

158

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

OBTENCION Y PURIFICACION DE LA HORMONA
FOLICULOESTIMULANTE
(F S H)
DE ORIGEN EQUINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

NOE DANIEL ZUÑIGA RESENDIZ

DIRECTOR DE TESIS

M. V. Z. SERGIO CORTES HUERTA



Cuautitlán Izcalli, Estado de Méx.

1 9 8 6



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 está 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.

I N D I C E

LISTA DE ABREVIATURAS	I
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	29
DISCUSION	38
CONCLUSIONES	40
FORMULARIO Y CALCULOS	41
BIBLIOGRAFIA	50

ABREVIATURAS USADAS EN ESTE TRABAJO

FSH.- Hormona estimulante de los folículos
LH.- Hormona luteinizante
TSH.- Hormona estimulante de la tiroides
HCG.- Hormona gonadotropina coriónica humana
HMG.- Hormona gonadotropina menopáusica humana
PMSG.- Hormona del suero de yegua preñada
PGF₂ alfa.- Prostaglandina F₂ alfa

CMC.- Carboximetil celulosa
DEAE-C.- Diethylaminoetil celulosa
Ac(NH₄)- Acetato de amonio
ET-OH.- Etanol

min ó ' .- Minutos

h .- Horas

g.- Gramos

mg.- Miligramos

ml.- Mililitros

M.- Molar

mM.- Milimolar

nm.- Nanómetros

PM.- Peso molecular

V.- Volumen

°C.- Grados centígrados

rpm.- Revoluciones por minuto

PG.- Polvo cetónico

Ex-C-GIP.- Extracto crudo de glucoproteínas

Sn.- Sobrenadante

P.- Precipitado

R.- Residuo

DO.- Densidad óptica

I N T R O D U C C I O N

La hormona estimulante de los folículos (FSH), también conocida como folitropina, luteoantina, tilakentrina, gonadotropina A, gonadotropina I o prolán A, (3,23,25,30,33) es una de las hormonas gonadotrópicas producidas en la glándula hipófisis (erroneamente llamada glándula pituitaria)⁺, - específicamente por las células basófilas de la adenohipófisis. (8,30)

⁺"El término hipófisis (derivado del griego y que significa de pequeño tamaño) fué empleado primero por Solmering, y es más apropiado que el término pituitaria. Galeno y los anatomistas medievales creyeron que la hipófisis funcionaba como un órgano secretor, que absorbía líquido y desechos del cerebro para expulsarlos por la cavidad nasofaríngea. Esta creencia dió pie para la utilización del término pituitaria (del latín que significa légamo, humor viscoso), que no es adecuado a la luz de nuestros conocimientos actuales respecto a dicha glándula". (9,36)

El contenido de FSH en las hipófisis de diferentes especies es el siguiente: (24,30)

bovinos	muy bajo
ovinos y porcinos	intermedio
conejos y ratas	alto
caballos	muy alto

COMPOSICION QUIMICA DE LA FSH

La FSH, al igual que otras dos hormonas hipofisarias (hormona luteinizante-LH-, y hormona estimulante de la tiroides-TSH-) es de naturaleza glucoproteica, consistente de un núcleo proteínico con cadenas de carbohidratos terminadas en ácido siálico. (7,17,34) Está formada de dos subunidades distintas denominadas alfa y beta, (7,13,17) mantenidas juntas por uniones no covalentes. (7) Se ha demostrado en varias especies, incluyendo al humano, que las subunidades alfa son comunes a las tres hormonas glucoproteicas hipofisarias, extendiéndose esta característica a la gonadotropina de origen placentario en el humano. (7,13,17)

Por otro lado, existe gran variedad en la subunidad beta, la cual confiere tanto especificidad hormonal como de especie, (13,17) aunque se han encontrado fracciones polipeptídicas comunes en las diferentes subunidades beta, las que se supone están involucradas en el enlace con la subunidad alfa común. Varios estudios químicos y espectroscópicos han reforzado este punto de vista y conducido a la hipótesis de que en determinadas especies las áreas de unión entre las subunidades de todas estas hormonas son idénticas. De esta manera se pueden obtener moléculas híbridas por recombinación de la subunidad beta con cualquiera de las subunidades alfa. (7,13)

Cada una de las subunidades por separado tiene una actividad biológica insignificante o nula, pero cuando se combinan se restaura su actividad, algunas veces al mismo -

nivel o mayor todavía que el de la hormona nativa, característica dada por la particular subunidad beta usada para la recombinación. (13,17,34)

El contenido de carbohidratos de la FSH es de aproximadamente 25%. Las cadenas de carbohidratos se componen de manosa, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico), siendo este último de gran importancia para la actividad biológica máxima de una hormona glucoproteica, ya que alarga su vida media circulatoria. El contenido de ácido siálico de la FSH es de 5%, (13,17,34) teniendo una vida media circulatoria de aproximadamente 2 horas. (17)

La unidad polisacárida se une a la cadena polipeptídica mediante un puente entre la N-acetilglucosamina y la asparagina.⁺⁺(17)

La FSH está constituida por los siguientes aminoácidos:
(3,7)

Acido aspártico ⁺⁺	Leucina
Treonina	Tirosina
Serina	Fenilalanina
Acido glutámico	Histidina
Prolina	Lisina
Glicina	Arginina
Alanina	Triptófano
Valina	
Cisteína	
Metionina	
Isoleucina	

††.- La asparagina y el ácido aspártico son distintos únicamente en una molécula NH_2 que tiene la asparagina y que no presenta el ácido aspártico; (18) es posible que esa molécula se pierda o no durante la purificación de la -- hormona, y esa sea la causa de que algunos autores reporten asparagina y otros ácido aspártico.

Tiene un punto isoeléctrico de 4.5 (11,23) - 4.6 en ovejas, 4.8 en cerdos -, (30) es soluble en agua, en solución salina fisiológica y en solución alcohólica al 50%. También es soluble en un pH de 4.4 bufferado con acetato y conteniendo 20.5% de sulfato de sodio. (23)

Su peso molecular varía de 29 000 a 70 000 (17,23,24,30)

FSH ovina PM 30 000, (13) 33 800 (17) & 67 000 (24,30)

FSH porcina PM 29 000 (24,30)

FSH bovina PM 37 300 (17)

FSH equina PM 33 200 (17)

Estas diferencias entre los valores del PM pueden ser debidas a cambios estructurales durante la extracción y purificación de las hormonas; además de que las hipófisis usadas para la extracción se recolectan en rastros, (2,17) en donde se pueden encontrar glándulas de animales sexualmente maduros, - inmaduros, intactos, gonadectomizados, gestantes y vacíos, y se ha demostrado que el extraco de FSH hipofisiaria de monas ovalectomizadas es distinto al de monas intactas. (17)

PROPIEDADES FISIOLÓGICAS DE LA FSH

En primer lugar, hay que tomar en cuenta que la FSH y la LH no son entidades fisiológicas completamente separadas y -- que sus acciones individuales presentan un interés más bien -- químico y académico, observándose que las gonadotropinas al -- igual que las hormonas sexuales actúan de manera sinérgica.

(10)

El papel de la FSH en la hembra es el de estimular el de sarrollo folicular en el ovario al inicio de éste, y además -- se requiere para la formación del antro folicular (13,15) ya que la receptividad del ovario al comenzar el crecimiento y -- desarrollo folicular parece que depende esencialmente de la -- cantidad de FSH circulante. (4)

Una acción más importante de la FSH actuando sinérgica-- mente con el estrógeno, es causar la formación de los recepto res de FSH y de LH en las células granulosas foliculares, (17) además de que el estradiol (E_2) aumenta la acción estimulato ria sobre la esteroidogénesis. (4,35) Para la maduración com pleta del folículo y la producción de estrógenos ováricos son necesarias tanto FSH como LH. (4,11,15,17,33)

En el macho la FSH tiene importancia para el desarrollo de las gónadas antes de la pubertad, ya que parece ser neces a ria para iniciar la secuencia espermatogénica. (17,29) La FSH sola no parece influir en la secreción de esteroides por los testículos, (29) pero en adición con la LH causa un marcado -- incremento en la concentración de testosterona en la linfa -- testicular. (37)

Los efectos de esta hormona están por tanto casi confinados a una acción directa sobre el epitelio germinal, en donde propicia síntesis proteínica y mantiene a dicho epitelio, y - sobre las células de sostén (Sertoli) de los tubos seminife--ros, en las que estimula la secreción de proteína ligadora de andrógeno, manteniendo por tanto altos niveles de testosterona en la luz del tubo seminífero. (11,13,17,29)

A manera de resumen, se puede decir que la progresión --rítmica y sincrónica de la espermatogénesis es el resultado - de la acción combinada de la FSH y de los andrógenos secreta--dos por las células intersticiales testiculares (Leydig) ba--jo la estimulación de la LH.

Aunque se ha considerado que en machos la secreción de - gonadotropinas no se realiza en forma cíclica, algunos estu--dios en animales sugieren la existencia de un ritmo circadia--no que quizá esté bajo la influencia de la glándula pineal; - lo anterior está apoyado en variaciones diurnas en la concen--tración de testosterona en el plasma. (22)

Control de la secreción de FSH

La regulación de la secreción de FSH y LH por la adenohi--pófisis está basada en una interacción entre un agente neuro--hormonal del hipotálamo y un sistema de retroalimentación en el que participan los esteroides sexuales (estrógenos y andró--genos). (13,15,24,28)

Se han demostrado factores de liberación capaces de libe--rar FSH y LH de la hipófisis in vitro y también in vivo en -

animales y humanos, además de que también estimulan la síntesis de FSH y LH in vitro. Se presume que una sola hormona hipotalámica participa en la regulación de la secreción de FSH y LH. (22)

Los niveles elevados de esteroides sexuales retroalimentan al hipotálamo para que éste a su vez disminuya la producción del factor liberador de FSH, que por tanto dejará de estimular a la hipófisis y ésta suspenderá la producción de la FSH. (13,15,24)

Además, ciertas condiciones del medio como los cambios de estación y por tanto la duración de los días, llegan al hipotálamo mediadas por algún exteroceptor como el ojo e influyen sobre la producción del factor liberador de la FSH. (24, 26,33)

USOS DE LA FSH

La FSH o algunas otras hormonas con funciones de FSH como la gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG), la gonadotropina menopáusica humana (HMG), también conocida como -pergonal, (2,23) o simplemente el extracto hipofisiario anterior son utilizadas para tratar algunos desórdenes de tipo sexual tanto en hembras como en machos.

En hembras se utiliza para el tratamiento del anestro de bido a infantilismo genital, a ovarios atrésicos o por bajas concentraciones de gonadotropinas; también se usa para corregir calores silenciosos, estro normal pero sin posterior fe--cundación por falta de ovulación, y en algunos casos para producción de estro en el periodo de reposo sexual o bien, para adelantar la aparición de los primeros calores. En machos es usada para casos de retardo sexual, ausencia de líbido, azoospermia u oligospermia o atrofia testicular. (16,23,24,25,30)

En humanos se recomienda en los casos de amenorrea o de ciclos anovulatorios con esterilidad cuando es de origen hipofisiario -hipogonadismo hipogonadotrópico con escasez o falta de gonadotropinas urinarias-. (19)

Hiperovulación

Actualmente, el uso sobre todo de la FSH y de la PMSG se centra en la inducción de la hiperovulación en el ganado para la transferencia de embriones. (1,2,5,6,14,20,21,26,32)

La hiperovulación es el incremento de la respuesta ovulatoria natural producido por la administración de hormonas exógenas, y tiene como objetivo aumentar el número de óvulos via

bles en cada ciclo estral, ya que existe en el ovario una cantidad mucho mayor de óvulos de los que podrían ser liberados a lo largo de toda la vida de una hembra, aumentando de esta manera el potencial reproductivo de la misma.

Esta gran cantidad de óvulos se convertirían en embriones al ser fertilizados, pero por otra parte, esta hembra hiperovulada no podría llevar a término la gestación de todos estos embriones, por lo que es necesario extraerlos para ser transferidos a otras hembras que se deben encontrar en el mismo momento del ciclo estral y que actuarían como incubadoras para llevar a término la gestación. (2,5,21,32)

La posibilidad de estimular la maduración de los ovocitos para obtener un mayor número de óvulos de un animal fué demostrada en 1927 por Engle, que experimentó en ratones: y Casida y col. la aplicaron a la vaca en 1940, esta técnica se llamó hiperovulación. (5)

La técnica de la transferencia de embriones se inició en 1890 cuando Heape transfirió con éxito dos óvulos fertilizados de coneja, y a partir de 1949 el método fué utilizado en animales domésticos. (2,21)

Para producir la hiperovulación se aplican hormonas que induzcan el crecimiento de una gran cantidad de folículos en los ovarios, siendo las más utilizadas la PMSG y la FSH, aunque los primeros trabajos fueron hechos con extractos hipofisarios. También se pueden usar otras hormonas como la HMG o pergusonal. (1,2,5,6,14,20,21,26,32)

Para controlar el tiempo de ovulación se puede administrar LH, gonadotropinas con LH o similares como HCG, o bien -

prostaglandinas como la PGF_2 alfa. (2,5)

En la actualidad, la FSH tiende a sustituir a cualquiera de las otras hormonas, ya que se han obtenido mejores respuestas con ésta que con la PMSG o que con el pergonal, (1,2) a pesar de que con la PMSG se requiere por lo general de una sola aplicación, mientras que para la FSH se necesitan varias. (1,2,5,6,14,20,21)

Ejemplo: en el trabajo de Arriola, A.S.P. y Jacob, Z.M.R. se usó para la PMSG una sola aplicación de 3 000 U.I. por animal por vía intramuscular el día 13 del ciclo estral (día 0 = estro), después de la aplicación de PMSG, se les administró una dosis de 30 mg de PGF_2 alfa por vía intramuscular.

Para la FSH, la dosis fué de 40 mg por vía intramuscular, dividida en 8 dosis, aplicadas 2 diarias con intervalos de 12 horas, y disminuyendo progresivamente en 4 días, empezando el tratamiento el día 9 del ciclo estral.

Día 9	del ciclo	8 mg	12 h	8 mg
" 10	" "	6 "	" "	6 "
" 11	" "	4 "	" "	4 "
" 12	" "	2 "	" "	2 "

Después de 72 horas de la primera aplicación de FSH, se inyectó una dosis de 30 mg de PGF_2 alfa por vía intramuscular.

A la fecha, en México sólo un laboratorio produce FSH, ya que los demás manejan gonadotropina coriónica o -la mayoría- extracto hipofisario anterior, que contiene todas las hormonas producidas en la adenohipófisis, por lo que su aplicación es un tanto general. (27) De ahí la importancia de la purificación de la FSH para un uso más específico como la hi-

perovulación para la transferencia de embriones.

PURIFICACION DE LA FSH

La purificación de las hormonas gonadotrópicas a partir de tejido hipofisiario, se basa en el empleo de la precipitación etanólica y de la cromatografía sobre carboximetil celulosa y dietilaminoetil celulosa, y también sobre el empleo de sefadex. (3,7,10)

La estimación de la actividad biológica de la FSH puede ser efectuada tanto por ensayos inmunológicos como biológicos. (3,7,10)

Algunos de los ensayos biológicos se presentan en el cuadro de la página siguiente. (30,31)

En este trabajo se empleará para la purificación la precipitación etanólica y la cromatografía sobre carboximetil celulosa y dietilaminoetil celulosa; y para la estimación de la actividad biológica, el método propuesto por Steelman y Pohlley, que se basa en el crecimiento de los ovarios bajo estimulación de HCG y FSH. (3,7,31)

Para poder hacer una evaluación correcta de la respuesta ovárica a las gonadotropinas exógenas, se deben tomar en cuenta los siguientes factores: cantidad de gonadotropinas endógenas, estimulación previa de los ovarios, número de folículos presentes, calidad intrínseca de la respuesta folicular, factores inhibitorios de gonadotropinas y, por último, el tipo de preparación de gonadotropinas y el modo de administración.

DIFERENTES BIOENSAYOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LA F S H

Animal experimental y preparación	Reacción	Autor (es)
Ratas machos inmaduras hipofisectomizadas, tratadas con HCG	aumento de peso testicular	Paesi, Wijnans, de Jongh
Ratas machos hipofisectomizados	aumento de peso testicular	Greep y col.
Sapos machos	descarga de espermatozoides	Hobson
Ratas hembras inmaduras hipofisectomizadas	crecimiento folicular	Evans y col.
Ratas hembras inmaduras	aumento de peso de los ovarios	Fevold y col.
Ratas hembras hipofisectomizadas tratadas con estrógenos	aumento de peso de los ovarios	Payne y col.
Ratones hembras inmaduros tratados con HCG	aumento de peso de los ovarios	Brown
Ratas hembras inmaduras tratadas con HCG	aumento de peso de los ovarios	Simpson, Evans
Ratas hembras inmaduras tratadas con HCG	aumento de peso de los ovarios	Steelman, Pohley

O B J E T I V O

El presente trabajo tiene como fin el extraer y purificar la hormona folículo estimulante (F S H) a partir de hipófisis de equino.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

A) EQUIPO

Licuadaora con vaso metálico

Bomba de vacío

Agitador magnético

Cámara fría a 4°C

Cámara a - 15°C

Centrífuga refrigerada DAMON/IEC DIVISION mod. PR-600
con capacidad para 4 litros

Potenciómetro ORION RESEARCH mod. 301

Espectrofotómetro BECKMAN mod. 25 con luz ultravioleta

Balanza analítica SARTORIUS mod. 1402 con sensibilidad
de 0.1 mg

Balanza granataria TRIPLE BEAM BALANCE con capacidad -
para 2610 g

B) MATERIAL

Pinzas de disección y tijeras

Papel aluminio

Papel filto Whatman # 1

Bolsa de diálisis

Espátula

Manguera millipore

Jeringas de 1 ml (insulina)

Matraces Erlen Meyer graduados de diferentes capacidades

Vasos de precipitado graduados de diferentes capacidades

Probetas graduadas de distintas capacidades

Pipetas graduadas de 10, 5 y 1 ml 1/10, de 2.0 ml 2 en
1/100 y de 0.1 ml 1/10 en 1/100

Embudo Büchner de 20 cm de diámetro, de poro fino

Matraz kitasato de 1000 ml

Matraces bola de 1000 ml

Hielo seco

C) REACTIVOS

- Acetona $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$

LAB. MONTERREY

- Eter $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$

LAB. J.T. BAKER

- Alcohol etílico absoluto $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

LAB. MERCK

- Acido Clorhídrico HCl

LAB. J.T. BAKER

- Hidróxido de sodio NaOH

LAB. MERCK

- Acetato de amonio $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

LAB. MERCK

- Glicina (glicocola) $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$

LAB. SIGMA

- Carboximetil celulosa (CMC)

LAB. MERCK

- Dietilaminoetil celulosa (DEAE-C)

LAB. J.T. BAKER

- Albúmina sérica bovina (fracción V)

LAB. J.T. BAKER

- Solución salina fisiológica

D) MATERIAL BIOLÓGICO

- 450 hipófisis de equino obtenidas en el rastro, no
importando el sexo, edad ni estado fisiológico -
del animal donante

- FSH-P (origen porcino)

equivalente a 5 mg por ml

BURNS-BIOTEC LABORATORIES, INC.

- HCG

equivalente a 250 U.I. por ml

LAB. SANFER

E) METODO

Se dividió en las siguientes etapas :

- I) Obtención del polvo cetónico (diagrama No. 1)
- II) Obtención del extracto crudo de glucoproteínas (diagrama No. 2)
- III) Separación de TSH-LH-FSH (diagrama No. 3)
- IV) Purificación de FSH (diagrama No. 4)
- V) Bioensayo de FSH

I.- OBTENCION DEL POLVO CETONICO

- Se colocaron las 450 hipófisis en 750 ml de acetona fría
- se dejaron fijar por 72 h
- se quitó el tejido conjuntivo adherido a la glándula
- se separó el lóbulo anterior del posterior
- se dejaron secar los lóbulos anteriores por 24 h a 4°C
- se cortaron en trozos pequeños
- se depositaron los trozos en el vaso de la licuadora - agregándoles 300 ml de acetona fría y aproximadamente 250 g de hielo seco
- se licuó durante 5 min
- se filtró el licuado en el Büchner con papel filtro y bomba de vacío y se desechó el filtrado
- el residuo se licuó con 300 ml de acetona fría y aprox. 250 g de hielo seco
- se filtró y se desechó el filtrado
- el residuo se licuó nuevamente con 300 ml de éter frío y aproximadamente 250 g de hielo seco

- se filtró y se desechó el filtrado
- el residuo se dejó secar por 48 h a 4°C
- este residuo se denominó polvo cetónico (PC) y se pesó

II.- OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO DE GLUCOPROTEINAS

- Por cada 10 g de PC se agregaron 120 ml de acetato de amonio al 10% pH 5.1 y 80 ml de etanol absoluto
- se agitó durante 24 h a 4°C
- se centrifugó a 2500 rpm por 15 min a 4°C guardando el sobrenadante (Sn)
- el precipitado se resuspendió con 10 ml de ac. de amonio al 10% pH 5.1 y 4 ml de etanol absoluto por cada 10 g de PC
- se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min a 4°C guardando este Sn con el primero
- el precipitado se resuspendió con 30 ml de etanol absoluto por cada 10 g de PC
- se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min a 4°C agregándose este Sn a los dos anteriores y desechando el precipitado
- el total de Sn se midió y se dejó en agitación durante 48 h a 4°C
- se agregó etanol absoluto frío por goteo en una cantidad igual al doble del volumen obtenido con los tres Sn. Este proceso se conoce con el nombre de precipitación etanólica y se llevó a cabo en la cámara fría a 4°C
- se agitó durante 60 min a 4°C y se decantó por aspira-

ción

- se centrifugó a 3000 rpm por 20 min desechando el Sn
- el precipitado se resuspendió con 100 ml de etanol absoluto
- se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min desechando el Sn
- se resuspendió el precipitado con 100 ml de acetona -- fría
- se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min desechando el Sn
- el precipitado se dejó secar por 48 h a 4°C y se pesó
- este precipitado se denominó extracto crudo de gluco-- proteínas (Ex-C-G1P) y contiene TSH, LH y FSH
- se resuspendió con 75 ml de ac. de amonio 5.0 mM pH - 4.5

III.- SEPARACION DE TSH-LH-FSH

- el Ex-C-G1P se depositó en una bolsa de diálisis
- se suspendió la bolsa de diálisis en una probeta
- se aforó la probeta a 2000 ml con acetato de amonio - 5.0 mM pH 4.5
- se agitó durante 24 h a 4°C
- el Ex-C-G1P dializado se depositó en un matraz bola -- agregándole 1 g de CMC previamente activada* por cada - 100 mg de Ex-C-G1P y 400 ml de ac. de amonio 5.0 mM pH 4.5
- se agitó durante 2 h a 4°C
- se filtró en el Büchner con papel filtro y bomba de va

cío

- se recuperó el filtrado que se denominó CM-1 y que contiene principalmente FSH
- el residuo se resuspendió con 400 ml de ac. de amonio 1.0 M pH 6.5
- se agitó durante 2 h a 4°C y se filtró
- se recuperó el filtrado que se denominó CM-2 y que contiene principalmente LH
- el residuo se resuspendió con 400 ml de ac. de amonio 1.0 M pH 9.5
- se agitó durante 2 h a 4°C y se filtró
- se recuperó el filtrado que se denominó CM-3 y que contiene principalmente TSH
- el residuo (CMC) se guardó en 200 ml de agua destilada
- de la fracción CM-1 se tomó una muestra de 25 ml para leer pH y determinar proteínas por DO a 270 nm
- el resto de la fracción CM-1 y las otras dos fracciones se guardaron a -15°C

* .- ACTIVACION DE LA CMC

- lavar con agua destilada
- filtrar
- lavar con NaOH 1.0 N y dejar reposar por 24 h
- lavar con agua destilada y filtrar
- lavar con HCl 1.0 N y dejar reposar por 24 h
- lavar con agua destilada y filtrar al momento de usarla

IV.- PURIFICACION DE FSH

- A la fracción CM-1 se le agregó 1 g de DEAE-C previamente ^{**} activada por cada 100 mg de Ex-C-GLP y 400 ml de glicina 1.0 M pH 9.5
- se agitó durante 2 h a 4°C y se filtró
- se recuperó el filtrado que se denominó CM-1-DEAE-1
- el residuo se resuspendió con 400 ml de ac. de amonio 1.0 M pH 6.5
- se agitó por 2 h a 4°C y se filtró
- se recuperó el filtrado que se denominó CM-1-DEAE-2
- el residuo se resuspendió con 400 ml de ac. de amonio 5.0 mM pH 4.5
- se agitó durante 2 h a 4°C y se filtró
- se recuperó el filtrado que se denominó CM-1-DEAE-3

Este mismo proceso se llevó a cabo con la fracción CM-2, guardando el último residuo (DEAE-C) en 200 ml de agua - destilada.

Las fracciones obtenidas fueron las siguientes:

CM-1-DEAE-1, CM-2-DEAE-1 que contienen TSH

CM-1-DEAE-2, CM-2-DEAE-2 que contienen LH

CM-1-DEAE-3, CM-2-DEAE-3 que contienen FSH

De las últimas dos fracciones se tomó una muestra de 25 ml cada una para leer pH y determinar proteínas por DO - a 270 nm.

El resto de estas dos últimas fracciones se guarda al -- igual que las otras a -15°C

*** * .- ACTIVACION DE LA DEAE-C**

- lavar con agua destilada
- filtrar
- lavar con HCl 1.0 N y dejar reposar por 24 h
- lavar con agua destilada y filtrar
- lavar con NaOH 1.0 N y dejar reposar por 24 h
- lavar con agua destilada y filtrar al momento de usarla

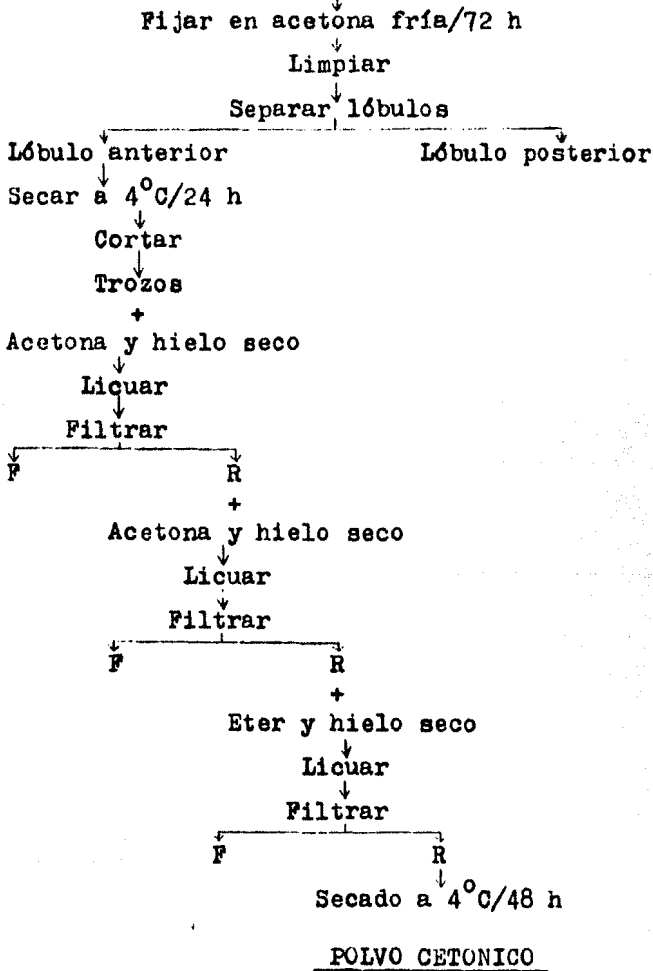
OBTENCION DE POLVO GETONICOHIPOFISIS

DIAGRAMA No. 1

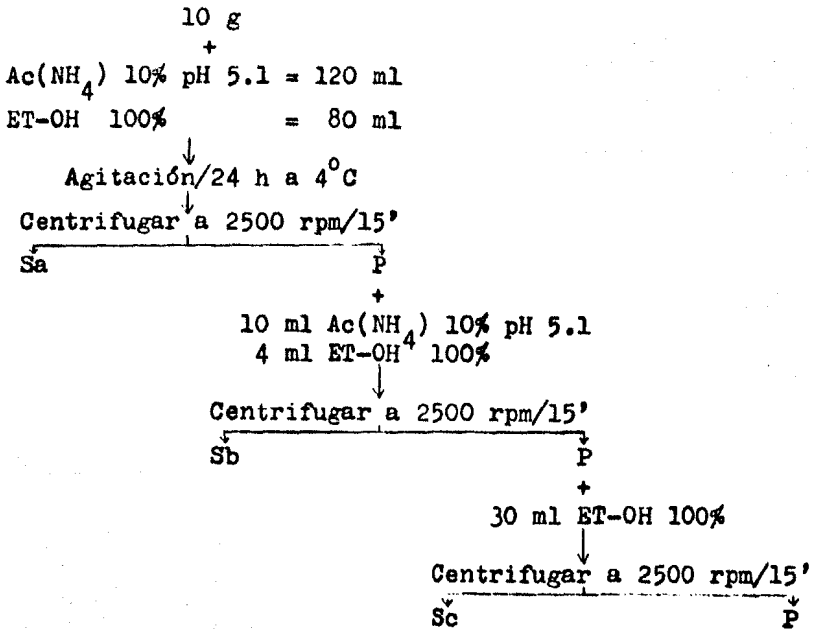
OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO DE GLUCOPROTEINASPOLVO GETONICO

DIAGRAMA No. 2 A

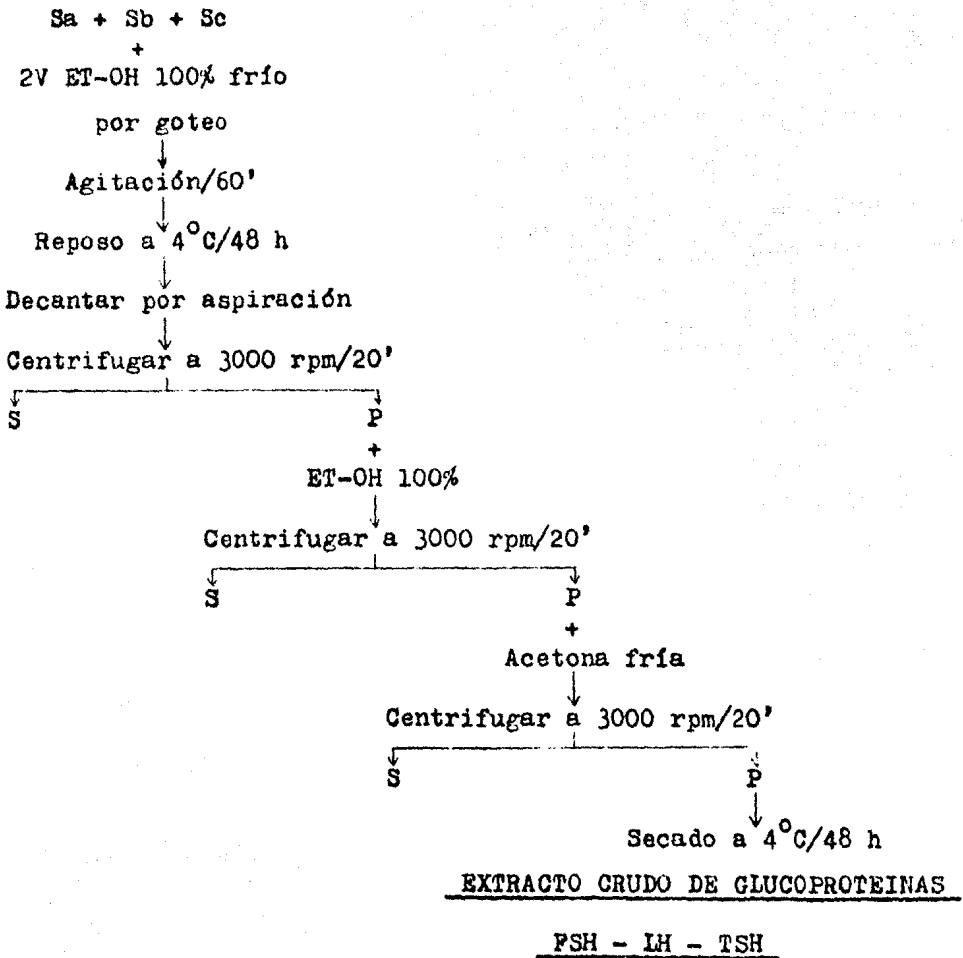


DIAGRAMA No. 2 B

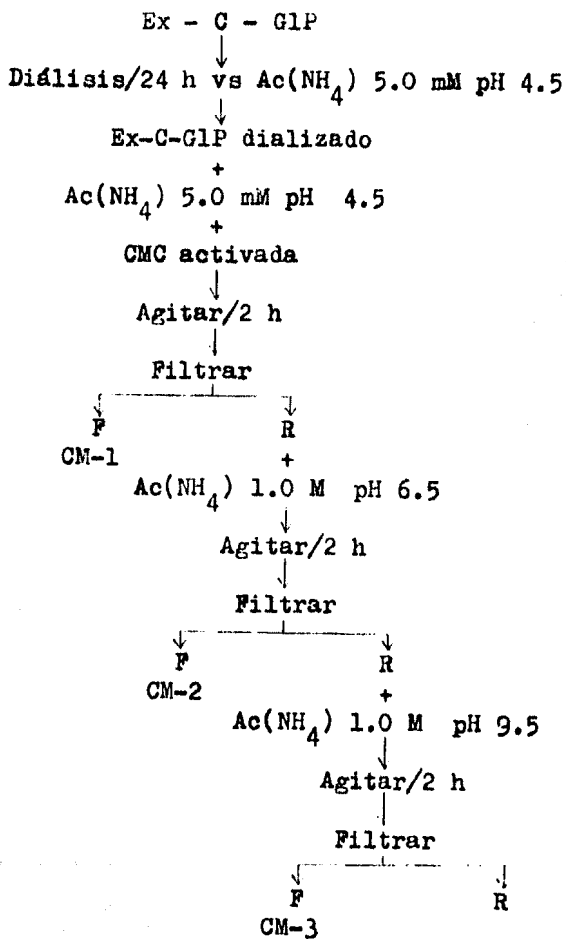
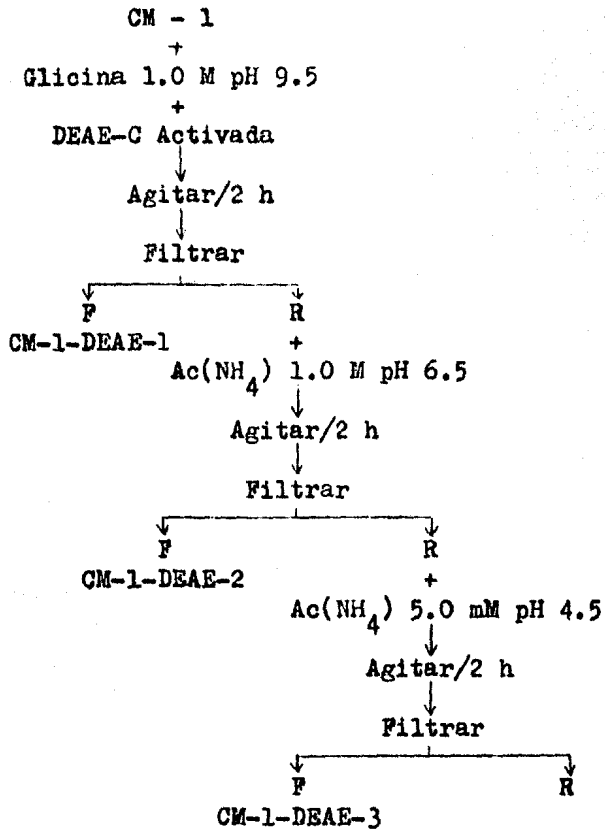
SEPARACION DE FSH - LH - TSH

DIAGRAMA No. 3

PURIFICACION DE F S H

El mismo proceso se lleva a cabo para la fracción CM-2
obteniéndose las siguientes fracciones: CM-2-DEAE-1

CM-2-DEAE-2

CM-2-DEAE-3

V.- BIOENSAYO DE FSH

Las 35 ratas se dividieron en 7 grupos de 5 animales cada uno de la siguiente manera:

1 grupo control que recibió 125 U.I. de HCG por animal

1 grupo tratado con 0.15 mg de FSH-P y 125 U.I. de HCG por animal

1 grupo tratado con 0.3 mg de FSH-P y 125 U.I. de HCG por animal

1 grupo tratado con 0.15 mg de CM-1 y 125 U.I. de HCG por animal

1 grupo tratado con 0.3 mg de CM-1 y 125 U.I. de HCG por animal

1 grupo tratado con 0.15 mg de CM-1-DEAE-3 y 125 U.I. de HCG por animal

1 grupo tratado con 0.3 mg de CM-1-DEAE-3 y 125 U.I. de HCG por animal

Las soluciones con la correspondiente dosis por animal - se prepararon usando como diluyente solución salina fisiológica, y en base a la concentración de proteína por ml obtenida por la lectura de la DO en las soluciones problema, y a los - mg por ml de hormona contenidos en la preparación comercial - de FSH-P. Para la HCG se tomó como base las U.I. contenidas - en la preparación comercial.

A cada animal se le aplicó 0.5 ml de la preparación correspondiente por vía subcutánea cada 12 h durante 3 días, sacrificándose 24 h después de la última inoculación.

Se extirparon ambos ovarios, se limpiaron del tejido adyacente y se pesaron en la balanza analítica.

R E S U L T A D O S

En la tabla I se pueden observar los resultados de la lectura de pH de las fracciones que contienen FSH, en la tabla II se encuentran las lecturas de DO de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina y de las fracciones que contienen FSH. Estos resultados están graficados en la figura No. 1, en la que conjuntamente con la tabla III se observa la concentración de proteína de las fracciones con FSH.

Los resultados referentes al peso de los ovarios de las ratas después de haber recibido diferentes dosis de FSH estándar (FSH-P) y de FSH problema (CM-1 y CM-1-DEAE-3), se muestran en la tabla IV, y por último, los datos concernientes a la potencia relativa de dos fracciones con FSH, se encuentran tanto en la tabla V como en las figuras No. 2 y 3 .

pH DE LAS FRACCIONES QUE CONTIENEN

F S H

FRACCIÓN	pH
CM-1	5.6
CM-1-DEAE-3	6.6
CM-2-DEAE-3	6.2

TABLA I

DENSIDAD OPTICA DE LAS FRACCIONES QUE CONTIENEN FSH

(Para ser comparada con la DO de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina)

FRACCION	Conc. Proteica (mg/ml)	DO (a 270 nm)
CM-1	----	0.286
CM-1-DEAE-3	----	0.074
CM-2-DEAE-3	----	0.067

No. de tubo		
1	1.56	0.805
2	0.78	0.42
3	0.39	0.214
4	0.195	0.125
5	0.097	0.071
6	0.048	0.045

TABLA II

CURVA ESTANDAR
 PARA LA DETERMINA--
 CION DE PROTEINA DE
 LAS FRACCIONES QUE
 CONTIENEN F S H .
 (Se utilizó albúmi--
 na sérica bovina a
 diferentes concen--
 traciones y lectu--
 ras a 270 nm -véase
 la tabla II-)

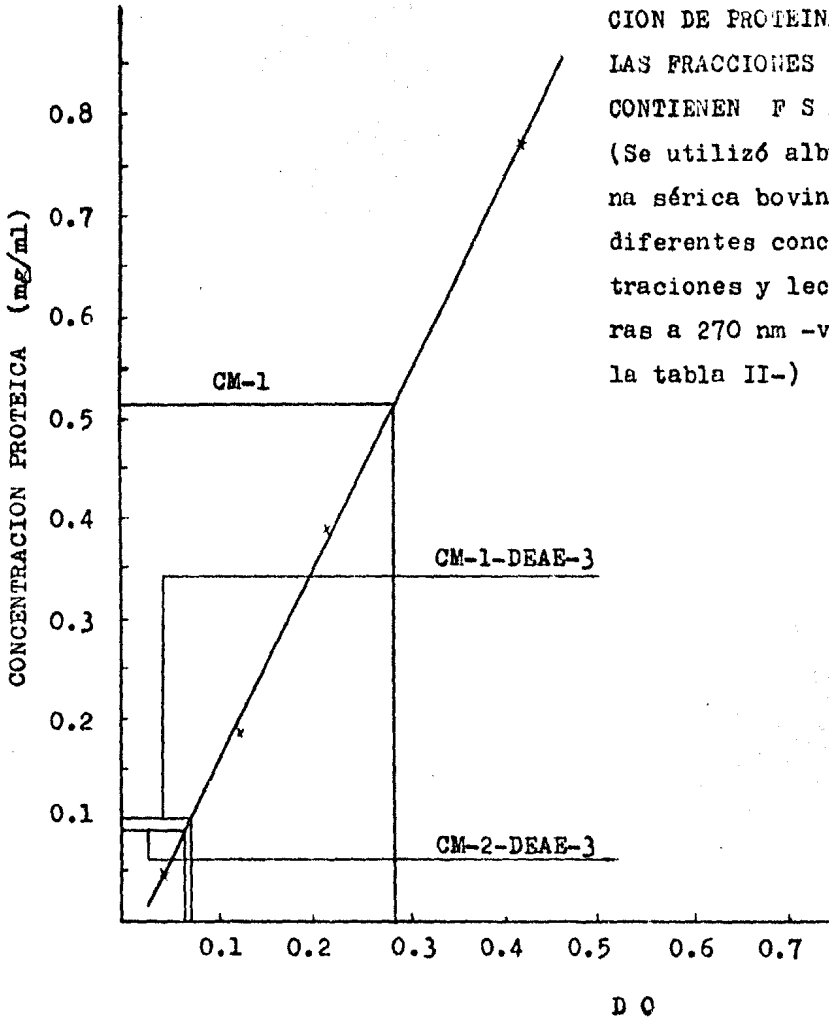


Figura No. 1

CONCENTRACION DE PROTEINA DE LAS
FRACCIONES QUE CONTIENEN F S H
(Obtenida por la comparación de
la DO de estas fracciones con--
tra la DO de concentraciones co
nocidas de albúmina sérica bovi
na)

F R A C C I O N	CONCENTRACION (mg/ml)
CM-1	0.52
CM-1-DEAE-3	0.1
CM-2-DEAE-3	0.09

TABLA III

B I O E N S A Y O

Peso de los ovarios (mg) después de haber
 recibido 125 U.I. de HCG y diferentes do-
 sis (mg) de FSH-P (ST) y de FSH-problema
 (C-1 y C-1-D-3)

	CONTROL	ST-0.15	ST-0.3	Cl-0.15	Cl-0.3	C1D3-0.15	C1D3-0.3
1	33.5	51.1	53.0	31.7	33.7	44.4	44.8
2	36.6	55.3	63.2	42.9	41.5	46.1	46.3
3	40.6	57.2	69.6	49.5	41.9	47.4	49.9
4	42.9	62.0	80.3	55.3	60.3	49.4	60.9
5	50.2	63.5	82.1	61.7	66.2	56.2	69.7
X	203.8	289.1	348.2	241.1	243.6	243.5	271.6

T A B L A I V

POTENCIA RELATIVA DE DOS FRACCIONES

QUE CONTIENEN F S H

(La potencia fué medida siguiendo la técnica del bioensayo propuesta por Steelman y Pohley) (31)

FRACCIÓN	POTENCIA
CM-1	26.08 ± 18.0 %
CM-1-DEAE-3	44.45 ± 9.6 %

TABLA V

LINEAS DE REGRESION DEL ENSAYO DE UNA
PREPARACION DE FSH DE POTENCIA DESCONOCIDA
CONTRA UNA PREPARACION COMERCIAL DE F S H
(FSH-P) UTILIZADA COMO ESTANDAR

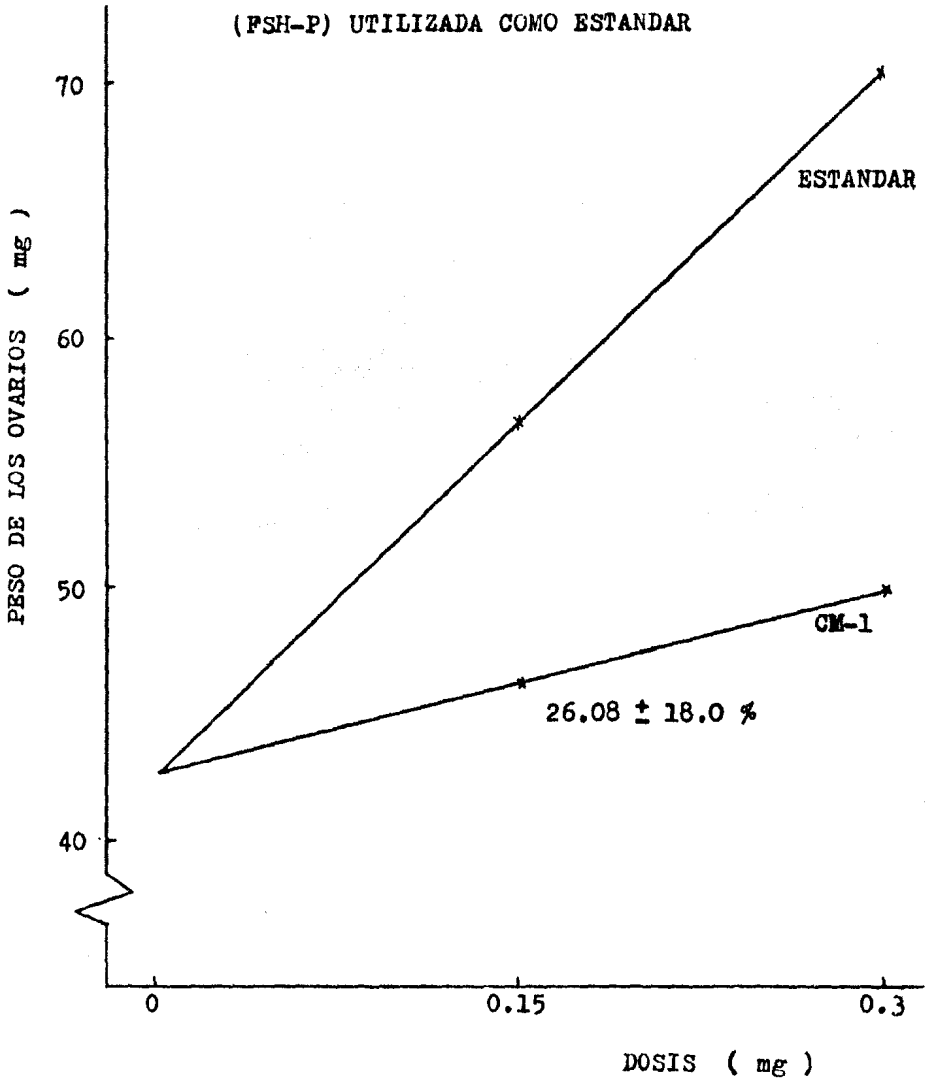


Figura No. 2

LINEAS DE REGRESION DEL ENSAYO DE UNA
PREPARACION DE FSH DE POTENCIA DESCONOCIDA
CONTRA UNA PREPARACION COMERCIAL DE F S H
(FSH-P) UTILIZADA COMO ESTANDAR

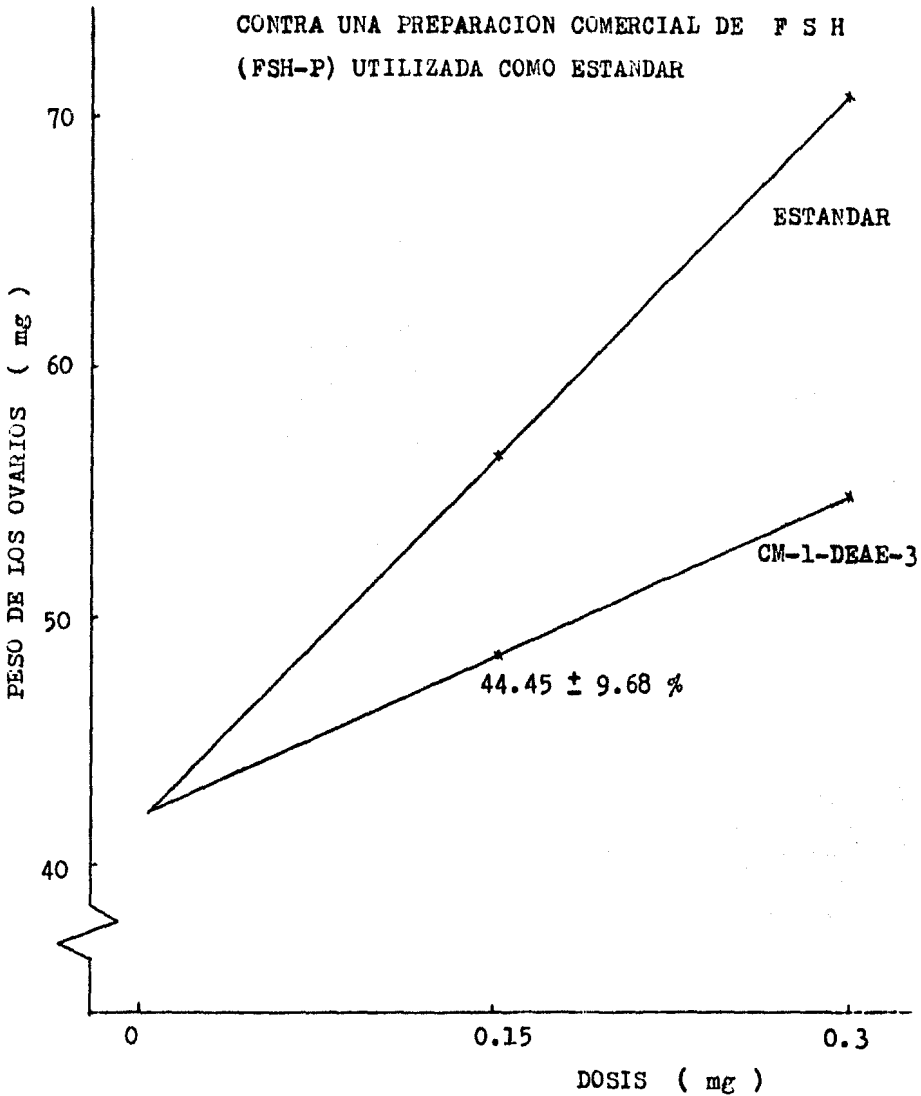


Figura No. 3

D I S C U S I O N

Como puede observarse en la tabla I, el pH de las fracciones que contienen la FSH está elevado a comparación del pH con el que se inició la cromatografía (ver material y métodos y los diagramas 3 y 4), lo que pudo haber influido para que la concentración de la hormona en esas fracciones resultara tan baja. (fig. No. 1 y tabla III)

Otra causa de esta concentración tan baja pudo haber sido que el etanol empleado para la precipitación etanólica no se haya usado a la concentración adecuada, ya que se han reportado diferentes resultados de recuperación de FSH empleando distintas concentraciones de etanol. (3,7)

Sin embargo, al correr la prueba de actividad biológica de la FSH mediante el método propuesto por Steelman y Pohley (31), se observó que la fracción CM-1 en la que la FSH sólo está separada de las otras hormonas glucoproteicas hipofisarias, tuvo una potencia relativa de $26.08 \pm 18.0 \%$ (tabla V y fig. No. 2), que aunque baja, indica la presencia de FSH. Lo anterior se refuerza al purificar dicha fracción con DEAE-C y observarse un aumento considerable de la potencia relativa en esta fracción purificada (CM-1-DEAE-3), siendo esa potencia de $44.45 \pm 9.68 \%$. (tabla V y fig. No. 3)

Los resultados obtenidos con la prueba de potencia de la fracción CM-1-DEAE-3 coinciden con los reportados por Steelman y Pohley. (31)

El problema mencionado podría ser corregido utilizando - otros amortiguadores o usando los mismos pero más concentra- dos, para que pudieran mantener el pH dentro de los límites - deseados, y realizar la precipitación etanólica con algunas - de las concentraciones de etanol recomendadas en la literatu- ra. (3,7)

Por lo que respecta al bioensayo, los resultados obteni- dos son satisfactorios de acuerdo a los reportados, (31) pero hay que recordar que este método no es el único para determi- nar la actividad biológica de la FSH. (3,7,10)

CONCLUSIONES

1.- Se obtuvo y purificó FSH en dos fracciones.

2.- De las fracciones anteriores, la más purificada mostró mayor actividad biológica de acuerdo al ensayo de Steel--man y Pohley, lo que demuestra la extracción y purificación - de la FSH a partir de las hipófisis equinas.

3.- Sería de bastante utilidad realizar un ensayo con la fracción CM-1-DEAE-3 (FSH purificada) en bovinos y otras especies para determinar la actividad de esta hormona en animales con anestro fisiológico, y sobre todo, en aquellos destinados a la hiperovulación.

FORMULAS PARA OBTENER LA POTENCIA RELATIVA
DE DOS FRACCIONES QUE CONTIENEN

F S H

Tomado de Finney, D.J. (12)

$\sum w$ = Suma de pesos de ovarios de p animales que no recibieron FSH

$\sum x_1$ = Suma de pesos de ovarios de m_1 animales que recibieron s_1 mg de FSH-P

$\sum x_2$ = Suma de pesos de ovarios de m_2 animales que recibieron s_2 mg de FSH-P

$\sum y_1$ = Suma de pesos de ovarios de n_1 animales que recibieron t_1 mg de FSH problema

$\sum y_2$ = Suma de pesos de ovarios de n_2 animales que recibieron t_2 mg de FSH problema

Como existe el mismo número de animales por grupo:

$$p = m_1 = m_2 = n_1 = n_2$$

N = Número total de animales

$$N = p + m_1 + m_2 + n_1 + n_2$$

Z = Total de todos los pesos de los ovarios

$$Z = \sum w + \sum x_1 + \sum x_2 + \sum y_1 + \sum y_2$$

$$S_s^2 = \sum (s - \bar{s})^2 = m_1 s_1^2 + m_2 s_2^2 - \frac{(m_1 s_1 + m_2 s_2)^2}{N}$$

$$S_t^2 = \sum (t - \bar{t})^2 = n_1 t_1^2 + n_2 t_2^2 - \frac{(n_1 t_1 + n_2 t_2)^2}{N}$$

Sólo si: $m_1 = n_1$, $m_2 = n_2$, $s_1 = t_1$, y $s_2 = t_2$ entonces $Ss^2 = St^2$

$$Sst = \sum (s - \bar{s})(t - \bar{t}) = \frac{(m_1 s_1 + m_2 s_2)(n_1 t_1 + n_2 t_2)}{N}$$

$$Sxs = \sum (x - \bar{x})(s - \bar{s}) = s_1 \sum x_1 + s_2 \sum x_2 - \frac{(m_1 s_1 + m_2 s_2)(Z)}{N}$$

$$Syt = \sum (y - \bar{y})(t - \bar{t}) = t_1 \sum y_1 + t_2 \sum y_2 - \frac{(n_1 t_1 + n_2 t_2)(Z)}{N}$$

$$A = Ss^2 St^2 - (Sst)^2$$

Curva de regresión lineal de la preparación estándar:

$$bs = \frac{Sxs St^2 + Syt Sst}{A}$$

Curva de regresión lineal de la preparación problema:

$$bt = \frac{Sxs Sst + Syt Ss^2}{A}$$

Relación de las pendientes:

$$R = \frac{bt}{bs}$$

La potencia de la preparación problema es:

R X 100 relativa al estándar

v = varianza de dosis

$$v = \frac{\text{Suma de cuadrados de todos los pesos de los ovarios} - \left[\frac{(\sum w)^2}{p} + \frac{(\sum x_1)^2}{m_1} + \frac{(\sum x_2)^2}{m_2} + \frac{(\sum y_1)^2}{n_1} + \frac{(\sum y_2)^2}{n_2} \right]}{(p-1) + (m_1-1) + (m_2-1) + (n_1-1) + (n_2-1)}$$

Error estándar de R:

$$\sigma_R = \sqrt{\left[\frac{v}{bs^2} \right] \left[\frac{Ss^2 - 2RSst + R^2St^2}{A} \right]}$$

Por lo tanto la potencia es:

$$R \times 100 \pm R$$

Fórmulas de las curvas de regresión lineal:

$$Ys = a + bs s$$

$$Yt = a + bt t$$

$$\bar{s} = \frac{m_1 s_1 + m_2 s_2}{N}$$

$$\bar{t} = \frac{n_1 t_1 + n_2 t_2}{N}$$

$$a = \frac{Z}{N} - bs \bar{s} - bt \bar{t}$$

CALCULOS PARA OBTENER LA POTENCIA DE LA
FRACCION CM-1

$$\sum w = 203.8$$

$$\sum x_1 = 289.1$$

$$\sum x_2 = 348.2$$

$$\sum y_1 = 241.1$$

$$\sum y_2 = 243.6$$

$$Z = 1325.8$$

$$p = m_1 = m_2 = n_1 = n_2 = 5$$

$$N = 5 + 5 + 5 + 5 + 5 = 25$$

$$s_1 = t_1 = 0.15$$

$$s_2 = t_2 = 0.3$$

$$s_s^2 = 5(0.15)^2 + 5(0.3)^2 - \frac{[5(0.15) + 5(0.3)]^2}{25}$$

$$= 0.36$$

$$s_t^2 = 5(0.15)^2 + 5(0.3)^2 - \frac{[5(0.15) + 5(0.3)]^2}{25}$$

$$= 0.36$$

$$s_{st} = \frac{[5(0.15) + (5(0.3))][5(0.15) + (5(0.3))]}{25}$$

$$= 0.2025$$

$$s_{xs} = 0.15(289.1) + 0.3(348.2) - \frac{[5(0.15) + 5(0.3)][1325.8]}{25}$$

$$= 28.503$$

$$s_{yt} = 0.15(241.1) + 0.3(243.6) - \frac{[5(0.15) + 5(0.3)][1325.8]}{25}$$

$$= -10.077$$

$$A = (0.36)(0.36) - (0.2025)^2$$

$$= 0.0885938$$

$$b_s = \frac{28.503(0.36) + (-10.077)(0.2025)}{0.0885938}$$

$$= 92.788547$$

$$b_t = \frac{28.503(0.2025) + (-10.077)(0.36)}{0.0885938}$$

$$= 24.201891$$

$$R = \frac{24.201891}{92.788547}$$

$$= 0.2608286$$

Potencia de la fracción GM-1 = 0.2608 X 100

$$= 26.08 \% \left[\frac{74916.52 - \left[\frac{(203.8)^2}{5} + \frac{(289.1)^2}{5} + \frac{(348.2)^2}{5} + \frac{(241.1)^2}{5} + \frac{(243.6)^2}{5} \right]}{4 + 4 + 4 + 4 + 4} \right]$$

$$= 107.5594$$

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{107.5594}{(92.7885)^2} \left[\frac{0.36 - 2(0.26082)(0.2025) + (0.26082)^2(0.36)}{0.0885938} \right]}$$

$$= 0.1800414$$

Por lo tanto :

Potencia de la fracción GM-1 = 26.08 ± 18.0 %

Curvas de regresión lineal (de la figura No. 2)

$$\bar{x} = \frac{5(0.15) + 5(0.3)}{25}$$

$$= 0.09$$

$$\bar{t} = \frac{5(0.15) + 5(0.3)}{25}$$

$$= 0.09$$

$$a = \frac{1325.8}{25} - 92.788547(0.09) - 24.201891(0.09)$$

$$= 42.502861$$

$$Ys_1 = 42.5 + 92.78(0.15) = 56.41$$

$$Ys_2 = 42.5 + 92.78(0.3) = 70.33$$

$$Yt_1 = 42.5 + 24.2(0.15) = 46.13$$

$$Yt_2 = 42.5 + 24.2(0.3) = 49.76$$

CALCULOS PARA OBTENER LA POTENCIA DE LA
FRACCION CM-1-DEAE-3

$$\sum w = 203.8$$

$$\sum x_1 = 289.1$$

$$\sum x_2 = 348.2$$

$$\sum y_1 = 243.5$$

$$\sum y_2 = 271.6$$

$$z = 1356.2$$

$$p = m_1 = m_2 = n_1 = n_2 = 5$$

$$N = 5 + 5 + 5 + 5 + 5 = 25$$

$$s_1 = t_1 = 0.15$$

$$s_2 = t_2 = 0.3$$

$$s_s^2 = 5(0.15)^2 + 5(0.3)^2 - \frac{[5(0.15) + 5(0.3)]^2}{25}$$

$$= 0.36$$

$$s_t^2 = 5(0.15)^2 + 5(0.3)^2 - \frac{[5(0.15) + 5(0.3)]^2}{25}$$

$$= 0.36$$

$$s_{st} = \frac{[5(0.15) + 5(0.3)][5(0.15) + 5(0.3)]}{25}$$

$$= 0.2025$$

$$s_{xs} = 0.15(289.1) + 0.3(348.2) - \frac{[5(0.15) + 5(0.3)][1356.2]}{25}$$

$$= 25.767$$

$$s_{yt} = 0.15(243.5) + 0.3(271.6) - \frac{[5(0.15) + 5(0.3)][1356.2]}{25}$$

$$= -4.053$$

$$A = (0.36)(0.36) - (0.2025)^2$$

$$= 0.0885938$$

$$b_s = \frac{25.767(0.36) + (-4.053)(0.2025)}{0.0885938}$$

$$= 95.439951$$

$$b_t = \frac{25.767(0.2025) + (-4.053)(0.36)}{0.0885938}$$

$$= 42.426642$$

$$R = \frac{42.426642}{95.439951}$$

$$= 0.444537$$

Potencia de la fracción CM-1-DEAE-3 = 0.4445 X 100
= 44.45 %

$$V = \frac{77273.68 - \left[\frac{(203.8)^2}{5} + \frac{(289.1)^2}{5} + \frac{(348.2)^2}{5} + \frac{(243.5)^2}{5} + \frac{(271.6)^2}{5} \right]}{4 + 4 + 4 + 4 + 4}$$

$$= 69.531$$

$$\gamma R = \sqrt{\left[\frac{69.531}{(95.4399)^2} \right] \left[\frac{0.36 - 2(0.44453)(0.2025) + (0.44453)^2(0.36)}{0.0885938} \right]}$$

$$= 0.0968$$

Por lo tanto :

Potencia de la fracción CM-1-DEAE-3 = 44.45 ± 9.68 %

Curvas de regresión lineal (de la figura No. 3)

$$\bar{s} = \frac{5(0.15) + 5(0.3)}{25}$$

$$= 0.09$$

$$\bar{t} = \frac{5(0.15) + 5(0.3)}{25}$$

$$= 0.09$$

$$a = \frac{1356.2}{25} - 95.439951(0.09) - 42.426642(0.09)$$

$$= 41.84$$

$$Ys_1 = 41.84 + 95.43(0.15) = 56.15$$

$$Ys_2 = 41.84 + 95.43(0.3) = 70.46$$

$$Yt_1 = 41.84 + 42.42(0.15) = 48.2$$

$$Yt_2 = 41.84 + 42.42(0.3) = 54.56$$

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alcivar, A.A.; Maurer, R.R.; Anderson, L.L.; SUPEROVULATORY RESPONSES IN FSH OR PERGONAL TREATED HEIFERS.; *Theriogenology*, 19 (1) 109, 1983
- 2.- Arriola, A.S.P.; Jacob, Z.M.R.; ESTUDIO COMPARATIVO DE LA UTILIZACION DE PMSG Y FSH EN LA SUPEROVULACION DEL GANADO BOVINO.; Tesis profesional, F.E.S.C., U.N.A.M. 1985
- 3.- Bousfield, G.R.; Ward, D.N.; PURIFICATION OF LUTROPIN -- AND POLLITROPIN IN HIGH YIELD FROM HORSE PITUITARY GLANDS *Journal of Biological Chemistry*, 259 (3) 1911-1921, 1984
- 4.- Campenhout, J.V.; Heather Wyman, B.A.; THE FOLLICULAR RECEPTIVITY TO EXOGENOUS HUMAN GONADOTROPINS en: Thomas, - J.V.; Kaspro, B.A.; *Biology of Reproduction, Basic and Clinical studies. III Pan American Congress of Anatomy, Sponsored Symposium, Reproductive Biology, New Orleans, Louisiana, U.S.A., 141-145, 1972*
- 5.- Cedillo, A.O.L.; TEXTO PROGRAMADO DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN BOVINOS.; Tesis profesional, F.E.S.C., U.N.A.M. 1985
- 6.- Chupin D.; Procorsur, R.; USE OF PITUITARY FSH TO INDUCE SUPEROVULATION IN CATTLE, EFFECT OF INJECTION REGIMEN.; *Theriogenology*, 17 (1) 81, 1982

- 7.- Combarous, Y.; Henge, M.H.; EQUINE FSH. PURIFICATION, - ACID DISSOCIATION AND BINDING TO EQUINE TESTICULAR TI---SSUE.; Journal of Biological Chemistry, 256 (18) 9567---9572; 1981
- 8.- Dellman, H.D.; ENDOCRINE SYSTEM en: Dellman, H.D.; Brown E.M.; Textbook of Veterinary Histology, 2a/e, Philadel--phia, Lea and Febiger, 360; 1981
- 9.- Dellman, H.D.; Mclure, R.C.; SISTEMA NERVIOSO DE LOS E--QUINOS en: Getty, R. Anatomía de los animales domésticos Tomo I, 5a/e, México, Salvat; 716; 1982
- 10.- Derivaux, J.; REPRODUCCION DE LOS ANIMALES DOMESTICOS, - España, Acribia, 61-63; 1982
- 11.- Dickson, W.M.; GLANDULAS ENDOCRINAS en: Dukes, H.H.; Swen son, M.J.; Fisiología de los animales domésticos, Tomo II México, Aguilar, 1523; 1981
- 12.- Finney, D.J.; in Burn, J.H. et al.; BIOLOGICAL STANDARI--ZATION, 2a/e, London: Oxford University Press, 94-101, - 1950
- 13.- Ganong, W.F.; MANUAL DE FISILOGIA MEDICA, 5a/e, México, El manual moderno, 195, 347, 370, 389; 1976
- 14.- García, G.J.K.; Seidel, G.E.; Elsdén, R.P.; EFFICACY OF SHORTENED FSH TREATMENT FOR SUPEROVULATING CATTLE, The---riogenology, 17, (1) 90; 1982

- 15.- Grtler, H.; Ketz, H.A.; Kolb, E.; FISILOGIA VETERINARIA Tomos I y II, 2a/e, España, Acribia, 88, 739; 1976
- 16.- Jones, M.L.; FARMACOLOGIA Y TERAPEUTICA VETERINARIAS, ; México, U.T.E.H.A., 845-847, 851; 1980
- 17.- Kaltenbach, C.C.; Dun, T.G.; ENDOCRINOLOGY OF REPRODUCTION en : Hafez, E.S.E; Reproduction in farm Animals, 4a/e, - Philadelphia, Lea and Febiger, 60, 86-89; 1980
- 18.- Lehninger, A.L.; BIOQUIMICA, 2a/e, España, 76-77; 1982
- 19.- Litter, M.; FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL Y CLINICA, 6a/e, - Argentina, El Ateneo, 1210; 1980
- 20.- Looney, C.R.; Hill, K.G.; Thompson, D.L. Jr.; COMPARISON OF FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH) IN GELATIN AND SALINE DILUENTS FOR SUPEROVULATING DONOR CATTLE, Theriogenology, 17 (1) 97; 1982
- 21.- Lozano, S.B.; TRANSPLANTE DE EMBRIONES DE GANADO SUIZO Y CEBU REALIZADOS EN MEXICO, Tesis profesional, F.M.V. y Z. U.N.A.M., 1982
- 22.- Mancini, R.E.; PROBLEMS IN THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM en: Thomas, J.V.; Kaspro, B.A.; Biology of Reproduction Basic and Clinical studies. III Pan American Congress of Anatomy, Sponsored Symposium, Reproductive Biology; New Orleans, Louisiana, U.S.A., 41-45; 1972

- 23.- MERCK INDEX.; 8a/e, Rahway, N.J.; U.S.A., 472; 1966
- 24.- McDonald, L.E.; REPRODUCCION Y ENDOCRINOLOGIA VETERINARIA--
RIAS, 2a/e, México, Interamericana, 29-30, 346-347; 1978
- 25.- Mollereau, H.; Porcher, CH.; VADEMECUM DEL VETERINARIO,
3a/e, España, Ediciones GEA, 380-381; 1976
- 26.- Mutiga, E.R.; Baker, A.A.; EFFECT OF REDUCED DAYLIGHT --
LENGHT ON OESTRUS OCCURRENCE AND SUPEROVULATORY RESPONSE
IN EWES TREATED WITH FOLLICLE STIMULATING HORMONE DURING
THE NON-BREEDING SEASON, Veterinary Record, 114 (1) 13-15
1984
- 27.- Rosenstein, E.; PRONTUARIO DE ESPECIALIDADES VETERINARIAS
8a/e, México, Centro profesional de publicaciones, S.A.,
60-61, 92-93, 113-114, 142, 186; 1984
- 28.- Schally, A.V.; Arimura, A.; Kastin, A.J.; THE HIPOTALA--
MIC HORMONE REGULATING LH AND FSH SECRETION en: Thomas,
J.V.; Kasprow, B.A.; Biology of Reproduction, Basic and
Clinical studies. III Pan American Congress of Anatomy,
Sponsored Symposium, Reproductive Biology; New Orleans,
Louisiana, U.S.A., 61; 1972
- 29.- Short, R.V.; PAPEL DE LAS HORMONAS EN LOS CICLOS SEXUALES
en: Austin, C.R.; Short, R.V.; Procesos de Reproducción
en Mamíferos, Tomo 3, 1a/e, México, La Prensa Médica Me-
xicana, S.A., 43; 1982

- 30.- Smidt, D.; Ellendorff, P.; ENDOCRINOLOGIA Y FISILOGIA -
DE LA REPRODUCCION DE LOS ANIMALES ZOOTECNICOS, España,
Acribia, 53-55, 59; 1972
- 31.- Steelman, S.L.; Pohley, P.M.; ASSAY OF THE FOLLICLE STI-
MULATING HORMONE BASED ON THE AUGMENTATION WITH HUMAN --
CHORIONIC GONADOTROPIN, Endocrinology; (53) 604-616; 1953
- 32.- Sugie, T.; Seidel, G.E.; Hafez, E.S.E.; EMBRYO TRANSFER -
en: Hafez, E.S.E.; Reproduction in farm animals, 4a/e, -
Philadelphia, Lea and Febiger, 559-560; 1980
- 33.- Tillman, H.; FISIOPATOLOGIA DE LA REPRODUCCION en: Spörrri
H.; Stünzi, H.; Fisiopatología Veterinaria, España, Acri-
bia, 430, 432, 444, 450-451, 453, 459; 1976
- 34.- Vaitukaitis, J.L.; Ross, G.T.; BIOLOGIC AND IMMUNOLOGIC
STUDIES OF THE HUMAN GONADOTROPIC HORMONES AND THEIR SUB-
UNITS en: Thomas, J.V.; Kaspro, B.A.; Biology of Repro-
duction, Basic and Clinical studies. III Pan American --
Congress of Anatomy, Sponsored Symposium, Reproductive -
Biology; New Orleans, Louisiana, U.S.A., 125; 1972
- 35.- Veldhuis, J.D.; Klase, P.A.; Strauss, J.F.; THE ROLE OF
STRADIOL AS A BIOLOGICAL AMPLIFIER OF THE ACTION OF FO--
LLICLE STIMULATING HORMONE; IN VITRO STUDIES IN SWINE --
GRANULOSA CELLS, Endocrinology, 111 (1) 144-151; 1982

- 36.- Venzke, W.G.; ENDOCRINOLOGIA GENERAL en: Getty, R.; Anatomía de los animales domésticos, 5a/e, Tomo I, México, Salvat, 173; 1982
- 37.- Voglmayr, J.K.; Roberson, C.; Musto, N.A.; COMPARISON OF ANDROGEN LEVELS IN RAM RETE TESTIS FLUID, TESTICULAR -- LIMPH AND SPERMATIC VENOUS BLOOD PLASMA: EVIDENCE FOR A REGULATORY MECHANISM IN THE SEMINIFEROUS TUBULES, Biology of Reproduction, 23 (1) 29-39; 1980