, la isoforma predominante de VEGF corresponde al VEGF<sub>164</sub>, cuya expresión y síntesis se lleva a cabo principalmente en las células de la granulosa de folículos dominantes (Berisha et al., 2000; Greenaway et al., 2004; Chowdhury et al., 2010). En este sentido, en los ovinos se demostró, mediante estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, que la expresión del VEGF en los folículos se incrementa conforme aumenta el diámetro folicular y esto a su vez depende de la etapa del ciclo estral; en particular, durante y después del pico preovulatorio de LH (Chowdhury et al., 2010). Adicionalmente, se ha documentado una asociación positiva con la expresión y síntesis del receptor tipo 2 del VEGF (Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010). De forma similar, en bovinos con estro sincronizado e hiperestimulados con FSH para posteriormente ser tratados con GnRH se observó que las células de la granulosa de folículos preovulatorios presentaron una mayor expresión del gene para VEGF durante el pico preovulatorio de la LH (Berisha et al., 2008).

El VEGF en el folículo ovárico se encarga de regular la proliferación, la supervivencia y permeabilidad del endotelio vascular (Park et al., 1993; Taylor et al., 2007; McFee y Cupp, 2013). En primates no humanos, la disminución en la proliferación de células endoteliales, en la densidad vascular y en la expresión del VEGF en las células de la granulosa de folículos preovulatorios se ha asociado con una inhibición del pico preovulatorio de la LH (Taylor et al., 2004). Adicionalmente, un incremento en la síntesis (ARNm) y secreción del VEGF de células de la granulosa de los folículos preovulatorios bovinos se observa durante el pico preovulatorio de la LH (Berisha et al., 2008). Finalmente, un efecto negativo en la angiogénesis intrafolicular, en el desarrollo folicular y en la ovulación de folículos preovulatorios de primates no humanos se asoció con la inhibición del grupo de receptores para VEGF en células de la granulosa (Wulff et al., 2002). Estas series de resultados en conjunto vinculan a la LH con el VEGF como participantes en la selección de folículos preovulatorios y en la ovulación.

La asociación de la LH como regulador de la expresión del VEGF, se ha descrito en estudios *in vitro* e *in vivo*. Estudios *in vitro*, han encontrado que la síntesis y expresión del VEGF por las células de la granulosa se incrementa después del tratamiento con hCG (Lee et al., 1997), LH humana (Guimera et al., 2009) y LH bovina (Babitha et al., 2013; Babitha et al., 2014); *in vivo*, el incremento de VEGF en el líquido folicular de folículos dominantes se presentó después de un bolo de hCG (Hazzard et al., 1999); a través de desarrollo del ciclo estral ovino, y mediante estudios inmunohistoquímicos e hibridación *in situ* en estructuras ováricas se ha observado un cambio en la inmunolocalización y un incremento en la expresión del VEGFR2 y del VEGF en concordancia con el tamaño folicular; adicionalmente este cambio fue mayor durante el pico preovulatorio y post-pico de LH comparado con la fase lútea y pre-pico de LH (Chowdhury et al., 2010). Por otro lado, primates no humanos que recibieron un antagonista a GnRH y en los que se analizó el patrón angiogénico dentro del ovario, mostraron que el bloqueo del pico preovulatorio de la LH, generó un impacto negativo en la proliferación de células endoteliales, densidad vascular y en la expresión del VEGF en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios (Taylor et al., 2004).

El mecanismo por el cual la LH induce la expresión y síntesis de VEGF es actualmente un tema de estudio: Garrido (1993) demuestra que en células de la granulosa bovina expuestas a LH se induce un incremento en la activación de la adenilato ciclasa asociado a la transcripción del VEGF. Recientemente, Zhang (2011) y Liao (2012) analizaron la respuesta de las células lúteas y la línea celular OVCAR-3 después del tratamiento con hCG con resultados que establecen la posibilidad que la vía de señalización de fosfatidil inositol (IP3K/mTOR) contribuya a la activación del VEGF.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A pesar de contar con un cuerpo de evidencias que muestran claramente que la LH está involucrada en la regulación del VEGF dentro de las células de la granulosa de folículos dominantes, se desconoce si las distintas isoformas de la LH estimulan en la misma magnitud la producción de dicho factor angiogénico. Esto a pesar de que está claramente documentado que la LH está integrada por una familia de proteínas cuya diferencia de cada miembro se ha atribuido a la estructura de sus oligosacáridos que se refleja en sus propiedades físico-químicas, biológicas e inmunológicas (Baenziger y Green, 1988; Cooke et al., 1996; Manzella et al., 1996; Perera-Marín et al., 2007). Por lo tanto, el presente estudio doctoral se encaminó a evaluar bajo condiciones *in vitro* el efecto de las isoformas de la LH ovina sobre la producción de VEGF en las células de la granulosa obtenidas de folículos dominantes ovinos. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de la actividad biológica de las isoformas a través de la producción de AMPc en un sistema heterólogo en las células HEK-293 transfectadas con el cDNA para el receptor de LH de rata.

## 4. HIPÓTESIS

Las distintas isoformas de carga de la oLH regulan en las células de la granulosa de folículos dominantes, la producción de VEGF de manera similar entre ellas y con respecto a la oLH de referencia.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si las distintas isoformas de carga de la LH ovina regulan diferencialmente la secreción del VEGF en las células de la granulosa de folículos dominantes de la especie ovina.

### Objetivos particulares:

- 1.- Obtener el extracto glicoprotéico de glándulas pituitarias de ovino. Su purificación en el intercambiador iónico, CM-Sepharosa, para la obtención de la fracción rica en la hormona luteinizante ovina (oLH).
- 2.- Purificar la fracción rica en LH ovina mediante el cromatoenfoco, con lo que se obtendrán las principales isoformas de carga de la hormona luteinizante ovina (oLH).
- 3.- Determinar la actividad inmunológica de cada isoforma aislada, mediante el RIA homólogo y específico para LH.
- 4.- Evaluar la actividad biológica *in vitro* de cada isoforma aislada, mediante la producción de AMPc en células HEK-293 transfectadas con el cDNA para el receptor de LH de rata.
- 5.- Desarrollar el cultivo primario de células de la granulosa de folículos dominantes ovinos y evaluar en el cultivo: 1) El efecto de cada isoforma de oLH sobre la producción de VEGF, bloqueando la síntesis de progesterona con

trilostano. 2) Evaluar la producción de VEGF en células de la granulosa luteinizadas y no luteinizadas.

6.- Evaluar mediante PCR en tiempo real los cambios en la expresión del gene de VEGF en células de la granulosa no luteinizadas expuestas a distintas dosis de las isoformas de la oLH.

## **6. PURIFICACIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE OVINA (oLH) Y OBTENCIÓN DE SUS ISOFORMAS.**

### **6.1 Introducción**

La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína que se sintetiza y secreta en los gonadotropos de la hipófisis anterior. Químicamente, la LH está formada por dos cadenas polipeptídicas,  $\alpha$  y  $\beta$  en unión no covalente (Combarous, 1988). Dentro de una misma especie, la cadena polipeptídica  $\alpha$  es común a todas las glicoproteínas presentes en la hipófisis; en contraste, la cadena polipeptídica  $\beta$  le confiere su alta especificidad biológica e inmunológica a cada glicoproteína (Creus et al., 2001).

Durante el proceso de síntesis, la LH sufre modificaciones post-traduccionales que le permiten incorporar residuos de oligosacáridos del tipo N-unidos con diferente proporción de sulfato y ácido siálico (Baenziger y Green, 1988). Esta variación específica se considera la principal base bioquímica de la diferenciación entre isoformas de carga de las gonadotropinas presentes en la hipófisis y en la circulación (Baenziger et al., 1992). Este polimorfismo estructural generado, en parte por el patrón de glicosilación, confiere cambios en las propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y biológicas de la hormona (Pierce y Parsons, 1981; Kojima et al., 1995).

En rumiantes, se han observado evidencias sobre el polimorfismo de la LH bajo distintas condiciones, tanto en extractos de hipófisis (Zalesky et al., 1992; Hejl et al., 1992; Perera-Marín et al., 2008) como en el suero (Perera-Marín et al., 2005; Arrieta et al., 2006; Rojas-Maya et al., 2007), con resultados que indican que el patrón de distribución y la secreción de las isoformas de esta hormona cambia con la condición fisiológica.

El empleo de diversas estrategias de purificación de proteínas como lo es el intercambio iónico (Perera-Marín et al., 1996; Perera-Marín et al., 2004), la cromatografía de interacción hidrofóbica (Jack et al., 1987; Hiyama et al., 1990) y el cromatofoco (Grotjan et al., 1991; Kojima et al., 1995; Perera-Marín et al., 2005; Perera-Marín et al., 2008) han permitido identificar el patrón de distribución de las isoformas de la LH en diferentes fluidos biológicos; así mismo, con estas metodologías se han logrado purificar grupos de isoformas de la LH de la hipófisis. El número de proteínas identificadas y aisladas, así como su rendimiento depende de la capacidad resolutive de cada procedimiento.

Aunque está disponible esta información y se cuenta con el procedimiento de obtención de isoformas de la LH de la hipófisis bovina mediante el intercambio catiónico (Perera-Marín et al., 2004), nuestro grupo de investigación describió recientemente el procedimiento de obtención de cinco isoformas de carga de la LH bovina mediante el cromatofoco (Ortega-León et al., 2016), lo que abre la posibilidad de utilizar esta última estrategia de purificación de proteínas para obtener por primera vez isoformas (básicas, neutra y ácidas) de la LH ovina con grandes rendimientos, alta pureza y un punto isoeléctrico definido, en contraste a lo que se ha reportado previamente (Nakamura et al., 1993), en donde utilizan rangos de pH muy reducidos y se limitó a isoformas básicas de la oLH. Por lo tanto, el primer objetivo de este trabajo doctoral se encaminó a obtener cantidades suficientes de isoforma de la LH de la hipófisis ovina para realizar su caracterización fisicoquímica e inmunológica, parámetros que nos permitan continuar con su caracterización biológica y facilitar el estudio de su participación en diferentes procesos de la fisiología reproductiva.

## **6.2 Materiales y métodos**

### *6.2.1 Colección de las hipófisis*

Se colectaron las hipófisis de 200 ovinos sanos adultos, sin distinción de sexo o condición fisiológica, en el rastro municipal de Capulhuac, Estado de México. Previo al sacrificio, cada animal se aturdió con una pistola de perno cautivo y se le retiró la cabeza. La hipófisis se recuperó y se depositó en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7.2) para su transporte. Las hipófisis se limpiaron del tejido

que las rodeaba y los lóbulos anteriores o adenohipófisis se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Todos los pasos de extracción y purificación se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### *6.2.2 Obtención del extracto glicoprotéico de las adenohipófisis*

El extracto glicoprotéico (EGP) se extrajo de las adenohipófisis ovinas de acuerdo al método descrito para el EGP bovino (Perera-Marín et al., 2004). En breve, 200 adenohipófisis con un peso húmedo aproximado de 105 g se homogeneizaron en una solución de acetato de amonio al 10%, pH 7.0, que contenía 10.0 mM de fenilsulfonilmetilfluoruro (PMSF) con una relación de 10 ml de solución por gramo de tejido húmedo.

Una vez obtenido el homogeneizado se agitó mecánicamente y 24 h después se centrifugó a 12,000 xg por 45 min; el precipitado obtenido de la centrifugación (R0) se descartó y el sobrenadante recibió un volumen de etanol que correspondió al 40% del volumen total. La suspensión con el etanol permaneció en agitación durante 24 h y después se centrifugó. Las proteínas precipitadas después de la centrifugación se descartaron (R1) y el sobrenadante recibió un volumen de etanol puro que correspondió al 85% del volumen total. Esta suspensión permaneció en reposo durante 48h y al término, el sobrenadante se eliminó y las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación. A este grupo de proteínas se les denominó extracto glicoprotéico (EGP). El EGP se resuspendió en agua desionizada, se dializó (membrana de diálisis; spectra/por # 4, con límite de exclusión de 12 a 14 kDa) durante 24 h con cambios de agua desionizada cada 8 horas y al terminó se liofilizó para su procesamiento posterior.

### *6.2.3 Purificación del extracto glicoprotéico*

Del total del extracto glicoprotéico (EGP) recuperado, únicamente se purificaron 285.3 mg de proteína en el intercambiador catiónico CM-Sepharosa en condiciones similares a las descritas para el EGP de bovino (Perera-Marín et al., 2004). Para ello, el EGP se resuspendió en 50 ml de acetato de amonio 5.0 mM, pH 5.1, solución que se conservó en agitación durante 16 h y el material insoluble después se descartó por centrifugación (12,000 x g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ). El

sobrenadante por su alto contenido de proteína se dividió en dos lotes para su purificación. El lote A comprendió un volumen de 20 ml que contenía una concentración de 169.4 mg y en el lote B con un volumen de 30 ml y un contenido de 115.9 mg.

Cada lote se purificó de forma independiente en una columna (27 cm x 1.5 cm) empacada con el intercambiador CM-Sepharosa (Pharmacia Biotech, Piscataway, NY) equilibrada previamente con 20 volúmenes de acetato de amonio 5.0 mM, pH 5.1. La fracción de proteína en cada columna se eluyó con un gradiente escalonado de acetato de amonio a diferente pH, a saber; 0.005 M, pH 5.1; 0.1 M, pH 6.8 y 1.0 M + 0.1 M de glicina, pH 9.5.

En cada corrida cromatográfica se colectaron fracciones de dos ml con un flujo de 23 ml/h y el patrón de elución del extracto glicoprotéico se monitoreó por espectrometría a 280 nm. El cambio de amortiguador ocurrió cuando la densidad óptica del efluente fue cercana a cero. Cada pico de proteína que se recuperó, se identificó en función del pH de elución, a saber; CM-1ab para el pico de proteína colectado a pH 5.1; CM-2ab, colectado a pH 6.8; CM-3ab pico de proteína recuperada a pH 9.5 y las proteínas que no eluyeron con el gradiente de acetato de amonio y que se recuperaron con 1.0 M de NaCl, se le denominó fracción S. Cada pico de proteína se dializó y liofilizó como se describió para el extracto glicoprotéico.

Previo a la obtención de las isoformas de carga de la LH se realizó el análisis electroforético en SDS-PAGE de cada pico de proteína recuperado durante la cromatografía en CM-Sepharosa, y adicionalmente a cada una de estas proteínas se determinó la cantidad de LH inmunoreactiva con un RIA específico para LH ovina. Al final, la fracción CM-3ab de los lotes A y B se mezclaron y se calculó la LH en la mezcla.

#### *6.2.4 Obtención de las isoformas de carga de la LH*

La obtención de las isoformas de carga de la LH se realizó por medio del cromatoenfoco (Perera-Marín et al., 2008) a partir de la fracción CM-3ab que se recuperó a pH 9.5 durante la purificación del EGP en CM-Sepharosa. La fracción

CM-3ab, presentó un patrón electroforético en SDS-PAGE similar al estándar NIDDK-oLH-I-2 y mostró el mayor contenido de LH inmunoreactiva.

El contenido total de la fracción CM-3ab (22.9 mg de proteína) se resuspendió en 3 ml del amortiguador Pharmalyte (Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden) diluido 1:45 con agua desionizada y ajustado a pH 7.0. La proteína en solución se cargó en una columna (27cm x 0.7 i.d) pre-empacada con el intercambiador iónico PBE-118 (Polybuffer exchanger for chromatofocusing, capacity: 50.4  $\mu\text{mol. pH unit}^{-1}\text{ml}^{-1}$ , Pharmacia, Biotech, Piscataway, NY), que fue equilibrada previamente con 20 volúmenes (1 volumen=10.4 ml) de 25.0 mM de trietilamina a pH 11.0 y conservada a 4°C. Previo a la aplicación de la proteína, la columna recibió tres ml de amortiguador Pharmalyte, pH 7.0 para evitar la exposición de la muestra a un pH extremo.

La proteína se eluyó con el amortiguador Pharmalyte con un flujo de siete ml/h y se colectaron fracciones de dos ml. En cada fracción colectada se midió el pH y se determinó la densidad óptica a 280 nm. Una vez detectado el pH 7.0 en más de diez fracciones consecutivas se realizó el cambio de amortiguador a Polybuffer 74 (Pharmacia, Biotech AB, Uppsala, Sweden) diluido 1:8 con agua desionizada y ajustado a pH 3.5, con el fin de obtener las proteínas que eluyen de pH 7.0 a 3.5. Cuando se detectó el pH 3.5 en más de diez fracciones consecutivas se aplicó una solución 1.0 M de NaCl y se colectaron 20 fracciones más.

Con el registro de pH y la densidad óptica, cada fracción se neutralizó de acuerdo al pH de elución. Las fracciones colectadas entre el pH 11.0 a 7.0 se neutralizaron con 200  $\mu\text{l}$  de una solución Tris-HCl, 1.1 M, pH 7.4. Las fracciones colectadas entre el pH de 6.99 a pH 3.5 y aquellas proteínas que no eluyeron con el gradiente de pH se neutralizaron con 200  $\mu\text{l}$  de Imidazol 1.1 M pH 7.0. Una vez neutralizadas, el total de las fracciones se agruparon en el rango de pH en donde se observó un pico de proteína: Isoformas Básicas, A (rango de pH 10.56 a 10.14), B (pH, 9.91 a 9.02), C (pH, 8.97 a 7.83), Neutra, D (pH, 7.73 a 6.98) y las isoformas Ácidas; E (pH, 6.83 a 6.19), F (pH, 5.98 a 3.65) y G (pH 3.66 a 3.55). Los distintos picos de proteínas se dializaron y se liofilizaron hasta su análisis. En el diagrama 1 se resumen los pasos de extracción, purificación y caracterización

de la LH y sus isoformas.

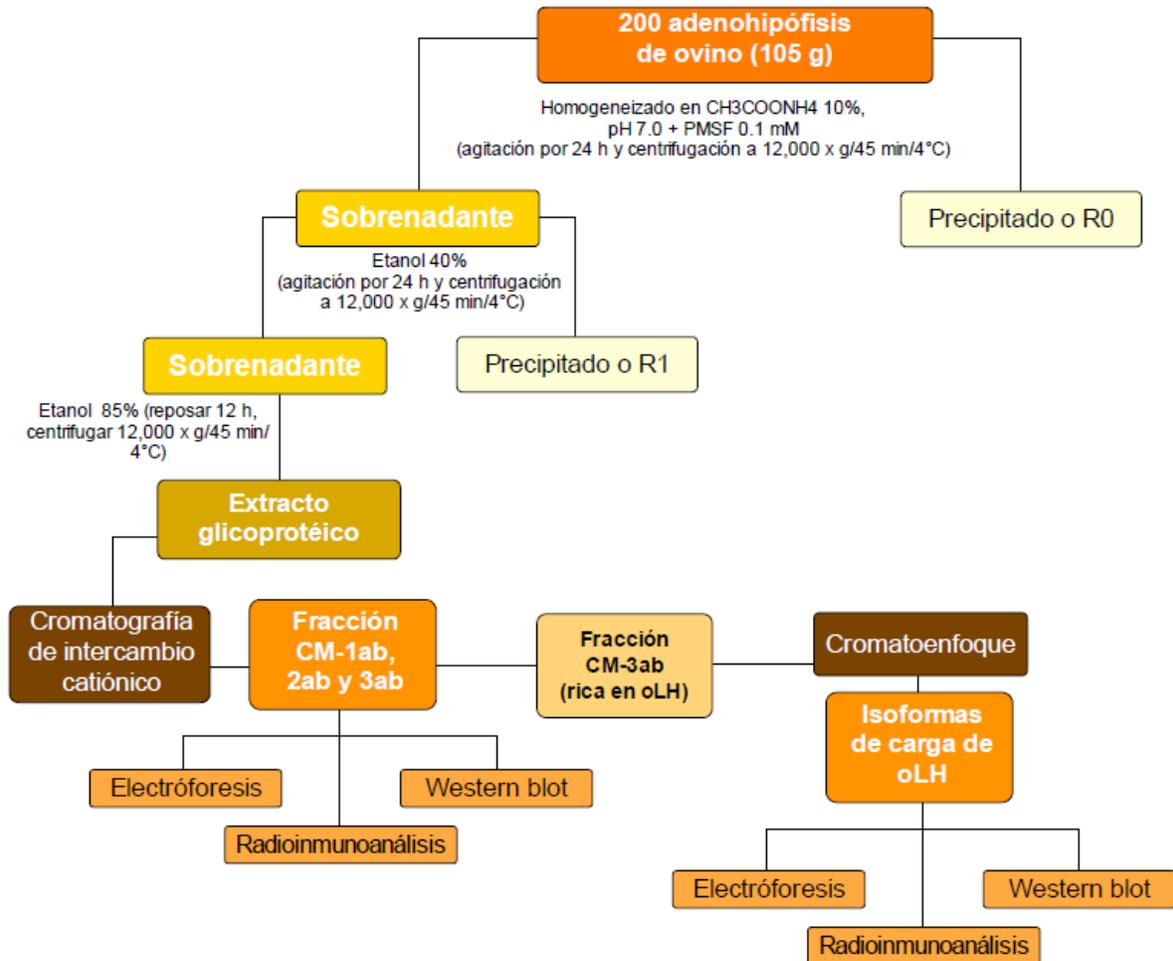


Diagrama 6.1. Pasos de la extracción, purificación y caracterización de la LH y sus isoformas de adenohipófisis ovina.

### 6.2.5 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína en cada paso de extracción y purificación de la LH y sus isoformas se determinó con el método de Bradford (Bollag y Edelstein, 1991), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón de referencia (Albumine concentrate 20% w/v, Immunochemical Products Ltd). Para ello, un miligramo de polvo de cada fracción se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua desionizada; de esta solución se analizaron fracciones desde 1 a 10  $\mu$ l.

### *6.2.6 Determinación del peso molecular*

El peso molecular de cada fracción de proteína obtenida durante la extracción y purificación de la LH y sus isoformas se determinó mediante una electroforesis en placa con geles de poliacrilamida al 12.5%, pH 8.6 en presencia de dodecil sulfato de sodio (Laemmli, 1970). Durante cada corrida electroforética se aplicaron 70 Volts en el gel concentrador y 140 Volts en el gel resolvidor. Cada muestra se analizó a una concentración de 1 µg de proteína en ausencia (condiciones no reductoras) o presencia de 2β-mercaptoetanol (condiciones reductoras); Al término de cada corrida electroforética cada gel se tiñó con plata siguiendo las especificaciones del estuche comercial (Silver Stain Kit, Bio-Rad, Laboratories, Inc). En cada corrida electroforética se utilizaron como referencia marcadores de bajo peso molecular preteñidos (Bio-Rad Laboratories, Inc).

### *6.2.7 Identificación de proteínas inmunoreactivas a LH*

El peso molecular de las proteínas inmunoreactivas como LH se determinó por medio de la inmunotransferencia (Towbin et al., 1979). Para ello, el extracto glicoprotéico y aquellas proteínas obtenidas durante la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa), así como las fracciones de proteína colectadas durante la purificación de la CM-3ab en el cromatofoco, se analizaron a una concentración de 100 ng de proteína en una electroforesis en SDS-PAGE. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm trans, blot, Bio-Rad) utilizando una cámara Trans-Blot® Semi-Dry (Bio-Rad, USA) aplicando 200 mA durante 75 minutos. Al término, la membrana se bloqueó con una solución de TBS-T (0.02M Tris, 0.15M NaCl, Tween 20, 0.05%, pH 7.5) que contenía 3% de BSA, durante 60 minutos y después se lavó e incubó durante 16h a 4°C con el anticuerpo primario generado en conejo (anti-oLH-26, 1:1000, previamente validado). Concluido este tiempo, la membrana se lavó con TBS-T y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo generado en cabra y conjugado a peroxidasa, Jackson Immuno Research) diluido 1:20,000 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana

se lavó y el complejo inmunoreactivo fue detectado por quimioluminiscencia (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Este mismo procedimiento de inmunoanálisis se realizó de forma particular en tres isoformas de la oLH seleccionadas por su punto isoeléctrico (pI); a saber: isoforma básica B, pH 9.91 a 9.02; isoforma neutra D, pH 7.73 a 6.98 e isoforma ácida F, pH 5.98 a 3.65. En este estudio, cada isoforma se analizó a una concentración de 200 ng de LH inmunoreactiva. Una vez realizada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm) por medio de un trans blot semi cell (Bio-Rad) durante 75 minutos a 200 mA. Transferidas las proteínas, la membrana de nitrocelulosa se secó durante 5 minutos, posteriormente se equilibró con TBS por 5 minutos, una vez terminado este proceso, la membrana se colocó en la caja de doble compartimento (Blot Holders - Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante, para ello, la caja se humedeció con TBS (Tris, 0.02M, NaCl 0.5M) y se colocó la membrana de nitrocelulosa que contenía las proteínas transferidas, posteriormente la membrana fue lavada con TTBS (TBS + Tween 0.1%) y bloqueada con BSA al 1%. Al término, se incubó con el anticuerpo primario (anti-oLH-26, 1:500) durante 10 minutos, enseguida se realizaron tres lavados con TTBS y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (*SNAP i.d. System*, Millipore) con el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo generado en cabra diluido 1:1000 y conjugado a fosfatasa alcalina, Jackson Immuno Research). Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas con el estuche comercial (AP conjugate substrate Kit, Bio-Rad) utilizando para ello 150 µl del agente de color A (azul de tetrazolio en dimetilformamida), 150 µl del agente de color B (5-bromo-4- cloro-3-indolilfosfato en dimetilformamida), disueltos en 15 ml de amortiguador TRIS (0.1 M).

#### 6.2.8 Cuantificación de la LH inmunoreactiva

La concentración de LH inmunoreactiva se realizó con un radioinmunoensayo (RIA) homólogo en fase líquida previamente validado (Perera-Marín et al., 2005). Las fracciones analizadas correspondieron a las proteínas obtenidas durante la

extracción, purificación de la LH y sus isoformas. El trazador del ensayo se obtuvo incorporando el Na<sup>125</sup>I al estándar NIDDK-oLH-I-2 con el método del IODO-GEN (Perera-Marín et al., 2004) y el mismo estándar se utilizó como patrón de referencia a las dosis de 0.1, 2.5, 5.0, 10 y 20 ng/tubo en cuatro réplicas. El anticuerpo primario (anti-oLH-26) generado en conejo se utilizó a una dilución de trabajo 1:40,000 en presencia de suero normal de conejo a una dilución de 1:1600. El complejo antígeno-anticuerpo formado después de 48 h de incubación se acopló a un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo generado en burro) diluido 1:80 incubado por 24h. Finalmente, mediante centrifugación (1500 xg por 15 minutos a 4°C) el complejo antígeno-anticuerpo se separó de la fracción no unida, previa adición de 1 ml de amortiguador PBS 0.05M, pH 7.2 que contenía BSA al 0.1%. La fracción inmunoprecipitada se analizó en un contador de radiaciones gamma. La concentración de LH inmunoreactiva se calculó en función de la dosis obtenida al 50% (IC<sub>50</sub>) en la curva dosis-respuesta del %B/B<sub>0</sub> vs logaritmo de la dosis. Con ello, se realizó la comparación entre los parámetros IC<sub>50</sub> y la pendiente de Hill (DeLean et al., 1978).

La concentración cuantitativa de LH inmunoreactiva se determinó a partir del cálculo del parámetro IC<sub>50</sub>, definido como la concentración de proteína (ng de proteína/tubo) que causó el 50% de inhibición en la respuesta del %B/B<sub>0</sub>. Para lo anterior se utilizó el programa estadístico Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., USA) que incluyó las ecuaciones de Hill. Ambos parámetros, IC<sub>50</sub> y la pendiente de Hill se compararon con la prueba de F de la suma de cuadrados, probando como hipótesis nula que estos parámetros son idénticos entre cada par de hormonas evaluadas; sí se obtiene un valor de p>0.05, se concluye que el parámetro es el mismo para los dos ajustes (Borromeo et al., 2004). Adicionalmente, se utilizó ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias significativas (p<0.05) entre isoformas ensayadas (DeLean et al., 1978).

### 6.3 Resultados

Durante el proceso de extracción del tejido adenohipofisario se generó el extracto glicoprotéico con un rendimiento de 460 mg de proteína y un contenido de  $64.0 \pm 14.9$   $\mu\text{g}$  de LH por mg de proteína.

De la cantidad de extracto glicoprotéico analizado en el intercambio catiónico (285.32 mg de proteína) y como se indicó en la sección de materiales y métodos, esta cantidad de proteína se dividió en dos lotes (A y B) para una mejor separación. El lote A se distribuyó en tres picos de proteína (Fig. 1), siendo la fracción que eluyó a pH 9.5 (CM-3ab) donde se concentró el contenido de LH con un incremento de 8.4 veces más cantidad de LH con respecto al extracto glicoprotéico (Cuadro 1). De forma similar, el lote B (Fig. 2) mostró un patrón de distribución con un incremento en la cantidad de LH inmunoreactiva en la fracción CM-3ab de 5.4 veces más al compararlo con el extracto glicoprotéico (Cuadro 1).

El patrón de respuesta de las fracciones recuperadas durante el proceso de purificación del EGP en CM-Sepharosa de ambos lotes, en el inmunoensayo específico para LH se presenta en las figuras 3 y 4, respectivamente. La fracción CM-3ab de ambos lotes mostró una curva de desplazamiento inversamente proporcional a la dosis de proteína, paralela al estándar que al cálculo de la actividad inmunológica a partir del parámetro  $IC_{50}$  resultó cercana al estándar de referencia (Cuadro 2). Siendo este resultado diferente al de las otras fracciones.

La fracción CM-3ab en el cromatoenfoco se distribuyó a lo largo del gradiente de pH en siete picos de proteínas, cada pico correspondió a una isoforma (Fig. 5). Del total de la proteína analizada se recuperó sólo el 38.94% (8.92 mg); siendo el 16.02 % (3.67 mg) de la cantidad total de proteína que eluyó entre el pH 10.56 a pH 7.83 (isoformas básicas), mientras que 1.44% (0.33 mg) de la proteína total eluyó entre pH 7.73 a 6.98 (isoforma neutra) y el 21.17% (4.85 mg) del total de proteína eluyó entre pH 6.83 y pH 3.5 (isoformas ácidas). La fracción de proteína que eluyó con NaCl (S) correspondió al 0.31% (0.07 mg). Del total de LH inmunoreactiva recuperada (4.99 mg), el 73.55% se obtuvo a pH básico, mientras que a pH neutro el 6.61% y a pH ácido el 19.84%. El rango de

pH, la cantidad de LH inmunoreactiva y el porcentaje de recuperación de cada isoforma se resumen en el Cuadro 3.

El patrón electroforético en SDS-PAGE en ausencia y presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol del patrón de referencia (NIDDK-oLH-I-2), del EGP y de cada fracción recuperada durante la purificación del EGP en CM-Sepharosa se presenta en la Fig. 6. El patrón electroforético en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (No Reductoras) se caracterizó en el patrón de referencia, el EGP y el CM-3ab (Panel I) por la presencia de dos proteínas con un peso molecular de 36.5 y 23.4 kDa, mientras que el patrón para las fracciones CM-1ab, CM-1cd y CM-2ab se caracterizó por una proteína de 55 kDa y una amplia variedad de proteínas de mayor peso molecular. El análisis del patrón electroforético en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Reductoras) se caracterizó por la presencia de dos proteínas con un peso molecular de 23.4 kDa y 20.8 kDa, proteínas ausentes en las fracciones CM-1ab, CM-1cd y CM-2ab (Panel II). El análisis por inmunotransferencia en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (No Reductoras) confirmó que las proteínas de 36.5 kDa y 23.4 kDa identificadas previamente en el patrón de referencia, en el EGP y la fracción CM-3ab correspondieron a proteínas inmunoreactivas a LH que correspondieron a la forma nativa y a la subunidad beta de la LH (Fig. 7).

El patrón electroforético en SDS-PAGE en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Reductoras) para el estándar NIDDK-oLH-I-2 y las isoformas purificadas (Fig. 8) denotó en cada fracción una proteína de peso molecular de 36.5 kDa (poco intensa), Sin embargo, en esta condición se incrementó la presencia de dos proteínas con un peso molecular de 23.4 kDa y 20.8 kDa, respectivamente. En el caso de las isoformas C, D y E, además de estas proteínas, se observó la existencia de una proteína con un peso aproximado de 15 kDa. Las isoformas F y G en las mismas condiciones muestran un patrón de proteínas más heterogéneo y las proteínas de 23.4 y 20.8 kDa muy poco definidas.

El análisis electroforético del estándar de referencia y de cada isoforma en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Reductoras) por medio de la inmunotransferencia (Fig. 9), confirmó que las proteínas peso molecular aproximado de 23.4 y 20.8 kDa correspondieron a elementos del heterodímero de la LH tanto en el estándar de

referencia y las isoformas A, B, C, D y E, sin embargo; bajo estas condiciones el patrón de proteínas inmunoreactivas a LH para las isoformas F y G no se observó. Un re-análisis del inmunoblot en ausencia (No Reductoras) o en presencia (Reductoras) de  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración de 200 ng de LH inmunoreactiva para el estándar y las isoformas B, D y F, isoformas que por su punto isoeléctrico representaron el gradiente de pH del cromatoenfoque, mostraron un similar patrón de proteínas inmunoreactivas de peso molecular aproximado de 36.5, 23.4 y 20.8 kDa, respectivamente (Fig. 10).

La respuesta de cada isoforma y el patrón de referencia en el ensayo inmunológico de LH fue dependiente de la dosis, como se aprecia en la Fig. 11, 12 y 13 para las isoformas básicas, neutra y ácidas, respectivamente. Así mismo, no se observó ningún cambio significativo en el valor de cada pendiente de las curvas entre proteínas (Cuadro 4). La dosis calculada al 50% ( $IC_{50}$ ) de la curva de inhibición entre el %B/B0 vs. la dosis de proteína ensayada entre isoformas, denotó diferencias, siendo las isoformas básicas (B y C) las proteínas inmunológicamente más activas, mientras que el patrón de referencia (NIDDK-oLH-I-2), la isoforma neutra (D) y la medianamente ácida (E) no presentaron diferencia a la dosis  $IC_{50}$  (Cuadro 4). De forma particular se observó que se requirió 7.5 veces más proteína de la isoforma F (pH, 5.98-3.65) para alcanzar el  $IC_{50}$ , y este parámetro en la isoforma G (pH, 3.55-3.66) no se pudo determinar.

#### **6.4 Discusión**

En este estudio se demostró que las proteínas aisladas del lóbulo anterior de la hipófisis mediante el cromatoenfoque contenían características fisicoquímicas e inmunológicas a LH con un comportamiento de respuesta inmunológica diferencial entre proteínas. Este grupo de isoformas mostraron un mismo patrón de pesos moleculares que el de referencia (NIDDK-oLH-I-2). Así mismo, este grupo de isoformas representaron diferentes proporciones de la LH total (fracción CM-3ab), donde predominaron las isoformas básicas.

Durante la purificación del EGP en CM-Sepharosa se obtuvo una fracción que eluyó a pH 9.5 (CM-3ab) y que concentró a la LH. Esta fracción de proteína

mostró características fisicoquímica e inmunológicas similares a la LH de referencia. Estas observaciones son consistentes con lo reportado para extractos hipofisarios obtenidos de rumiantes (Carranza et al., 1994; Perera-Marín et al., 1996; Perera-Marín et al., 2004). Por otra parte, el análisis de la heterogeneidad de la fracción CM-3ab por medio del cromatoenfoco resultó similar al patrón observado en la fracción rica en LH, obtenida de extractos hipofisarios de la especie bovina (Ortega-León et al., 2016), así como al patrón de elución que se observó durante el análisis de extractos hipofisarios ovinos (Zalesky et al., 1992) y bovinos (Perera-Marín et al., 2008). El patrón de distribución de la LH en este estudio y otros confirmó una predominancia de proteínas inmunoreactivas a LH que eluyeron en el rango de pH básico.

Cada isoforma aislada presentó un patrón de peso molecular similar al estándar (NIDDK-oLH-I-2); en condiciones no reductoras predominó una proteína de 36.5 kDa y que correspondió al heterodímero de la LH (Perera-Marín et al., 2004). La presencia de las proteínas con peso molecular de 23.4 y 20.8 kDa en condiciones reductoras confirmó que la LH es una glicoproteína heterodimérica formada por subunidades ( $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente). Estos resultados en conjunto se asemejan a lo reportado para la forma nativa de la LH y para cada subunidad de esta proteína en esta y otras especies (Sairam y Schiller, 1979; Carranza et al., 1994; Perera-Marín et al., 1996; Chaudhary y Muralidhar, 2007; Borromeo et al., 2014). El análisis de cada isoforma mediante la inmunotransferencia confirmó que la proteína con un peso molecular relativo de 36.5 kDa, así como las proteínas con un peso molecular de 20.8 y 23.4 kDa correspondieron a la estructura de la LH.

El análisis electroforético de las isoformas ácidas (F y G) en condiciones reductoras denotó la presencia de una proteína con alto peso molecular  $\approx 75$  kDa inmunoreactiva a la LH. La posibilidad de que se trate de una proteína contaminante se puede descartar ya que el anticuerpo utilizado para el análisis de la LH inmunoreactiva fue previamente caracterizado para LH ovina (Arrieta et al., 2006) y bovina (Perera-Marín et al., 2008), en donde se demostró su alta especificidad para discriminar proteínas estructuralmente relacionadas con la LH. Por lo tanto, se puede afirmar entonces que esta proteína es un agregado

molecular de la hormona ya que con el tratamiento de  $\beta$ -mercaptoetanol no se disgregó.

El patrón electroforético de las isoformas C, D y E bajo condiciones reductoras mostró la presencia de una proteína con peso molecular aproximado de 15 kDa, proteína no inmunoreactiva a LH a través del análisis por medio de la inmunotransferencia, lo que sugiere que se trata de una proteína contaminante y que se concentró en el rango de elución a pH de 8.97 a 6.19, rango de pH donde eluyen diferentes fracciones de FSH (Perera-Marin et al., 2008). Sin embargo, existe la posibilidad de que se trate de una forma inmadura de alguna de las subunidades que conforman a la LH. A este respecto, estudios de LH ovina deglicosilada muestran una proteína en condiciones reductoras con un peso molecular similar (Manjunath et al., 1982). Finalmente, no se descarta la posibilidad de un rompimiento proteolítico de alguna de las subunidades (Stanton et al., 1993). Es interesante mencionar que en estudios previos de este laboratorio en la especie bovina se presentó un patrón similar de proteínas (Ortega-León et al., 2016).

## **6.5 Conclusión**

El sistema de extracción del tejido adenohipofisario ovino permitió obtener un extracto glicoprotéico con alto contenido en LH. La purificación de este extracto glicoprotéico en el intercambiador catiónico CM-Sepharosa generó una fracción que concentró la LH y mediante una repurificación con el cromatoenfoco permitió aislar siete isoformas de la oLH, proteínas que presentaron un patrón de pesos moleculares similares al patrón de referencia y cuya actividad inmunológica (RIA) fue distinta.

## 6.6 Referencias

ARRIETA, E., PORRAS, A., GONZALEZ-PADILLA, E., MURCIA, C., ROJAS, S. & PERERA-MARIN, G. 2006. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinising hormone during the luteal phase. *Reprod Fertil Dev*, 18, 485-95.

BAENZIGER, J. U. & GREEN, E. D. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*, 947, 287-306.

BAENZIGER, J. U., KUMAR, S., BRODBECK, R. M., SMITH, P. L. & BERANEK, M. C. 1992. Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 334-8.

BOLLAG, D. M. & EDELSTEIN, S. J. 1991. *Protein Methods*, New York, USA, Wiley-Liss, Inc.

BORRAMEO, V., AMSTERDAM, A., BERRINI, A., GAGGIOLI, D., DANTES, A. & SECCHI, C. 2004. Characterization of biologically active bovine pituitary FSH purified by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Gen Comp Endocrinol*, 139, 179-89.

BORRAMEO, V., BERRINI, A., DE GRANDI, F., CREMONESI, F., FIANDANESE, N., POCAR, P. & SECCHI, C. 2014. A novel monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay to determine luteinizing hormone in bovine plasma. *Domest Anim Endocrinol*, 48, 145-57.

CARRANZA, S. M. E., AMEZCUA, M. E. V., NERI, R. B. & SALAS, V. A. 1994. Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Técnica Pecuaria México*, 32, 5-17.

COMBARNOUS, Y. 1988. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Dev*, 28, 211-28.

CREUS, S., CHAIA, Z., PELLIZZARI, E. H., CIGORRAGA, S. B., ULLOA-AGUIRRE, A. & CAMPO, S. 2001. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of *in vitro* bioactivity. *Mol Cell Endocrinol*, 174, 41-9.

CHAUDHARY, R. & MURALIDHAR, K. 2007. Caprine (*Capra hircus*) luteinizing hormone: purification and chromatographic investigation of its different isoforms. *Prep Biochem Biotechnol*, 37, 277-300.

DELEAN, A., MUNSON, P. J. & RODBARD, D. 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol*, 235, E97-102.

GROTJAN, H. E., SCHANBACHER, B. D. & KEEL, B. A. 1991. Ovine luteinizing hormone. V. Significance of flow-through peaks observed during chromatofocusing as revealed by various methods of sample preparation and application. *J Chromatogr*, 549, 141-52.

HEJL, K. M., WOLFE, M. W., KINDER, J. E. & GROTJAN, H. E. 1992. Bioactive and immunoreactive concentrations of circulating luteinizing hormone during sexual maturation in the bovine. *Biol Reprod*, 46, 1205-10.

HIYAMA, J., SURUS, A. & RENWICK, A. G. 1990. Purification of human pituitary LH and thyrotrophin by hydrophobic chromatography. *J Endocrinol*, 125, 493-500.

JACK, G. W., BLAZEK, R., JAMES, K., BOYD, J. E. & MICKLEM, L. R. 1987. The automated production by immunoaffinity chromatography of the human pituitary glycoprotein hormones thyrotropin, follitropin and lutropin. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 39, 45-58.

KOJIMA, F. N., CUPP, A. S., STUMPF, T. T., ZALESKY, D. D., ROBERSON, M. S., WERTH, L. A., WOLFE, M. W., KITOK, R. J., GROTJAN, H. E. & KINDER, J. E. 1995. Effects of 17 beta-estradiol on distribution of pituitary isoforms of

luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod*, 52, 297-304.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

MANJUNATH, P., SAIRAM, M. R. & SCHILLER, P. W. 1982. Chemical deglycosylation of ovine pituitary lutropin. A study of the reaction conditions and effects on biochemical, biophysical and biological properties of the hormone. *Biochem J*, 207, 11-9.

ORTEGA-LEÓN, A., OLIVARES, A., MURCIA, C., DIAZ, D., GONZÁLEZ-PADILLA, E., GUTIERREZ-OSPINA, G., MONTERO, A. & PERERA-MARÍN, G. 2016. Actividad biológica e inmunológica de las isoformas de carga de la hormona luteinizante bovina. *Rev Mex Cienc Pecu* 7, 29-51.

PERERA-MARÍN, G., ORTIZ, R. F., GAMBOA, V. J. J., REYNOSO, M. W., FALCÓN, A. A. & SALAS, V. A. 1996. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipófisis caprina (gLH). *Veterinaria México*, 27, 1-10.

PERERA-MARÍN, G., FALCÓN, A. A., MURCIA, C., HERNÁNDEZ-CERÓN, J. & GONZÁLEZ-PADILLA, E. 2004. Purificación de cinco isoformas de hormona luteinizante bovina (bLH). Caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica. *Veterinaria México*, 35, 129-45.

PERERA-MARIN, G., MURCIA, C., ROJAS, S., HERNANDEZ-CERON, J. & GONZALEZ-PADILLA, E. 2005. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Anim Reprod Sci*, 86, 53-69.

PERERA-MARIN, G., GUTIERREZ, C. G., MURCIA, C., LEON, H. & GONZALEZ-PADILLA, E. 2008. Progesterone and the distribution of pituitary gonadotropin isoforms in cattle. *Anim Reprod Sci*, 104, 164-76.

PIERCE, J. G. & PARSONS, T. F. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 50, 465-95.

ROJAS-MAYA, S., GONZALEZ-PADILLA, E., MURCIA-MEJIA, C., OLIVARES-SEGURA, A., HERNANDEZ-CERON, J. & PERERA-MARIN, G. 2007. Caprine luteinizing hormone isoforms during the follicular phase and anestrus. *Anim Reprod Sci*, 100, 280-90.

SAIRAM, M. R. & SCHILLER, P. W. 1979. Receptor binding, biological, and immunological properties of chemically deglycosylated pituitary lutropin. *Arch Biochem Biophys*, 197, 294-301.

STANTON, P. G., POZVEK, G., BURGON, P. G., ROBERTSON, D. M. & HEARN, M. T. 1993. Isolation and characterization of human LH isoforms. *J Endocrinol*, 138, 529-43.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.

ZALESKY, D. D., NETT, T. M. & GROTTJAN, H. E. 1992. Ovine luteinizing hormone: isoforms in the pituitary during the follicular and luteal phases of the estrous cycle and during anestrus. *J Anim Sci*, 70, 3851-6.

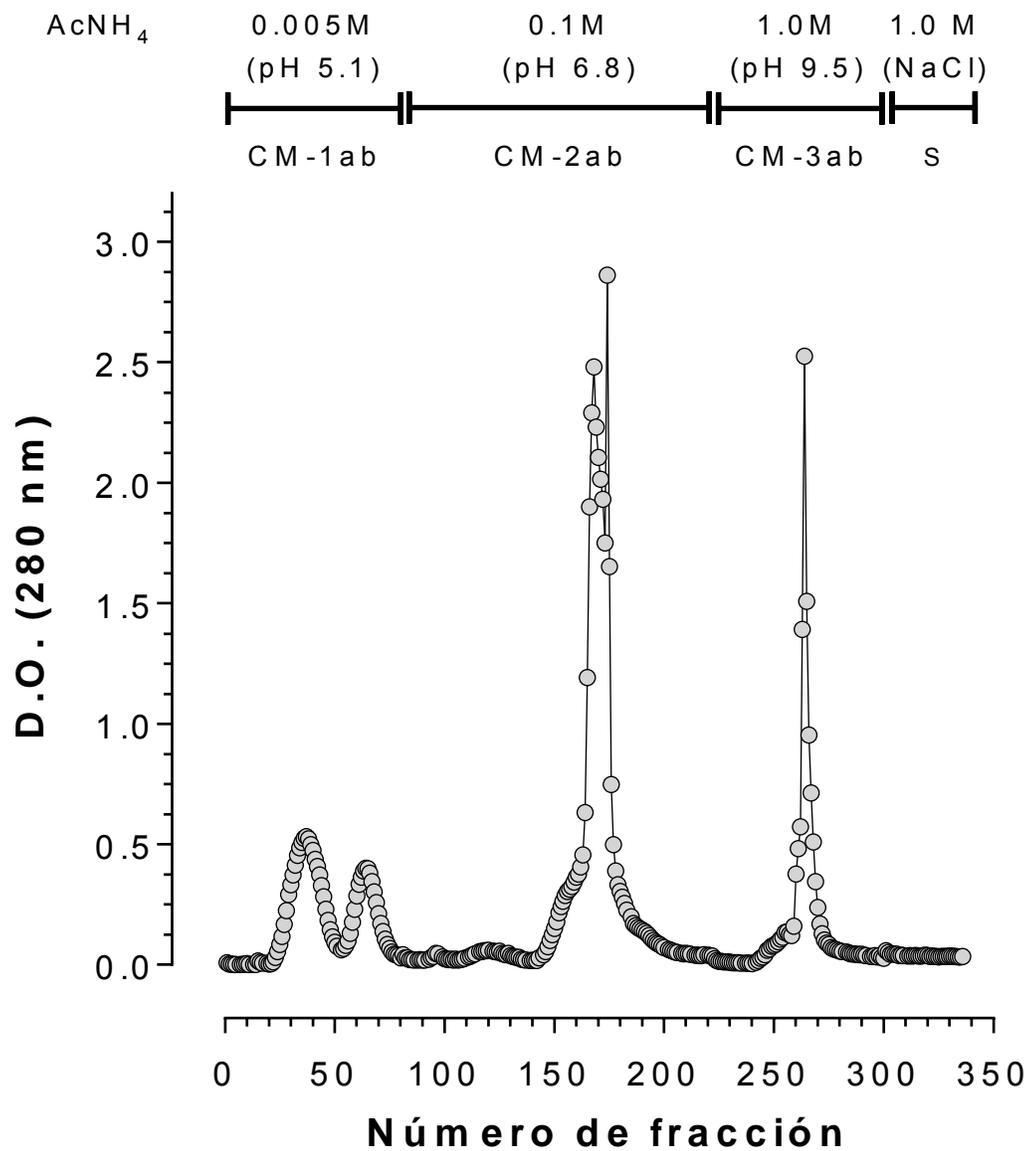


Fig. 6.1. Patrón de elución del extracto glicoprotéico (EGP) del lote A en la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). La columna se eluyó con un gradiente de acetato de amonio (AcNH<sub>4</sub>) a diferente pH. Cada pico de proteína se monitoreó a 280 nm.

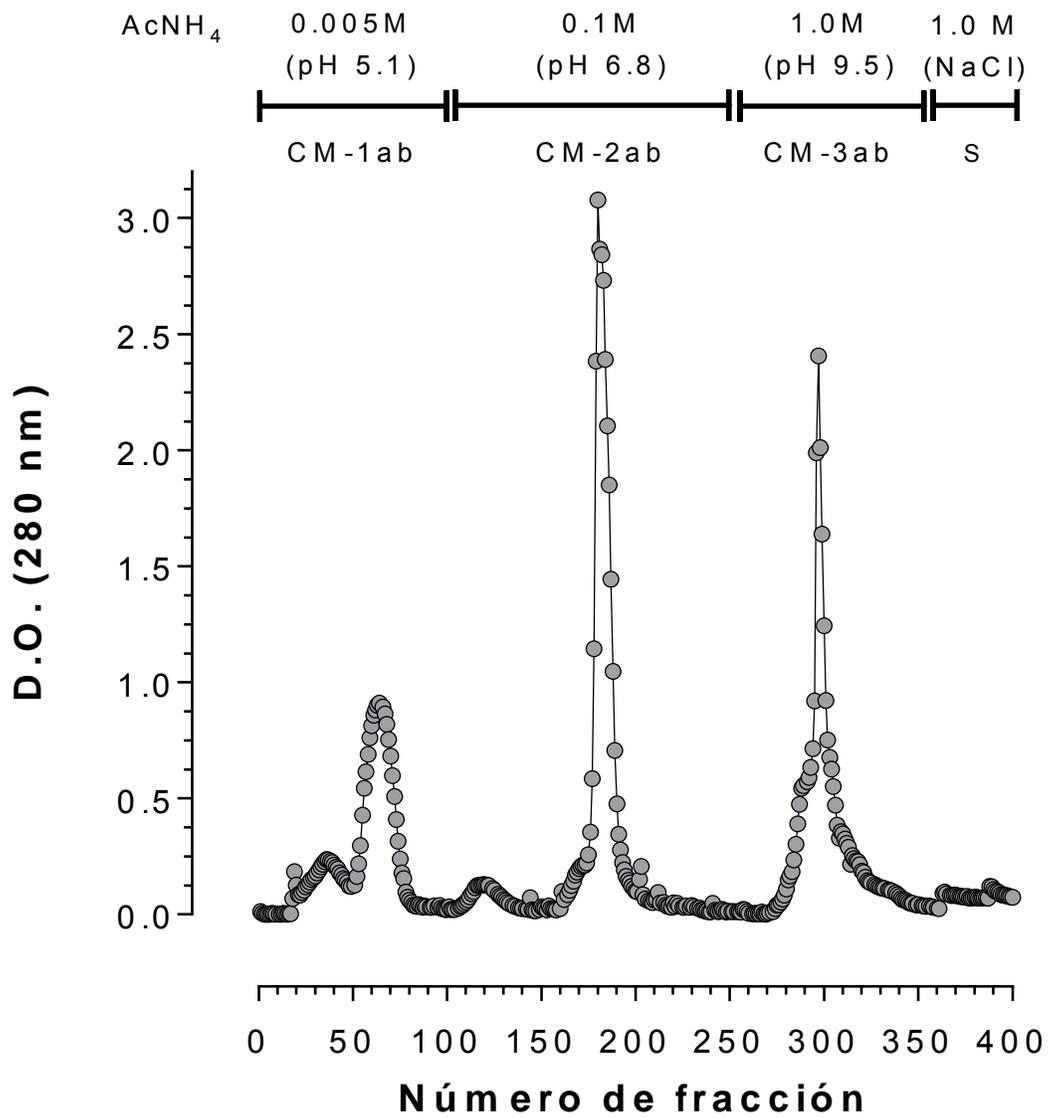


Fig. 6.2. Patrón de elución del extracto glicoprotéico (EGP) del lote B en la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). La columna se eluyó con un gradiente de acetato de amonio (AcNH<sub>4</sub>) a diferente pH. Cada pico de proteína se monitoreó a 280 nm.

Cuadro 6.1. Cantidad de proteína y concentración de LH inmunoreactiva por mg de proteína de las distintas fracciones recuperadas durante la purificación del extracto glicoprotéico en CM-Sepharosa.

Fracción	Proteína <sup>1</sup> (mg)		µg de LH <sup>2</sup> /mg de proteína	
	Lote		Lote	
	A	B	A	B
EGP	285.32		64.00 ± 14.90	
CM-1ab	2.90	3.19	2.63 ± 0.89	1.14 ± 0.34
CM-2ab	45.04	71.76	3.80 ± 0.21	4.88 ± 0.59
CM-3ab	11.02	25.60	540 ± 48.80	348.33 ± 45.45

<sup>1</sup> Método de Bradford

<sup>2</sup> RIA homólogo de LH

Fig. 6.3. Lote A. Curvas dosis-respuesta obtenidas en el RIA homólogo y específico para LH para cada fracción recuperada durante la purificación del extracto glicoprotéico (EGP) en CM-Sepharosa.

Fig. 6.4. Lote B. Curvas dosis-respuesta obtenidas en el RIA homólogo y específico para LH para cada fracción recuperada durante la purificación del extracto glicoprotéico (EGP) en CM-Sepharosa.

Cuadro 6.2. Parámetros de la actividad inmunológica específica a LH y dependiente de la dosis para el estándar oLH y para los diferentes productos obtenidas del EGP durante su purificación el intercambio iónico CM-Sepharosa. Los parámetros fueron obtenidos de las curvas no lineales ajustadas del %B/B0 vs. log de la dosis. IC<sub>50</sub>, corresponde a la dosis (ng/ml) obtenida al 50% de la curva. h, corresponde a la pendiente de Hill (h) y R<sup>2</sup> se refiere al coeficiente de determinación para cada fracción analizada.

Fracción	IC <sub>50</sub> <sup>1</sup>		h		R <sup>2</sup>	
	Lote		Lote		Lote	
	A	B	A	B	A	B
oLH-I-2	1.32 ± 0.02		-0.80		0.99	
EGP	18.99 ± 0.11		-1.13		0.80	
CM-1ab	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CM-2ab	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CM-3ab	2.39 ± 0.02	3.53 ± 0.02	-0.91	-1.03	0.98	0.97

<sup>1</sup>Nanogramos de proteína ± el error estándar  
 ND = No determinada

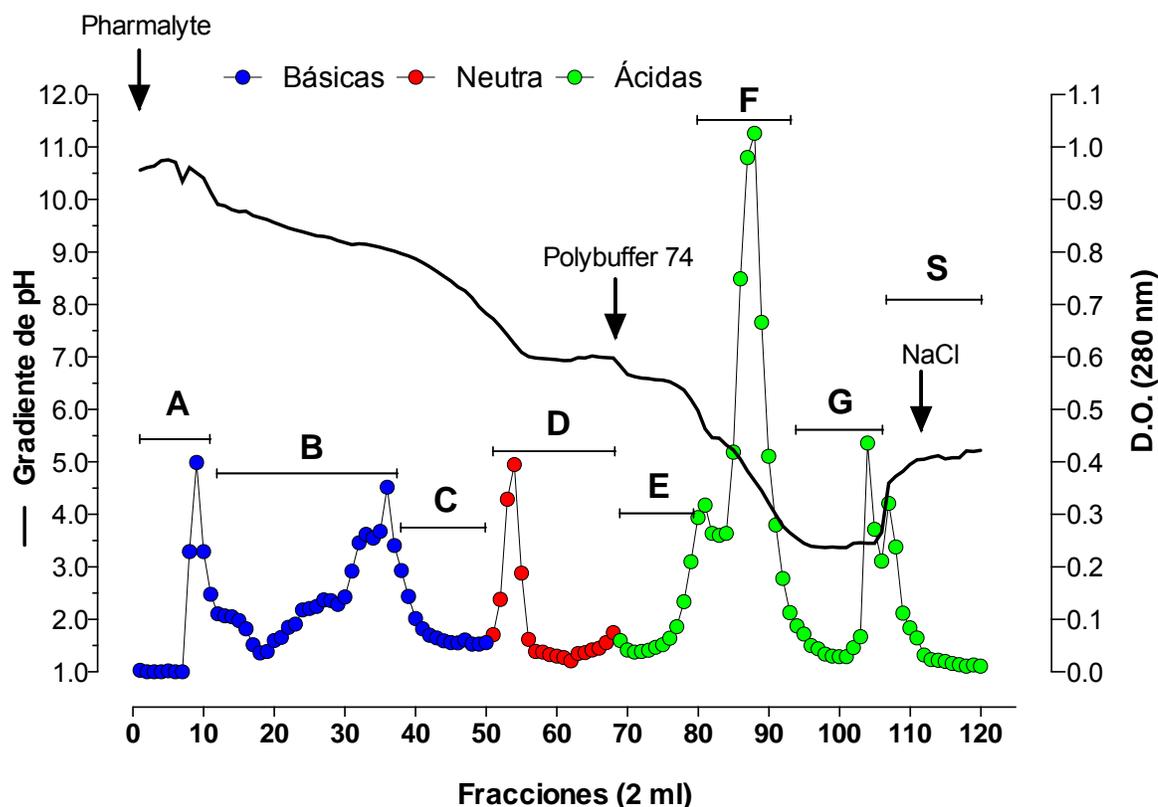


Fig. 6.5. Perfil de elución de la fracción CM-3ab en el cromatoenfoque para la obtención de isoformas de la oLH. El contenido total de proteína (22.9 mg) de CM-3ab se resuspendió en amortiguador de pharmalyte y fue eluida en una columna con PBE-118 que sirvió como intercambiador iónico. La columna fue equilibrada con 0.025M de trietilamina-HCl, pH 11.0 y fracciones de 2 ml se colectaron. Cada fracción de proteína fue identificado a 280 nm y codificado con una letra, comenzando con la proteína que eluyó a pH más básico (isoforma A) y se finalizó con la proteína de elución a pH más ácido (isoforma G). El pico de proteína recuperado con NaCl 1M se denominó S. La línea negra continua denota el gradiente de pH.

Cuadro 6.3. Rango de pH de elución, cantidad de LH inmunoreactiva y el porcentaje de recuperación de cada isoforma durante la purificación de la fracción CM-3ab en el cromatoenfoco.

Isoforma	Rango de pH	LH inmunoreactiva <sup>1</sup> (mg)	Recuperación (%)
A	10.56-10.14	0.08	1.60
B	9.91-9.02	3.06	61.32
C	8.97-7.83	0.53	10.62
D	7.73-6.98	0.33	6.61
E	6.83-6.19	0.39	7.82
F	5.98-3.65	0.59	11.82
G	3.55-3.66	0.01	0.20

<sup>1</sup> La actividad inmunológica se determinó con el RIA homólogo de LH

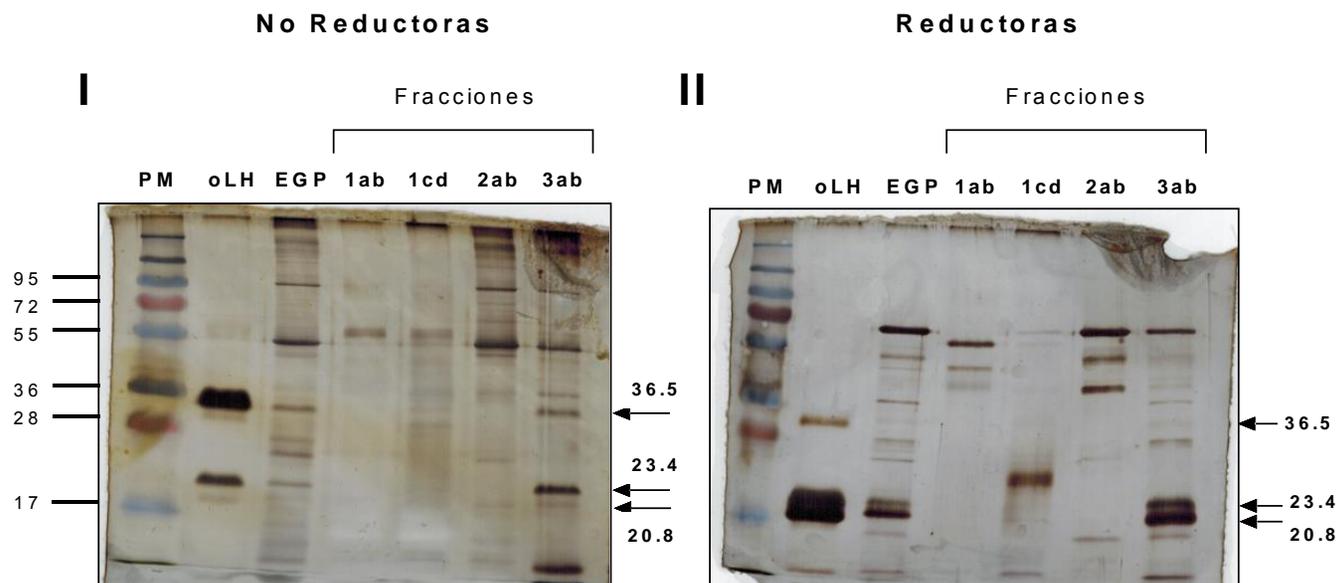


Fig. 6.6. Patrón electroforético en SDS-PAGE al 12.5%, pH 8.6 en ausencia (I) y en presencia (II)  $\beta$ -mercaptoetanol para el estándar de oLH (NIDDK-oLH-I-2), el extracto glicoprotéico (EGP) y para las distintas fracciones de proteína obtenidas durante la cromatografía de intercambio catiónico. En cada panel los marcadores de peso molecular (PM) son indicados y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y sus subunidades. Una vez concluida la electroforesis los geles se tiñeron con nitrato de plata (Bio-Rad).

## No Reductoras

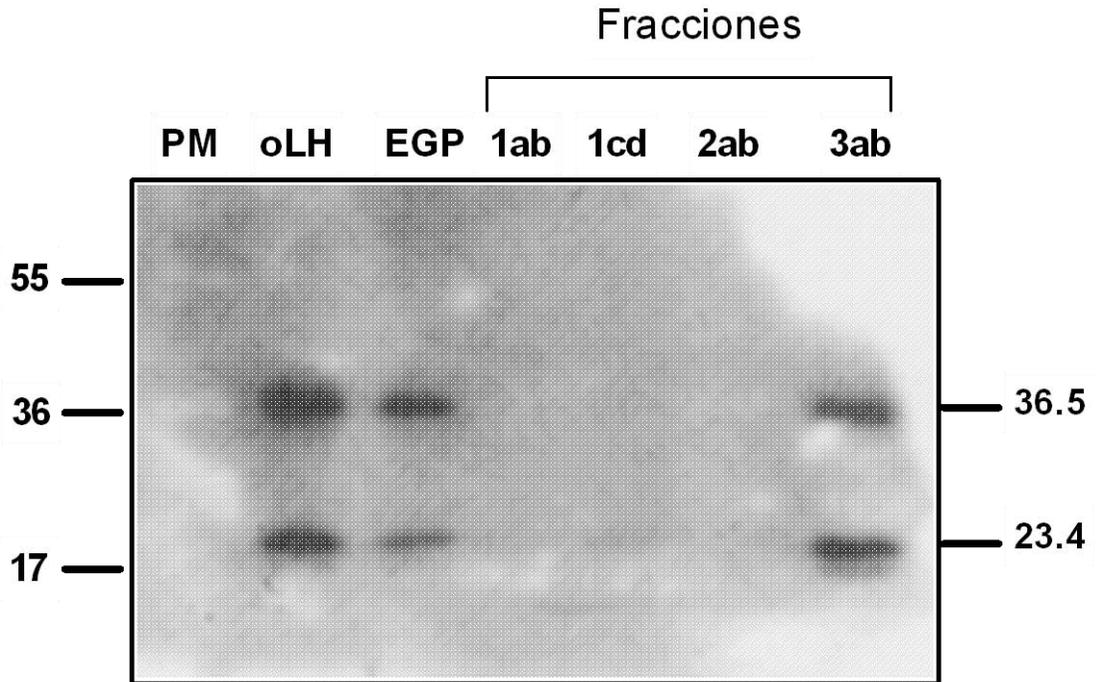


Fig. 6.7. Patrón de inmunotransferencia de cada fracción de proteína recuperada durante la purificación del extracto glicoprotéico (EGP) en el intercambiador catiónico (CM-Sepharosa). Cada carril corresponde a 100 ng de proteína para cada fracción. Las bandas de proteínas inmunoreactivas a LH se revelaron por quimioluminiscencia. Se indican los marcadores de peso molecular (PM) y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y la subunidad beta (23.4 kDa) se indican a la derecha. Este patrón se desarrolló en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (No Reductoras).

## Reductoras

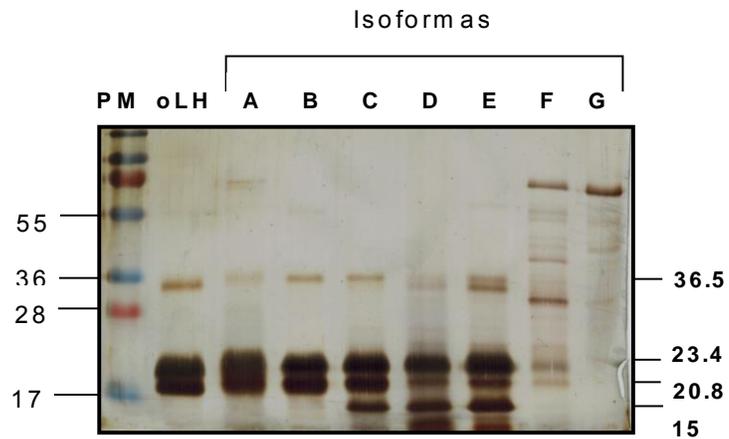


Fig. 6.8. Patrón electroforético en SDS-PAGE al 12.5%, pH 8.6 en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Reductoras) para el estándar de oLH y las isoformas de carga aisladas de la fracción CM-3ab durante el cromatofoco. En el panel los marcadores de peso molecular (PM) son indicados y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y sus subunidades (23.4 kDa, 20.8). Adicionalmente se indica la presencia de la proteína de 15.0kDa. La tinción se realizó con nitrato de plata (Bio-Rad).

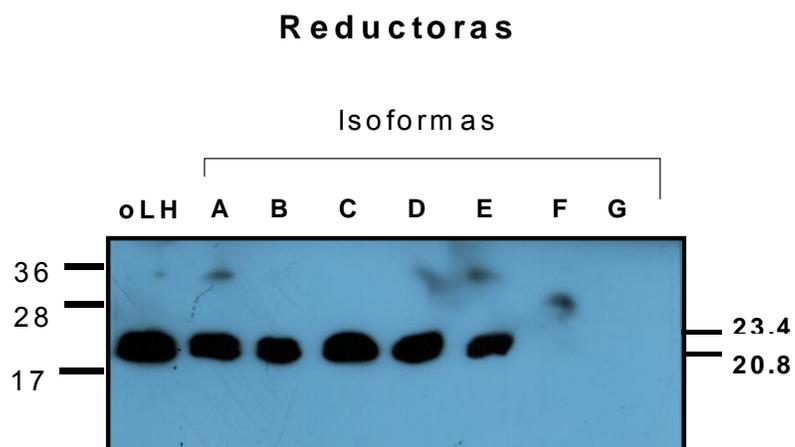


Fig. 6.9. Patrón de inmunotransferencia del estándar de la oLH y de las isoformas de carga obtenidas durante la purificación de la fracción CM-3ab en el cromatoenfoco. La corrida electroforética se realizó en SDS-PAGE al 12.5%, pH 8.6 en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Reductoras). La concentración de cada carril correspondió a 100 ng de proteína. El revelado se realizó por quimioluminiscencia. En el panel los marcadores de peso molecular (PM) son indicados con una línea negra y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y sus subunidades (23.4 y 20.8 kDa).

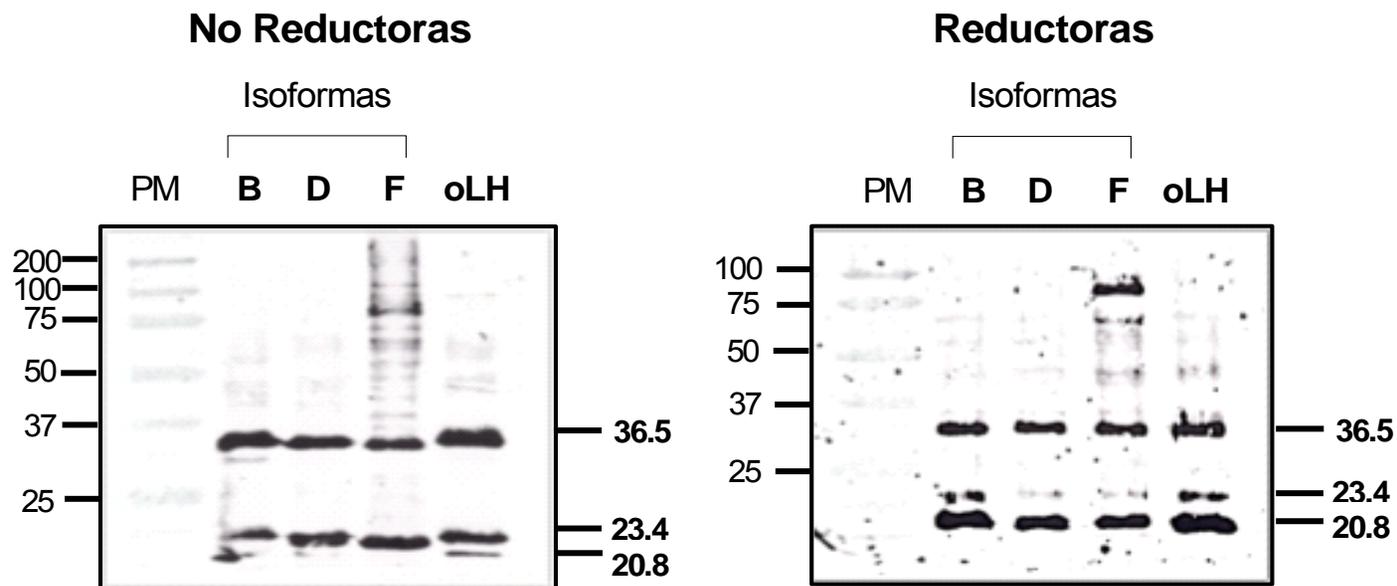


Fig. 6.10. Re-análisis específico del patrón por inmunotransferencia en condiciones no reductoras y reductoras para las isoformas que representaron el gradiente de pH del cromatoenfoco: isoforma básica (B), neutra (D) y la ácida (F) y el patrón de referencia (oLH). Cada isoforma se analizó a una concentración de 200 ng de LH inmunoreactiva. El revelado se realizó con el estuche comercial *AP conjugate substrate Kit* (Bio-Rad). En cada panel los marcadores de peso molecular (PM) son indicados con una línea negra y las proteínas correspondientes al heterodímero de la LH (36.5 kDa) y sus subunidades (23.4 y 20.8 kDa).

Fig. 6.11. Curvas dosis-respuesta inhibitorias en un RIA específico y homólogo para LH estándar (oLH) y para las isoformas de carga básicas obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. B, pH 9.91-9.02 y C, pH 8.97-7.83. Cada punto de la curva representa el promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas.

Fig. 6.12. Curvas dosis-respuesta inhibitoria en un RIA específico y homólogo para LH estándar (oLH) y para la isoforma de carga neutra (D, pH 7.73-6.98) obtenida de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. Cada punto de la curva representa el promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas.

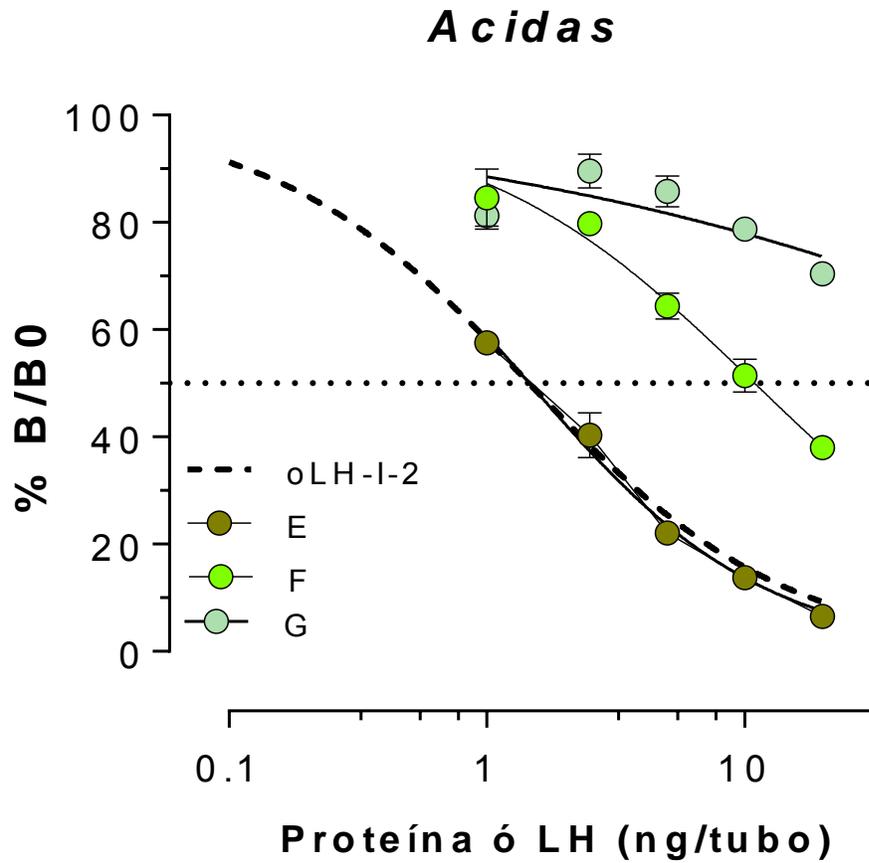


Fig. 6.13. Curvas dosis-respuesta inhibitorias en un RIA específico y homólogo para LH estándar (oLH) y para las isoformas de carga ácidas obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. E, pH 6.83-6.19; F, pH 5.98-3.65 y G, pH 3.55-3.66. Cada punto de la curva representa el promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas.

Cuadro 6.4. Parámetros de la actividad inmunológica específica a LH y dependiente de la dosis para el estándar oLH y para las diferentes isoformas de carga de la oLH obtenidas de la fracción CM-3ab durante su purificación en el cromatoenfoco. Los parámetros fueron obtenidos de la curva no lineales ajustadas del %B/B0 vs. log de la dosis. IC<sub>50</sub>, corresponde a la dosis (ng/ml) obtenida al 50% de la curva. h, corresponde a la pendiente de Hill y R<sup>2</sup> se refiere al coeficiente de determinación para cada fracción analizada.

		<b>Isoformas oLH</b>					
		<b>Básicas</b>		<b>Neutra</b>	<b>Ácidas</b>		
	<b>oLH</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>
<b>IC<sub>50</sub></b>	1.4 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.6 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.02 <sup>c</sup>	10.9 ± 0.03 <sup>d</sup>	ND
<b>h</b>	-0.87 <sup>a,b</sup>	-0.93 <sup>a,b</sup>	-0.91 <sup>a,b</sup>	-0.93 <sup>a,b</sup>	-0.96 <sup>a</sup>	-0.80 <sup>b</sup>	ND
<b>R<sup>2</sup></b>	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.97	ND

Distintas literales entre isoformas indican diferencias (p<0.05).  
ND=No determinada.

## 7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE CADA ISOFORMA DE LA $\alpha$ LH.

### 7.1 Introducción

La actividad biológica de la LH y sus isoformas en mamíferos se ha determinado mediante bioensayos *in vivo* e *in vitro*. En rumiantes, la actividad biológica de las isoformas de la LH aisladas de la hipófisis con bioensayos *in vivo* nos indican que estos métodos son herramientas biológicas para discernir diferencias biológicas entre isoformas de la LH; sin embargo, estos resultados son inconsistentes. Esta discrepancia en la respuesta biológica se ha atribuido en parte a: (1) la baja sensibilidad que presentan los bioensayos en animales, ya que se requiere cantidad de microgramos de cada proteína; (2) no se considera la tasa de depuración de cada isoforma; (3) hay alta variabilidad biológica en los animales de experimentación. A pesar de ello, los resultados coinciden que bajo esta condición de análisis, la mayor bioactividad la presentan las isoformas de la LH que eluyen a un pH ácido (Perera-Marín et al., 1996; Perera-Marín et al., 2004; Chaudhary y Muralidhar, 2007).

En contraste, el empleo de bioensayos *in vitro*, como el basado en la producción de andrógenos por las células de Leydig de roedores después del tratamiento con distintas isoformas de carga de la LH de diferentes especies, ha generado una serie de resultados que coinciden en que las isoformas básicas son las más biológicamente activas que su contraparte ácida (Lichtenberg et al., 1984; Nomura et al., 1989; Hejl et al., 1992; Nakamura et al., 1993). Sin embargo, no siempre se obtiene un resultado satisfactorio debido a que el origen de las células de Leydig (rata o ratón) plantea la cuestión de la especificidad de especie cuando se utilizan ligandos de otras especies.

Una alternativa a los bioensayos clásicos ha sido el desarrollo de bioensayos basados en la clonación de receptores para gonadotropinas. Ejemplo de ello es el empleo de la línea celular estable derivada de células embrionarias de riñón humano (HEK-293) y transfectadas con el cDNA para el receptor de la LH de rata, con la cual se ha logrado evaluar la bioactividad de distintos extractos

hipofisarios de rata obtenidos a pH básico (Olivares et al., 2009; Olivares et al., 2010); así mismo, con este modelo biológico se ha determinado la constante de afinidad de la LH bovina al receptor de la LH de rata (Galet y Ascoli, 2005) mediante la producción de AMPc.

El desarrollo de este tipo de bioensayos ofrece una serie de ventajas: (1) se trata de líneas celulares estables en donde las células clonadas expresan un número definido y una población homogénea de receptores; (2) permite evaluar de forma directa la hormona biológicamente activa a través de la producción del segundo mensajero, AMPc; (3) presenta una sensibilidad y una variación interensayo e intraensayo similar a bioensayos *in vitro* clásicos (Christin-Maitre et al., 2000; Galet y Ascoli, 2005). Sin embargo, es importante destacar que tiene la limitante de que mide sólo la bioactividad que ocurre a través de la vía de señalización de AMPc y hoy se sabe que la LH, al igual que la FSH puede incrementar el calcio intracelular en células de Sertoli (Dimino et al., 1987; Flores et al., 1998; Nguyen et al., 2003; Lin et al., 2006).

Durante la última década, el grupo de investigación del cual formo parte, se ha enfocado a aislar y caracterizar distintas isoformas de la LH de rumiantes para conocer la relación estructura-función de esta glicoproteína, su patrón de secreción en diferentes estadios fisiológicos y su actividad biológica. Sin embargo, debido al bajo rendimiento de cada isoforma, su caracterización biológica ha sido muy limitada. Es por esto, que con la disposición del bioensayo basado en la clonación del receptor para LH, se abre la posibilidad de cuantificar la bioactividad de este grupo de isoformas que por su bajo rendimiento es difícil de monitorear.

Por lo tanto, otro de los objetivos de este proyecto fue evaluar el efecto de las isoformas aisladas de la LH ovina sobre la producción de AMPc por las células HEK-293 transfectadas con el cDNA para el receptor de LH de rata, como una medida de actividad biológica.

## **7.2 Materiales y métodos**

La actividad biológica para cada isoforma de la LH aislada se determinó con el bioensayo *in vitro* en las células HEK-293 transfectadas con el cDNA para el

receptor de la LH de rata; células donadas por el Dr. Mario Ascoli (Iowa University, Iowa City, IA). El contenido de AMPc total (intra y extracelular) se midió con un RIA en fase líquida.

### *7.2.1 Cultivo celular*

Las células se sembraron en caja de cultivo de 162 cm<sup>2</sup> (Costar, Cambridge, MA, EUA) que contenían medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alto en glucosa (Life Technologies, Gaithersburg, MD) que contenía 5% de suero fetal bovino (Gibco, BRL), 2.0 mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, EUA), 100 mg/ml de gentamicina (Life Technologies), 50 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, EUA).

Después de sembradas y con una confluencia del 90%, las células se resembraron en cajas de 24 pozos (Gibco, BRL) con una densidad de  $5 \times 10^4$  células por pozo que contenía el medio de cultivo antes mencionado. Previo al tratamiento, las células se conservaron en un ambiente con el 5% de CO<sub>2</sub> y temperatura de 37°C durante 24 h. Posteriormente, se retiró el 85% de medio y las células se expusieron a dosis crecientes de LH (0.1, 1.0, 10 y 100 ng/ml) diluida en el mismo medio que contenía 1.25 mM de inhibidor de la fosfodiesterasa (3-isobutil-1-metilxantina, Sigma), y se incubaron durante 24 h. Al término, el medio y las células fueron extraídos y calentados a 95°C durante 3 min y se almacenaron a -20°C hasta la cuantificación de AMPc total (intra y extracelular).

### *7.2.2 Medición de AMPc*

El contenido de AMPc total (intra y extracelular) en el medio de cultivo se determinó con un RIA en fase líquida previamente validado (Olivares et al., 2010). Como trazador se utilizó al 2-O-monosuccinil tirosil-metil éster de AMPc (Sigma), radiomarcado con Na<sup>125</sup>I (Amersham International Limite, Reino Unido) mediante el método de la Cloramina-T (Hunter y Greenwood, 1962). El anticuerpo primario (cAMP-CV-27, proporcionado por el National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, NIADDK, Bethesda, MD, USA) se utilizó a una dilución final de 1:70,000 en presencia de acetato de sodio 5.0 mM y BSA al 0.1 %, pH 6.1. Cada

tubo de reacción se incubó por 24 h a 4°C y al término se agregó etanol frío (3 ml) y se centrifugó a 1500 x g por 30 min a 4°C. La sensibilidad del ensayo se incrementó colocando trietilamina y ácido acético anhídrido a una proporción 2:1 (v/v). La sensibilidad fue de 2.0 pmol/ml. La fracción inmunoprecipitada se analizó en un contador de radiaciones gamma. La producción de AMPc se calculó por interpolación de los resultados en la curva de referencia de 2-O-monosuccinil tirosil-metil éster de AMPc.

### *7.2.3. Análisis estadístico*

La actividad biológica para cada isoforma se determinó a través del cálculo del parámetro EC<sub>50</sub>, definido como la cantidad requerida de LH (ng/ml) que generó una respuesta al 50% de la respuesta máxima, bajo las condiciones establecidas en el ensayo (DeLean et al., 1978; Borromeo et al., 2004). Para ello, los datos experimentales se ajustaron en curvas dosis-respuesta de estimulación de cuatro parámetros, en el rango de la dosis de LH inmunoreactiva probada del estándar y de cada isoforma, utilizando el programa estadístico Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

A partir de las curvas de ajuste se realizaron comparaciones estadísticas de los parámetros EC<sub>50</sub> y el coeficiente de Hill. Para lo anterior se utilizó la prueba F de la suma de cuadrados, probando como hipótesis nula que los parámetros son idénticos entre cada par de hormonas evaluadas; sí se obtiene un valor de  $p > 0.05$ , se concluye que el parámetro es el mismo para los dos ajustes (Borromeo et al., 2004). Además, se utilizó ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las isoformas ensayadas.

## **7.3 Resultados**

La producción de AMPc por las células HEK-293 fue dependiente de la dosis de LH aplicada, tanto del patrón de referencia (NIDDK-oLH-I-2) como de las isoformas en estudio. La respuesta observada en las isoformas básicas fue similar al patrón de referencia (Fig. 1). La producción de AMPc generada por la isoforma neutra (D) fue significativamente menor al patrón de referencia (Fig. 2). En el caso

de las isoformas ácidas, la respuesta generada por la isoforma menos ácida fue similar al patrón de referencia, en tanto que la isoforma ácida F generó una producción de AMPc significativamente menor y en el caso de la isoforma ácida G la dosis alta fue la que generó la mayor respuesta, pero no mostró un efecto dependiente de la dosis (Fig. 3).

La dosis calculada al 50% ( $EC_{50}$ ) de la curva de estimulación en la producción de AMPc vs. la dosis inmunoreactiva de LH (Cuadro 1) denotó que las respuestas a las isoformas A, B, C y E fueron estadísticamente similares a las del patrón de referencia; mientras que en el caso de la isoforma neutra (D) y la isoforma más ácida (F) la dosis  $EC_{50}$  fue significativamente mayor, lo cual indica que este grupo de isoformas mostró la menor actividad biológica, sobre la base de la producción de AMPc, en comparación con el resto. En el caso de la isoforma más ácida (G), este parámetro no se pudo determinar.

#### **7.4 Discusión**

La heterogeneidad de la hormona luteinizante (LH) de mamíferos se refleja en sus propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y biológicas. La actividad biológica de distintos aislados de la LH hipofisaria de rumiantes se ha determinado con bioensayos *in vivo* (Perera-Marín et al., 2004; Chaudhary y Muralidhar, 2007) e *in vitro* (Hejl et al., 1992; Nakamura et al., 1993) con resultados que indican que las isoformas básicas son las proteínas más bioactivas *in vitro*, en tanto que la mayor respuesta *in vivo* lo generan las isoformas ácidas.

En el presente estudio se evaluó la actividad biológica de las distintas isoformas de carga de la LH de la hipófisis ovina utilizando por primera vez, para esta especie, el bioensayo *in vitro* de la células HEK-293 transfectadas con el cDNA para el receptor de la LH de rata (Olivares et al., 2009), con resultados que mostraron diferencias significativas en la producción cuantitativa de AMPc por unidad de LH inmunoreactiva, siendo las isoformas de tipo básico y la isoforma menos ácida las que mostraron la mayor producción de AMPc en el medio de cultivo en comparación con sus isoformas análogas neutra y más ácidas. Bajo las condiciones del bioensayo utilizado, el patrón de respuesta con los diferentes

aislados de la LH bovina fue dependiente de la dosis en el rango de 0.1 a 10 ng de LH inmunoreactiva, mientras que la producción de AMPc a la dosis más alta (100 ng/ml) no se modificó con relación a la dosis de 10 ng/ml. Esta respuesta en el bioensayo podría deberse a la desensibilización del número limitado de receptores presentes en las células HEK-293 (Galet y Ascoli, 2005), a través de un proceso relativamente lento de regulación a la baja del número de receptores presentes en cada célula, o bien mediante el proceso relativamente rápido de la disminución en la capacidad del receptor de la LH de interactuar y activar a sus proteínas G afines (Galet et al., 2003). Aunque en este estudio no se analizó la producción de AMPc dependiente del tiempo, el tratamiento por 24 h nos permitió observar un cambio diferencial en la producción de AMPc entre las isoformas.

La mayor respuesta entre las isoformas básicas con respecto a sus análogas más ácidas de la LH ovina, coincidió con el efecto biológico que se generó después de colocar diferentes dosis de extractos de hipófisis de rata diabética y obesa, eluidos a pH básico y ácido, donde evaluaron como respuesta, la producción de AMPc generada en las células HEK-293 (Olivares et al., 2009; Olivares et al., 2010). Estos resultados también coincidieron con el patrón de respuesta generado *in vitro* en cultivos primarios de células de Leydig después del estímulo con isoformas hipofisarias de la LH humana (Robertson y Diczfalusy, 1977); de rata (Hattori et al., 1983); ovina (Nakamura et al., 1993). Además, entre isoformas básicas de la oLH, se han observado diferencias significativas en la producción de AMPc por las células de Leydig *in vitro* (Nakamura et al., 1993). Por lo tanto, bajo las condiciones *in vitro* ensayadas, las isoformas básicas y la isoforma menos ácida de la LH presentaron la mayor actividad biológica.

Los mecanismos responsables de las diferencias en la actividad biológica entre las isoformas ensayadas no son del todo conocidos; sin embargo, ésta diferencia biológica se atribuye en parte al tipo de oligosacáridos que integran cada isoforma (Baenziger y Green, 1988), dado que la remoción total o parcial de algunos de los componentes de los oligosacáridos por medios químicos o enzimáticos modifican esa actividad (Sairam y Schiller, 1979; Sairam, 1990). Se conoce que la LH ovina presenta un contenido del 69% de los oligosacáridos con

terminaciones de N-acetilgalactosamina sulfatadas, 5% con terminaciones galactosa sializadas y 26% de tipo neutro (Green et al., 1988) y la eliminación del ácido siálico (Burgon et al., 1996; Burgon et al., 1997) y sulfato (Baenziger et al., 1992) de la estructura de los oligosacáridos de la LH conduce a una disminución en la vida media circulante de la hormona (Burgon et al., 1996). Esta rápida depuración de las isoformas de la circulación se debe a la alta afinidad de la hormona por el receptor específico presente en el hígado (Gal/GalNAc-receptor específico), reduciendo proporcionalmente la actividad biológica *in vivo* de la proteína (Fiete et al., 1991). Por otro lado, la remoción total del oligosacárido de la LH, ha confirmado que las hormonas deglicosiladas pierden su acción estimuladora sobre la actividad de la adenilato ciclasa, sin que se aprecie un cambio en su alta afinidad por el receptor (Fares, 2006). Con ello, se ha observado que las hormonas deglicosiladas presentan funciones antagónicas en la inducción de la formación de AMPc y producción de segundos mensajeros y por ende sobre la producción de hormonas esteroides (Sairam, 1989; Sairam, 1990; Ulloa-Aguirre et al., 2003).

Por otro lado, no se puede descartar la posible participación del receptor de acuerdo a la afinidad que presenta por cada isoforma. Estudios de unión en células HEK-293 transfectadas con el cDNA para el receptor de la LH de rata, demostraron que existe una constante de asociación diferente entre las distintas LH que se evaluaron, donde la LH bovina presentó la menor afinidad por ese receptor. Esto se atribuyó a las regiones repetidas ricas en leucina (LRR) 3, 7, 8 y 9 en el dominio extracelular del receptor, específicas para el reconocimiento de esta hormona (Galet y Ascoli, 2005).

Por lo tanto, basados en esta serie de resultados se puede inferir que el patrón diferencial en la respuesta biológica sobre la producción de AMPc por las células HEK-293 a través del estímulo con las distintas isoformas de la LH este regulado por el patrón de glicosilación de la LH que puede dar origen a proteínas con distinta afinidad por el receptor y cuya interacción se refleje en un cambio en la respuesta biológica medida como la producción de AMPc por las células.

## **7.5 Conclusión**

El sistema de evaluación de la actividad biológica indica que las isoformas de la hormona luteinizante ovina, en las células HEK-293 transfectadas con el receptor a LH de rata, inducen diferente producción de AMPc. Además, esta línea celular es sensible a las isoformas de LH de origen ovino y se pudo diferenciar la actividad biológica entre distintos aislados de la LH, en donde las isoformas básicas y la menos ácida generaron la mayor producción de AMPc cuando se comparó con la isoforma neutra y las más ácidas. Estos hallazgos pueden representar un mecanismo fino de regulación de la adenohipófisis sobre la función gonadal.

## 7.6 Referencias

BAENZIGER, J. U. & GREEN, E. D. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*, 947, 287-306.

BAENZIGER, J. U., KUMAR, S., BRODBECK, R. M., SMITH, P. L. & BERANEK, M. C. 1992. Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 334-8.

BORROMEO, V., AMSTERDAM, A., BERRINI, A., GAGGIOLI, D., DANTES, A. & SECCHI, C. 2004. Characterization of biologically active bovine pituitary FSH purified by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Gen Comp Endocrinol*, 139, 179-89.

BURGON, P. G., STANTON, P. G. & ROBERTSON, D. M. 1996. *In vivo* bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology*, 137, 4827-36.

BURGON, P. G., STANTON, P. G., PETTERSSON, K. & ROBERTSON, D. M. 1997. Effect of desialylation of highly purified isoforms of human luteinizing hormone on their bioactivity *in vitro*, radioreceptor activity and immunoactivity. *Reprod Fertil Dev*, 9, 501-8.

CHAUDHARY, R. & MURALIDHAR, K. 2007. Caprine (*Capra hircus*) luteinizing hormone: purification and chromatographic investigation of its different isoforms. *Prep Biochem Biotechnol*, 37, 277-300.

CHRISTIN-MAITRE, S., VASSEUR, C., FAUSER, B. & BOUCHARD, P. 2000. Bioassays of gonadotropins. *Methods*, 21, 51-7.

DELEAN, A., MUNSON, P. J. & RODBARD, D. 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol*, 235, E97-102.

DIMINO, M. J., SNITZER, J. & BROWN, K. M. 1987. Inositol phosphates accumulation in ovarian granulosa after stimulation by luteinizing hormone. *Biol Reprod*, 37, 1129-34.

FARES, F. 2006. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. *Biochim Biophys Acta*, 1760, 560-7.

FIETE, D., SRIVASTAVA, V., HINDSGAUL, O. & BAENZIGER, J. U. 1991. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO<sub>4</sub>-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell*, 67, 1103-10.

FLORES, J. A., AGUIRRE, C., SHARMA, O. P. & VELDHUIS, J. D. 1998. Luteinizing hormone (LH) stimulates both intracellular calcium ion ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) mobilization and transmembrane cation influx in single ovarian (granulosa) cells: recruitment as a cellular mechanism of LH-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dose response. *Endocrinology*, 139, 3606-12.

GALET, C., MIN, L., NARAYANAN, R., KISHI, M., WEIGEL, N. L. & ASCOLI, M. 2003. Identification of a transferable two-amino-acid motif (GT) present in the C-terminal tail of the human lutropin receptor that redirects internalized G protein-coupled receptors from a degradation to a recycling pathway. *Mol Endocrinol*, 17, 411-22.

GALET, C. & ASCOLI, M. 2005. The differential binding affinities of the luteinizing hormone (LH)/choriogonadotropin receptor for LH and choriogonadotropin are dictated by different extracellular domain residues. *Mol Endocrinol*, 19, 1263-76.

GREEN, E. D., ADELTE, G., BAENZIGER, J. U., WILSON, S. & VAN HALBEEK, H. 1988. The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis

of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, 263, 18253-68.

HATTORI, M., SAKAMOTO, K. & WAKABAYASHI, K. 1983. The presence of LH components having different ratios of bioactivity to immunoreactivity in the rat pituitary glands. *Endocrinol Jpn*, 30, 289-96.

HEJL, K. M., WOLFE, M. W., KINDER, J. E. & GROTTJAN, H. E. 1992. Bioactive and immunoreactive concentrations of circulating luteinizing hormone during sexual maturation in the bovine. *Biol Reprod*, 46, 1205-10.

HUNTER, W. M. & GREENWOOD, F. C. 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194, 495-6.

LICHTENBERG, V., WEISE, H. C., GRAESSLIN, D. & BETTENDORF, G. 1984. Polymorphism of human pituitary lutropin (LH). Effect of the seven isohormones on mouse Leydig cell functions. *FEBS Lett*, 169, 21-4.

LIN, Y. F., TSENG, M. J., HSU, H. L., WU, Y. W., LEE, Y. H. & TSAI, Y. H. 2006. A novel follicle-stimulating hormone-induced G<sub>α</sub>h/phospholipase C-δ1 signaling pathway mediating rat sertoli cell Ca<sup>2+</sup>-influx. *Mol Endocrinol*, 20, 2514-27.

NAKAMURA, Y., NOMURA, K., WATANABE, M., UJIHARA, M. & DEMURA, H. 1993. Comparison of biological aspects among ovine luteinizing hormone isoforms with charge heterogeneity. *Endocr J*, 40, 73-81.

NGUYEN, V. T., SINGH, V., BUTNEV, V. Y., GRAY, C. M., WESTFALL, S., DAVIS, J. S., DIAS, J. A. & BOUSFIELD, G. R. 2003. Inositol phosphate stimulation by LH requires the entire alpha Asn56 oligosaccharide. *Mol Cell Endocrinol*, 199, 73-86.

NOMURA, K., OHMURA, K., NAKAMURA, Y., HORIBA, N., SHIRAKURA, Y., SATO, Y., UJIHARA, M., OHKI, K. & SHIZUME, K. 1989. Porcine luteinizing

hormone isoform(s): relationship between their molecular structures, and renotropic versus gonadotropic activities. *Endocrinology*, 124, 712-9.

OLIVARES, A., MENDEZ, J. P., CARDENAS, M., OVIEDO, N., PALOMINO, M. A., SANTOS, I., PERERA-MARIN, G., GUTIERREZ-SAGAL, R. & ULLOA-AGUIRRE, A. 2009. Pituitary-testicular axis function, biological to immunological ratio and charge isoform distribution of pituitary LH in male rats with experimental diabetes. *Gen Comp Endocrinol*, 161, 304-12.

OLIVARES, A., MENDEZ, J. P., ZAMBRANO, E., CARDENAS, M., TOVAR, A., PERERA-MARIN, G. & ULLOA-AGUIRRE, A. 2010. Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *Gen Comp Endocrinol*, 166, 356-64.

PERERA-MARÍN, G., ORTIZ, R. F., GAMBOA, V. J. J., REYNOSO, M. W., FALCÓN, A. A. & SALAS, V. A. 1996. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipófisis caprina (gLH). *Veterinaria México*, 27, 1-10.

PERERA-MARÍN, G., FALCÓN, A. A., MURCIA, C., HERNÁNDEZ-CERÓN, J. & GONZÁLEZ-PADILLA, E. 2004. Purificación de cinco isoformas de hormona luteinizante bovina (bLH). Caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica. *Veterinaria México*, 35, 129-45.

ROBERTSON, D. M. & DICZFALUSY, E. 1977. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone: II. A comparison of the immunological and biological activities of pituitary extracts after electrofocusing using different standard preparations. *Mol Cell Endocrinol*, 9, 57-67.

SAIRAM, M. R. & SCHILLER, P. W. 1979. Receptor binding, biological, and immunological properties of chemically deglycosylated pituitary lutropin. *Arch Biochem Biophys*, 197, 294-301.

SAIRAM, M. R. 1989. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J*, 3, 1915-26.

SAIRAM, M. R. 1990. Complete dissociation of gonadotropin receptor binding and signal transduction in mouse Leydig tumour cells. Obligatory role of glycosylation in hormone action. *Biochem J*, 265, 667-74.

ULLOA-AGUIRRE, A., TIMOSSO, C., BARRIOS-DE-TOMASI, J., MALDONADO, A. & NAYUDU, P. 2003. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from *in vitro* and *in vivo* models. *Biol Reprod*, 69, 379-89.

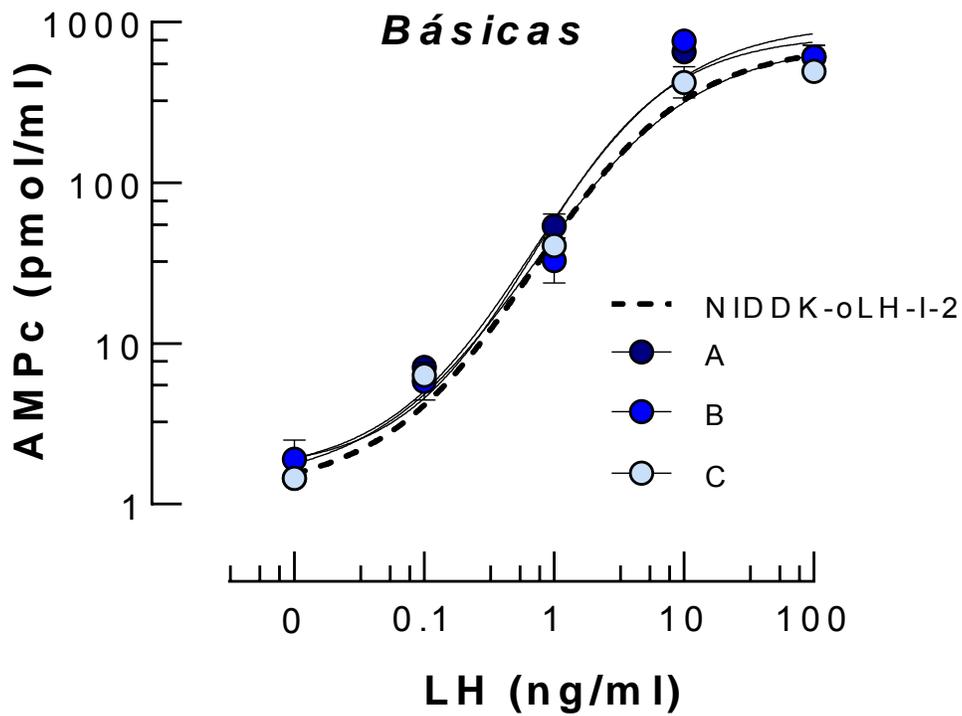


Fig. 7.1. Curva dosis-respuesta estimuladora de las isoformas de carga de la oLH a inducir la producción de AMPc por las células HEK-293 cuando se estimularon con el estándar de oLH (NIDDK-oLH-I-2) y las isoformas básicas (A, 10.56-10.14; B, 9.91-9.02; C, 8.97-7.83) obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. Cada punto de la curva corresponde al promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas.

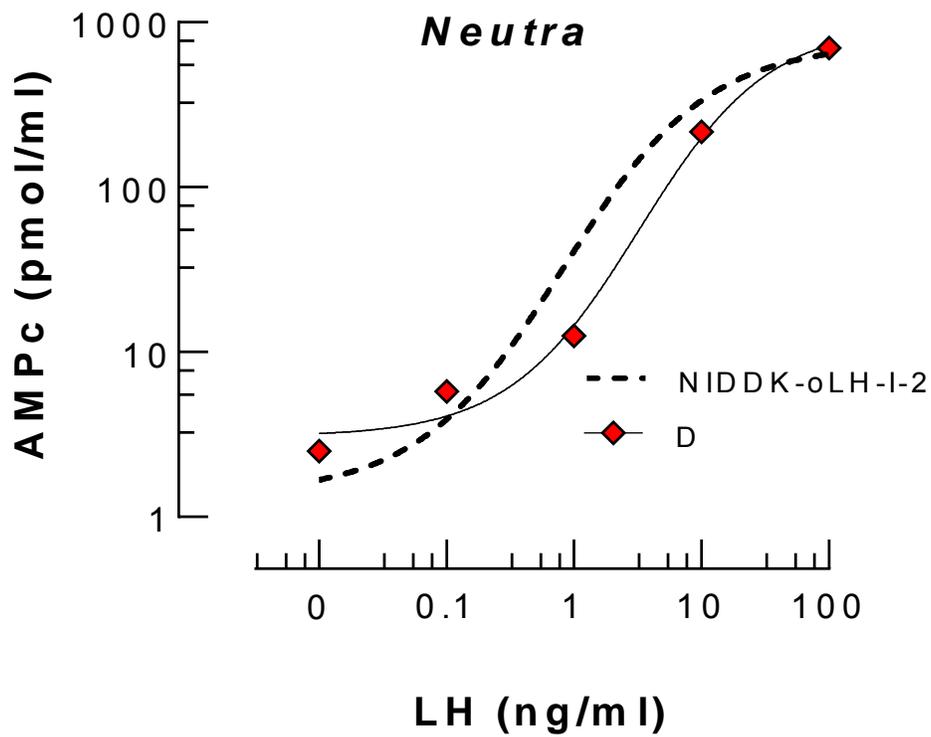


Fig. 7.2. Curva dosis-respuesta estimuladora de las isoformas de carga de la oLH a inducir la producción de AMPc por las células HEK-293 cuando se estimularon con el estándar de oLH (NIDDK-oLH-I-2) y la isoforma neutra (D, 7.73-6.98) obtenida de la fracción CM-3ab durante el cromatofoco. Cada punto de la curva corresponde al promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas.

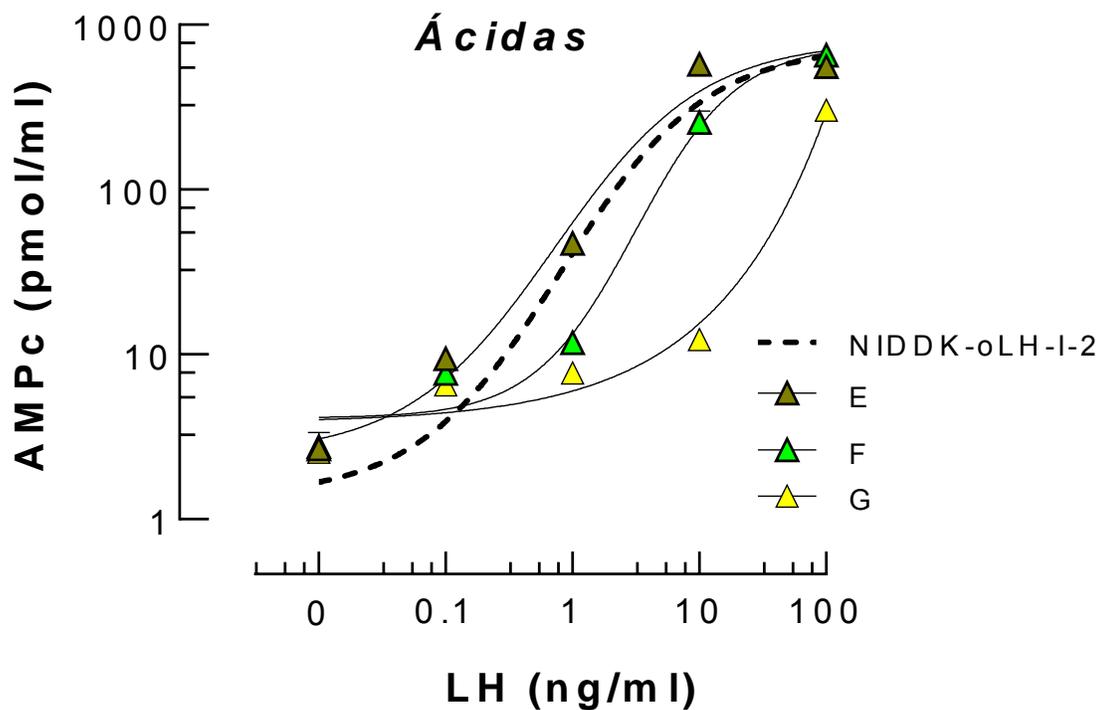


Fig. 7.3. Curva dosis-respuesta estimuladora de las isoformas de carga de la oLH a inducir la producción de AMPc por las células HEK-293 cuando se estimularon con el estándar de oLH (NIDDK-oLH-I-2) y las isoformas neutras (E, 6.83-6.19; F, 5.98-3.65; G, 3.55-3.66) obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatofoco. Cada punto de la curva corresponde al promedio  $\pm$  EE de tres sub-réplicas.

Cuadro 7.1. Resumen de la actividad biológica dependiente de la dosis del estándar de la oLH y de las isoformas obtenidas de la fracción CM-3ab durante el cromatoenfoco. Los parámetros fueron obtenidos de las curvas no lineales ajustadas para cada hormona. EC<sub>50</sub> dosis obtenida al 50% de la curva ajustada; h, corresponde a la pendiente de Hill y R<sup>2</sup> se refiere al coeficiente de determinación.

Isoformas de oLH								
		Básicas			Neutra	Ácidas		
oLH		A	B	C	D	E	F	G
<b>EC<sub>50</sub></b>	0.8 ± 0.1 <sup>b,c</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.09 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b,c</sup>	3.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b,c</sup>	3.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	ND
<b>h</b>	0.76 <sup>a</sup>	0.69 <sup>a</sup>	1.11 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	0.75 <sup>a</sup>	1.08 <sup>a</sup>	ND
<b>R<sup>2</sup></b>	0.98	0.98	0.97	0.99	0.99	0.98	0.98	ND

Distintas literales entre isoformas indican diferencias (p<0.05).

ND=No determinada.

## **8. EFECTO DE LAS ISOFORMAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE OVINA (OLH) SOBRE LA EXPRESIÓN, SÍNTESIS Y SECRECIÓN DEL VEGF EN EL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE FOLÍCULOS DOMINANTES**

### **8.1 Introducción**

En rumiantes, durante cada ciclo estral se producen varias oleadas de crecimiento folicular (Fortune, 1994). Este proceso se inicia con el reclutamiento de una cohorte o grupo de folículos, dentro de los cuales los folículos que se seleccionaron, mediante mecanismos sólo parcialmente conocidos, continuarán su desarrollo hasta volverse dominantes (Fortune et al., 2001). Una vez que se alcanza esta etapa de desarrollo, el folículo dominante disminuye su dependencia de FSH y, entonces, se vuelve dependiente a la estimulación por parte de la LH (Campbell et al., 2003; Zeleznik, 2004; Fortune et al., 2004; Webb y Campbell, 2007). La LH resulta esencial en esta etapa final del crecimiento folicular, debido a que la expresión de receptores para esta gonadotropina en las células de la granulosa permite que el folículo responda al pico preovulatorio de LH para finalmente concluir con el proceso de ovulación (Hunter et al., 2004; Espinoza-Villavicencio et al., 2007; Uribe-Velásquez et al., 2009).

Adicionalmente, la participación de la LH resulta fundamental durante los eventos de extensión de la vasculatura que acompañan el crecimiento del folículo dominante (Tamanini y De Ambrogi, 2004; Berisha y Schams, 2005; Chowdhury et al., 2010). Estos procesos de extensión de la vasculatura preexistente se denominan angiogénesis y ocurren de forma fisiológica en el ovario. La angiogénesis intrafolicular está regulada en parte por factores de crecimiento, siendo el principal actor, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El VEGF es un homodímero de 45 kDa que en el proceso de corte y empalme de su mRNA da origen a cinco isoformas, siendo la isoforma VEGF<sub>164</sub> la predominante y más estudiada (Park et al., 1993; Ferrara y Davis-Smith, 1997; Kaczmarek et al., 2005). A su vez, la actividad biológica del VEGF depende de la expresión diferencial de los receptores de membrana del tipo tirosina-cinasa; el receptor 2

(VEGF-R2 o KDR) que media su actividad pro-angiogénica, mientras que el receptor 1 (VEGF-R1 o Flt-1) determina su actividad anti-angiogénica (Park et al., 1993; Zimmermann et al., 2003; Ferrara, 2004). A nivel folicular el VEGF participa en la proliferación, la sobrevivencia y los cambios en la permeabilidad del endotelio vascular (Taylor et al., 2007; McFee y Cupp, 2013). En conjunto los eventos mencionados impactan en el aporte sanguíneo al folículo de forma tal que mediante esta irrigación diferencial se proveen los elementos necesarios para asegurar el desarrollo final y el tránsito de folículo dominante a folículo preovulatorio, el cual es necesario para la reproducción de las hembras (Hazzard et al., 2002; Grazul-Bilska et al., 2007; Rocha-Araujo et al., 2011).

Estudios realizados en varias especies han demostrado la participación de la LH en la producción de VEGF. En particular se sabe que en condiciones *in vitro* las células de la granulosa incrementan la expresión y síntesis del VEGF en respuesta al tratamiento con hCG (Lee et al., 1997), LH humana (Guimera et al., 2009) y LH bovina (Babitha et al., 2013; Babitha et al., 2014). Por otra parte, en estudios *in vivo* se ha demostrado el incremento del VEGF en el líquido folicular de folículos dominantes de monos *Rhesus* después de 12 h de haber sido expuestos a la hCG (Hazzard et al., 1999). Por último, en monos marmoset (*Callithrix jacchus*) tratados con un antagonista a GnRH para evitar la secreción preovulatoria de LH, se demostró la reducción en la proliferación de las células endoteliales, un cambio en la densidad vascular y la disminución en la expresión del VEGF en las células granulosas de los folículos preovulatorios (Taylor et al., 2004). Con respecto a los rumiantes, la isoforma predominante de VEGF corresponde al VEGF-A<sub>164</sub> cuya expresión y síntesis se lleva a cabo principalmente en las células de la granulosa de folículos dominantes (Berisha et al., 2000; Greenaway et al., 2004; Chowdhury et al., 2010). En este sentido, en los ovinos se demostró, mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, que la expresión del VEGF en los folículos se incrementa conforme aumenta el diámetro folicular y esto a su vez depende de la etapa del ciclo estral; en particular, durante y después del pico preovulatorio de LH (Chowdhury et al., 2010). Adicionalmente, se ha documentado una asociación positiva con la expresión y síntesis del

receptor tipo 2 del VEGF (Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010). De forma similar, en bovinos con estro sincronizado e hiperestimulados con FSH para posteriormente ser tratados con GnRH se observó que las células de la granulosa de folículos preovulatorios presentaron una mayor expresión del gene para VEGF durante el pico preovulatorio de la LH (Berisha et al., 2008).

A pesar de contar con este cuerpo de evidencias que muestran que la LH está involucrada en la regulación del VEGF dentro de las células de la granulosa de folículos dominantes, en la actualidad se desconoce de forma precisa cual es el efecto que tiene cada grupo de isoformas de la LH sobre la regulación de la expresión y secreción del VEGF. Está claramente documentado que la LH está integrada en una familia de proteínas dependiendo de la estructura de sus oligosacáridos, lo que se refleja en cambios específicos en sus propiedades físico-químicas, biológicas e inmunológicas (Baenziger y Green, 1988; Cooke et al., 1996; Perera-Marín et al., 2007).

Por lo tanto, en el presente capítulo mostramos las evidencias del efecto *in vitro* que tienen las isoformas de la oLH sobre la expresión y la producción de VEGF en células de la granulosa obtenidas de folículos dominantes de ovinos.

## **8.2 Materiales y métodos**

### **8.2.1 Animales y diseño experimental**

Con el propósito de obtener y coleccionar células de la granulosa de folículos preovulatorios antes de la presentación del pico preovulatorio de LH, en cada experimento se utilizaron ovejas de pelo, con una edad de 1 a 3 años de edad y con un peso vivo entre los 40 a 45 kg a las que se les sincronizó el estro de acuerdo al procedimiento descrito por Menchaca (2007) y Ungerfeld y Rubianes (2002). Para ello, cada animal seleccionado recibió por vía i.m. 250 µg de cloprostenol sódico (Celosil® SCHERING-PLOUGH, México) con el objeto de lisis los cuerpos lúteos presentes. Inmediatamente después se colocó el dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR 330 Sheep and Goat, Zoetis, México). Cinco días después, el CIDR se retiró y a las 24 horas del retiro los animales se sacrificaron previa insensibilización con una pistola de perno cautivo.

De cada animal se colectaron los ovarios y se depositaron en un frasco que contenía 100 ml de medio DMEM F-12 frío, suplementado con BSA 0.1% (grado RIA, sigma A-7888) y penicilina-estreptomicina (100 unidades/ 100 µg/ml de medio, EMD Millipore TMS-AB2-C). Dentro de las tres horas posteriores al sacrificio, los ovarios se limpiaron del tejido que los rodea y se conservaron en medio DMEM F-12 fresco.

### *8.2.2 Cultivo primario de células de la granulosa*

Para establecer el cultivo primario de células de la granulosa únicamente se utilizaron folículos preovulatorios, los cuales se caracterizaron por presentar un diámetro de 4 a 7 mm, una pared bien vascularizada, líquido folicular color ámbar y sin desprendimiento de las células de la granulosa. Previo a la obtención de las células de la granulosa cada folículo se aspiró con una jeringa de 1 ml (27G x 13 mm; 0.40mm X1/2") y el líquido folicular se almacenó a -20°C hasta la determinación de su concentración de estradiol, progesterona y VEGF.

Una vez concluido este procedimiento, los folículos se depositaron en una placa de cultivo (60 mm, Corning®) que contenía solución de Hank con bicarbonato, libre de calcio y magnesio (Sigma-aldrich, Cat # H2387-1L). La solución se suplementó con BSA 0.1% (grado RIA, sigma A-7888) y penicilina/estreptomicina (100 unidades/ 100 µg/ml de medio, EMD Millipore TMS-AB2-C). Las células de la granulosa se obtuvieron a partir del raspado de la pared interna de los folículos hemidisectados (raspador, Fisher Scientific, Cat # 08-773-2). Una vez separadas, las células de la granulosa se conservaron en la solución de Hank para evitar su aglutinación. Al final de este paso la suspensión celular se centrifugó (1000 rpm/10 min/20°C) y el sobrenadante se desechó. El botón celular se resuspendió en medio McCoy's 5A libre de suero, suplementado con L-glutamina, 25mM de HEPES (Gibco®), BSA 0.1% (Sigma A-7888), transferrina 2.5 µg/ml, insulina 100 ng/ml, bicarbonato de sodio, 1.06 mg/ml, selenito de sodio 5 ng/ml y penicilina/estreptomicina (100 unidades/ 100 µg/ml, EMD Millipore TMS-AB2-C). Previo al conteo celular, las células en suspensión se lavaron nuevamente con el mismo medio y se centrifugaron en las mismas condiciones ya descritas. Una vez limpio el botón celular, este se resuspendió en McCoy's 5A y se

tomó un volumen de 10  $\mu$ l a partir del cual se determinó la viabilidad celular aplicando el colorante vital azul de tripano (Luque y Herráez, 2006); en todos los casos se obtuvieron valores cercanos al 95% de viabilidad.

### 8.2.3 Efecto del trilostano en la producción de VEGF

Para evaluar el efecto directo de la oLH y sus isoformas sobre la producción de VEGF en células de la granulosa o si ésta era mediada por la síntesis de progesterona, se inhibió de forma competitiva a la enzima  $3\beta$ HD, la cual se encarga de convertir a la pregnenolona en progesterona o de dehidroepiandrosterona a androstenediona (Miller, 2009). Para lo anterior se utilizó al trilostano (Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc-208469), el cual es un análogo sintético de las hormonas esteroides (Lee et al., 1997).

Las células de la granulosa en suspensión se sembraron en placas de 48 pozos (Costar®). Cada pozo recibió una densidad de  $1 \times 10^5$  células en un volumen de 500  $\mu$ l del medio McCoy's 5A. Las células se incubaron a 37°C en un atmosfera con el 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire durante 4 h. Al final de este período, a cada pozo se le retiró un volumen de 450  $\mu$ l del medio y se reemplazó con medio fresco conteniendo 0.1, 1, 10 ó 100 ng/ml de LH inmunoreactiva del estándar (NIDDK-oLH-I-2) o de la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02), neutra (D, pH, 7.73-6.98) o ácida (F, pH, 5.98-3.65) en presencia o ausencia de 250 ng/ml de trilostano (Lee et al., 1997). Veinticuatro horas después, el medio de cultivo de cada pozo se retiró y se almacenó a -20°C hasta la determinación de la concentración de VEGF. La células presentes en cada pozo se lavaron con PBS 0.01M, pH 7.4 e inmediatamente después se les determinó el porcentaje de sobrevivencia (Cabezas-Pérez et al., 2011). Para lo anterior, después de que se retiró el medio de cultivo, y con las células ya lavadas, se colocó un volumen de 100  $\mu$ l de medio que contenía 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de bromuro de 3-4,5 dimetil-2-tiazolil-2,5--difeniltetrazólico (MTT, Sigma Aldrich, USA). Doce horas después se retiró el medio con MTT y se colocaron 100  $\mu$ l de dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, USA), el cual permaneció durante 15 min previo a la lectura a 630 nm. En este

ensayo se consideraron cuatro réplicas por tratamiento. Los tratamientos y las réplicas se distribuyeron al azar en la placa de cultivo.

#### *8.2.4 Efecto de las isoformas de la oLH en la producción de VEGF en células de la granulosa no luteinizadas*

Para el análisis del efecto de la oLH y sus isoformas en células de la granulosa no luteinizadas se diseñó un esquema similar al previamente descrito. En breve, se sembraron las células de la granulosa en placas de 48 pozos (Costar®). Cada pozo recibió una densidad de  $1 \times 10^5$  de células en un volumen 500  $\mu$ l de medio McCoy's 5A. Las células se incubaron a 37°C en un atmosfera con el 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire durante 4 h; al término, a cada pozo se le retiró un volumen de 450  $\mu$ l de medio y se reemplazó con medio fresco que contenía 1, 10 ó 100 ng/ml de oLH inmunoreactiva del estándar (NIDDK-oLH-I-2) o de las isoformas B, D, o F. Veinticuatro horas después, el medio de cultivo de cada pozo se retiró y se almacenó a -20°C hasta la determinación de VEGF y progesterona. Las células presentes en cada pozo se lavaron con PBS 0.01M, pH 7.4 e inmediatamente se conservaron en congelación (-70°C) hasta su análisis. Para la medición de la producción de VEGF por las células de la granulosa se realizaron tres experimentos independientes; en cada experimento se realizaron cuatro réplicas por dosis. Los tratamientos y las réplicas se distribuyeron al azar en la placa de cultivo.

#### *8.2.5 Efecto de las isoformas de la oLH en la producción de VEGF en células de la granulosa luteinizadas de forma espontánea*

El efecto de la oLH y sus isoformas sobre la producción de VEGF en células de la granulosa luteinizadas de forma espontánea se determinó aplicando el mismo diseño de las células de la granulosa no luteinizadas. La diferencia consistió en que las células de la granulosa se luteinizaron de forma espontánea mediante un proceso de agitación constante de acuerdo a lo reportado previamente [revisado por (Murphy, 2000)]. La concentración de progesterona en el medio de cultivo se consideró el criterio para determinar que las células de la granulosa se

encontraban luteinizadas. Para la medición de la producción de VEGF por las células de la granulosa se realizó un solo experimento en el cual se probaron las tres dosis de oLH (1, 10 y 100 ng/ml) con cuatro réplicas por dosis.

#### *8.2.6 Análisis de expresión del VEGF*

El análisis de la expresión del gene del VEGF en las células de la granulosa se llevó a cabo en las células conservadas después del tratamiento con la oLH o sus isoformas. Así mismo, la expresión del VEGF se analizó en muestras de cuerpo lúteo ovino obtenidas de los ovarios de las hembras sincronizadas. Dichos cuerpos lúteos sirvieron como control positivo para la evaluación.

##### *8.2.6.1 Obtención del RNA*

Las placas de cultivo de 48 pozos conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , así como el tejido luteal se descongelaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . De cada pozo y de la muestra (32 mg) se extrajo el RNA total de acuerdo al procedimiento descrito previamente (Chomczynski y Sacchi, 1987). Tanto el vial que contenía el tejido luteal como los pozos de cada placa recibieron un volumen de 500  $\mu\text{l}$  del reactivo trizol (Invitrogen, cat. 50300416). Después de mezclar vigorosamente, el homogeneizado celular se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml que recibió 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo (grado biología molecular, 99 % Sigma, cat C2432). Después de ser agitados vigorosamente, cada tubo se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y después se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase superior acuosa (incolora) se recuperó y se colocó en un tubo eppendorf que recibió 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol (con el fin de precipitar el RNA en cada tubo) y la mezcla se agitó manualmente y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se decantó y el precipitado se lavó por duplicado con 1 ml de etanol al 75 % (grado biología molecular). Entre cada lavado el tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Una vez concluido este paso, cada tubo se dejó secando durante dos horas. Finalmente, el RNA precipitado se resuspendió en 15  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAasa y la muestra se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### 8.2.6.2 *Cuantificación del RNA y retrotranscripción*

La cantidad de RNA en cada una de las muestras extraídas se determinó por el método de absorbancia en la región ultravioleta. Para ello, un  $\mu\text{l}$  de la muestra se colocó en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) y se realizó su lectura correspondiente, utilizando como blanco al agua libre de RNAasa (SIGMA, cat. D5758).

Una vez obtenido el RNA de cada pozo, se procedió a convertir a DNA complementario (cDNA). Con el fin de obtener una mayor expresión del gene, la reacción de síntesis de cDNA se realizó en dos pasos en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . El primer paso consistió en incubar a 70°C durante 5 minutos una solución que contenía 5  $\mu\text{l}$  de RNA, 2  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido para  $\beta$ -actina reversa (cuadro 8.1) a una concentración de 100 pmol, 2  $\mu\text{l}$  del primer VEGF reversa (cuadro 8.1) a la misma concentración y 2  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAasa. Al término de este tiempo, se inició el segundo paso, que consistió en la adición de un volumen de nueve  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía: cuatro  $\mu\text{l}$  de amortiguador de la transcriptasa reversa (1X, BIOTECMOL cat. AP002), dos  $\mu\text{l}$  de dNTPs (0.5 mM/ $\mu\text{l}$ , Fermentas, cat. R0192), 0.5  $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNAasa (40 U/ $\mu\text{l}$ , Thermo Scientific, cat. EO0381), un  $\mu\text{l}$  de transcriptasa reversa (200 U/ $\mu\text{l}$ , PROMEGA, cat. M1708) y 1.5  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAasa; este paso se realizó a 4°C durante 5 min. Una vez concluidos ambos pasos, se procedió a calentar la mezcla de la reacción a 37°C durante 5 min y enseguida el tubo de reacción se incubó siguiendo el patrón: 60 minutos a 42°C, seguidos de 10 minutos a 70°C y finalmente una disminución de la temperatura a 4°C, hasta el retiro de la muestra del termociclador. El producto final de la reacción se conservó a -20°C hasta su análisis en la PCR en tiempo real.

#### 8.2.6.3 *PCR en tiempo real*

Una vez obtenido el cDNA de cada pozo y de la muestra de cuerpo lúteo se cuantificó la expresión del VEGF y  $\beta$ -Actina (gene constitutivo) a través de una PCR cuantitativa. Para el análisis del cuerpo lúteo ovino, el cDNA se diluyó desde

1:20 hasta 1:320; mientras que para el extracto de células de la granulosa se utilizó un volumen directo de cinco  $\mu\text{l}$  del cDNA. El Cuadro 8.1 nos muestra los componentes de cada tubo de reacción.

Cuadro 8.1. Componentes de la reacción para la PCR en tiempo real

Reactivo	Solución Stock	Solución Final	Volumen por Reacción ( $\mu\text{l}$ )
Agua	-----	20 $\mu\text{l}$	1.4
Amortiguador-Taq	10X	1X	2.0
dNTP's	2mM	0.2mM	2.0
MgCl <sub>2</sub>	30mM	3.0mM	2.0
Iniciadores F+R			
VEGF 164F	10 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	1.0
VEGF 164R			
Sonda VEGF 164P	10 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$	0.2
Iniciadores F+R			
ACT2-1030-F	10 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	1.0
ACT-1135-R			
Sonda ACT-1081P	10 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$	0.2
Taq polimerasa	5 U/ $\mu\text{l}$	1U	0.2
cDNA	-----	-----	10.0

Para la reacción se utilizó el cDNA del cuerpo lúteo ovino. Para ello, se realizaron diferentes diluciones del cDNA, que correspondió a 1:10, 1:20, 1:40; 1:80; 1:160; 1:320. En cada caso se analizaron las sondas Taqman para VEGF y  $\beta$ -actina. El Cuadro 8.2 muestra los oligonucleótidos y las sondas para ambos genes. El esquema de expresión de cada gene durante 40 ciclos correspondió a un primer paso de 95°C durante 15 seg, seguido de 60°C durante 45 seg.

Este procedimiento se realizó con el termociclador de tiempo real marca Corbett (5 plex Rotor-gene 6000 Qiagen). El análisis de resultados se realizó con el programa integrado al equipo (Rotor Gene Q series software 2.1.0).

Cuadro 8.2. Los oligonucleótidos y las sondas utilizadas para la PCR- tiempo real

Gene	Gene Bank	Sentido	Secuencia	Amplicón
VEGF 164	AF071015	Forward	AGATTATGCGGATCAAACCTCATCCCA	118 pb
		Reverse	CA	
		Sonda	GGGATTTTCTTGCCTT	
ACT1030		Forward	CAGCATAGCAAATGTGAATGCAGACCA AA	146 pb
ACT-1135	Reverse	AGCGCAAGTACTCCGTGTG		
ACT-1081	Sonda	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT		
			TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT	

#### 8.2.6.4 Análisis de muestras

El cDNA de las muestras de las células de la granulosa se obtuvo a partir de 100 ng de RNA. El cDNA se analizó en un volumen de 5 µl para cada muestra y se sometió al análisis por PCR en tiempo real bajo las condiciones establecidas. El cDNA de las muestras de cuerpo lúteo se obtuvo a partir de 4.4 µg de RNA total. A partir del cDNA se realizaron diluciones seriadas de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320.

La expresión del VEGF y  $\beta$ -actina por PCR en tiempo real se analizó midiendo la cantidad de fluorescencia generada en el número del ciclo de la reacción que resultó proporcional al aumento de DNA (Tamay de Dios et al., 2013).

### *8.2.7 Cuantificación de estradiol, progesterona y VEGF*

La determinación de VEGF se realizó en el líquido folicular y en el medio de cultivo recuperado después de cada ensayo. Para ello, se utilizó un ELISA comercial (PeproTech® Human VEGF cat 900 K-10) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de estradiol y progesterona se determinó en el líquido folicular, mientras que en el medio de cultivo únicamente se midió progesterona. En ambos casos se utilizó el radioinmunoensayo (RIA) comercial en fase sólida (Coat-A-Count, Siemens, Los Ángeles, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo para VEGF fue de 4.0 pg/ml, para el estradiol de 0.1 pg/ml y para progesterona de 0.1 ng/ml. En todos los sistemas, el coeficiente de variación intraensayo fue menor del 10%. Para el análisis del líquido folicular fue necesario realizar una dilución de 1:100 con PBS 0.1M, pH 7.2.

### *8.2.8 Análisis estadístico*

Se utilizó ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias significativas en la concentración de estradiol, progesterona y VEGF en el líquido folicular de los folículos preovulatorios utilizados para establecer el cultivo primario de células de la granulosa. Además, también se utilizó esta prueba para comparar el diámetro de los folículos preovulatorios evaluados en cada repetición del cultivo.

El efecto del trilostano sobre la sobrevivencia de las células cultivadas se comparó mediante ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. De igual forma, esta prueba estadística se utilizó para comparar la producción de progesterona y VEGF en el sobrenadante del cultivo de células de la granulosa expuestas a diferentes concentraciones de las isoformas de la oLH. En el modelo se incluyeron como factores principales el tipo de oLH (estándar o isoforma B, D, o F) y la dosis utilizada (0, 1, 10 ó 100 ng/ml). Esta serie de análisis se realizaron para los cultivos de células de la granulosa no luteinizadas y luteinizadas de forma espontánea.

Los análisis y las gráficas se realizaron con el paquete estadístico Prism 6.0 (GraphPad, Software, California, USA). En todos los casos se consideró un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

### **8.3 Resultados**

Los folículos seleccionados para la realización de este estudio mostraron un diámetro promedio de  $5.37 \pm 0.17$  mm, cuya concentración de estradiol, progesterona y VEGF en el líquido folicular correspondió a  $1.77 \pm 0.23$  ng/ml,  $0.28 \pm 0.04$  ng/ml y  $82.90 \pm 6.18$  pg/ml, respectivamente. La relación E/P en todos los ensayos fue  $>1$  y varió entre 4.94 a 8.77, lo que indicó folículos estrogénicamente activos. En el Cuadro 3 se presenta un resumen de los parámetros obtenidos de tres ensayos independientes.

#### *8.3.1 Porcentaje de sobrevivencia y secreción de VEGF por las células de la granulosa cultivadas con o sin trilostano*

La presencia de trilostano en el cultivo de las células de la granulosa se asoció a una disminución significativa del porcentaje de sobrevivencia de las células (Fig. 8.1;  $p < 0.05$ ). Este resultado se presentó de forma consistente tanto en el estándar como en las isoformas y sus dosis correspondientes. En general, el cultivo en presencia de trilostano disminuyó la sobrevivencia de las células entre 75-85%.

Por su parte, en presencia de trilostano la producción de VEGF resultó similar entre las distintas dosis de la oLH y el grupo no tratado (Fig. 8.2;  $p > 0.05$ ). Este resultado se presentó de forma consistente tanto en la oLH estándar, así como en el resto de las isoformas. Con respecto a la producción de VEGF en las células de la granulosa cultivadas sin trilostano, en la oLH estándar y las isoformas, excepto la isoforma ácida, se encontró que las dosis de 0.1, 1.0 y 100 ng/ml no incrementaron la producción de VEGF cuando se compararon con el grupo no tratado (Fig. 8.2). Por el contrario, únicamente la dosis de 10 ng/ml aumentó de forma significativa la producción de VEGF en la oLH estándar, la isoforma básica y la neutra (Fig. 8.2). Finalmente, en la Figura 8.3 se presenta un

análisis comparativo de la producción de VEGF por parte de las células de la granulosa cultivadas con o sin trilostano que recibieron la dosis de 10 ng/ml de la gonadotropina mostró cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en la producción de VEGF entre grupos cuando se utilizó la oLH estándar o la isoforma básica o la neutra. En contraste, la isoforma ácida no presentó cambios ( $p > 0.05$ ) en la producción de VEGF con o sin trilostano.

### *8.3.2 Secreción de VEGF y progesterona en el cultivo de células de la granulosa luteinizadas de forma espontánea*

La producción de VEGF en el cultivo primario con células de la granulosa luteinizadas se presenta en la Figura 8.4. En esta condición, el patrón de respuesta varió con cada oLH. Con el estándar y la isoforma ácida (F), la máxima producción se presentó a 100 ng/ml, mientras que en la isoforma básica (B) y neutra (D) la mayor producción se presentó a la dosis de 10 ng/ml. Al comparar la producción de VEGF entre el control (0 ng/ml) y las dosis de cada isoforma, sólo se encontraron diferencias en la dosis de 10 ng de la isoforma neutra. Además cuando se compararon las dosis de la oLH estándar y las dosis de las distintas isoformas se demostró que únicamente en la dosis de 10 ng de la oLH estándar y la isoforma neutra, la producción de VEGF fue distinta (Fig. 8.4;  $p < 0.05$ ).

La secreción de progesterona en el cultivo primario de células de la granulosa luteinizadas y tratadas con diferentes dosis de oLH mostró una respuesta dependiente de la dosis, así como de la isoforma empleada (Cuadro 8.4). El estándar y la isoforma ácida a las dosis de 10 y 100 ng/ml generaron una producción de progesterona mayor que a la dosis de 0 ng/ml ( $p < 0.05$ ), en tanto que en la isoforma básica y la neutra esta diferencia se encontró con la dosis de 100 ng/ml (Cuadro 8.4). Al comparar la respuesta entre dosis del estándar y las dosis de cada isoforma no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ).

### 8.3.3 *Secreción de VEGF y progesterona en el cultivo de células de la granulosa no luteinizadas*

La producción de VEGF en el cultivo primario de células de la granulosa no luteinizadas y expuestas a diferentes dosis de oLH se presenta en la Figura 8.5. Los resultados mostraron que en la oLH estándar y en la isoforma básica y neutra se presentó un patrón de respuesta dependiente de la dosis en el rango de 0 a 10 ng/ml. Al comparar la producción de VEGF por dosis para cada isoforma y la oLH estándar se observó que la mayor producción ( $p < 0.05$ ) de VEGF se generó en el estándar a las dosis de 10 y 100 ng/ml. En contraste, en la isoforma básica y neutra esta diferencia se presentó únicamente a los 10 ng/ml. De forma contrastante, en la isoforma ácida no se presentaron diferencias en la producción de VEGF entre las dosis ensayadas (Fig. 8.5;  $p > 0.05$ ).

Por otra parte, la comparación de la producción de VEGF entre las dosis de cada isoforma con respecto a la oLH estándar nos indicó una respuesta similar entre el estándar y la isoforma básica ( $p > 0.05$ ). Con respecto a la isoforma neutra, la dosis de 100 ng/ml del estándar provocó una mayor producción de VEGF ( $p < 0.05$ ). Finalmente, la oLH estándar produjo concentraciones de VEGF mayores a las dosis de 10 y 100 ng/ml al ser comparadas contra la isoforma ácida.

La concentración de progesterona secretada por las células de la granulosa al medio de cultivo después del tratamiento con dosis crecientes del estándar o de las distintas isoformas de la oLH resultó similar en cada dosis y en cada isoforma (Cuadro 8.5;  $p > 0.05$ ).

### 8.3.4 *Experimentos de expresión del VEGF*

La expresión del gene para Actina y VEGF en el cuerpo lúteo se ejemplifica en la Figura 8.6. En la cual se observa un incremento en el número de ciclos (CT) de la expresión de cada gene dependiente de la dilución del cDNA. Así mismo, se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia con el número de ciclos desarrollados (Fig. 8.6 paneles I, II y III).

Una vez desarrollado el sistema de PCR en tiempo real con el cuerpo lúteo se procedió a determinar la expresión de VEGF y  $\beta$ -actina en la muestras de

cDNA obtenidas a partir del RNA extraído de cada grupo de células de la granulosa tratadas con distintas concentraciones de LH y o sus isoformas. Con este material no se pudo determinar el patrón y cantidad de expresión de VEGF y  $\beta$ -actina.

#### **8.4 Discusión**

La función regulatoria que ejerce la LH sobre la expresión y síntesis de VEGF en células de la granulosa de folículos dominantes está documentada (Christenson y Stouffer, 1997; Martínez-Chequer et al., 2003; Babitha et al., 2013; Babitha et al., 2014), sin embargo, en este grupo de estudios no se determinó el cambio en la producción de VEGF asociada con isoformas de la LH.

En este capítulo, nuestros resultados mostraron, que las isoformas de la oLH aisladas de la adenohipófisis resultaron biológicamente activas, con una respuesta diferenciada entre isoformas sobre la producción de VEGF en cultivos primarios de células de la granulosa de folículos dominantes de ovino.

Específicamente, la isoforma de tipo básico generó la mayor producción de VEGF, mientras que la isoforma ácida presentó la menor respuesta. Este resultado sugiere una asociación directa entre la actividad biológica y el punto isoeléctrico de cada isoforma (Castro-Fernandez et al., 2000). A este respecto, nuestras observaciones coincidieron con estudios que utilizando células de Leydig de rata, en las cuales la isoforma básica mostró el mayor efecto biológico con respecto al grupo de isoformas ácidas (Robertson y Diczfalusy, 1977; Hattori et al., 1983; Burgon et al., 1997). Con base en ello y bajo las condiciones del estudio *in vitro* ensayadas, la isoforma básica de la LH se considera la de mayor actividad biológica.

El mecanismo por el cual se generó esta diferencia biológica entre isoformas de carga de la oLH no está del todo conocido. Sin embargo, se ha demostrado que el patrón de glicosilación y el contenido de sulfato y ácido siálico de cada isoforma interviene en la biopotencia (Baenziger y Green, 1988). La remoción del 80% de los oligosacáridos que integran a la oLH conducen a una disminución significativa en la producción de testosterona, progesterona y AMPc (Sairam y

Schiller, 1979; Sairam, 1990), adicionalmente, la eliminación del contenido de ácido siálico (Burgon et al., 1996) o sulfato (Baenzinger et al., 1992) en la estructura del oligosacáridos de la LH muestran una disminución en la vida media circulante de la hormona (Burgon et al., 1996), debido al cambio en la afinidad de la hormona por su receptor asialoglicoprotéico presente en el hígado (Fiete et al., 1991; Creus et al., 2001). Adicionalmente, las modificaciones post-traduccionales que dan origen a las propiedades fisicoquímicas de cada isoforma y que definen su asociación específica al receptor y subyacen la traducción de la señal (Nakamura et al., 1993; Sairam et al., 1994), son en conjunto eventos que impactan en su respuesta biológica. Por lo tanto, el resultado que indicó que la isoforma básica y el estándar de referencia estimularon en las células una mayor producción de VEGF, se podría entender como un efecto positivo entre la LH y el receptor, como se ha reportado en la producción de AMPc y la expresión del gene para VEGF en células de la granulosa bovina después del tratamiento con la LH (Garrido et al., 1993).

Estudios previos han descrito un efecto directo de la progesterona y el estradiol sobre la secreción del VEGF en células de la granulosa bovinas (Shimizu y Miyamoto, 2007). Sin embargo, el grueso de la información se ha encaminado al análisis de la participación de las gonadotropinas sobre la producción de VEGF. Con base en ello, y tratando de analizar el efecto directo de la LH sobre la producción de VEGF, en este estudio, se bloqueó la vía esteroidogénica con el inhibidor competitivo de la enzima 3 $\beta$ HSD, trilostano (TRL), cuyo resultado mostró un efecto negativo en la sobrevivencia de la células de la granulosa. Aunque diversos estudios han demostrado que el TRL no es tóxico (Duffy et al., 1996), incluso tiene un efecto dosis dependiente y es reversible, en nuestro estudio la dosis de 250 ng/ml no resultó favorable debido posiblemente a la falta de precursores esteroidogénicos. A este respecto Duffy et al. (1996) analizaron en células de la granulosa luteinizadas la misma dosis de TRL en presencia de lipoproteínas de baja densidad y demuestran solo una disminución del 90% de la secreción de progesterona sin afectar el porcentaje de sobrevivencia de las células de la granulosa.

Debido a la disminución drástica en el porcentaje de sobrevivencia de las CG en este estudio no se determinó la concentración de P<sub>4</sub> después del tratamiento. Únicamente se analizó la concentración de VEGF en el medio de cultivo y los resultados indicaron una falta de respuesta dosis-dependiente en la producción de VEGF por parte de las células de la granulosa expuestas a TRL. En contraste, las CG que no recibieron TRL, demostraron un efecto dosis dependiente desde 10 a 100 ng de LH. Esta discrepancia en los resultados puede estar asociada directamente con la baja sobrevivencia de las células de la granulosa.

Un resultado interesante correspondió a la disminución significativa de la producción de VEGF por las CG en presencia de TRL a la dosis de 10 ng/ml y que en el grupo de TRL ninguna de las dosis de las isoformas analizadas tuvo una producción de VEGF diferente al testigo. Aunque este resultado sugiere que la producción de VEGF no depende de hormonas esteroides, no podemos concluir esta información con un solo estudio, por lo que es necesario realizar una serie de estudios enfocados a conocer la dosis de TRL que no afecte la sobrevivencia de la CG, tiempo de exposición del inhibidor y adicional al medio de cultivo un sustrato esteroideogénico; una vez establecidos estos parámetros, se obtendrá una mejor evaluación biológica de cada isoforma en presencia o ausencia de TRL.

Nuestros resultados confirmaron que la producción de VEGF por parte de las células de la granulosa está afectada no sólo por el tipo específico de isoforma, sino también por el estado de luteinización de las células, el cual se asocia a una capacidad diferencial para producir progesterona. De esta forma, se encontró que en las células de la granulosa no luteinizadas siempre produjeron concentraciones consistentemente bajas de progesterona (< 0.25 ng/ml) con cada dosis de isoforma, no así, la producción de VEGF que fue distinta entre dosis de cada isoforma. En contraste, las células de la granulosa luteinizadas presentaron un patrón de secreción de progesterona dosis-dependiente, cuyas concentraciones oscilaron entre los 1.88 y 3.74 ng/ml. Bajo estas condiciones de luteinización celular, la LH de referencia y la isoforma de tipo ácido de la oLH mostraron un patrón similar en la producción de progesterona, mientras que en su producción de VEGF no se encontraron diferencias entre dosis para cada isoforma. Esta

diferencia en respuesta de VEGF durante la luteinización de las células podría ser establecida por la presencia de progesterona endógena que pudiera interferir en la síntesis del VEGF (Shimizu y Miyamoto, 2007).

El efecto de la estimulación directa de la LH en la regulación de la expresión de VEGF se ha demostrado en cultivo primario de las células de la granulosa de folículos dominantes con o sin exposición al pico preovulatorio de LH en bovinos (Babitha et al., 2014), primates no humanos (Christenson y Stouffer, 1997; Hazzard et al., 1999; Martínez-Chequer et al., 2003) y humanos (Guimerá et al., 2009) con resultados en todos los casos positivos sobre la producción de VEGF en respuesta a esta gonadotropina, cuyos resultados de este estudio lo confirmaron más aún se extendió para las distintas isoformas ensayadas.

Los resultados del presente estudio apoyan la idea de un efecto directo de la LH en la regulación del VEGF, dado que: 1) Las células de la granulosa utilizadas para el cultivo primario se obtuvieron de folículos dominantes estrogénicamente activos no expuestos a un pico preovulatorio de LH (células no luteinizadas); 2) Se utilizó un medio de cultivo libre de suero fetal bovino, sin un suplemento de sustratos de la vía esteroidogénica; y 3) Se analizó la respuesta de la hormona en un tiempo corto de exposición (24 h), con lo cual se aseguró que las células no se luteinizarán e incrementarán su producción de progesterona. Por lo tanto este conjunto de factores sugieren que el cambio en la producción de VEGF por las células de la granulosa ovina se puede atribuir de forma específica al tratamiento con las isoformas de la oLH y que no existió un efecto enmascarado por las hormonas esteroideas.

Por último, estudios previos han demostrado que existe un incremento en la síntesis y expresión del VEGF en la fase folicular y el inicio de la fase lútea (Fraser y Wulff, 2001; Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010; Babitha et al., 2013), los cuales son eventos fisiológicos regulados en parte por la LH. En consecuencia, nuestra serie de resultados que demuestran un efecto diferencial en la actividad biológica entre isoformas de la oLH sobre la producción de VEGF por las células de la granulosa puede tener implicaciones fisiológicas, ello debido a que durante la fase folicular cuando se incrementa la presencia de isoformas ácidas y neutras en

circulación (Rojas-Maya et al., 2007) lo que implica un cambio finamente regulado en la angiogénesis folicular.

Aunque se estandarizó el sistema de análisis de expresión del VEGF por PCR en tiempo real con extractos de cuerpo lúteo, no se logró analizar la expresión de este factor de crecimiento en extractos de células de la granulosa colectadas después del tratamiento con las distintas isoformas de la oLH, debido posiblemente a la poca cantidad RNA total recuperado a partir de 100,000 células, adicionalmente el RNA obtenido de cada tratamiento permaneció durante un periodo de seis meses en congelación, lo que pudo ser un factor para su degradación.

## **8.5 Conclusión**

El protocolo de sincronización corto de estro en la oveja de pelo permitió colectar folículos dominantes, previo al pico preovulatorio de LH. De estos folículos se obtuvieron las células de la granulosa para el cultivo primario. El patrón de secreción de VEGF se ve modificado en presencia de progesterona. La inhibición de la vía esteroidogénica con trilostano afectó el porcentaje de sobrevivencia de las células de la granulosa. Finalmente la isoforma básica, así como la LH de referencia generaron una mayor producción de VEGF cuando se comparó con su contraparte ácida y neutra, todo ello en células de la granulosa no luteinizadas.

## 8.6 Referencias

BABITHA, V., PANDA, R. P., YADAV, V. P., CHOUHAN, V. S., DANGI, S. S., KHAN, F. A., SINGH, G., BAG, S., TARU SHARMA, G., SILVIA, W. J. & SARKAR, M. 2013. Amount of mRNA and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the ovarian follicle during estrous cycle of water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci*, 137, 163-76.

BABITHA, V., YADAV, V. P., CHOUHAN, V. S., HYDER, I., DANGI, S. S., GUPTA, M., KHAN, F. A., TARU SHARMA, G. & SARKAR, M. 2014. Luteinizing hormone, insulin like growth factor-1, and epidermal growth factor stimulate vascular endothelial growth factor production in cultured bubaline granulosa cells. *Gen Comp Endocrinol*, 198, 1-12.

BAENZIGER, J. U. & GREEN, E. D. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*, 947, 287-306.

BAENZIGER, J. U., KUMAR, S., BRODBECK, R. M., SMITH, P. L. & BERANEK, M. C. 1992. Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 334-8.

BERISHA, B., SCHAMS, D., KOSMANN, M., AMSELGRUBER, W. & EINSPANIER, R. 2000. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol*, 167, 371-82.

BERISHA, B. & SCHAMS, D. 2005. Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol*, 29, 305-17.

BERISHA, B., STEFFL, M., WELTER, H., KLIEM, H., MEYER, H. H., SCHAMS, D. & AMSELGRUBER, W. 2008. Effect of the luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. *Reprod Fertil Dev*, 20, 258-68.

BURGON, P. G., STANTON, P. G. & ROBERTSON, D. M. 1996. *In vivo* bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology*, 137, 4827-36.

BURGON, P. G., STANTON, P. G., PETTERSSON, K. & ROBERTSON, D. M. 1997. Effect of desialylation of highly purified isoforms of human luteinizing hormone on their bioactivity *in vitro*, radioreceptor activity and immunoactivity. *Reprod Fertil Dev*, 9, 501-8.

CABEZAS-PÉREZ, R., VALLEJO-PULIDO, A. F., FREYRE-BERNAL, S. I., UMAÑA-PÉREZ, A. & SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. 2011. IGF-II y la gonadotropina coriónica regulan la proliferación, migración e invasión de células de trofoblasto humano. *Acta Biológica Colombiana*, 16.

CAMPBELL, B. K., SOUZA, C., GONG, J., WEBB, R., KENDALL, N., MARSTERS, P., ROBINSON, G., MITCHELL, A., TELFER, E. E. & BAIRD, D. T. 2003. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl*, 61, 429-43.

CASTRO-FERNANDEZ, C., OLIVARES, A., SODERLUND, D., LOPEZ-ALVARENGA, J. C., ZAMBRANO, E., VELDHUIS, J. D., ULLOA-AGUIRRE, A. & MENDEZ, J. P. 2000. A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4603-10.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.

CHOWDHURY, M. W., SCARAMUZZI, R. J., WHEELER-JONES, C. P. & KHALID, M. 2010. The expression of angiogenic growth factors and their receptors in ovarian follicles throughout the estrous cycle in the ewe. *Theriogenology*, 73, 856-72.

CHRISTENSON, L. K. & STOUFFER, R. L. 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 2135-42.

COOKE, D. J., CROWE, M. A., ROCHE, J. F. & HEADON, D. R. 1996. Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 41, 77-99.

CREUS, S., CHAIA, Z., PELLIZZARI, E. H., CIGORRAGA, S. B., ULLOA-AGUIRRE, A. & CAMPO, S. 2001. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol Cell Endocrinol*, 174, 41-9.

DUFFY, D. M., MOLSKNESS, T. A. & STOUFFER, R. L. 1996. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in luteinized granulosa cells of rhesus monkeys are regulated in vitro by gonadotropins and steroids. *Biol Reprod*, 54, 888-95.

ESPINOZA-VILLAVICENCIO, J. L., ORTEGA, P. R., PALACIOS, E. A., VALENCIA, M. J. & ARÉCHIGA, F. C. F. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*, 32, 93-9.

FERRARA, N. & DAVIS-SMYTH, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4-25.

FERRARA, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611.

FIETE, D., SRIVASTAVA, V., HINDSGAUL, O. & BAENZIGER, J. U. 1991. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO<sub>4</sub>-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell*, 67, 1103-10.

FORTUNE, J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, 50, 225-32.

FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M., EVANS, A. C. & TURZILLO, A. M. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*, 65, 648-54.

FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M. & YANG, M. Y. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 109-26.

FRASER, H. M. & WULFF, C. 2001. Angiogenesis in the primate ovary. *Reprod Fertil Dev*, 13, 557-66.

GARRIDO, C., SAULE, S. & GOSPODAROWICZ, D. 1993. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors*, 8, 109-17.

GRAZUL-BILSKA, A. T., NAVANUKRAW, C., JOHNSON, M. L., VONNAHME, K. A., FORD, S. P., REYNOLDS, L. P. & REDMER, D. A. 2007. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J Anim Sci*, 85, 1914-22.

GREENAWAY, J., CONNOR, K., PEDERSEN, H. G., COOMBER, B. L., LAMARRE, J. & PETRIK, J. 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*, 145, 2896-905.

GUIMERA, M., MORALES-RUIZ, M., JIMENEZ, W. & BALASCH, J. 2009. LH/HCG stimulation of VEGF and adrenomedullin production by follicular fluid macrophages and luteinized granulosa cells. *Reprod Biomed Online*, 18, 743-9.

HAZZARD, T. M., MOLSKNESS, T. A., CHAFFIN, C. L. & STOUFFER, R. L. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod*, 5, 1115-21.

HAZZARD, T. M., XU, F. & STOUFFER, R. L. 2002. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod*, 67, 1305-12.

HATTORI, M., SAKAMOTO, K. & WAKABAYASHI, K. 1983. The presence of LH components having different ratios of bioactivity to immunoreactivity in the rat pituitary glands. *Endocrinol Jpn*, 30, 289-96.

HUNTER, M. G., ROBINSON, R. S., MANN, G. E. & WEBB, R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 461-77.

KACZMAREK, M. M., SCHAMS, D. & ZIECIK, A. J. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod Biol*, 5, 111-36.

LEE, A., CHRISTENSON, L. K., PATTON, P. E., BURRY, K. A. & STOUFFER, R. L. 1997. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum Reprod*, 12, 2756-61.

LUQUE, C. J. & HERRÁEZ, S. A. 2006. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*, Madrid, España, MMI Elsevier.

MANZELLA, S. M., HOOPER, L. V. & BAENZIGER, J. U. 1996. Oligosaccharides containing beta 1,4-linked N-acetylgalactosamine, a paradigm for protein-specific glycosylation. *J Biol Chem*, 271, 12117-20.

MARTINEZ-CHEQUER, J. C., STOUFFER, R. L., HAZZARD, T. M., PATTON, P. E. & MOLSKNESS, T. A. 2003. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod*, 68, 1112-8.

MCFEE, R. M. & CUPP, A. S. 2013. Vascular contributions to early ovarian development: potential roles of VEGFA isoforms. *Reprod Fertil Dev*, 25, 333-42.

MENCHACA, A., MILLER, V., SALVERAGLIO, V. & RUBIANES, E. 2007. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the short-term protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim Reprod Sci*, 102, 76-87.

MILLER, W. L. 2009. Androgen synthesis in adrenarche. *Rev Endocr Metab Disord*, 10, 3-17.

MURPHY, B. D. 2000. Models of luteinization. *Biol Reprod*, 63, 2-11.

NAKAMURA, Y., NOMURA, K., WATANABE, M., UJIHARA, M. & DEMURA, H. 1993. Comparison of biological aspects among ovine luteinizing hormone isoforms with charge heterogeneity. *Endocr J*, 40, 73-81.

PARK, J. E., KELLER, G. A. & FERRARA, N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4, 1317-26.

PERERA-MARIN, G., MURCIA, C. & GONZALEZ-PADILLA, E. 2007. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance. *Anim Reprod Sci*, 101, 187-207.

ROBERTSON, D. M. & DICZFALUSY, E. 1977. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone: II. A comparison of the immunological and biological activities of pituitary extracts after electrofocusing using different standard preparations. *Mol Cell Endocrinol*, 9, 57-67.

ROCHA-ARAUJO, V., GRAÇA, D. A. B., BEZERRA, B. J., PINHO, L. C. A. & DE FIGUEIREDO, J. R. 2011. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote*, 21, 295-304.

ROJAS-MAYA, S., GONZALEZ-PADILLA, E., MURCIA-MEJIA, C., OLIVARES-SEGURA, A., HERNANDEZ-CERON, J. & PERERA-MARIN, G. 2007. Caprine luteinizing hormone isoforms during the follicular phase and anestrus. *Anim Reprod Sci*, 100, 280-90.

SAIRAM, M. R. & SCHILLER, P. W. 1979. Receptor binding, biological, and immunological properties of chemically deglycosylated pituitary lutropin. *Arch Biochem Biophys*, 197, 294-301.

SAIRAM, M. R. 1990. Complete dissociation of gonadotropin receptor binding and signal transduction in mouse Leydig tumour cells. Obligatory role of glycosylation in hormone action. *Biochem J*, 265, 667-74.

SAIRAM, M. R., ZAKY, A. A. & HASSAN, A. A. 1994. Isolation and characterization of distinct bioactive forms of LH from male buffalo pituitaries: differences localized to their alpha subunits. *J Endocrinol*, 143, 313-23.

SHIMIZU, T. & MIYAMOTO, A. 2007. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci*, 102, 228-37.

TAMANINI, C. & DE AMBROGI, M. 2004. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim*, 39, 206-16.

TAMAY DE DIOS, L., IBARRA, C. & VELASQUILLO, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2, 70-78.

TAYLOR, P. D., HILLIER, S. G. & FRASER, H. M. 2004. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *J Endocrinol*, 183, 1-17.

TAYLOR, P. D., WILSON, H., HILLIER, S. G., WIEGAND, S. J. & FRASER, H. M. 2007. Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset. *Mol Hum Reprod*, 13, 729-36.

UNGERFELD, R. & RUBIANES, E. 2002. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, 46, 63-66.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F., CORREA-OROZCO, A. & HENRY, O. J. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, 117-131.

WEBB, R. & CAMPBELL, B. K. 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64, 141-63.

ZELEZNIK, A. J. 2004. The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 31.

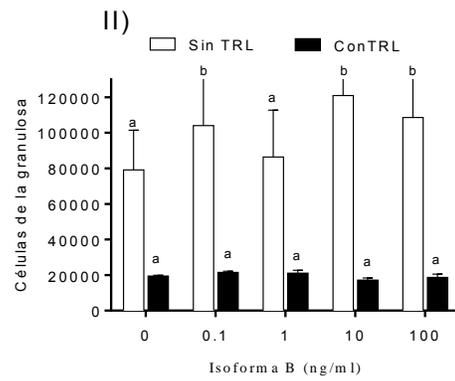
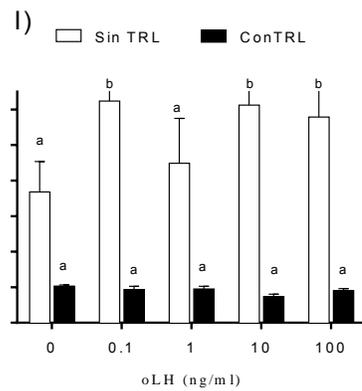
ZIMMERMANN, R. C., HARTMAN, T., KAVIC, S., PAULI, S. A., BOHLEN, P., SAUER, M. V. & KITAJEWSKI, J. 2003. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest*, 112, 659-69.

Cuadro 8.3. Promedio ( $\pm$  EE) del tamaño, concentración de esteroides, relación estradiol:progesterona (E/P) y concentración de VEGF en líquido folicular de folículos dominantes de ovinos con estro sincronizado.

Folículos (n)	Diámetro (mm)	Estradiol (ng/ml)	Progesterona (ng/ml)	Relación (E/P)	VEGF (pg/ml)
12	5.70 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	1.73 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	4.94	92.89 $\pm$ 11.39 <sup>a</sup>
15	5.22 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	8.77	71.61 $\pm$ 10.45 <sup>b</sup>
11	5.18 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	1.31 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	5.70	84.20 $\pm$ 15.74 <sup>ab</sup>

n = número de folículos en los que se obtuvo el líquido folicular.

<sup>a,b</sup> Distintas literales en cada columna indican diferencias entre repeticiones ( $p < 0.05$ ).



III)

IV)

Fig. 8.1. Supervivencia de las células de la granulosa después del estímulo con la LH y sus isoformas, el medio de cultivo sin TRL o con TRL (Trilostano 250 ng/ml). La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2, panel I; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02, panel II); la neutra (D, pH, 7.73-6.98, panel III) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65, panel IV). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de un cultivo con tres sub-réplicas. <sup>a,b</sup>En cada dosis indica diferencias significativas entre el grupo Sin TRL y Con TRL al nivel de  $p < 0.05$ .

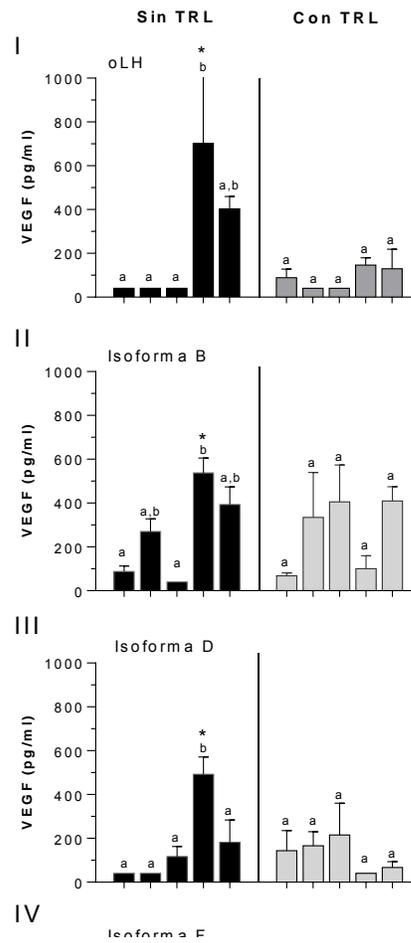


Fig. 8.2. Secreción de VEGF (pg/ml) por las células de la granulosa después del estímulo con la oLH y sus isoformas, el medio de cultivo sin TRL o con TRL (Trilostano 250 ng/ml). La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2, panel I; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02, panel II); la neutra (D, pH, 7.73-6.98, panel III) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65, panel IV). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de un cultivo con tres sub-réplicas. \*En cada dosis indica diferencias significativas entre el grupo Sin TRL y Con TRL al nivel de  $p < 0.05$ .

Fig. 8.3. Secreción de VEGF (pg/ml) por las células de la granulosa después del estímulo con 10 ng de la oLH y sus isoformas, el medio de cultivo sin TRL o con TRL (Trilostano 250 ng/ml). La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2, panel I; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02, panel II); la neutra (D, pH, 7.73-6.98, panel III) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65, panel IV). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de un cultivo con tres sub-réplicas. \*En cada dosis indica diferencias significativas entre el grupo Sin TRL y Con TRL al nivel de  $p < 0.05$ .

Fig. 8.4. Secreción de VEGF (pg/ml) por células de la granulosa luteinizadas después del estímulo con LH y sus isoformas. La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02); la neutra (D, pH, 7.73-6.98) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de un cultivo con cuatro sub-réplicas. <sup>a,b</sup>Distintas literales en cada dosis indican diferencias al nivel de  $p < 0.05$ .

Cuadro 8.4. Secreción de progesterona (ng/ml) por células de la granulosa luteinizadas de forma espontánea tratadas con la oLH y las isoformas. La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02); la neutra (D, pH, 7.73-6.98) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de un cultivo con cuatro sub-réplicas.

Dosis (ng/ml)	Isoformas de la oLH			
	oLH	B	D	F
0	1.88 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
1	2.41 $\pm$ 0.14 <sup>a,b</sup>	2.90 $\pm$ 0.32 <sup>a,b</sup>	1.57 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.08 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
10	3.01 $\pm$ 0.31 <sup>b,c</sup>	2.84 $\pm$ 0.07 <sup>a,b</sup>	2.34 $\pm$ 0.28 <sup>a,b</sup>	3.33 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>
100	3.74 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>	2.99 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	3.39 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	3.73 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>

a,b Distintas literales entre dosis para cada isoforma indican diferencias al nivel de  $p < 0.05$ .

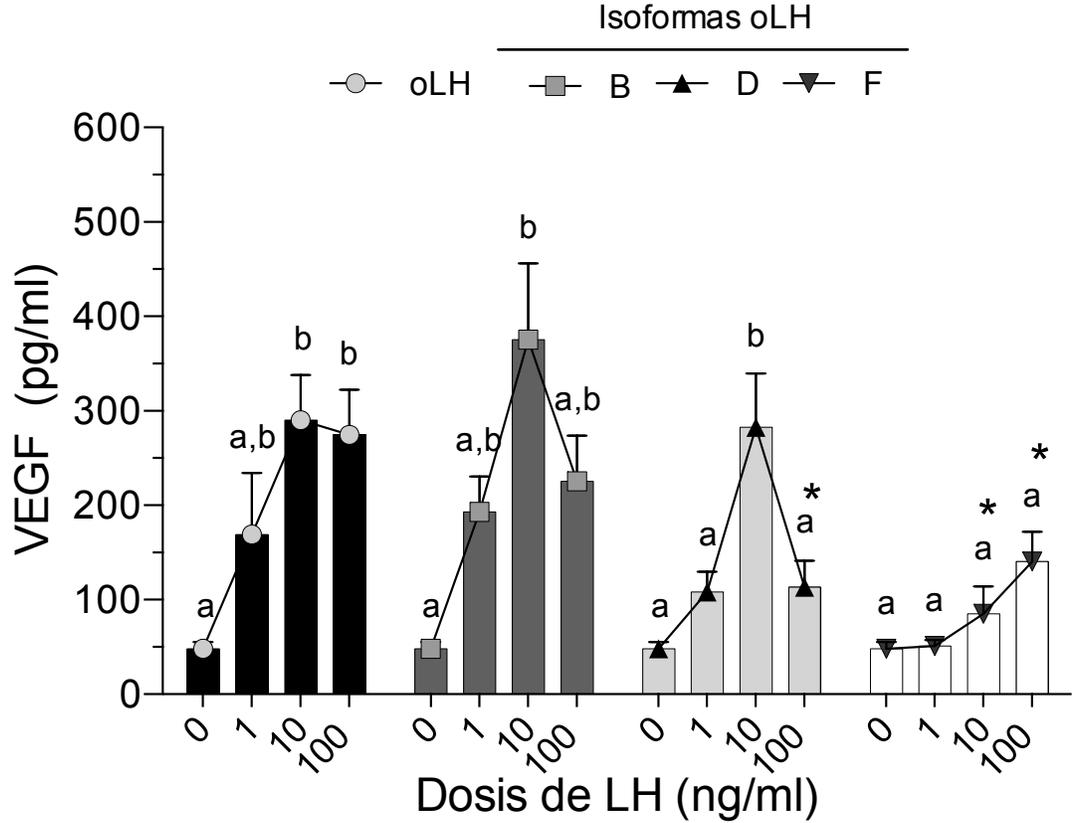


Fig. 8.5. Secreción de VEGF (pg/ml) por las células de la granulosa después del estímulo con LH y sus isoformas. La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02); la neutra (D, pH, 7.73-6.98) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de tres cultivos independientes con cuatro sub-réplicas cada cultivo. <sup>a,b</sup> Distintas literales entre dosis para cada isoforma indican diferencias al nivel de  $p < 0.05$ . \* En cada dosis indica diferencias significativas al nivel de  $p < 0.05$  entre la isoforma vs. el estándar.

Cuadro 8.5. Secreción de progesterona por las células de la granulosa después del estímulo con LH y sus isoformas. La oLH correspondió al estándar NIDDK-oLH-I-2; la isoforma básica (B, pH, 9.91-9.02); la neutra (D, pH, 7.73-6.98) y la ácida (F, pH, 5.98-3.65). Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar de tres cultivos independientes con cuatro sub-réplicas en cada cultivo.

Dosis (ng/ml)	Isoformas de la oLH			
	oLH	B	D	F
0	0.08 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>			
1	0.05 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
10	0.09 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
100	0.24 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>

a,b Distintas literales entre dosis para cada isoforma indican diferencias al nivel de  $p < 0.05$ .

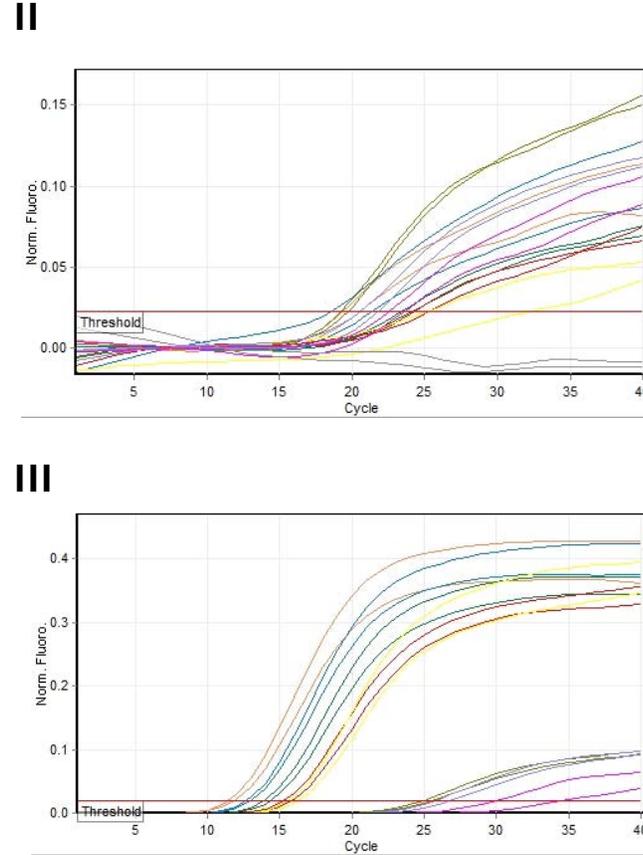
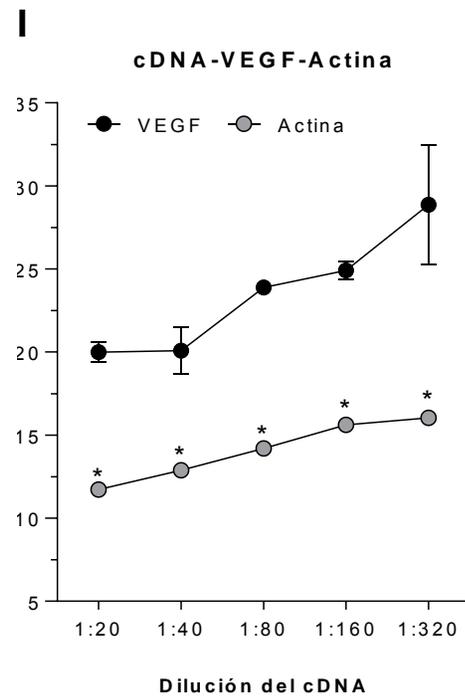


Fig. 8.6. Expresión del gene de VEGF<sub>164</sub> y  $\beta$ -actina por la PCR en tiempo real con el cDNA de cuerpo lúteo ovino diluido en 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 (panel I). Expresión del gene de VEGF (panel II). Expresión del gene de  $\beta$ -actina (panel III).

## 9. Artículo científico

Animal Reproduction Science 163 (2015) 35–47



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)



### Effect of ovine luteinizing hormone (oLH) charge isoforms on VEGF and cAMP production<sup>☆</sup>



Arnulfo Montero-Pardo<sup>a</sup>, Daniel Diaz<sup>b</sup>, Aleida Olivares<sup>c</sup>,  
Everardo González-Padilla<sup>a,\*,\*\*</sup>, Clara Murcia<sup>a</sup>, Margarita Gómez-Chavarín<sup>b</sup>,  
Gabriel Gutiérrez-Ospina<sup>b</sup>, Gerardo Perera-Marín<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México

<sup>b</sup> Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

<sup>c</sup> Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, UMAZ Hospital de Gineco-Obstetricia No. 42, s/n Castelazo Ajala, IMSS, México DF., México

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 5 June 2015

Received in revised form

22 September 2015

Accepted 26 September 2015

Available online 3 October 2015

##### Keywords:

VEGF

Granulosa

Luteinizing hormone

Isoforms

Ovine

In vitro cAMP

#### ABSTRACT

Although an increase in VEGF expression and synthesis in association with LH has been established; it is unknown if all LH isoforms act similarly. This study evaluated the production of cAMP and VEGF among 144 isoforms in two *in vitro* bioassays. The LH was obtained from hypophyses and the group of isoforms was isolated by chromatofocusing. cAMP production was assessed using the *in vitro* bioassay of HEK-293 cells and VEGF production was evaluated in granulosa cells. Immunological activity was measured with a homologous RIA. Immunoactivity and bioactivity for each isoform were compared against a standard, by estimating the IC<sub>50</sub> and the EC<sub>50</sub>. The basic isoforms were more immunoactive than the standard. The neutral and the moderately acidic had an immunological activity similar to the standard. The acidic isoform was the least immunoreactive. cAMP production at the EC<sub>50</sub> dose was similar among the basic isoforms, the moderately acidic and the standard; for the neutral and the acidic, the EC<sub>50</sub> dose was higher. It was observed that compared with the control, VEGF production at the lowest LH dose was no different in the standard and each isoform. In the intermediate dose, a positive response was caused in the standard and the neutral and basic isoforms. Although the acidic isoform showed a dose-dependent response, it was not significant relative to the control. In conclusion, the basic isoform generated the greatest cAMP and VEGF production, similar to the reference standard, and the acidic the smallest.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

<sup>☆</sup> This research was conducted with funding from Mexico's National Science and Technology Council (CONACYT), Project N° 78811. Special thanks to the National Institute of Health and Dr. A. F. Parlow for providing the standard NIDDK-oLH-1-2. Dr. Jesús Ramírez and M.Sc. Ana Rodríguez for its technical support. Arnulfo Montero Pardo, doctoral student in Animal Health and Production Sciences, UNAM, México. Arnulfo Montero is a recipient of a graduate scholarship from DAFIPHI, CONACYT (193458).

\* Corresponding author at: Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior de Ciudad Universitaria S/N, CP 04510 México, México.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [evero@unam.mx](mailto:evero@unam.mx) (E. González-Padilla), [perera@unam.mx](mailto:perera@unam.mx) (G. Perera-Marín).

## 1. Introduction

In ruminants, several waves of follicular growth occur during each estrous cycle. This process begins with the recruitment of a cohort or group of follicles within which selected follicles will continue to develop until becoming dominant. At that moment, their dependency on FSH decreases but increases for LH (reviewed by Webb and Campbell, 2007).

LH has been associated with the angiogenic process observed in the preexisting perifollicular vasculature of dominant follicle (Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010).

Follicular angiogenesis is partially regulated by growth factors, with the vascular endothelial growth factor (VEGF) being the main actor (reviewed by Kaczmarek et al., 2005). At follicular level, VEGF takes part in cell proliferation and survival, and it also induces changes in vascular endothelial permeability (Taylor et al., 2007). These changes have an impact on blood supply to the follicle, thus providing the necessary elements to ensure its final development and transition from dominant to preovulatory follicle (reviewed by Rocha-Araujo et al., 2011).

In ruminants, the predominant isoform is VEGF-A<sub>165</sub>, whose expression and synthesis takes place mainly in granulosa cells of the dominant follicle (Chowdhury et al., 2010; Berisha et al., 2000; Greenaway et al., 2004). LH participation in VEGF production has been reported in various *in vitro* studies, where VEGF synthesis and expression by granulosa cells increases after treatment with hCG (Lee et al., 1997), human LH (Guilmer et al., 2009) and bovine LH (Sabitha et al., 2014); additionally, *in vivo* studies have demonstrated that the increase in VEGF in the follicular fluid of dominant follicles occurs after being treated with hCG (Hazzard et al., 1999). Particularly in sheep, immunohistochemistry and *in situ* hybridization studies on intraovarian structures have demonstrated that VEGF expression in follicles depends on the stage of the estrous cycle and follicular size (Chowdhury et al., 2010). In bovines with synchronized estruses, and hyperstimulated with FSH and treated with GnRH, it was observed that granulosa cells of preovulatory follicles showed a greater expression of the VEGF gene during the preovulatory LH surge (Berisha et al., 2008). Furthermore, marmoset monkeys treated with an antagonist to GnRH to avoid preovulatory LH secretion showed a reduction in the proliferation of endothelial cells, vascular density, and in VEGF expression in the granulosa cells of the preovulatory follicles (Taylor et al., 2004).

LH is a heterodimeric glycoprotein which, depending on the arrangement of its oligosaccharides, shows several isoforms that have physical-chemical, immunological and biological potency (Baenziger and Green, 1988; reviewed by Cooke et al., 1996; reviewed by Manzella et al., 1996; reviewed by Perera-Marin et al., 2007). In ruminants, it has been observed that the participation of different isoforms in circulating LH varies depending on the stage of the estrous cycle (Rojas-Maya et al., 2007; Arrieta et al., 2005; Perera-Marin et al., 2005).

Given the relationship between LH and VEGF, and the existence of different isoforms of the gonadotropin, this study was conducted to compare under standardized

*in vitro* conditions the effect of different LH isoforms on VEGF production in granulosa cells obtained from dominant follicles in sheep.

## 2. Materials and methods

To carry out this work and prior to the development of the *in vitro* bioassay with granulosa cells from dominant ovarian follicles in ewes, it was necessary to obtain the LH isoforms in sufficient quantities. Ovine adenohypophyses were obtained and then subjected to chromatofocusing to separate and collect the isoforms. By means of the assay in HEK-293 cells transfected with cDNA for the rat LH receptor, the isoelectric point, immunological activity (homologous RIA for LH) and *in vitro* biological activity were determined for every isoform.

### 2.1. Collection of pituitary gland

Pituitary glands from healthy adult sheep were collected. Prior to slaughter, each animal was stunned with a captive bolt gun and its head removed. The pituitary glands were collected and deposited in phosphate buffer (50 mM, pH 7.2) for transport. The pituitary glands were cleaned of surrounding tissue, and the lobe anterior was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processing. Every LH extraction and purification step was performed at  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Obtaining of glycoprotein extract from the lobe anterior

The glycoprotein extract (GPE) was extracted from ovine lobe anterior according to the method described for bovine GPE (Perera-Marin et al., 2004). First, 200 adenohypophyses with a wet weight of approximately 105 g were homogenized in 10% ammonium acetate solution, pH 7.0, containing 10.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) with a ratio of 10 ml of solution per gram of wet tissue.

Once the homogenate was obtained, it was mechanically stirred and 24 h later it was centrifuged at  $12,000 \times g$  for 45 min and the precipitate obtained after centrifugation (R0) was discarded and the supernatant received an ethanol volume corresponding to 40% of total volume. The ethanol suspension was stirred for 24 h and then centrifuged. The proteins precipitated (R1) after centrifugation was discarded and the supernatant received a volume of pure ethanol corresponding to 85% of total volume. This suspension remained undisturbed for 48 h, after which the supernatant was discarded and the precipitated proteins were collected by centrifugation. This group of proteins was named glycoprotein extract (GPE).

The GPE was re-suspended in deionized water, dialyzed (Spectra/Por # 4, cut-off 12–14 kDa) for 24 h with the water changed every 8 h, and, after that, lyophilized for later processing.

### 2.3. Glycoprotein extract purification

Of total GPE, only 285 mg of protein were purified in the CM-Sepharose cation exchanger in conditions similar to those described for bovine GPE (Perera-Marin et al.,

2004). For this purpose, GPE was re-suspended in 50 ml of 5.0 mM ammonium acetate, pH 5.1; the solution was stirred for 16 h and the insoluble material was discarded by centrifugation (12,000 × g for 5 min at 4 °C). Because of its high protein content, the supernatant was divided into two batches for purification. Batch A consisted of a volume of 20 ml containing a concentration of 169.4 mg, and batch B had a volume of 30 ml and a content of 115.9 mg.

Each batch was purified independently in a column (27 cm × 1.5 cm) pre-packed with CM-Sepharose exchanger (Pharmacia Biotech, Piscataway, NY), previously balanced with 20 volumes of 0.005 M ammonium acetate, pH 5.1. The protein fraction in the column was eluted with an ammonium acetate gradient at different pH, i.e., 0.005 M, pH 5.1; 0.1 M, pH 6.8; and 1.0 M + 0.1 M glycine pH 9.5.

In each chromatography run, fractions of two ml with a flow of 23 ml/h were collected, and the GPE elution pattern was monitored at 280 nm. The buffer was changed when the optical density of the effluent was close to zero. Each collected protein surge was identified as a function of elution pH, i.e., CM-1ab for the protein surge obtained at pH 5.1; CM-2ab collected at pH 6.8; CM-3ab protein surge obtained at pH 9.5 and those proteins that did not elute with the ammonium acetate gradient were obtained with 1.0 M NaCl, a fraction that was named S. Each protein surge was dialyzed as described for the glycoprotein extract and lyophilized until analysis.

Prior to obtaining LH charge isoforms, electrophoretic analysis in SDS-PAGE was performed in each protein surge collected during CM-Sepharose chromatography, and the amount of immunoreactive LH in each protein was determined with a specific homologous RIA. At the end, the CM-3ab fraction of batches A and B were mixed, and the LH in the mixture was calculated.

#### 2.4. Obtaining LH charge isoforms

Luteinizing hormone charge isoforms present in CM-3ab fraction were separated by chromatofocusing (Perera-Marin et al., 2008). The CM-3ab fraction showed an electrophoretic pattern in SD-PAGE similar to the NIDDK-oLH-1-2 standard and showed the highest immunoreactive LH content. In brief, the CM-3ab fraction (22.9 mg of protein) was re-suspended in Pharmalyte buffer (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) diluted 1:45 with deionized water, adjusted to pH 7.0 and applied to a 27 cm × 0.7 cm i.d. column pre-packed with an ionic exchange resin (PBE-118) previously balanced with 20 volumes of 0.025 M HCl-triethylamine (pH 11.0) and kept at 4 °C. Eluted fractions (2 ml) were collected with a flow of 7 ml/h. In each collected fraction, pH was measured and the optical density was determined at 280 nm. Once pH 7.0 was detected in at least ten consecutive fractions, the buffer was changed to Polybuffer 74 (Pharmacia, Biotech AB, Uppsala, Sweden) diluted 1:8 with deionized water and adjusted to pH 3.5. Once pH 3.5 was detected in at least ten consecutive fractions, a 1.0 M NaCl solution was applied and 20 more fractions were collected.

Using the pH and optical density record, each protein fraction was neutralized in accordance with the elution pH. The fractions collected between pH 11.0 and 7.0 received

200 µl of a 1.1 M Tris-HCl (pH 7.4) solution. Fractions eluted between pH 6.99 and pH 3.5, as well as those proteins that did not elute with the pH gradient, were neutralized with 200 µl of 1.1 M imidazole (pH 7.0). Once neutralized, all fractions were grouped in the eluting pH range in which a protein surge was observed: A (pH range, 10.56–10.14), B (pH, 9.91–9.02); C (pH, 8.97–7.83); D (pH, 7.73–6.98), E (pH, 6.83–6.19), F (pH, 5.98–3.65) and G (pH, 3.55–3.66). All protein surges were dialyzed and lyophilized until analysis.

#### 2.5. Quantification of proteins

The quantification of total protein for each step in the extraction and purification of LH and its isoforms was determined following the Bradford method (Bollag and Edelstein, 1991), using bovine serum albumin (BSA) as standard (Albumine concentrate 20% (w/v), Immunochemical Products Ltd.).

#### 2.6. Determination of the molecular weight

The approximate molecular weight of each protein fraction obtained during the extraction and purification of LH and its isoforms was determined by electrophoresis with 12.5% polyacrylamide gels (pH 8.6) in the presence of SDS (Laemmli, 1970). Each sample was analyzed at a 1 µg of protein in the absence (non-reducing conditions) or presence of 2β-mercaptoethanol (reducing conditions); at the end of each electrophoretic run, each gel was dyed with silver nitrate on the basis of the commercial kit specifications (Silver Stain Kit, Bio-Rad, Laboratories, Inc). Prestained standards low molecular weight (Bio-Rad Laboratories, Inc.) were used as the reference. Determination of the approximate molecular weight (MW) of the LH and its isoforms was estimated with SDS-PAGE by comparing the relative electrophoretic mobility of each protein of interest with the generated relative mobility of proteins with known molecular weight (pre-dyed markers). Relative mobility (Rf) was determined by dividing the distance (mm) covered by the band of interest by the distance covered by the front of the gel, which corresponded to bromophenol blue.

Once the Rf was determined for each protein band, the graph was generated using the Rf of proteins with known molecular weight ( $x = Rf$ ) and the logarithm of its corresponding molecular weight ( $y = \log MW$ ); thus, a reference line on which the Rf of the samples with unknown MW could be interpolated was obtained (Bollag and Edelstein, 1991).

#### 2.7. Quantification of immunoreactive LH

The concentration of immunoreactive LH was quantified by means of a homologous liquid-phase RIA, previously validated (Perera-Marin et al., 2005). The analyzed fractions were those proteins obtained during the extraction and purification of LH and its isoforms. In brief, the RIA was developed using NIDDK-oLH-1-2 labeled with sodium [<sup>125</sup>I] as tracer by means of the IODO-GEN technique (Perera-Marin et al., 2004), and the same standard was

used as the reference pattern at doses of 0.1, 2.5, 5.0, 10 and 20 ng of LH/tube in four replicates. The first antibody (anti- $\alpha$ LH-26) generated in rabbit was used at a working dilution of 1:40,000 (after characterization and titration) in the presence of rabbit normal serum at a dilution of 1:1600. The separation of the antigen–antibody complex formed after 48 h of incubation from the free fraction was performed with a second antibody (rabbit anti-IgG produced in donkey), diluted 1:80, after incubation at 4 °C for 24 h. Finally, by centrifugation (1500  $\times$  g for 15 min at 4 °C) the antigen–antibody complex was separated, after the addition of 1 ml of 0.05 M PBS buffer (pH 7.2) containing 0.1% BSA. The immunoprecipitated fraction was analyzed in a gamma radiation counter. Assay sensitivity was 0.01 ng/tube and the intra- and inter assay coefficients of variation were determined from the expected dose with 50% of the relation logit–log (Matteri et al., 1986) and corresponded to 3 and 5%, respectively. The concentration of immunoreactive LH was calculated as a function of the dose obtained at 50% ( $IC_{50}$ ) in the dose–response curve of the 38/80 vs. the logarithm of the dose. With this, the comparison between the parameters  $IC_{50}$  and Hill slope was made (DeLean et al., 1978).

#### 2.8. Identification of LH-immunoreactive proteins

To confirm the observations made by RIA that the fraction proteins obtained during cation exchange chromatography (CM-Sepharose) and in fractions collected during CM-3ab purification in chromatofocusing were molecules of LH. The approximate molecular weight of proteins immunoreactive to the LH was determined through immunoblotting (Towbin et al., 1979). Those proteins obtained were analyzed by SDS-PAGE at a concentration of 100 ng of protein/10  $\mu$ l. At the end of electrophoresis, the proteins present in the gel were transferred to a nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m trans, blot, Bio-Rad) using a Trans-Blot<sup>®</sup> Semi-Dry cell (Bio-Rad, USA) applying 200 mA for 75 min. At the end, the membrane was blocked for 60 min with 4 TBS-T solution (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) containing 3% BSA; after this, it was rinsed and then incubated for 16 h at 4 °C with the first antibody generated in rabbit (anti- $\alpha$ LH-26, 1:1000, previously validated). Afterwards, the membrane was rinsed with TBS-T and incubated for 60 min at room temperature with the second antibody (rabbit anti IgG generated in goat and conjugated to peroxidase, Jackson Immuno Research) diluted 1:20,000. Finally, and the protein bands were developed by chemiluminescence (Immobilon<sup>™</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

This immunoassay procedure was carried out for three  $\alpha$ LH isoforms selected because of their isoelectric point (pI), i.e.: isoform B, pH 9.91–9.02; isoform D, pH 7.73–6.98, and isoform F, pH 5.98–3.65, applying 200 ng immunoreactive LH. In order to facilitate their analysis, the SNAP i.d. System (Millipore) was used. Proteins transferred to nitrocellulose paper were incubated for 10 min at room temperature in the presence of the first antibody at a 1:500 dilution, after which the second antibody was placed at room temperature at a 1:1000 dilution for 10 min. Finally,

the immunoreactive bands were developed with a commercial AP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad).

#### 2.9. Bioassay in HEK-293 cells: cAMP measurement

The biological activity for each isoform of the isolated LH was determined using the *in vitro* bioassay in HEK-293 cells transfected with the cDNA for the rat LH receptor; cells were donated by Dr. Mario Ascoli (Iowa University, Iowa City, IA). Total cAMP content (intra- and extracellular) was measured with a liquid-phase RIA.

The cells were plated in 162 cm<sup>2</sup> culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA) containing DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) high in glucose (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 5% fetal bovine serum (Gibco, BRL), 2.0 mM L-glutamine (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), 100 mg/ml gentamicin (Life Technologies), 50 IU/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA).

After being plated and with 90% confluence, the cells were re-plated in 24-well culture plates (Gibco, BRL) with a density of  $5 \times 10^4$  cells per well, each containing the aforementioned culture medium. Prior to treatment, the cells were preserved with 5% CO<sub>2</sub> and a temperature of 37 °C for 24 h. At the end, 85% of the medium was withdrawn and the cells were exposed to increasing doses of LH (0.1, 1.0, 10 and 100 ng/ml) diluted in the same medium, containing 1.25 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma) and a phosphodiesterase inhibitor, and were incubated for 24 h.

Total cAMP content (intra- and extracellular) in the culture medium was determined with a liquid-phase RIA, previously validated (Olivares et al., 2010). 2-O-Monosuccinyl tyrosyl-methyl ester of cAMP (Sigma) was used as a tracer, radiolabeled with Na<sup>225</sup>I (Amersham International Limited, United Kingdom) using the chloramine-T method (Hunter and Greenwood, 1962). The first antibody (cAMP-CV-27, provided by the National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, NIADDK, Bethesda, MD, USA) was used in a 1:70,000 final dilution in the presence of 5.0 mM sodium acetate and 1% BSA (pH 6.1). Each reaction tube was incubated for 24 h at 4 °C and at the end the united antibody and the cAMP-free fraction were separated with ethanol precipitation followed by centrifugation at 1500  $\times$  g for 30 min at 4 °C. The sensitivity of the assay was increased by trapping the antigen–antibody complex with triethylamine and acetic acid. The sensitivity was 2.0 pmol/ml. The immunoprecipitated fraction was analyzed in a gamma radiation counter. cAMP production was calculated by interpolation of the results in the reference curve of 2-O-monosuccinyl tyrosyl-methyl ester of cAMP.

#### 2.10. Bioassay in granulosa cells: VEGF measurement

VEGF production by granulosa cells was assessed after the cells received the reference standard stimulus, NIDDK- $\alpha$ LH-1-2 or one of the three selected isoforms (isoform B, pH 9.91–9.02; isoform D, pH 7.73–6.98; isoform F, pH 5.98–3.65). The VEGF produced by the cells was measured in the serum-free culture medium.

The granulosa cells were collected from dominant follicles (4–7 mm) of ewes previously treated to synchronize their estrous cycle (Ungerfeld and Rubianes, 2002; Menchiaca et al., 2007). Initially, each animal received a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR, Pfizer) and immediately after that each animal received 250 µg cloprostenol (Celosil® Shering-Plough, Mexico) Im. Five days later, the CIDR was removed and at 24 h the animals were slaughtered after desensitization with a captive bolt gun, and the ovaries were collected and deposited in cold DMEM-F12 medium, supplemented with 0.1% ISA (RIA grade, Sigma) and penicillin-streptomycin (100 units/ml–100 µg/ml, EMD Millipore), and in this condition the ovaries were transported to the laboratory. Within 3 h after slaughter, each ovary was cleaned of surrounding tissue. Also, follicles from 4 to 7 mm, with a vascularized wall, amber-colored follicular fluid and without granulosa cell detachment, were grouped for granulosa cell collection.

The follicular fluid of each selected follicle was aspirated (1 ml plastic syringes with 27-gauge needles) and then stored at –20 °C until its concentration of steroid hormone was measured. The granulosa cells were obtained by hemidissecting and scraping of the inner wall of each follicle. The cells were deposited in Hank medium with sodium bicarbonate, free of calcium and magnesium, supplemented with 0.1% BSA, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml); this procedure prevented cell agglutination. Subsequently, the cell suspension was centrifuged (1000 rpm/10 min/20 °C) and the cellular pellet was re-suspended in serum-free McCoy's 5A medium, supplemented with L-glutamine, 25 mM HEPES (Gibco®), 0.1% BSA (Sigma A-7888), 2.5 µg/ml transferrin, 100 ng/ml insulin, 1.06 mg/ml sodium bicarbonate, 5 ng/ml sodium selenite and penicillin-streptomycin (100 units/100 µg/ml, EMD Millipore TMS-AB2-C). Cells in suspension were centrifuged under the same conditions and the cellular pellet was resuspended in McCoy's 5A and in a 10 µl fraction, cell viability was determined by the trypan blue exclusion method (Luque and Herrera, 2006).

The cells were re-suspended in McCoy's 5A medium, plated in 48-well culture plates in a volume of 500 µl of medium with a density of  $1 \times 10^5$  live cells per well, and incubated at 37 °C in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air for 4 h; at the end, 450 µl of medium were removed from each well and replaced with fresh medium containing 1, 10 or 100 ng/ml of immunoreactive LH of the standard (NIDDK-αLH-1-2, AF, 11743B) or of isoforms B, D, or F, considering four replicates per treatment. The treatments and the replicates were randomly distributed in the culture plate. Twenty-four hours later, the culture medium was removed and stored at –20 °C until VEGF and progesterone determination. For this study three separate experiments were conducted, with four replicates per treatment and dose.

#### 2.10.1. Quantification of estradiol, progesterone and VEGF

The VEGF concentration was assessed in the follicular fluid and in the culture medium collected after each assay. In order to do that, a commercial ELISA kit (PeproTech®

Human VEGF cat 900 K-10) was used, following the instructions of the manufacturer.

Estradiol and progesterone quantification was made in the follicular fluid, while in the culture medium only progesterone was measured. In both cases, a commercial solid-phase radioimmunoassay (Coat-a-Count, Siemens, Los Angeles, CA, USA) was used, according to the instructions of the manufacturer. The sensitivity of the assay for VEGF was 4.0 pg/ml, for estradiol 0.1 pg/ml and for progesterone 0.1 ng/ml. In all systems, the intra-assay coefficient of variation was below 10%. The follicular fluid was diluted 1:100 with 0.1 M PBS (pH 7.2) for analysis.

### 3. Statistical analysis

The analyses of immunological and biological activity of the isolated isoforms were performed by fitting the experimental data with dose-response curves of inhibition or stimulation, respectively. For this purpose, Prism 6.0 statistical software (GraphPad Software, Inc., USA) was used; this program includes the equations of Hill that are described below:

$$Y = 100 / [1 + 10^{(h(\log IC_{50} - X))}] \quad (1)$$

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / [1 + 10^{(h(\log EC_{50} - X))}] \quad (2)$$

For Eq. (1),  $X$  is the logarithm of the concentration,  $Y$  is the normalized response that ranges from 100 to 0% for inhibition,  $\log IC_{50}$  is the antagonist concentration that causes 50% inhibition, and  $h$  is the Hill coefficient that indicates the slope of the curve.

For Eq. (2),  $X$  is the logarithm of the concentration,  $Y$  is the response that increases as  $X$  increases, Top and Bottom are the bottom and top plateaus,  $\log EC_{50}$  is the agonist concentration that causes 50% stimulation, and  $h$  is the Hill coefficient that indicates the slope of the curve.

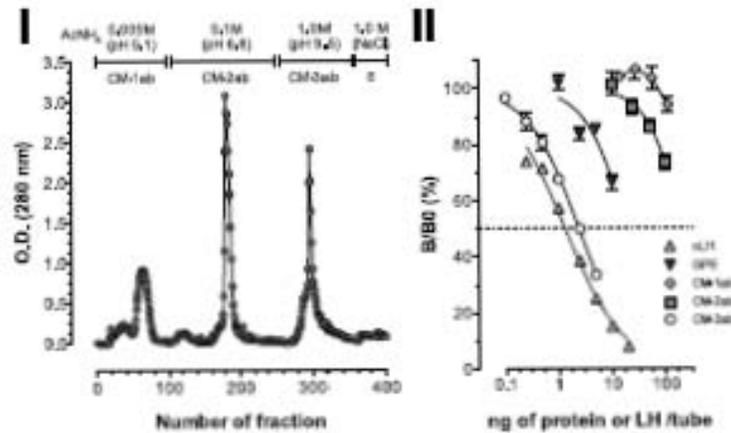
From the fitted curves, statistical comparisons of parameters  $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$  and the Hill coefficient were performed. For the foregoing, the  $F$ -test included in Prism 6.0 was used. This method compares the parameters of each pair of non-linear fittings, testing as null hypothesis that the parameters are identical between each pair of hormones evaluated; if a value of  $p > 0.05$  is obtained, it is then concluded that the parameter is the same for the two fits (Bortomeo et al., 2004).

Finally, for the analysis of VEGF production by granulosa cells after treatment with the standard and LH isoforms, comparisons were made using multiple  $t$ -tests; for this, a power of 85% was considered and variance homogeneity was assumed. The level of statistical significance was 0.05 and the Holm-Sidak correction method for multiple comparisons was used.

All statistical analyses and graphs were made using Prism 6.0 statistical software.

### 4. Results

During extraction of the adenohipophyseal tissue, the GPE was obtained with a yield of 460 mg of protein and a content of  $64.0 \pm 149$  µg of LH per mg of protein. The



**Fig. 1.** Representative elution profile of the glycoprotein extract (GPE) from ovine adrenohypophysis during its cation-exchange chromatography with CM-Sepharose, and (I)  $\alpha 21$  immunoreactivity curves of the collected fractions during GPE purification. In I, column was eluted with an ammonium acetate ( $\text{AcNH}_4$ ) gradient at different pH values, and each protein peak was identified at 280 nm. In II,  $\alpha 21$ -specific homologous RIA of the standard, GPE, and its fractions.

amount of purified GPE in cation exchange (285.32 mg of protein) was distributed in three protein surges (Fig. 1, panel I), with the fraction that eluted at pH 9.5 (CM-3ab) being where LH content was concentrated: 8.4 (batch A) and 5.4 (batch B) times more LH than GPE (Table 1). The behavior in the LH-specific immunoassay of the CM-3ab fraction showed an inversely proportional curve to the protein dose (Fig. 1, panel II), parallel to that of the standard, an immunological LH activity determined by the calculation of the  $\text{IC}_{50}$  dose close to the reference standard (Table 2).

**Table 1**  
Protein concentration and  $\alpha 21$ -specific immunoreactivity of the fractions obtained during glycoprotein extract (GPE) purification from ovine adrenohypophysis.

Fraction	Protein (mg) <sup>a</sup>		LH ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein) <sup>b</sup>	
	Batch A	Batch B	Batch A	Batch B
GPE	285.32		64.00 $\pm$ 14.00	
CM-1ab	2.90	3.19	2.63 $\pm$ 0.89	1.14 $\pm$ 0.34
CM-2ab	45.04	71.76	3.80 $\pm$ 0.21	4.88 $\pm$ 0.29
CM-3ab	11.02	25.60	540 $\pm$ 48.89	348.33 $\pm$ 45.45

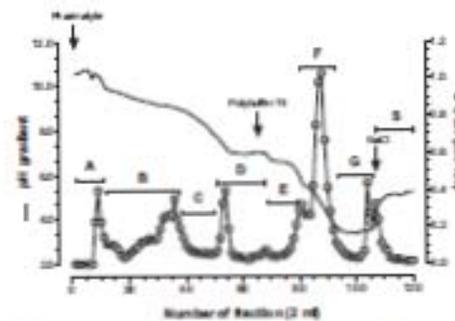
<sup>a</sup> Protein concentration determined by Bradford method.

<sup>b</sup>  $\alpha 21$  immunological activity assessed by homologous RIA.

**Table 2**  
Summary of the dose-dependent  $\alpha 21$ -specific immunological activity evaluated in the fractions of the glycoprotein extract (GPE) purified from ovine adrenohypophysis. Parameters were obtained from non-linear curves fitted to each analyzed fraction. Curves were expressed as the  $\text{B}/\text{B}_0$  vs. logs of the dose.

Fraction	$\text{IC}_{50}$ <sup>a</sup>	b	$\text{R}^2$
WIDOME- $\alpha 21$ -2	1.32 $\pm$ 0.02	-0.80	0.95
GPE	18.09 $\pm$ 0.11	-1.13	0.80
CM-1ab	124.50 $\pm$ 10.50	-0.47	0.14
CM-2ab	270.30 $\pm$ 0.10	-1.28	0.83
CM-3ab	2.39 $\pm$ 0.02	-0.91	0.98

<sup>a</sup> Protein (ng)  $\pm$  S.E.



**Fig. 2.** Chromatofocusing elution profile of the CM-3ab fraction to obtain  $\alpha 21$  charge isoforms. Total protein content of CM-3ab was re-suspended in Pharmalyte buffer and eluted in a column with PBE-118, which served as the ion exchanger. The column was balanced with 25 mM triethylamine at pH 11.0 and 2 ml fractions were collected. Protein surges were identified at 280 nm and codified with a letter, beginning with the most basic isoform (A) and finishing with the most acidic (G). Protein surge eluted with 1 M NaCl was denoted S.

The CM-3ab fraction in chromatofocusing was distributed in seven protein surges, each of them corresponding to an isoform (Fig. 2). Out of the total protein analyzed, only 38.9% (8.92 mg) was collected; 16.0% (3.67 mg) of the total protein amount eluted between pH 10.56 and pH 7.83 (basic isoforms), while 0.33 mg (1.4%) of total protein eluted between pH 7.73 and 6.98 (neutral isoform) and 4.85 mg (21.2%) of total protein eluted between pH 6.83 and 3.5 pH (acidic isoforms). The protein fraction that eluted with NaCl (S) corresponded to 0.07 mg (0.31%). Of the total immunoreactive LH collected (4.99 mg), 73.55% was obtained at basic pH, while 6.61% was obtained at neutral pH and 19.84% at acidic pH. The pH

**Table 3**

pH range, protein LH immunoreactive concentration, and percentage of recovery of the charge isoforms purified from CM-3ab fraction during chromatofocusing.

Isoform	pH range	LH immunoreactive* (ng)	Recovery (%)
A	10.56–10.14	0.08	1.00
B	9.97–9.02	3.06	61.32
C	8.59–7.83	0.53	10.62
D	7.73–6.98	0.33	6.61
E	6.83–6.19	0.30	7.82
F	5.98–3.65	0.59	11.82
G	3.55–3.06	0.01	0.20

\* oLH immunological activity assessed by a homologous RIA.

range, the amount of immunoreactive LH and the collection percentage of each isoform are summarized in Table 3.

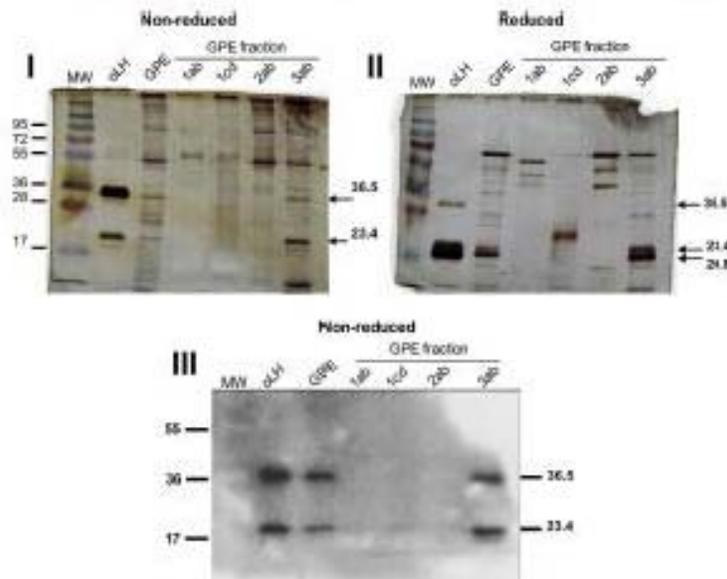
The electrophoretic pattern in SDS-PAGE, both in the absence and presence of  $\beta$ -mercaptoethanol for the standard (NIDDK-oLH-1-2), the GPE and the fractions collected during GPE purification in CM-Sepharose are shown in Fig. 3. The electrophoretic pattern in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol (NR) was characterized in the standard, GPE and CM-3ab (Panel I), by the presence of two proteins with an approximate molecular weight of 36.5 and 23.4 kDa, while the pattern for fractions CM-1ab, CM-1cd and CM-2ab was characterized by a 55 kDa protein and a wide variety of proteins of higher molecular weight.

The analysis of the electrophoretic pattern in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (R) for the standard, GPE and the CM-3ab fraction (panel II) was characterized by

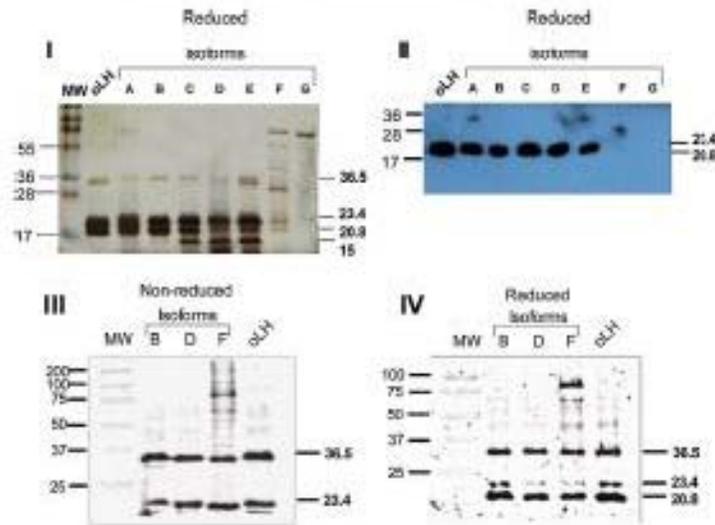
presenting two proteins with approximate molecular weight of 23.4 kDa and 20.8 kDa, proteins that were absent in fractions CM 1ab, CM 1cd and CM 2ab. The analysis of the electrophoretic pattern by immunoblotting in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol for the standard, GPE and the CM-3ab fraction showed LH-immunoreactive proteins with approximate molecular weights of 36.5 kDa and 23.4 kDa that corresponded to the native form and beta subunit of LH (panel III).

The electrophoretic pattern in SDS-PAGE in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (R) for the standard NIDDK-oLH-1-2 and the purified isoforms (Fig. 4, panel I) showed in all cases proteins with approximate molecular weight of 36.5 kDa (slightly intense) and two proteins with approximate molecular weights of 23.4 kDa and 20.8 kDa. For the isoforms C–E, in addition to the same proteins, a 15 kDa protein was observed. Isoforms F and G under the same conditions show a more heterogeneous protein pattern and the 23.4 and 20.8 kDa proteins are poorly defined.

Immunoblotting of the standard and of each isoform in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (Fig. 4, panel II) denoted the presence of LH-immunoreactive proteins with approximate molecular weights of 23.4 and 20.8 kDa for the standard and isoforms A–E; however, under these conditions the LH-immunoreactive protein pattern for isoforms F and G was not observed. A re-analysis of the immunoblot in the absence (NR) or presence (R) of  $\beta$ -mercaptoethanol with a concentration of 200 ng of immunoreactive LH for the standard and isoforms B, D and F, isoforms that due to



**Fig. 3.** (I) Electrophoretic pattern in 12.5% SDS-PAGE at pH 8.0 in presence, and (II) absence of  $\beta$ -mercaptoethanol for the standard oLH (NIDDK-oLH-1-2), the GPE and its fractions during cation-exchange chromatography. (III) Immunoblotting electrophoretic pattern of the standard oLH, the GPE and its fractions in absence of  $\beta$ -mercaptoethanol. In each panel, molecular weight markers are indicated (MW), as well as the proteins corresponding to the LH heterodimer (36.5 kDa) and its subunits.



**Fig. 4.** (I) Electrophoretic pattern in 12.5% SDS-PAGE at pH 8.6 in presence of  $\beta$ -mercaptoethanol for the standard oLH and the charge isoforms isolated from CM-3ab fraction during chromatofocusing. (II) Immunoblotting analysis of the standard oLH and the charge isoforms in reduced conditions. (III) Specific re-analysis of the immunoblotting pattern in non-reduced, and (IV) reduced conditions for those isoforms representing the chromatofocusing pH gradient: basic, B; neutral, D; and acidic, F. In each panel, molecular weight markers are indicated (MW), as well as the proteins corresponding to the LH heterodimer (36.5 kDa) and its subunits.

their isoelectric point represented the chromatofocusing pH gradient, showed a similar pattern of immunoreactive proteins with approximate molecular weights of 36.5, 23.4 and 20.8 kDa (Fig. 4, panels III and IV).

The response pattern in the immunoassay for each isoform and the reference standard was dependent on the dose, without significant change in the value of its slopes (Fig. 5 and Table 4). The dose calculated at 50% ( $IC_{50}$ ) of the inhibition curve between  $\pm 8/80$  vs. the protein dose assayed between isoforms showed differences, with the basic isoforms (B and C) being the most immunologically active proteins, while the standard (NIDDK-oLH-1-2), the neutral isoform (D) and the moderately acidic one (E) showed no difference at dose  $IC_{50}$ . In particular, it was observed that 7.5 times more protein of isoform F (pH, 5.98–3.65) was required to achieve the  $IC_{50}$ , whereas this parameter in isoform G (pH, 3.55–3.66) could not be determined. Therefore, these data indicate lower immunological activity in the isoforms collected at a more acidic pH or at a

lower LH concentration with a greater amount of contaminants.

cAMP production by HEK-293 cells was dependent on the LH dose applied, in both the reference pattern and the assessed isoforms (Fig. 6, panels I, II, and III). The dose calculated at 50% ( $EC_{50}$ ) of the cAMP production stimulation curve vs. the LH-immunoreactive dose (Table 5) indicated that responses to isoforms A, B, C and E were statistically similar to those of the standard, while in the case of the neutral isoform (D) and the more acidic isoforms (F and G), the  $EC_{50}$  dose was significantly higher, indicating that this group of isoforms showed less biological activity on the basis of cAMP production, compared to the other isoforms.

The average follicular diameter of the ovarian follicles used was  $5.37 \pm 0.17$  mm. The steroid hormone and VEGF contents in the follicular fluid were estradiol  $1.77 \pm 0.23$  ng/ml, progesterone  $0.28 \pm 0.04$  ng/ml and VEGF  $82.90 \pm 6.18$  pg/ml. The ratio between the concentration of estradiol and progesterone (6.3) indicated

**Table 4**

Summary of the dose-dependent LH-specific immunological activity evaluated in the standard oLH and the charge isoforms obtained from CM-3ab fraction during chromatofocusing. Parameters were obtained from non-linear curves fitted to each hormone. Curves were expressed as the  $IC_{50}/50$  vs. log of the dose.

	oLH	oLH isoforms						
		Basic		Neutral	Acidic		F	G
		B	C		D	E		
$IC_{50}$	$1.4 \pm 0.02^a$	$0.7 \pm 0.02^a$	$1.2 \pm 0.01^b$	$1.6 \pm 0.02^c$	$1.4 \pm 0.02^a$	$10.9 \pm 0.02^d$	ND	
$k$	$-0.87^{**}$	$-0.93^{**}$	$-0.91^{**}$	$-0.92^{**}$	$-0.90^*$	$-0.80^*$	ND	
$R^2$	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.97	ND	

\* $^{**}$  Between hormones, different letters indicates significant differences ( $p < 0.05$ ).  
ND, non-determined due to lack of fit.

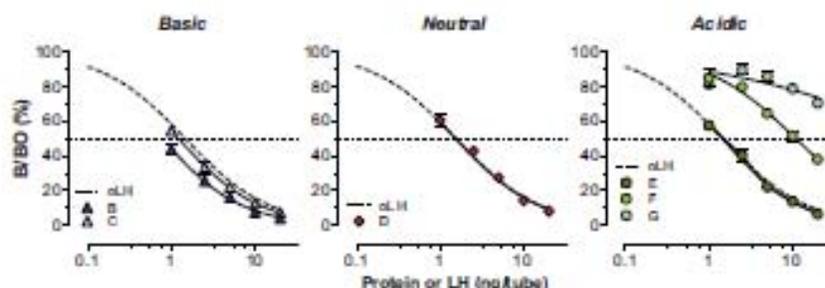


Fig. 5. Inhibitory dose-response curves of a homologous oLH-specific RIA for the standard oLH and the charge isoforms obtained from CM-3ab fraction during chromatofocusing. Each represents the mean  $\pm$  SE.

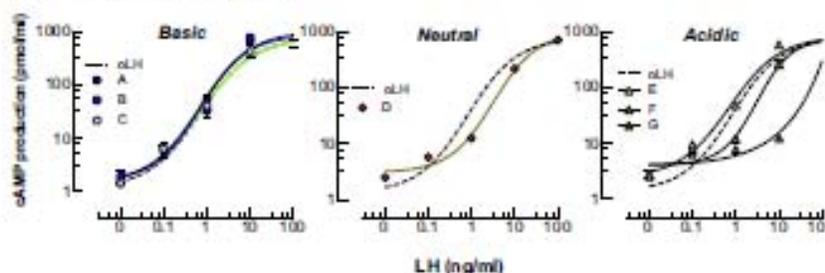


Fig. 6. Stimulatory dose-response curves of the oLH charge isoforms to induce cAMP production by HEC-293 cells when stimulated with the standard oLH and the charge LH isoforms obtained from CM-3ab fraction during chromatofocusing. Each point represents the mean  $\pm$  SE of three sub-replicates.

Table 5

Summary of the dose-dependent biological activity of the standard oLH and the charge LH isoforms obtained from CM-3ab fraction during chromatofocusing. Parameters were obtained from non-linear curves fitted to each hormone.

	oLH	oLH isoforms						
		Basic			Neutral	Acidic		
		A	B	C	D	E	F	G
EC <sub>50</sub>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.09 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>	3.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>	3.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	ND
h	0.76 <sup>a</sup>	0.65 <sup>b</sup>	1.11 <sup>a</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.75 <sup>a</sup>	1.08 <sup>b</sup>	ND
R <sup>2</sup>	0.98	0.98	0.97	0.99	0.99	0.98	0.98	ND

<sup>ab</sup> Between hormones, different letters indicates significant differences ( $p < 0.05$ ).

ND, non-determined due to lack of fit.

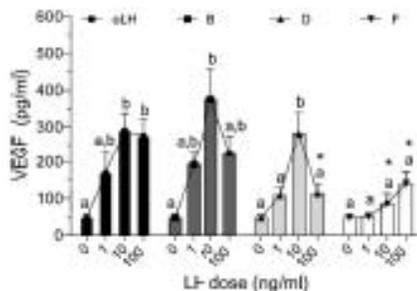
estrogenically active follicles. The concentration of progesterone secreted by the granulosa cells into the culture medium after treatment with increasing doses of the standard or of the various LH isoforms compared to the control group showed no differences.

Fig. 7 presents the results of VEGF production in the primary culture of granulosa cells exposed to different LH doses. It was observed that relative to the control (0 ng/ml), VEGF production at the lowest LH dose (1 ng/ml) was not different in the standard as it was in each isoform. For the intermediate dose (10 ng/ml), there was a positive response in the standard and the basic and neutral isoforms, except for the acidic isoform. The application of the highest dose (100 ng/ml) was significantly positive ( $p < 0.05$ ) only with the standard. The behavior of isoform F is consistent with that observed in cAMP production, where this isoform showed the lowest biological activity.

## 5. Discussion

Several studies have demonstrated the regulatory role exerted by LH on the expression, synthesis and secretion of VEGF in granulosa cells of dominant follicles (Christenson and Stouffer, 1997; Martinez-Chequer et al., 2003; Babitha et al., 2013, 2014). However, it has not yet been assessed whether the different LH isoforms show the same behavior with regard to VEGF production in granulosa cells of dominant follicles.

This study demonstrated that oLH isoforms isolated from the adenohypophysis were immunologically and biologically active, with a different magnitude response among isoforms. The isoforms showed the same molecular weight as the reference (NIDDK-oLH-1-2) pattern with a different isoelectric point. This group of isoforms represented different proportions of total LH



**Fig. 7.** VEGF secretion by cultured ovine granulosa cells 24 h after being stimulated either with standard oLH or the LH charge isoforms. Each point represents the mean  $\pm$  SE of three independent cultures with four sub-replicates for each culture. \*\* For each hormone, different letters among doses indicates significant differences at  $p < 0.05$ . \* In each dose, indicates significant differences at the level of  $p < 0.05$  between the isoform and the oLH standard.

(CM-3ab fraction), where the basic type of LH predominated.

The results of this study demonstrated a differential biological activity among oLH charge isoforms. Specifically, it was found in both bioassays that the basic-type isoform generated the greatest VEGF and cAMP production, whereas the acid-type isoform showed the lowest response. This result suggests the possibility of a directly proportional association between biological activity and the elution pH of each isoform, as has been previously reported by cAMP production with diabetic rat hypophysal extracts eluted in basic pH of chromatofocusing in HEK-293 cells transfected with the rat LH receptor (Olivares et al., 2009). The results also coincide with those of other *in vitro* studies performed with primary cultures of Leydig cells, which analyzed the response to applying human isoforms (Burgon et al., 1997; Robertson and Diczfalussy, 1977) and rat isoforms (Hattori et al., 1983) in terms of testosterone production; in all of those cases, the biological activity of the basic isoforms was greater than in the acidic ones. Even among basic oLH isoforms, significant differences have been observed in cAMP production by Leydig cells *in vitro* (Nakamura et al., 1993). Therefore, under the *in vitro* conditions assayed, basic oLH isoforms showed the greatest biological activity.

The mechanism by which these biological differences among isoforms are generated is not completely understood. However, it can be attributed to factors such as the glycosylation pattern and the sulfate and sialic acid contents of each isoform (Green et al., 1988; reviewed by Cooke et al., 1996; reviewed by Manzella et al., 1996; reviewed by Lambert et al., 1998; Ulloa-Aguirre et al., 2001). Additionally, the post-translational modifications that give rise to the oLH isoforms that define their chemical properties are specifically related to the affinity of the receptor and to signal transduction events (Sairam et al., 1994; Nakamura et al., 1993), associated with the biological response of the cells. The possibility of an effect of immature molecular aggregates of one of the subunits of LH that join the receptor and which do not produce a biological response cannot be

discarded (Burgon et al., 1997; Chaudhary and Muralidhar, 2007).

In this respect, there is a considerable body of evidence suggesting that glycosylation modulates LH bioactivity (Baenziger and Green, 1988; reviewed by Lambert et al., 1998; Ulloa-Aguirre et al., 2001). Chemical removal of approximately 80% of the oligosaccharides in oLH leads to a significant decrease in the production of testosterone, progesterone and cAMP (Sairam and Schiller, 1979; Sairam, 1990). In addition, the elimination of sialic acid (Burgon et al., 1996, 1997) and sulfate (Baenziger et al., 1992) in the structure of LH oligosaccharides leads to a decrease in the circulating half-life of the hormone (Burgon et al., 1996). This rapid depuration of the circulating isoforms is due to the high affinity of the hormone to the asialoglycoprotein receptor present in the liver (Fiete et al., 1991).

The result indicating that the basic isoform and the reference standard stimulated greater VEGF and cAMP production in the cells could be understood as a positive effect between the LH and the receptor, as has been reported in cAMP production and the gene expression for VEGF in bovine granulosa cells after treatment with LH (Garrido et al., 1993). The above study demonstrated an association between adenylate cyclase and protein kinase A (PKA) and the expression of VEGF mRNA, although there is also an increase in VEGF mRNA when protein kinase C (PKC) is activated. Although this study was not designed to correlate VEGF and cAMP in granulosa cells, VEGF production generated with the basic isoform could possibly be mediated by cAMP.

The effect of LH stimulation on the regulation of VEGF expression has been shown in granulosa cells of bovine dominant follicles with or without exposure to the preovulatory LH surge (Babitha et al., 2014), non-human primates (Hazard et al., 1999; Christenson and Stouffer, 1997; Martinez-Chequer et al., 2003) and humans (Guinera et al., 2009) with positive results in all cases on VEGF production in response to this gonadotropin. Additionally, the effect of progesterone and estradiol on the differential expression of different VEGF isoforms and their receptors in bovine granulosa cells has been demonstrated (Shimizu and Miyamoto, 2007). The results of the present study support the idea that LH favors VEGF synthesis and expression, given that: (1) the granulosa cells used for the primary culture were obtained from dominant follicles not exposed to a preovulatory LH surge; (2) the cells were cultured in a medium free of fetal bovine serum, without a supplement of substrates of the steroidogenic pathway; (3) the estradiol/progesterone ratio in the follicular fluid suggests estrogenically active follicles; and (4) the short exposure time of granulosa cells to the hormone (24 h) did not result in changes in the concentration of progesterone. Therefore, these factors together suggest that the change in VEGF production by ovine granulosa cells can be specifically attributed to treatment with the LH isoforms.

Previous studies have shown that fetal bovine serum contains growth factors (bFGF, bFGF-2, bFGF-1), LH and inhibin, which regulate the production of steroid hormones in bovine (Gong et al., 1994; Spicer et al., 1993) and ovine granulosa cells (Campbell et al., 1996), with an increase in the production of progesterone and estradiol

(Roberts and Echternkamp, 1994), steroid hormones associated with greater VEGF expression and synthesis (Shimizu and Miyamoto, 2007).

The increase in VEGF synthesis and expression in the follicular phase and the onset of the luteal phase (reviewed by Fraser and Wulff, 2001; Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010; Babitha et al., 2013) are physiological events regulated in part by the LH. Therefore, the demonstration of a differential effect on the *in vitro* biological activity among LH isoforms in VEGF production by granulosa cells of dominant follicles could have physiological implications, suggesting that the differential effect on biological activity among oLH charge isoforms could mean that they are being finely regulated, since the LH isoforms change their proportion at pituitary (Perera-Marin et al., 2008) and serum levels (Rojas-Maya et al., 2007; Arrieta et al., 2006; Perera-Marin et al., 2005) during the estrous cycle, which suggests that during the ewe estrous cycle the heterogeneous secretion pattern of LH could be differentially regulating VEGF production by granulosa cells in the dominant follicles.

A fraction that eluted at pH 9.5 (CM-3ab) and concentrated the LH was obtained during GPE purification in CM-Sepharose. This protein fraction showed physicochemical and immunological features similar to the reference LH. These findings are consistent with those reported in ruminant hypophyseal LH (Carranza et al., 1994; Perera-Marin et al., 2004, 1996). On the other hand, the results of the heterogeneity analysis of the CM-3ab fraction by means of chromatofocusing were similar to those observed in the bovine species (unpublished data), as well as the elution pattern observed during the analysis of ovine (Zalesky et al., 1992) and bovine hypophyseal extracts (Perera-Marin et al., 2008), where, from the isoforms isolated by chromatofocusing, the LH-immunoreactive proteins that eluted within the basic pH range predominated. Under all conditions the basic isoforms are predominant in hypophysis and in serum.

Each isolated isoform showed an approximate molecular weight pattern similar to the standard (NIDDK-oLH-1-2), where a 36.5 kDa protein predominated in non-reducing conditions and corresponded to the LH heterodimer. The presence of the 23.4 and 20.8 kDa proteins under reducing conditions showed the molecular weight pattern for each subunit. These results together are similar to those reported for the native form of LH and for each subunit of this protein (Sairam and Schiller, 1979; Perera-Marin et al., 1996; Carranza et al., 1994; Chaudhary and Muralidhar, 2007; Borromeo et al., 2014). The analysis of each isoform by immunoblotting confirmed that the protein with a relative approximate molecular weight of 36.5 kDa, as well as the proteins with approximate molecular weights of 20.8 and 23.4 kDa, corresponded to the LH structure.

During the electrophoretic analysis of the acidic isoforms (F and G) in reducing conditions, a protein of high molecular weight, ~75 kDa, which was immunoreactive to LH as was isoform F, was observed. The possibility that they are contaminant proteins can be discarded because the antibody used for the analysis of the immunoreactive LH was previously characterized for ovine (Arrieta et al., 2006) and bovine LH (Perera-Marin et al., 2008), where its high specificity to discriminate proteins structurally related to

the LH was observed. This finding thus affirms that this protein is a molecular aggregate of the hormone since it was not disaggregated with the  $\beta$ -mercaptoethanol treatment.

In the electrophoretic pattern under reducing conditions, isoforms C, D and E showed a protein with a approximate molecular weight of 15 kDa; this protein was not detected by immunoblotting, which suggests that it is a contaminant protein, and it was concentrated in the pH range from 8.97 to 6.19, a pH range of different PSH elution fractions (Perera-Marin et al., 2008). The other possibility is that it was an immature form of one of the subunits since studies on deglycosylated ovine LH show a protein under reducing conditions with a similar molecular weight (Manjunath et al., 1982). The possibility of a proteolytic breakdown of one of the subunits cannot be discarded (Stanton et al., 1993). It is interesting to note that in previous studies conducted in this laboratory on bovines a similar protein pattern was obtained (unpublished data).

In conclusion, seven oLH isoforms were obtained from an LH-rich GPE of ovine adenohypophyseal origin, which had a similar molecular weight to the reference standard and whose immunological (measured by RIA) and biological activity determined in *in vitro* cAMP and VEGF production was different among isoforms. In particular, the basic-type isoform generated the greatest cAMP and VEGF production, similar to the reference standard level. These results indicate that the different LH isoforms quantitatively regulate different VEGF production levels in granulosa cells.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### References

- Arrieta, E., Porras, A., Gonzalez-Padilla, E., Murcia, C., Rojas, S., Perera-Marin, G., 2006. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinizing hormone during the luteal phase. *Reprod. Fert. Dev.* 18, 485–492.
- Babitha, V., Pardo, R.P., Yadav, V.P., Choushan, V.S., Dangl, S.S., Khan, F.A., Singh, G., Bag, S., Tara Sharma, G., Silva, W.J., Sarkar, M., 2013. Amount of mRNA and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the ovarian follicle during estrous cycle of water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.* 137, 163–176.
- Babitha, V., Yadav, V.P., Choushan, V.S., Hyder, I., Dangl, S.S., Gupta, M., Khan, F.A., Tara Sharma, G., Sarkar, M., 2014. Luteinizing hormone, insulin like growth factor-I, and epidermal growth factor stimulate vascular endothelial growth factor production in cultured buffalo granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 198, 1–12.
- Baumgarten, J.H., Green, E.D., 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on luteotropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. Biophys. Acta* 947, 287–306.
- Baumgarten, J.H., Kumar, S., Brodbeck, R.M., Smith, P.L., Beranek, M.C., 1992. Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 334–338.
- Berisha, B., Schams, D., Kozmarec, M., Arnsperger, W., Dieropfer, B., 2000. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J. Endocrinol.* 167, 371–382.
- Berisha, B., Steffl, M., Wlitz, H., Klein, H., Meyer, H.H., Schams, D., Arnsperger, W., 2008. Effect of the luteinizing hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular

- matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. *Reprod. Fert. Dev.* 20, 258–268.
- Bollag, O.M., Edelestein, S.J., 1993. *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc., New York, USA.
- Borroni, V., Amsterdani, A., Berrini, A., Gaggioli, D., Dantón, A., Secchi, C., 2004. Characterization of biologically active bovine pituitary LH purified by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 179–183.
- Borroni, V., Berrini, A., De Grandi, F., Cremonesi, F., Fiamanone, N., Piccar, P., Secchi, C., 2014. A novel monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay to determine luteinizing hormone in bovine plasma. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 145–157.
- Burgen, P.G., Stanton, P.G., Robertson, K., Robertson, D.M., 1997. Effect of desialylation of highly purified isoforms of human luteinizing hormone on their bioactivity in vitro, radio-receptor activity and immunoreactivity. *Reprod. Fert. Dev.* 9, 501–508.
- Burgen, P.G., Stanton, P.G., Robertson, D.M., 1996. In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 137, 4827–4836.
- Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., Webb, R., 1996. Induction and maintenance of estradiol and progesterone production with LH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J. Reprod. Fert.* 106, 7–10.
- Carrazza, S.M.E., Amencora, M.E.V., Niet, R.B., Salas, V.A., 1994. Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Tec. Pecu. Mex.* 32, 5–17.
- Cooke, D.J., Crowe, M.A., Roche, J.P., Headen, D.R., 1996. Gonadotropin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 41, 77–99.
- Chaudhary, K., Muradikar, K., 2007. Caprine (*Capra hircus*) luteinizing hormone: purification and chromatographic investigation of its different isoforms. *Prog. Biotech. Biotechnol.* 37, 277–300.
- Chowdhury, M.W., Scaramuzzi, R.J., Wheeler-Jones, C.P., Khalid, M., 2010. The expression of angiogenic growth factors and their receptors in ovarian follicles throughout the estrous cycle in the ewe. *Theriogenology* 73, 856–872.
- Christenson, L.K., Stauffer, R.L., 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2135–2142.
- DeLean, A., Munson, P.J., Rodbard, D., 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.* 235, E97–E102.
- Flets, D., Srivastava, V., Hindiguel, O., Baumrager, J.J., 1997. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for 504-8GαhNαc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of luteotropin. *Cell* 67, 1103–1110.
- Fraser, H.M., Wulff, C., 2001. Angiogenesis in the primate ovary. *Reprod. Fert. Dev.* 13, 557–566.
- Garrido, C., Saule, S., Gospodarowicz, D., 1993. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 8, 103–117.
- Gong, J.C., McBride, D., Bramley, T.A., Webb, R., 1994. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth factor-1 and insulin on bovine granulosa cell stemogenesis in vitro. *J. Endocrinol.* 143, 157–164.
- Green, E.D., Adeli, G., Baumrager, J.J., Wilson, S., Van Halbeek, H., 1988. The asparagine-linked oligosaccharides on bovine lutein. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 263, 18253–18258.
- Greenaway, J., Corser, K., Pedersen, H.G., Coomber, B.L., LaMorte, J., Petrik, J., 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology* 145, 2936–2945.
- Gutierrez, M., Morales-Ruiz, M., Jimenez, W., Balazsch, J., 2009. LH/CG stimulation of VEGF and angiostatin production by follicular fluid macrophages and luteinized granulosa cells. *Reprod. Biomed. Online* 18, 743–749.
- Hattori, M., Sakamoto, K., Wakabayashi, K., 1983. The presence of LH components having different ratios of bioactivity to immunoreactivity in the rat pituitary gland. *Endocrinol. Jpn.* 30, 283–286.
- Hazzard, T.M., Melkness, T.A., Chaffin, C.L., Stauffer, R.L., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiostatin regulation by gonadotropin and steroids in macaque granulosa cells during the pre-ovulatory interval. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 1115–1121.
- Hunter, W.M., Greenwood, F.C., 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194, 495–496.
- Kaczmarek, M.M., Schams, D., Zieniĸ, A.J., 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology – an overview. *Reprod. Biol.* 5, 111–136.
- Lammers, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lambert, A., Talbot, J.A., Andrade, C.J., Robertson, W.R., 1998. Gonadotropin heterogeneity and biopotency: implications for assisted reproduction. *Mol. Hum. Reprod.* 4, G19–G29.
- Lee, A., Christenson, L.K., Patton, P.E., Barry, K.A., Stauffer, R.L., 1997. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum. Reprod. (Oxford, Engl.)* 12, 2756–2761.
- Lopez, C.J., Herrera, S.A., 2006. *Técnicas Ilustradas de Biología Molecular e Ingeniería Genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. MMB Elsevier, Madrid, Spain.
- Marquardt, P., Saitan, M.R., Schiller, F.W., 1982. Chemical deglycosylation of ovine pituitary luteotropin. A study of the reaction conditions and effects on biochemical, biophysical and biological properties of the hormone. *Biochem. J.* 207, 11–19.
- Marzella, S.M., Hooper, L.V., Baumrager, J.J., 1996. Oligosaccharides containing beta 1,4-linked N-acetylgalactosamine, a paradigm for protein-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* 271, 12117–12120.
- Mattiel, R.L., Papkoĸ, H., Ng, D.A., Swedlow, J.K., Chang, Y.S., 1986. Isolation and characterization of three forms of luteinizing hormone from the pituitary gland of the horse. *Biol. Reprod.* 34, 571–578.
- Martinez-Chaparro, J.C., Stauffer, R.L., Hazzard, T.M., Patton, P.E., Melkness, T.A., 2003. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol. Reprod.* 68, 1112–1118.
- Merchaca, A., Miller, V., Salveraglio, V., Roblani, E., 2007. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the short-term protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 76–87.
- Nakamura, Y., Nomura, K., Watanabe, M., Ujihara, M., Demura, H., 1993. Comparison of biological aspects among ovine luteinizing hormone isoforms with charge heterogeneity. *Endocr.* 3, 40, 73–81.
- Olivares, A., Mendez, J.P., Cardenas, M., Oviedo, N., Palomino, M.A., Santos, I., Perera-Marin, G., Gattienzo-Sagal, R., Ulloa-Aguirre, A., 2009. Pituitary-intracranial axis function, biological and immunological ratio and charge isoforms distribution of pituitary LH in male rats with experimental diabetes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 304–312.
- Olivares, A., Mendez, J.P., Zambrano, E., Cardenas, M., Tovar, A., Perera-Marin, G., Ulloa-Aguirre, A., 2010. Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 356–364.
- Perera-Marin, G., Falcon, A.A., Murcia, C., Hernandez-Coron, J., Gonzalez-Padilla, E., 2004. Purificación de cinco isoformas de hormona luteinizante bovina (LH). Caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica. *Vet. Mexico* 35, 129–145.
- Perera-Marin, G., Gattienzo, C.G., Murcia, C., Leon, H., Gonzalez-Padilla, E., 2008. Progesterone and the distribution of pituitary gonadotropin isoforms in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 164–176.
- Perera-Marin, G., Murcia, C., Gonzalez-Padilla, E., 2007. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance. *Anim. Reprod. Sci.* 101, 187–207.
- Perera-Marin, G., Murcia, C., Rojas, S., Hernandez-Coron, J., Gonzalez-Padilla, E., 2005. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 85, 53–63.
- Perera-Marin, G., Ortiz, R.F., Gamba, V.J.J., Reynoso, M.W., Falcon, A.A., Salas, V.A., 1996. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipofisis caprina (LH). *Vet. Mexico* 27, 1–10.
- Roberts, A.J., Echtenkamp, S.E., 1994. In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. *Biol. Reprod.* 51, 273–282.
- Robertson, D.M., Diczfalusy, E., 1977. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone: II. A comparison of the immunological and biological activities of pituitary extracts after electrofocusing using different standard preparations. *Mol. Cell. Endocrinol.* 9, 57–67.
- Rocha-Araujo, V., Graça, D.A.B., Bezerra, B.J., Pinho, L.C.A., de Figueiredo, J.R., 2011. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote (Cambridge, Engl.)* 21, 295–304.

- Rejas-Maya, S., Gonzalez-Padilla, E., Murcia-Mejia, C., Olivares-Segura, A., Hernandez-Coron, J., Perera-Marin, G., 2007. Caprine luteinizing hormone isoforms during the follicular phase and anestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 100, 280–290.
- Sairam, M.R., 1990. Complete dissociation of gonadotropin receptor binding and signal transduction in mouse Leydig tumor cells. Obligatory role of glycosylation in hormone action. *Biochem. J.* 269, 667–674.
- Sairam, M.R., Schiller, P.W., 1979. Receptor binding, biological, and immunological properties of chemically deglycosylated pituitary luteotropin. *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 294–301.
- Sairam, M.R., Zaky, A.A., Hassan, A.A., 1994. Isolation and characterization of distinct bioactive forms of LH from male buffalo pituitaries: differences localized to their alpha subunits. *J. Endocrinol.* 143, 313–323.
- Shimizu, T., Miyamoto, A., 2007. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 228–237.
- Spicer, L.J., Alipour, E., Schierskamp, S.R., 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor 1, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and/or insulin-like growth factor 1 production *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 77, 1232–1241.
- Stanton, P.G., Puzovik, G., Burgon, P.G., Robertson, D.M., Hearn, M.T., 1993. Isolation and characterization of human LH isoforms. *J. Endocrinol.* 138, 529–543.
- Taylor, P.D., Hillier, S.G., Fraser, H.M., 2004. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *J. Endocrinol.* 183, 1–17.
- Taylor, P.D., Wilson, H., Hillier, S.G., Wiggam, S.J., Fraser, H.M., 2007. Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the mare oviduct. *Mol. Hum. Reprod.* 13, 729–736.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.
- Ulloa-Aguirre, A., Maldonado, A., Damian-Matsumura, F., Timossi, C., 2001. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch. Med. Res.* 32, 520–532.
- Ungerfeld, R., Robles, E., 2002. Short term printings with different progestagen intravaginal devices (MAP/CA and CIDR) for oCG estrus induction in anestrus ewes. *Small Rumin. Res.* 46, 63–66.
- Webb, R., Campbell, B.K., 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64, 141–163.
- Zelenky, D.D., Nett, T.M., Grotjan, H.E., 1992. Ovine luteinizing hormone isoforms in the pituitary during the follicular and luteal phases of the estrous cycle and during anestrus. *J. Anim. Sci.* 70, 3851–3856.

## 10. DISCUSIÓN GENERAL

Dentro del proceso de foliculogénesis la participación de la LH es fundamental, en particular durante el desarrollo del folículo dominante en donde la estimulación de las células de la granulosa y de la teca por parte de ésta gonadotropina prepara las condiciones para la ovulación (Hunter et al., 2004). Adicionalmente, la LH se asocia con el proceso de angiogénesis que acompaña la formación del folículo dominante (Berisha et al., 2000; Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010). Cuyo mecanismo de la regulación depende de la expresión y síntesis del VEGF, el cual es considerado el principal actor dentro de los procesos angiogénicos (Rocha-Araujo et al., 2011). A pesar de que el proceso de regulación de la LH sobre el VEGF se ha documentado en diversas condiciones experimentales, incluyendo células de la granulosa (Christenson y Stouffer, 1997; Martínez-Chequer et al., 2003; Babitha et al., 2013; Babitha et al., 2014), hasta la fecha se desconoce si la heterogeneidad molecular de la LH se asocia a cambios en la producción de VEGF en las células provenientes de folículos dominantes.

En conjunto, la serie de resultados descritos en este estudio demuestran que las isoformas de carga de la LH de origen ovino presentaron características de peso molecular similares al estándar de referencia (NIDDK-oLH-I-2). Sin embargo, los grupos de isoformas (básicas, neutra o ácidas) mostraron diferente comportamiento inmunológico, ya que la isoforma básica y la neutra se comportaron de forma similar a la estándar. Adicionalmente, la isoforma básica B presentó la mayor capacidad biológica diferencial para estimular la producción de AMPc en células HEK-293 establemente transfectadas con el receptor a LH. Por otra parte, también se incrementó la producción de VEGF en cultivos primarios de células de la granulosa de folículos dominantes de ovino cuando se estimularon con la isoforma básica. Estos resultados sugieren que la existencia de heterogeneidad de la oLH se asocia con cambios en las características inmunológicas y de actividad biológica, esto último ocurre al menos cuando se utilizan sistemas *in vitro* para su evaluación.

En el Capítulo 6 encontramos que a partir de un EGP hipofisiario de origen ovino se obtuvieron siete isoformas de carga de oLH, las cuales se dividieron de acuerdo a su pH de elución en grupos de isoformas básicas (pH 10.56-7.83), neutras (pH 7.73-6.98) y ácidas (pH 6.83-3.66). En concordancia con experimentos realizados por Keel et al. (1987), Zalesky et al. (1992) y Arrieta et al. (2006), en nuestros extractos analizados predominó el grupo de isoformas básicas (73.5% de la LH inmunoreactiva recuperada). Estos resultados confirman la existencia de un mayor porcentaje de isoformas en el rango básico, el cual parece ser independiente del género y del estado fisiológico en el cual se encuentran los animales de donde se extraen (Perera-Marín et al., 2005; Rojas-Maya et al., 2007). De forma característica, las isoformas presentaron peso molecular similar a la oLH estándar; es decir, un peso aproximado de 36.5 kDa. Estos resultados son consistentes con reportes previos en otras especies (Sairam y Schiller, 1979; Carranza et al., 1994; Perera-Marín et al., 1996; Borromeo et al., 2004).

Adicionalmente, nuestros resultados demuestran la existencia de diferencias en la actividad inmunológica específica de las isoformas de oLH (Capítulo 6). A excepción de la isoforma más ácida (G), los ensayos inmunológicos presentaron curvas dosis-respuesta, en los cuales las isoformas básicas mostraron la mayor actividad inmunológica, a juzgar por los valores de IC<sub>50</sub> que resultaron significativamente inferiores a los de la oLH estándar y el resto de isoformas. En contraste, las isoformas ácidas presentaron la menor actividad inmunológica ya sea porque requirieron una mayor cantidad de proteína para alcanzar el valor IC<sub>50</sub> o porque no presentaron el comportamiento dosis-respuesta. En conclusión, los resultados que presentamos en el Capítulo 6 confirman observaciones previas realizadas por otros grupos de investigación y por el nuestro, las cuales sugieren que la existencia de heterogeneidad de la LH se asocia a propiedades bioquímicas e inmunológicas diferentes (Cooke et al., 1996; Perera-Marín et al., 2007).

Para demostrar la existencia de cambios en la actividad biológica asociados a las distintas isoformas de la oLH utilizamos ensayos *in vitro*. Para lo anterior seguimos dos estrategias: en la primera, evaluamos mediante un sistema heterólogo la

capacidad de las isoformas para producir AMPc, mientras que en la segunda, mediante un sistema homólogo evaluamos la capacidad de las isoformas para inducir la producción de VEGF.

Los resultados que presentamos en el Capítulo 7 demuestran mediante un modelo *in vitro* que la producción de AMPc fue dosis-dependiente y diferencial entre las distintas isoformas. En particular, las isoformas de tipo básico y la menos ácida mostraron un compartimiento similar al oLH estándar por unidad de LH inmunoreactiva en comparación con sus análogas neutra y más ácidas. Este resultado, coincidió con lo reportado previamente por Olivares et al., (2009; 2010) en extractos de hipófisis de rata diabética y obesa, eluidos a pH básico y ácido. Además, en un estudio reciente empleando éste modelo de células HEK-293 se evaluó la actividad biológica de isoformas de la LH bovina de origen hipofisiario (Ortega-León et al., 2016). En concordancia con nuestro estudio, los resultados de estos autores demuestran diferencias entre isoformas en la producción de AMPc por unidad de LH inmunoreactiva.

A pesar de ser un ensayo heterólogo, previamente se realizó un análisis comparativo de la alineación de la secuencia (BLAST) entre el receptor de la oLH (NP\_001265495.1, *Ovis aries*) y el receptor de la LH de rata (NP\_037110.1 *Rattus norvegicus*) y el resultado demostró una homología del 89% entre secuencias. Así mismo, nos basamos en la evidencia previamente reportada por Horvat y colaboradores (Horvat et al., 2001), en donde evaluaron la unión de la oLH al receptor de la LH de rata en las células HEK-293 y su producción de AMPc. Con base en los resultados obtenidos en las células HEK-293, consideramos a esta línea celular una buena herramienta metodológica para la evaluación de la actividad biológica *in vitro* de la oLH y sus isoformas.

Los resultados presentados en el capítulo 8 demostraron que las isoformas de la oLH resultaron biológicamente activas, con una respuesta diferenciada entre isoformas en la producción de VEGF cuando se evaluaron en el cultivo primario de células de la granulosa provenientes de folículos dominantes de ovino. La isoforma básica presentó la mayor producción de VEGF, mientras que su

contraparte la isoforma ácida generó la menor respuesta. En otros estudios, utilizando el modelo de las células de Leydig de rata *in vitro*, la isoforma básica mostró el mayor efecto biológico con respecto a la isoforma ácida (Robertson y Diczfalusy, 1977; Hattori et al., 1983; Burgon et al., 1997), observaciones que coinciden con lo encontrado con nuestro estudio. Cabe destacar que dichas observaciones se obtuvieron en cultivos primarios heterólogos, mientras que nuestros resultados se obtuvieron a partir de un cultivo primario homólogo, con lo cual se comprueban las sugerencias previas de una asociación directa entre la actividad biológica y el punto isoeléctrico de cada isoforma (Bergendah y Veldhuis, 2001).

La demostración de un efecto diferencial en la actividad biológica *in vitro* entre isoformas de la LH sobre la producción de VEGF por las células de la granulosa de folículos dominantes, podría tener implicaciones fisiológicas, debido a que está documentado que las isoformas de la LH cambian su proporción a nivel hipofisiario (Perera-Marín et al., 2008) y sérico (Perera-Marín et al., 2005; Arrieta et al., 2006; Rojas-Maya et al., 2007) durante el ciclo estral, lo que conlleva a pensar que durante el ciclo de la oveja, el patrón de secreción heterogéneo de la LH pudiera estar regulando de forma fina la producción del VEGF por las células de la granulosa en los folículos dominantes y que este incremento en la síntesis y expresión del VEGF en la fase folicular y el inicio de la fase lútea (Fraser y Wulff, 2001; Berisha et al., 2008; Chowdhury et al., 2010; Babitha et al., 2013), estén regulados por este grupo de isoformas de la LH.

Uno de los experimentos que realizamos nos indicó que el estado de luteinización de las células de la granulosa afectó tanto la producción de progesterona, así como la producción de VEGF. A pesar de que la producción de progesterona fue dosis-dependiente de la concentración de oLH utilizada, la producción de VEGF resultó muy variable, con lo cual no se encontró un patrón de respuesta que para el caso de las células luteinizadas fuera consistente con nuestras observaciones previas que indicaron de que la isoforma básica incrementa la producción de VEGF en células de la granulosa no luteinizadas. Nuestros resultados no

concuerdan con la observación previa de Christenson y Stouffer (1997) realizados en mono Rhesus, en donde encontraron que las células de la granulosa luteinizadas *in vitro* produjeron 8 veces más VEGF que las células de la granulosa no luteinizadas por efecto de la hCG.

Debido a que no nos fue posible evaluar la expresión de VEGF por las células de la granulosa estimuladas con las isoformas de la oLH, creemos necesario analizar en experimentos futuros la existencia de cambios en la expresión del ARNm para VEGF en dichas células. Con esta información se obtendría la correlación entre el incremento en la concentración de la proteína y la expresión del gene en respuesta a la estimulación con las isoformas de la oLH.

Finalmente, el hecho de haber demostrado que las isoformas de carga de la oLH presentan actividad biológica diferencial para estimular en un sistema homólogo la producción de VEGF, abre la posibilidad de realizar estudios *in vivo* para comprobar la consistencia de estos resultados. Actualmente, en nuestro grupo de trabajo se está considerando estudiar el efecto de las isoformas de la oLH sobre la expresión del VEGF y su actividad antiapoptótica en el folículo dominante. De igual forma, asociado a esta capacidad biológica diferencial sería posible pensar que cambios en el patrón de distribución de las isoformas podrían asociarse a fallas reproductivas. Tal podría ser el caso de un incremento sustancial en el porcentaje de la isoforma ácida, la cual se asoció a la menor producción de VEGF. De ser este el caso, sería posible pensar en una angiogénesis deficiente y la producción de folículos sin las características deseables para ovular. Sin embargo, todo esto queda como temas para estudios subsecuentes.

## 11. CONCLUSIONES

1.- Con el sistema de extracción y purificación se logró la obtención de isoformas de carga de la LH ovina con un adecuado rendimiento y grado de pureza que demostró que se trata de isoformas de carga, inmunológica y biológicamente activas.

2.- El sistema de evaluación biológica de LH con células HEK-293 transfectadas con el receptor a LH de rata, fue sensible a las isoformas de la oLH y nos permitió diferenciar la potencia biológica entre distintas isoformas. Las isoformas básicas generaron la mayor producción de AMPc cuando se comparó con las isoformas neutra y ácidas.

3.- El desarrollo del cultivo *in vitro* libre de suero, permitió evaluar el cambio en la secreción de VEGF por las células de la granulosa después del estímulo con isoformas de la oLH, lo cual resultó en una mayor producción de VEGF por la isoforma básica y neutra con respecto a la ácida.

## 12. REFERENCIAS

ARRIETA, E., PORRAS, A., GONZALEZ-PADILLA, E., MURCIA, C., ROJAS, S. & PERERA-MARIN, G. 2006. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinising hormone during the luteal phase. *Reprod Fertil Dev*, 18, 485-95.

BABITHA, V., PANDA, R. P., YADAV, V. P., CHOUHAN, V. S., DANGI, S. S., KHAN, F. A., SINGH, G., BAG, S., TARU SHARMA, G., SILVIA, W. J. & SARKAR, M. 2013. Amount of mRNA and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the ovarian follicle during estrous cycle of water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci*, 137, 163-76.

BABITHA, V., YADAV, V. P., CHOUHAN, V. S., HYDER, I., DANGI, S. S., GUPTA, M., KHAN, F. A., TARU SHARMA, G. & SARKAR, M. 2014. Luteinizing hormone, insulin like growth factor-1, and epidermal growth factor stimulate vascular endothelial growth factor production in cultured bubaline granulosa cells. *Gen Comp Endocrinol*, 198, 1-12.

BAENZIGER, J. U. & GREEN, E. D. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*, 947, 287-306.

BAENZIGER, J. U., KUMAR, S., BRODBECK, R. M., SMITH, P. L. & BERANEK, M. C. 1992. Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 334-8.

BARBONI, B., TURRIANI, M., GALEATI, G., SPINACI, M., BACCI, M. L., FORNI, M. & MATTIOLI, M. 2000. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod*, 63, 858-64.

BERGENDAH, M. & VELDHUIS, J. D. 2001. Is there a physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? III. Luteinizing hormone heterogeneity: a medical physiologist's perspective. *Hum Reprod*, 16, 1058-64.

BERISHA, B., SCHAMS, D., KOSMANN, M., AMSELGRUBER, W. & EINSPANIER, R. 2000. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol*, 167, 371-82.

BERISHA, B. & SCHAMS, D. 2005. Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol*, 29, 305-17.

BERISHA, B., STEFFL, M., WELTER, H., KLIEM, H., MEYER, H. H., SCHAMS, D. & AMSELGRUBER, W. 2008. Effect of the luteinising hormone surge on regulation of vascular endothelial growth factor and extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in bovine follicles. *Reprod Fertil Dev*, 20, 258-68.

BOLLAG, D. M. & EDELSTEIN, S. J. 1991. *Protein Methods*, New York, USA, Wiley-Liss, Inc.

BORROMEO, V., AMSTERDAM, A., BERRINI, A., GAGGIOLI, D., DANTES, A. & SECCHI, C. 2004. Characterization of biologically active bovine pituitary FSH purified by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Gen Comp Endocrinol*, 139, 179-89.

BORROMEO, V., BERRINI, A., DE GRANDI, F., CREMONESI, F., FIANDANESE, N., POCAR, P. & SECCHI, C. 2014. A novel monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay to determine luteinizing hormone in bovine plasma. *Domest Anim Endocrinol*, 48, 145-57.

BURGON, P. G., STANTON, P. G. & ROBERTSON, D. M. 1996. In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology*, 137, 4827-36.

BURGON, P. G., STANTON, P. G., PETTERSSON, K. & ROBERTSON, D. M. 1997. Effect of desialylation of highly purified isoforms of human luteinizing hormone on their bioactivity in vitro, radioreceptor activity and immunoactivity. *Reprod Fertil Dev*, 9, 501-8.

CABEZAS-PÉREZ, R., VALLEJO-PULIDO, A. F., FREYRE-BERNAL, S. I., UMAÑA-PÉREZ, A. & SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. 2011. IGF-II y la gonadotropina coriónica regulan la proliferación, migración e invasión de células de trofoblasto humano. *Acta Biológica Colombiana*, 16.

CAMPBELL, B. K., SCARAMUZZI, R. J. & WEBB, R. 1996. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J Reprod Fertil*, 106, 7-16.

CAMPBELL, B. K., SOUZA, C., GONG, J., WEBB, R., KENDALL, N., MARSTERS, P., ROBINSON, G., MITCHELL, A., TELFER, E. E. & BAIRD, D. T. 2003. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl*, 61, 429-43.

CARMELIET, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438, 932-6.

CARRANZA, S. M. E., AMEZCUA, M. E. V., NERI, R. B. & SALAS, V. A. 1994. Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Técnica Pecuaria México*, 32, 5-17.

CASTRO-FERNANDEZ, C., OLIVARES, A., SODERLUND, D., LOPEZ-ALVARENGA, J. C., ZAMBRANO, E., VELDHUIS, J. D., ULLOA-AGUIRRE, A. & MENDEZ, J. P. 2000. A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4603-10.

CHAUDHARY, R. & MURALIDHAR, K. 2007. Caprine (*Capra hircus*) luteinizing hormone: purification and chromatographic investigation of its different isoforms. *Prep Biochem Biotechnol*, 37, 277-300.

CHILDS, G. V., ELLISON, D. G. & GARNER, L. L. 1980. An immunocytochemist's view of gonadotropin storage in the adult male rat: cytochemical and morphological heterogeneity in serially sectioned gonadotropes. *Am J Anat*, 158, 397-409.

CHILDS, G. V., UNABIA, G. & ROUGEAU, D. 1994. Cells that express luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) beta-subunit messenger ribonucleic acids during the estrous cycle: the major contributors contain LH beta, FSH beta, and/or growth hormone. *Endocrinology*, 134, 990-7.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.

CHOWDHURY, M. W., SCARAMUZZI, R. J., WHEELER-JONES, C. P. & KHALID, M. 2010. The expression of angiogenic growth factors and their receptors in ovarian follicles throughout the estrous cycle in the ewe. *Theriogenology*, 73, 856-72.

CHRISTENSON, L. K. & STOUFFER, R. L. 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 2135-42.

CHRISTIN-MAITRE, S., VASSEUR, C., FAUSER, B. & BOUCHARD, P. 2000. Bioassays of gonadotropins. *Methods*, 21, 51-7.

COMBARNOUS, Y. 1988. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Dev*, 28, 211-28.

COOKE, D. J., CROWE, M. A., ROCHE, J. F. & HEADON, D. R. 1996. Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 41, 77-99.

CREUS, S., CHAIA, Z., PELLIZZARI, E. H., CIGORRAGA, S. B., ULLOA-AGUIRRE, A. & CAMPO, S. 2001. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol Cell Endocrinol*, 174, 41-9.

DAVIS, J. S., RUEDA, B. R. & SPANEL-BOROWSKI, K. 2003. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 89.

DELEAN, A., MUNSON, P. J. & RODBARD, D. 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol*, 235, E97-102.

DIMINO, M. J., SNITZER, J. & BROWN, K. M. 1987. Inositol phosphates accumulation in ovarian granulosa after stimulation by luteinizing hormone. *Biol Reprod*, 37, 1129-34.

DUFFY, D. M., MOLSKNESS, T. A. & STOUFFER, R. L. 1996. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in luteinized granulosa cells of rhesus monkeys are regulated in vitro by gonadotropins and steroids. *Biol Reprod*, 54, 888-95.

ESPINOZA-VILLAVICENCIO, J. L., ORTEGA, P. R., PALACIOS, E. A., VALENCIA, M. J. & ARÉCHIGA, F. C. F. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*, 32, 93-9.

FARES, F. 2006. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. *Biochim Biophys Acta*, 1760, 560-7.

FERRARA, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611.

FERRARA, N. & DAVIS-SMYTH, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4-25.

FERRARA, N., GERBER, H. P. & LECOUTER, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-76.

FIETE, D., SRIVASTAVA, V., HINDSGAUL, O. & BAENZIGER, J. U. 1991. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO<sub>4</sub>-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell*, 67, 1103-10.

FLORES, J. A., AGUIRRE, C., SHARMA, O. P. & VELDHUIS, J. D. 1998. Luteinizing hormone (LH) stimulates both intracellular calcium ion ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) mobilization and transmembrane cation influx in single ovarian (granulosa) cells: recruitment as a cellular mechanism of LH-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dose response. *Endocrinology*, 139, 3606-12.

FORTUNE, J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, 50, 225-32.

FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M., EVANS, A. C. & TURZILLO, A. M. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*, 65, 648-54.

FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M. & YANG, M. Y. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 109-26.

FRASER, H. M. & WULFF, C. 2001. Angiogenesis in the primate ovary. *Reprod Fertil Dev*, 13, 557-66.

GALET, C., MIN, L., NARAYANAN, R., KISHI, M., WEIGEL, N. L. & ASCOLI, M. 2003. Identification of a transferable two-amino-acid motif (GT) present in the C-terminal tail of the human lutropin receptor that redirects internalized G protein-coupled receptors from a degradation to a recycling pathway. *Mol Endocrinol*, 17, 411-22.

GALET, C. & ASCOLI, M. 2005. The differential binding affinities of the luteinizing hormone (LH)/choriogonadotropin receptor for LH and choriogonadotropin are dictated by different extracellular domain residues. *Mol Endocrinol*, 19, 1263-76.

GARNIER, J., PERNOLLET, J. C., TERTRIN-CLARY, C., SALESSE, R., CASTEING, M., BARNAVON, M., DE LA LLOSA, P. & JUTISZ, M. 1975. Conformational studies of ovine lutrophin (luteinizing hormone) and its native and chemically modified subunits by circular dichroism and ultraviolet adsorption spectroscopy. *Eur J Biochem*, 53, 243-254.

GARRIDO, C., SAULE, S. & GOSPODAROWICZ, D. 1993. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors*, 8, 109-17.

GEVA, E. & JAFFE, R. B. 2000. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril*, 74, 429-38.

GHARIB, S. D., WIERMAN, M. E., SHUPNIK, M. A. & CHIN, W. W. 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*, 11, 177-99.

GOODWIN, R. G., MONCMAN, C. L., ROTTMAN, F. M. & NILSON, J. H. 1983. Characterization and nucleotide sequence of the gene for the common alpha subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones. *Nucleic Acids Res*, 11, 6873-82.

GONG, J. G., MCBRIDE, D., BRAMLEY, T. A. & WEBB, R. 1994. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *J Endocrinol*, 143, 157-64.

GRAZUL-BILSKA, A. T., NAVANUKRAW, C., JOHNSON, M. L., VONNAHME, K. A., FORD, S. P., REYNOLDS, L. P. & REDMER, D. A. 2007. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J Anim Sci*, 85, 1914-22.

GREEN, E. D., ADELTE, G., BAENZIGER, J. U., WILSON, S. & VAN HALBEEK, H. 1988. The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, 263, 18253-68.

GREEN, E. D. & BAENZIGER, J. U. 1988. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem*, 263, 36-44.

GREENAWAY, J., CONNOR, K., PEDERSEN, H. G., COOMBER, B. L., LAMARRE, J. & PETRIK, J. 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*, 145, 2896-905.

GROTJAN, H. E., SCHANBACHER, B. D. & KEEL, B. A. 1991. Ovine luteinizing hormone. V. Significance of flow-through peaks observed during chromatofocusing as revealed by various methods of sample preparation and application. *J Chromatogr*, 549, 141-52.

GUIMERA, M., MORALES-RUIZ, M., JIMENEZ, W. & BALASCH, J. 2009. LH/HCG stimulation of VEGF and adrenomedullin production by follicular fluid macrophages and luteinized granulosa cells. *Reprod Biomed Online*, 18, 743-9.

HATTORI, M., SAKAMOTO, K. & WAKABAYASHI, K. 1983. The presence of LH components having different ratios of bioactivity to immunoreactivity in the rat pituitary glands. *Endocrinol Jpn*, 30, 289-96.

HAZZARD, T. M., MOLSKNESS, T. A., CHAFFIN, C. L. & STOUFFER, R. L. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod*, 5, 1115-21.

HAZZARD, T. M., XU, F. & STOUFFER, R. L. 2002. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod*, 67, 1305-12.

HEJL, K. M., WOLFE, M. W., KINDER, J. E. & GROTTJAN, H. E. 1992. Bioactive and immunoreactive concentrations of circulating luteinizing hormone during sexual maturation in the bovine. *Biol Reprod*, 46, 1205-10.

HIYAMA, J., SURUS, A. & RENWICK, A. G. 1990. Purification of human pituitary LH and thyrotrophin by hydrophobic chromatography. *J Endocrinol*, 125, 493-500.

HORVAT, R. D., BARISAS, B. G. & ROESS, D. A. 2001. Luteinizing hormone receptors are self-associated in slowly diffusing complexes during receptor desensitization. *Mol Endocrinol*, 15, 534-42.

HUNTER, W. M. & GREENWOOD, F. C. 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194, 495-6.

HUNTER, M. G., ROBINSON, R. S., MANN, G. E. & WEBB, R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 461-77.

JACK, G. W., BLAZEK, R., JAMES, K., BOYD, J. E. & MICKLEM, L. R. 1987. The automated production by immunoaffinity chromatography of the human pituitary glycoprotein hormones thyrotrophin, follitrophin and lutropin. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 39, 45-58.

JIA, X. C., PERLAS, E., SU, J. G., MORAN, F., LASLEY, B. L., NY, T. & HSUEH, A. J. 1993. Luminescence luteinizing hormone/choriogonadotropin (LH/CG) bioassay: measurement of serum bioactive LH/CG during early pregnancy in human and macaque. *Biol Reprod*, 49, 1310-6.

KACZMAREK, M. M., SCHAMS, D. & ZIECIK, A. J. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod Biol*, 5, 111-36.

KEEL, B. A., SCHANBACHER, B. D. & GROTTJAN, H. E., JR. 1987. Ovine luteinizing hormone. I. Effects of castration and steroid administration on the charge heterogeneity of pituitary luteinizing hormone. *Biol Reprod*, 36, 1102-13.

KOJIMA, F. N., CUPP, A. S., STUMPF, T. T., ZALESKY, D. D., ROBERSON, M. S., WERTH, L. A., WOLFE, M. W., KITTOCK, R. J., GROTTJAN, H. E. & KINDER, J. E. 1995. Effects of 17 beta-estradiol on distribution of pituitary isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod*, 52, 297-304.

KOOS, R. D. 1995. Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. *Biol Reprod*, 52, 1426-35.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

LAMBERT, A., TALBOT, J. A., ANOBILE, C. J. & ROBERTSON, W. R. 1998. Gonadotrophin heterogeneity and biopotency: implications for assisted reproduction. *Mol Hum Reprod*, 4, 619-29.

LEE, A., CHRISTENSON, L. K., PATTON, P. E., BURRY, K. A. & STOUFFER, R. L. 1997. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum Reprod*, 12, 2756-61.

LIAO, H., ZHOU, Q., GU, Y., DUAN, T. & FENG, Y. 2012. Luteinizing hormone facilitates angiogenesis in ovarian epithelial tumor cells and metformin inhibits the effect through the mTOR signaling pathway. *Oncol Rep*, 27, 1873-8.

LICHTENBERG, V., WEISE, H. C., GRAESSLIN, D. & BETTENDORF, G. 1984. Polymorphism of human pituitary lutropin (LH). Effect of the seven isohormones on mouse Leydig cell functions. *FEBS Lett*, 169, 21-4.

LIN, Y. F., TSENG, M. J., HSU, H. L., WU, Y. W., LEE, Y. H. & TSAI, Y. H. 2006. A novel follicle-stimulating hormone-induced G alpha h/phospholipase C-delta1

signaling pathway mediating rat sertoli cell Ca<sup>2+</sup>-influx. *Mol Endocrinol*, 20, 2514-27.

LOOSFELT, H., MISRAHI, M., ATGER, M., SALESSE, R., VU HAI-LUU THI, M. T., JOLIVET, A., GUIOCHON-MANTEL, A., SAR, S., JALLAL, B., GARNIER, J. & ET AL. 1989. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science*, 245, 525-8.

LUQUE, C. J. & HERRÁEZ, S. A. 2006. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*, Madrid, España, MMI Elsevier.

MANJUNATH, P., SAIRAM, M. R. & SCHILLER, P. W. 1982. Chemical deglycosylation of ovine pituitary lutropin. A study of the reaction conditions and effects on biochemical, biophysical and biological properties of the hormone. *Biochem J*, 207, 11-9.

MANZELLA, S. M., HOOPER, L. V. & BAENZIGER, J. U. 1996. Oligosaccharides containing beta 1,4-linked N-acetylgalactosamine, a paradigm for protein-specific glycosylation. *J Biol Chem*, 271, 12117-20.

MARTINEZ-CHEQUER, J. C., STOUFFER, R. L., HAZZARD, T. M., PATTON, P. E. & MOLSKNESS, T. A. 2003. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod*, 68, 1112-8.

MATTERI, R. L. & PAPKOFF, H. 1987. Characterization of equine luteinizing hormone by chromatofocusing. *Biol Reprod*, 36, 261-9.

MCFARLAND, K. C., SPRENGEL, R., PHILLIPS, H. S., KOHLER, M., ROSEMBLIT, N., NIKOLICS, K., SEGALOFF, D. L. & SEEBURG, P. H. 1989.

Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science*, 245, 494-9.

MCFEE, R. M. & CUPP, A. S. 2013. Vascular contributions to early ovarian development: potential roles of VEGFA isoforms. *Reprod Fertil Dev*, 25, 333-42.

MENCHACA, A., MILLER, V., SALVERAGLIO, V. & RUBIANES, E. 2007. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the short-term protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim Reprod Sci*, 102, 76-87.

MILLER, W. L. 2009. Androgen synthesis in adrenarche. *Rev Endocr Metab Disord*, 10, 3-17.

MULLEN, M. P., COOKE, D. J. & CROW, M. A. 2013. Structural and functional roles of FSH and LH as glycoproteins regulating reproduction in mammalian species. In: J, V. (ed.) *Gonadotrophin*. Croatia.

MURPHY, B. D. 2000. Models of luteinization. *Biol Reprod*, 63, 2-11.

NAKAMURA, Y., NOMURA, K., WATANABE, M., UJIHARA, M. & DEMURA, H. 1993. Comparison of biological aspects among ovine luteinizing hormone isoforms with charge heterogeneity. *Endocr J*, 40, 73-81.

NGUYEN, V. T., SINGH, V., BUTNEV, V. Y., GRAY, C. M., WESTFALL, S., DAVIS, J. S., DIAS, J. A. & BOUSFIELD, G. R. 2003. Inositol phosphate stimulation by LH requires the entire alpha Asn56 oligosaccharide. *Mol Cell Endocrinol*, 199, 73-86.

NISHIMURA, S., MAENO, N., MATSUO, K., NAKAJIMA, T., KITAJIMA, I., SAITO, H. & MARUYAMA, I. 2002. Human lactiferous mammary gland cells produce vascular endothelial growth factor (VEGF) and express the VEGF receptors, Flt-1 AND KDR/Flk-1. *Cytokine*, 18, 191-8.

NISWENDER, G. D., JUENGEL, J. L., SILVA, P. J., ROLLYSON, M. K. & MCINTUSH, E. W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev*, 80, 1-29.

NOMURA, K., OHMURA, K., NAKAMURA, Y., HORIBA, N., SHIRAKURA, Y., SATO, Y., UJIHARA, M., OHKI, K. & SHIZUME, K. 1989. Porcine luteinizing hormone isoform(s): relationship between their molecular structures, and renotropic versus gonadotropic activities. *Endocrinology*, 124, 712-9.

OLIVARES, A., MENDEZ, J. P., CARDENAS, M., OVIEDO, N., PALOMINO, M. A., SANTOS, I., PERERA-MARIN, G., GUTIERREZ-SAGAL, R. & ULLOA-AGUIRRE, A. 2009. Pituitary-testicular axis function, biological to immunological ratio and charge isoform distribution of pituitary LH in male rats with experimental diabetes. *Gen Comp Endocrinol*, 161, 304-12.

OLIVARES, A., MENDEZ, J. P., ZAMBRANO, E., CARDENAS, M., TOVAR, A., PERERA-MARIN, G. & ULLOA-AGUIRRE, A. 2010. Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *Gen Comp Endocrinol*, 166, 356-64.

ORTEGA-LEÓN, A., OLIVARES, A., MURCIA, C., DIAZ, D., GONZÁLEZ-PADILLA, E., GUTIERREZ-OSPINA, G., MONTERO, A. & PERERA-MARÍN, G. 2016. Actividad biológica e inmunológica de las isoformas de carga de la hormona luteinizante bovina. . *Rev Mex Cienc Pecu* 7, 29-51.

PARK, J. E., CHEN, H. H., WINER, J., HOUCK, K. A. & FERRARA, N. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, 269, 25646-54.

PARK, J. E., KELLER, G. A. & FERRARA, N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4, 1317-26.

PERERA-MARÍN, G., ORTIZ, R. F., GAMBOA, V. J. J., REYNOSO, M. W., FALCÓN, A. A. & SALAS, V. A. 1996. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipófisis caprina (gLH). *Veterinaria México*, 27, 1-10.

PERERA-MARÍN, G., FALCÓN, A. A., MURCIA, C., HERNÁNDEZ-CERÓN, J. & GONZÁLEZ-PADILLA, E. 2004. Purificación de cinco isoformas de hormona luteinizante bovina (bLH). Caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica. *Veterinaria México*, 35, 129-45.

PERERA-MARIN, G., MURCIA, C., ROJAS, S., HERNANDEZ-CERON, J. & GONZALEZ-PADILLA, E. 2005. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Anim Reprod Sci*, 86, 53-69.

PERERA-MARIN, G., MURCIA, C. & GONZALEZ-PADILLA, E. 2007. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance. *Anim Reprod Sci*, 101, 187-207.

PERERA-MARIN, G., GUTIERREZ, C. G., MURCIA, C., LEON, H. & GONZALEZ-PADILLA, E. 2008. Progesterone and the distribution of pituitary gonadotropin isoforms in cattle. *Anim Reprod Sci*, 104, 164-76.

PIERCE, J. G. & PARSONS, T. F. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 50, 465-95.

RICHARDS, J. S., RUSSELL, D. L., ROBKER, R. L., DAJEE, M. & ALLISTON, T. N. 1998. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol*, 145, 47-54.

ROBERTS, A. J. & ECHTERNKAMP, S. E. 1994. In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. *Biol Reprod*, 51, 273-82.

ROBERTSON, D. M. & DICZFALUSY, E. 1977. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone: II. A comparison of the immunological and biological activities of pituitary extracts after electrofocusing using different standard preparations. *Mol Cell Endocrinol*, 9, 57-67.

ROBERTSON, D. M., FOULDS, L. M., FRY, R. C., CUMMINS, J. T. & CLARKE, I. 1991. Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology*, 129, 1805-13.

ROCHA-ARAUJO, V., GRAÇA, D. A. B., BEZERRA, B. J., PINHO, L. C. A. & DE FIGUEIREDO, J. R. 2011. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote*, 21, 295-304.

ROJAS-MAYA, S., GONZALEZ-PADILLA, E., MURCIA-MEJIA, C., OLIVARES-SEGURA, A., HERNANDEZ-CERON, J. & PERERA-MARIN, G. 2007. Caprine luteinizing hormone isoforms during the follicular phase and anestrus. *Anim Reprod Sci*, 100, 280-90.

SAIRAM, M. R. & SCHILLER, P. W. 1979. Receptor binding, biological, and immunological properties of chemically deglycosylated pituitary lutropin. *Arch Biochem Biophys*, 197, 294-301.

SAIRAM, M. R. 1989. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J*, 3, 1915-26.

SAIRAM, M. R. 1990. Complete dissociation of gonadotropin receptor binding and signal transduction in mouse Leydig tumour cells. Obligatory role of glycosylation in hormone action. *Biochem J*, 265, 667-74.

SAIRAM, M. R., ZAKY, A. A. & HASSAN, A. A. 1994. Isolation and characterization of distinct bioactive forms of LH from male buffalo pituitaries: differences localized to their alpha subunits. *J Endocrinol*, 143, 313-23.

SENGER, P. L. 2003. *Pathways to pregnancy and parturition*, Hayden, Ross and Co.

SHIMIZU, T. & MIYAMOTO, A. 2007. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci*, 102, 228-37.

SPICER, L. J., ALPIZAR, E. & ECHTERNKAMP, S. E. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci*, 71, 1232-41.

STANTON, P. G., POZVEK, G., BURGON, P. G., ROBERTSON, D. M. & HEARN, M. T. 1993. Isolation and characterization of human LH isoforms. *J Endocrinol*, 138, 529-43.

STOUFFER, R. L., MARTINEZ-CHEQUER, J. C., MOLSKNESS, T. A., XU, F. & HAZZARD, T. M. 2001. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res*, 32, 567-75.

STUMPF, T. T., WOLFE, M. W., ROBERSON, M. S., CADDY, G., KITOK, R. J., SCHANBACHER, B. D., GROTHAN, H. E. & KINDER, J. E. 1992. Bovine luteinizing hormone (LH) isoforms and amounts of messenger ribonucleic acid for alpha- and LH beta-subunits in pituitaries of cows immunized against LH-releasing hormone. *Biol Reprod*, 47, 776-81.

TAMANINI, C. & DE AMBROGI, M. 2004. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim*, 39, 206-16.

TAMAY DE DIOS, L., IBARRA, C. & VELASQUILLO, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2, 70-78.

TAYLOR, P. D., HILLIER, S. G. & FRASER, H. M. 2004. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *J Endocrinol*, 183, 1-17.

TAYLOR, P. D., WILSON, H., HILLIER, S. G., WIEGAND, S. J. & FRASER, H. M. 2007. Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset. *Mol Hum Reprod*, 13, 729-36.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.

ULLOA-AGUIRRE, A., MALDONADO, A., DAMIAN-MATSUMURA, P. & TIMOSSO, C. 2001. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res*, 32, 520-32.

ULLOA-AGUIRRE, A., TIMOSSO, C., BARRIOS-DE-TOMASI, J., MALDONADO, A. & NAYUDU, P. 2003. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biol Reprod*, 69, 379-89.

UNGERFELD, R. & RUBIANES, E. 2002. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, 46, 63-66.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F., CORREA-OROZCO, A. & HENRY, O. J. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, 117-131.

WEBB, R. & CAMPBELL, B. K. 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64, 141-63.

WULFF, C., WILSON, H., WIEGAND, S. J., RUDGE, J. S. & FRASER, H. M. 2002. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology*, 143, 2797-807.

ZALESKY, D. D., NETT, T. M. & GROTTJAN, H. E. 1992. Ovine luteinizing hormone: isoforms in the pituitary during the follicular and luteal phases of the estrous cycle and during anestrus. *J Anim Sci*, 70, 3851-6.

ZALESKY, D. D., SCHANBACHER, B. D. & GROTTJAN, H. E. 1993. Effect of immunization against LHRH on isoforms of LH in the ovine pituitary. *J Reprod Fertil*, 99, 231-5.

ZELEZNIK, A. J. 2004. The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 31.

ZHANG, Z., YU, D., YIN, D. & WANG, Z. 2011. Activation of PI3K/mTOR signaling pathway contributes to induction of vascular endothelial growth factor by hCG in bovine developing luteal cells. *Anim Reprod Sci*, 125, 42-8.

ZIMMERMANN, R. C., HARTMAN, T., KAVIC, S., PAULI, S. A., BOHLEN, P., SAUER, M. V. & KITAJEWSKI, J. 2003. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest*, 112, 659-69.