



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"IZTACALA"

"Purificación de Hormona Foliculo Estimulante de  
Origen Equino para Inducir el Estro en Vacas"

T E S I S

Que para Obtener el Título de:

B I O L O G O

Presenta:

Mario Cárdenas León



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.

A MIS PADRES

A IRENE

A LOS DOCTORES SERGIO CORTES Y HUERTA, JOSUE GARZA-  
FLORES, PAUL O. GARCIA TORRES Y AL QFB LUIS  
BOJORQUEZ NARVAEZ, A ELLOS POR EL GRAN APOYO  
MANIFESTADO EN TODO MOMENTO, POR SU NOTABLE  
PARTICIPACION E INVALUABLES CONSEJOS.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

Este trabajo se realizó en la división de Estudios de Investigación y Posgrado, Campo No. 1, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, bajo la dirección del Dr. Sergio Cortés y Huerta y con la valiosa colaboración del Dr. Josué Garza-Flores.

## I N D I C E

	Página
Resumen .....	1
Introducción .....	2
1.- Hormona Folículo Estimulante.	
A.- Estructura Molecular .....	4
B.- Correlación entre Actividad Biológica y Contenido de - Acido Siálico .....	5
C.- Heterogeneidad .....	11
D.- Peso Molecular, Punto Isoeléctrico y Vida Media .....	12
E.- Almacenamiento y Secresión .....	12
2.- Papel de las Hormonas en el Ciclo Estral Bovino .....	13
3.- Purificación de FSH .....	14
4.- Utilidad de FSH .....	16
A.- Transferencia de Embriones .....	16
B.- Inducción del Estro .....	18
Justificación .....	21
Objetivos .....	21
Material y Métodos .....	22
Resultados .....	31
Discusión .....	37
Conclusiones .....	41
Bibliografía .....	43

## RESUMEN

La hormona folículo estimulante (FSH) se utiliza para superovulación e inducción del estro en las especies domésticas. No existen en el país preparados comerciales disponibles. Se diseñó el presente trabajo, con el fin de obtener una preparación de FSH equina, estimar su potencia biológica e inmunológica y evaluar su actividad como inductora del estro en vacas.

Se procesaron 300 lóbulos anteriores de hipófisis de caballo (230 g). La extracción de las glucoproteínas (FSH, LH y TSH) se llevó a cabo con acetato de amonio al 10%, pH 5.1 y etanol al 96% (3:2 v/v, 10 ml/g de tejido) y la separación de FSH por cromatografía de intercambio iónico, usando una columna de CM-celulosa de 2.6 x 40 cm.

Resultó una preparación de FSH (fracción CM-1) de 0.744 g, con un rendimiento de 3.2 g/Kg de hipófisis y una potencia biológica del 47.8% de FSH-P. La potencia inmunológica estimada al 50% de unión específica fué del 150% con respecto a FSH-P y 37% con relación a rFSH-RP-1.

Al dar tratamiento a vacas en anestro, 23 (92%) mostraron signos de estro, de éstas, 14 (61%) quedaron preñadas a primer servicio y llegaron a término, produciendo partos simples.

De acuerdo con los resultados, es posible obtener una preparación de FSH hipofisiaria de origen equino, de utilidad para la inducción del estro en vacas.

## INTRODUCCION

La glándula hipófisis o pituitaria se localiza en la base del cerebro, debajo del hipotálamo (Fig. 1 A) y se conecta con éste por medio del tallo hipofisiario. Se encuentra colocada dentro de una depresión del hueso basiesfenoides denominada silla turca. En el hombre mide alrededor de 1.5 cm de longitud, 1 cm de ancho y 6 a 8 mm de altura.

Está constituida por dos porciones principales: adenohipófisis, cuyo origen embrionario es el techo de la cavidad oral (bolsa de Rathke) y neurohipófisis formada a partir del infundíbulo, una evaginación ventral del diencéfalo.

La adenohipófisis está integrada por la pars distalis, pars tuberalis y pars intermedia. La pars distalis y pars tuberalis constituyen el lóbulo anterior. La neurohipófisis está representada básicamente por la pars nerviosa, ésta junto con la pars intermedia forman el lóbulo posterior (75) (Fig. 1 B).

El lóbulo anterior, específicamente la pars distalis de la hipófisis, produce tres hormonas gonadotrópicas, las cuales tienen una influencia muy importante sobre el sistema reproductor de ambos sexos, éstas son: La hormona folículo estimulante (FSH) o Folitropina, la hormona luteinizante (LH), también conocida como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) y la prolactina u hormona luteotrópica (PRL o LTH). Parece que FSH y LH son sintetizadas por la misma célula (39) y que el proceso de biosíntesis y secreción está influenciado por la misma hormona hipotalámica, hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (86, 98), aunque pudiera ser que ambas glucoproteínas tuvieran un origen celular separado (75).

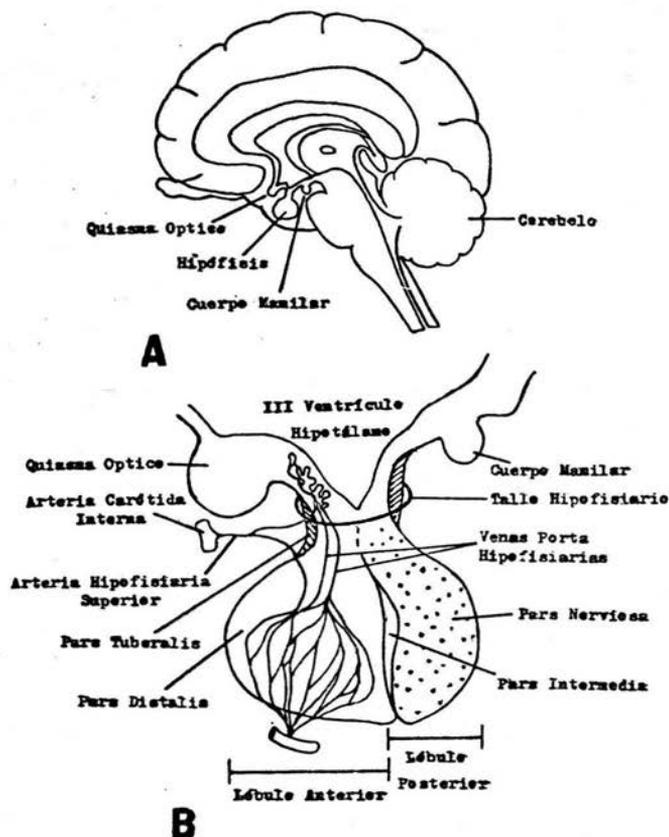


Figura 1. A.- Encéfalo, corte sagital.  
 B.- Glándula Hipófisis, vista lateral.

Otras gonadotropinas, pero de origen placentario, son la gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG) y la gonadotropina coriónica humana (hCG).

A la PMSG también se le denomina gonadotropina coriónica equina (eCG), ya que además se encuentra en otros équidos (burra, cebrá e híbridos). La producen células especializadas derivadas del trofoblasto (las llamadas copas endometriales) entre los días

40-120 de preñación (3, 78). Posee actividad semejante a las de FSH y LH (51, 58, 59), con predominio de la primera (78). Su elevado contenido de ácido siálico le confiere una vida media in vivo que excede ampliamente a la de FSH (Tabla 2 y 3). Es responsable de una estimulación folicular, ovulación y luteinización adicional, formando una serie de cuerpos lúteos secundarios que reemplazan al primario, ya que éste desaparece alrededor del día 32-48 de gestación, coincidiendo con el tiempo en que se empieza a producir la gonadotropina (78).

La hCG tiene propiedades biológicas similares a las de LH y además cierta actividad de FSH (89). Se produce en el trofoblasto, se excreta por la orina y en el primer trimestre de embarazo se encuentra en alta concentración; también está asociada con una variedad de tumores trofoblásticos y no-trofoblásticos (30). Una hormona semejante se ha encontrado en mono Rhesus y roedores (6).

### Hormona Folículo Estimulante

#### A.- Estructura Molecular.

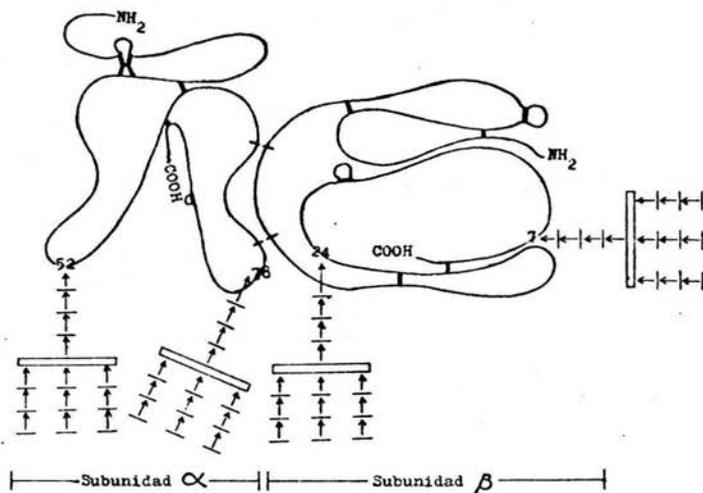
Las hormonas glucoproteicas sintetizadas en la hipófisis (FSH, LH, TSH) y las de origen placentario (hCG, eCG) están constituidas por dos subunidades o cadenas (alfa y beta), unidas por enlaces no-covalentes (11, 17, 84, 92). En una misma especie, las mencionadas glucoproteínas poseen subunidades alfa ( $\alpha$ ) cuya secuencia de aminoácidos es similar y cadenas beta ( $\beta$ ) diferentes. En éste caso, la subunidad beta les confiere especificidad biológica e inmunológica. Por ejemplo, cuando se combina la cadena beta de FSH con la alfa de LH, TSH o hCG, se obtiene una hormona híbrida con actividad biológica de FSH. Por el

contrario, en especies diferentes la subunidad beta de FSH es similar, mientras que la alfa muestra variaciones (66, 69, 70). La molécula de FSH está representada en la figura 2. La subunidad alfa de FSH equina (eFSH-alfa), humana (hFSH-alfa) y bovina (bFSH-alfa), posee 82, 92 y 96 aminoácidos, respectivamente. Entre eFSH-alfa y bFSH-alfa existen 19 aminoácidos diferentes en varias posiciones de la secuencia y 24 entre eFSH-alfa y hFSH-alfa (69). La subunidad beta de FSH equina (eFSH-beta) tiene 118 aminoácidos al igual que la subunidad beta de FSH humana (hFSH-beta), varían solamente en seis aminoácidos. La secuencia de aminoácidos comparada entre eFSH y hFSH se muestra en las figuras 3 y 4 (70). El contenido total de aminoácidos en moléculas de FSH de diferentes especies es similar (Tabla 1). En general, se observa que es rica en ácido aspártico, treonina, ácido glutámico y cistina, lo cual explica el punto isoeléctrico relativamente bajo de la proteína (Tabla 3). Es además pobre en triptofano, metionina e histidina.

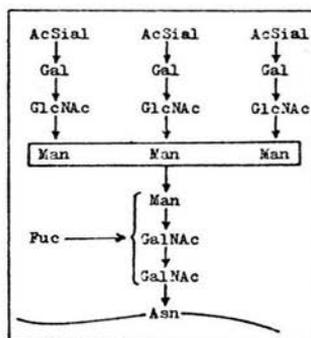
La composición de carbohidratos, comparada en FSH de varias especies, se enlista en la tabla 2. Estos representan alrededor del 25% de la molécula y de éste, aproximadamente el 5% corresponde a ácido siálico.

#### B.-Correlación entre Actividad Biológica y contenido de Acido Siálico.

La actividad biológica de la FSH parece estar influenciada por la cantidad de residuos de ácido siálico unidos a ella (11, 31). Las moléculas que contienen éste carbohidrato están protegidas de las enzimas del hígado que degradan asialoglucoproteínas (61). La influencia se manifiesta en dos formas: 1) afectando su vida media



A



B

Figura 2. A.- Representación esquemática de la molécula de FSH humana. Las cadenas de carbohidratos se hayan unidas a Asparagina (Asn), en la subunidad alfa, en posiciones 52 y 78 y en la beta, 7 y 24. Adaptada a partir de varios autores (34, 67, 69, 70).

— Enlaces disulfuro.  
 - - Enlaces no-covalentes.

B.- Cadena de carbohidratos.

AcSial = Acido Siálico.                      Man = Manosa.  
 Gal = Galactosa.                              Fuc = Fucosa.  
 GlcNAc = N-acetilglucosamina.  
 GalNAc = N-acetilgalactosamina.



eFSH	Asx-Ser-Cys-Glx-Leu-Thr-Asn (CHO)-Ile-Thr-Ile-Ala-Val-Glu-		
hFSH	Asn-Ser-Cys-Glu-Leu-Thr-Asn (CHO)-Ile-Thr-Ile-Ala-Ile-Glu-	5	10
eFSH	Lys-Glu-Gly-Cys-Arg-Phe-Cys-Ile-Thr-Ile-Asn (CHO)-Thr-Thr-		
hFSH	Lys-Glu-Glu-Cys-Arg-Phe-Cys-Leu-Thr-Ile-Asn (CHO)-Thr-Thr-	15	20 25
eFSH	Trp-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Thr-Arg-Asp-Leu-Val-Tyr-Lys-Asp-		
hFSH	Trp-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys-Tyr-Thr-Arg-Asp-Leu-Val-Tyr-Lys-Asn-	30	35 40
eFSH	Pro-Ala-Arg-Pro-Lys-Ile-Gln-Lys-Thr-Cys-Thr-Phe-Lys-Glu-Leu-		
hFSH	Pro-Ala-Arg-Pro-Lys-Ile-Gln-Lys-Thr-Cys-Thr-Phe-Lys-Glu-Leu-	45	50 55
eFSH	Val-Tyr-Glu-Thr-Val-Lys-Val-Pro-Gly-Cys-Ala-His-His-Ala-Asp-		
hFSH	Val-Tyr-Glu-Thr-Val-Arg-Val-Pro-Gly-Cys-Ala-His-His-Ala-Asp-	60	65 70
eFSH	Ser-Leu-Tyr-Thr-Tyr-Pro-Val-Ala-Thr-Glx-Cys-His-Cys-Gly-Lys-		
hFSH	Ser-Leu-Tyr-Thr-Tyr-Pro-Val-Ala-Thr-Gln-Cys-His-Cys-Gly-Lys-	75	80 85
eFSH	Cys-Asx-Ser-Asp-Ser-Thr-Asx-Cys-Thr-Val-Arg-Gly-Leu-Gly-Pro-		
hFSH	Cys-Asp-Ser-Asp-Ser-Thr-Asp-Cys-Thr-Val-Arg-Gly-Leu-Gly-Pro-	90	95 100
eFSH	Ser-Tyr-Cys-Ser-Phe-Gly-Asp-Met-Lys-Glx-Tyr-Pro-Val-Ala-Leu-		
hFSH	Ser-Tyr-Cys-Ser-Phe-Gly-Glu-Met-Lys-Gln-Tyr-Pro-Thr-Ala-Leu-	105	110 115
eFSH	Ser-Tyr		
hFSH	Ser-Tyr		
		118	

Figura 4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad beta de FSH equina (eFSH-beta) y humana (hFSH-beta). CHO indica la posición de las cadenas de carbohidratos. Tomado de Rathnam (70).

Tabla 1. Composición de aminoácidos en FSH de varias especies comparada con otras hormonas.

Aminoácido	Número de residuos por molécula								
	bFSH (14)	oFSH (14)	pFSH (97)	eFSH (69,70)	hFSH (84)	bLH (28)	bTSH (50)	hCG (7)	eCG (59) *
Lisina	14	15	18	11	13	12	19	7	9
Histidina	5	5	5	11	6	6	6	3	3
Arginina	8	8	8	9	9	10	5	11	13
Ac. Aspártico	17	17	18	14	15	11	15	13	13
Treonina	20	17	17	21	20	15	20	12	20
Serina	13	13	16	13	19	13	11	15	17
Ac. Glutámico	20	18	22	13	23	14	15	14	18
Prolina	10	17	14	10	16	27	14	20	31
Glicina	10	11	15	10	11	11	8	10	12
Alanina	13	14	18	11	12	15	13	10	17
Valina	13	12	11	13	16	12	11	12	12
Cistina	17	15	17	20	21	22	22	12	18
Metionina	4	2	4	4	13	7	8	2	6
Isoleucina	7	8	6	9	7	6	8	4	11
Leucina	10	10	12	9	15	14	6	11	14
Tirosina	10	9	7	14	11	7	16	4	7
Fenilalanina	7	8	7	7	8	8	9	4	8
Triptofano	-	-	1	1	1	-	-	1	-

bFSH, oFSH, pFSH, eFSH y hFSH = FSH de origen bovino, ovino, porcino, equino y humano, respectivamente.

bLH = LH bovina. bTSH = TSH bovina. hCG = gonadotropina coriónica humana. eCG = PMSG o gonadotropina coriónica equina.

\* Los números entre paréntesis corresponden a las referencias bibliográficas.

Tabla 2. Contenido de carbohidratos en FSH de varias especies comparado con otras glucoproteínas.

Carbohidrato	g/100 g de hormona							
	bFSH (31)	oFSH (31)	pFSH (97)	eFSH (46)	hFSH (34)	hLH (34)	hCG (92)	eCG (59)
Fucosa	1.9	1.4	2.2	1.0	0.4	0.4	0.6	0.2
Manosa	5.6	5.2	7.3	5.7	7.9	7.7	4.3	2.1
Galactosa	3.6	3.4	1.9	3.0	2.7	1.3	4.3	14.1
Glucosamina	8.2	9.4	11.8	5.3	8.8	7.6	7.1	13.6
Galactosamina	2.8	1.3	-	2.3	2.2	2.9	1.7	4.1
Acido Siálico	3.1	4.7	6.0	6.8	5.2	1.5	7.2	11.0
Total	25.2	25.4	29.2	24.1	27.2	21.4	25.2	45.1

Tabla 3. Peso molecular, punto isoeléctrico y vida media de varias gonadotropinas.

Hormona	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico (pI)	Vida Media <i>in vivo</i> (h)
FSH	30,000-34,000	4.2 - 7.0 <sup>h</sup>	2 - 5
LH	30,000-34,000 <sup>a</sup>	4.5 - 7.3 <sup>b h</sup>	0:20 <sup>c</sup>
eCG	52,000-68,000 <sup>d</sup>	2.0 <sup>e</sup>	21 <sup>f</sup>
hCG	59,000 <sup>g</sup>	4.0 - 5.2 <sup>g h</sup>	12 <sup>i</sup>

a (95), b (9), c (96), d (59), e (78), f (58), g (6).

h) El intervalo de pI se debe a la heterogeneidad de la hormona.

i) Calculada por regresión lineal tomando el porcentaje de ácido siálico contra vida media de las otras hormonas.

vida media en plasma (una mayor incorporación de ácido siálico incrementa el tiempo de circulación y por lo tanto la actividad biológica) (Tablas 2 y 3), 2) por una alteración de la actividad de unión con el receptor celular (una mayor cantidad de residuos de ácido siálico disminuye la unión con el receptor) (11). Por variaciones en el contenido de ácido siálico, la molécula de FSH puede tener una vida media larga pero reducida afinidad por el receptor o una vida media corta con capacidad de unión al receptor elevada.

### C.- Heterogeneidad.

Se ha observado que la FSH existe en formas heterogéneas dentro de la hipófisis de roedores, monos, caballos y burros, entre otros (9, 10, 12, 17, 76, 93). Cada isohormona FSH exhibe punto isoeléctrico (pI), unión con el receptor y actividad biológica, diferentes (56). Esto se debe esencialmente a que las diferentes formas de la hormona varían en su contenido de ácido siálico (94). Durante la fase de máxima actividad gonadal, existe una mayor proporción de tipos de FSH más básicos (en relación al pI) en la hipófisis, ocurre lo contrario en la etapa de menor actividad gonadal, o bien después de la castración o antes de iniciarse la pubertad (10, 93). En ésta forma, parece que la hipófisis tiene la capacidad de alterar no sólo el número total de moléculas FSH sino también los tipos secretados, y por lo tanto, la potencia de la señal derivada hacia las gónadas (11).

También en otras hormonas como PRL, hCG, LH, hormona del crecimiento (GH) y hormona adrenocorticotrópica (HCTH), se manifiesta la heterogeneidad (6, 9, 41, 63, 71).

#### D.- Peso Molecular, Punto Isoeléctrico y Vida Media.

El peso molecular de la hormona folículo estimulante es alrededor de 30,000 (9, 14, 34, 46, 84, 88, 97) y sus dos cadenas pesan más o menos lo mismo. El punto isoelectrico es aproximadamente de 4.7 (9, 88, 94) y su vida media circulante de 2 a 5 horas (47). Estas propiedades se comparan con las de otras gonadotropinas en la tabla 3.

#### E.- Almacenamiento y Secreción.

La hormona folículo estimulante se almacena en las células de la hipófisis anterior, dentro de gránulos de secreción, sólo una pequeña porción de la misma está disponible para ser liberada y sus niveles séricos varían durante el ciclo ovulatorio. La proporción de FSH almacenada y la disponible para ser liberada puede estar regulada al menos en parte, por el grado de incorporación de ácido siálico dentro de la molécula (11). No existe efecto estacional en cuanto a la concentración de FSH en la hipófisis de la yegua. Por el contrario, LH si muestra variación, siendo baja su concentración durante el invierno (anestro), incrementándose al final de la primavera para alcanzar los valores más altos en el verano (época reproductiva) (35). La hipófisis de caballo es la fuente más rica de FSH (Fig. 5).

La LH equina (eLH) posee un alto grado de actividad de FSH, la cual no es resultado de la contaminación (17, 51, 76). Es posible que la doble actividad (FSH-LH) sea una característica general de las gonadotropinas equinas, más que una propiedad de la eCG relacionada con su origen extrahipofisiario (51).

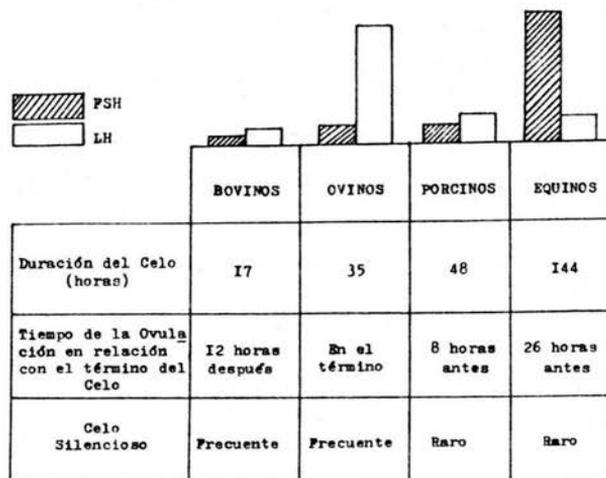


Figura 5. Contenido de FSH y LH en la hipófisis de varias especies en relación con algunos fenómenos estrales. Modificado de Holy (40).

#### Papel de las Hormonas en el Ciclo Estral Bovino

Se define como estro, celo o calor, el momento durante el cual la hembra acepta la cópula con el macho. Este periodo es de naturaleza cíclica, estableciéndose lo que se conoce como ciclo estral y se produce a causa de varias hormonas, más o menos como sigue. El hipotálamo produce GnRH que viaja a través del sistema vascular porta hipofisiario hacia la adenohipófisis donde promueve la síntesis y secreción de FSH y LH (86), éstas llegan al ovario y estimulan el crecimiento folicular. Los folículos en crecimiento principalmente aquel destinado a ovular, producen a su vez en la teca interna, esteroides androgénicos por efecto de la LH, posteriormente éstos se aromatizan en las células de la granulosa,

convirtiéndose en estrógenos (estradiol), bajo la influencia de FSH (4, 33, 55). El estradiol pasa al útero y provoca la proliferación endometrial; es además responsable de la libido. Cuando el nivel sérico de estradiol alcanza cierto umbral por un tiempo específico, señalando la presencia de un folículo maduro, se induce una mayor producción de GnRH que a su vez incrementa la liberación de FSH y LH (Fig. 6) (1, 8, 43), la cual coincide con el inicio del celo. La LH lleva al folículo a la ovulación, ésta ocurre aproximadamente 30 horas después de iniciado el estro (32) y simultáneamente la luteinización del mismo, así se forma un cuerpo lúteo que produce progesterona, responsable de preparar al útero para la implantación del huevo fertilizado y sostener el embarazo. Cuando no ocurre el embarazo, el endometrio secreta prostaglandina F2-alfa en cantidades elevadas, desde el día 14 del ciclo alcanzando niveles máximos durante los días 15-17 que se mantienen hasta el día 20 (99), es un agente que destruye al cuerpo lúteo (luteolítico), viaja por contracorriente del útero al ovario, vía sanguínea y linfática (38) y permite que un nuevo ciclo estral se inicie. En la vaca, el ciclo dura alrededor de 21 días.

#### Purificación de FSH

Los primeros intentos para preparar FSH libre de la actividad de otras hormonas fueron reportados hace aproximadamente 54 años (29). Esta fué aislada por Li y Colaboradores (49) de hipófisis de borrego, posteriormente se ha purificado a partir de ovinos (64, 72, 88), porcinos (42, 97), bovinos (14, 31, 73), humanos (65, 74, 83) y equinos (9, 17, 37, 51, 69), principalmente.

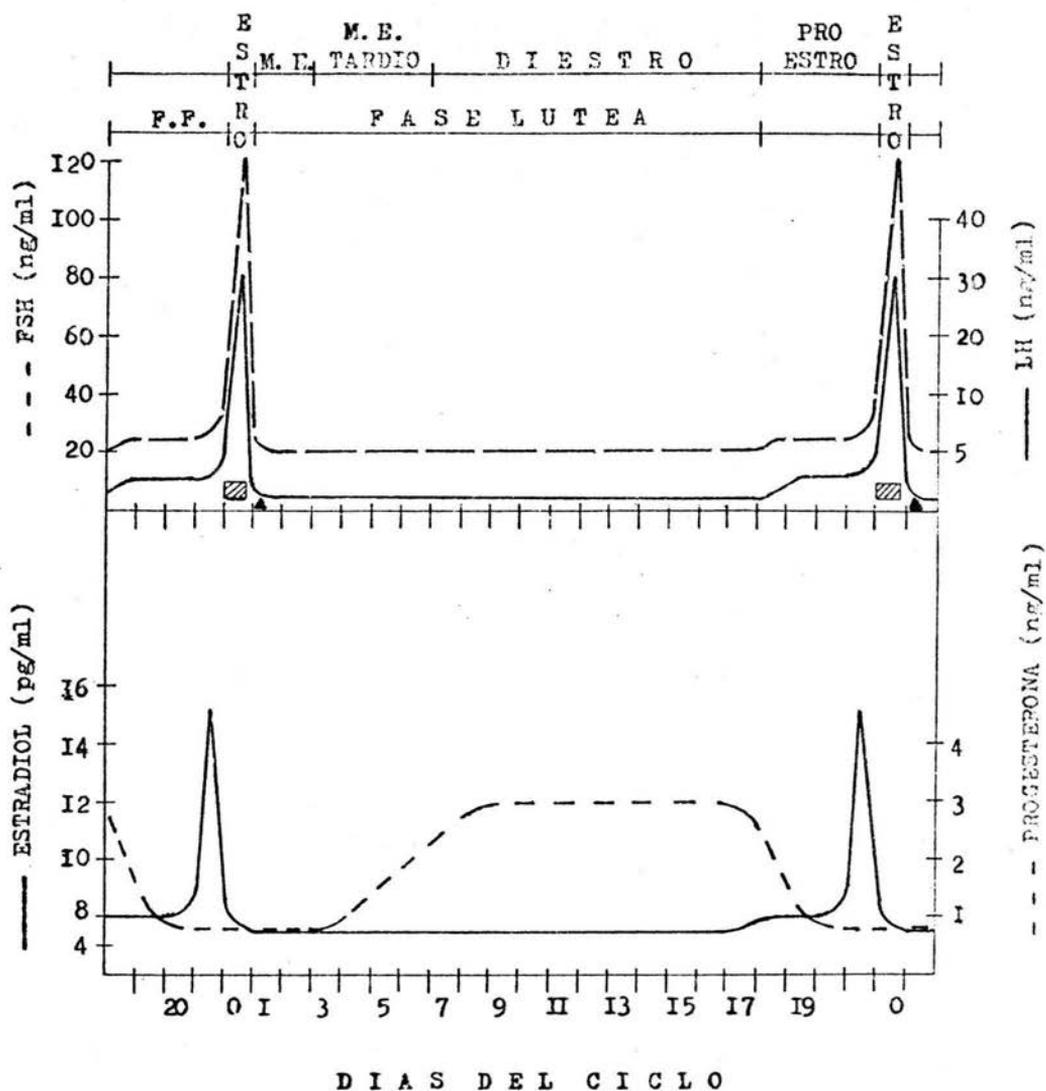


Figura 6. Cambios hormonales durante el ciclo estral bovino. Adaptado de varios autores (8, 33, 45, 90).

F.F. = Fase Folicular.  
 M.E. = Meta Estro.

▨ Celo o Estro.  
 ▲ Ovulación.

Se han empleado diferentes técnicas para purificar la hormona. Inicialmente se extraen las glucoproteínas (FSH, LH y TSH) con acetato de amonio-etanol o sulfato de amonio y se precipitan con etanol, acetona o sulfato de amonio, después se separan por cromatografía de intercambio iónico y de filtración en gel (9, 14, 17, 31, 36, 65, 69). La preparación que se obtiene, generalmente posee una cantidad considerable de LH, dicha contaminación es hasta cierto punto necesaria puesto que como se sabe, FSH y LH actúan en forma sinérgica sobre el ovario y por la doble actividad de eLH mencionada antes. Al respecto, Moniaux (57) prefiere llamar a éste tipo de productos, preparaciones "FSH-LH".

#### Utilidad de FSH

##### A.- Transferencia de Embriones.

La transferencia de embriones consiste en remover un embrión en sus primeras fases de desarrollo, de un tracto reproductivo a otro, donde continuará desarrollandose hasta su nacimiento (Fig. 7). Se practica desde hace 90 años con fines experimentales en más de una docena de especies y en forma extensiva en conejas, ratas, ovejas y vacas. Es actualmente una técnica muy difundida y de uso generalizado entre muchos ganaderos. Las ventajas que se obtienen a través de ella son muchas: permite acelerar el mejoramiento genético, se logra obtener mayor descendencia de vacas valiosas, hace posible obtener progenie de animales que sufren ciertos tipos de infertilidad, se pueden conservar embriones *in vitro* y determinar su sexo antes de realizar la transferencia. Esta práctica, en nuestro país, se ha venido desarrollando con buenos resultados (5) desde hace 9 años.

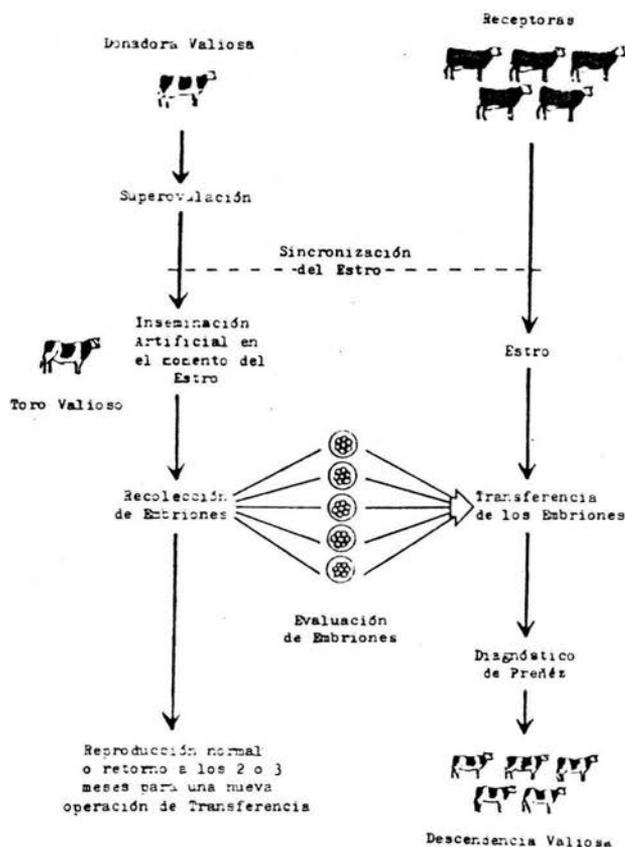


Figura 7. Transferencia de Embriones.

Uno de los procesos principales de la transferencia de embriones en bovinos es la superovulación (s.o.), consistente en inducir la maduración y ovulación de un número de folículos mayor al normal, mediante la aplicación de gonadotropinas exógenas. Para lograr la s.o. en vacas se han empleado varios preparados hormonales, éstos son PMSG, FSH, Extracto Pituitario Equino (HAP) y Gonadotropina Menopáusica Humana (HMG), siendo los más usados.

PMSG y FSH. Para todos ellos existen tratamientos específicos (2, 18, 22, 23, 25).

La FSH es en la actualidad la hormona más utilizada para inducir superovulación en donadoras de embriones bovinos (53). En general, los resultados finales, expresados por el promedio de embriones transferibles obtenidos de cada animal, han sido mejores al superovular con FSH que cuando se induce con PMSG (27, 48, 57).

La dosis total de FSH empleada está entre 28 a 55 mg, aplicados por vía subcutánea (s.c.) cada 12 horas, durante 4 a 5 días en dosis decrecientes o constantes durante la fase lútea del ciclo estral, seguida de la aplicación de un agente luteolítico para inducir el estro (16, 18, 22, 53). A la presentación del celo se realiza inseminación y aproximadamente 7 días después se extraen los embriones, para éste tiempo la mayoría se encuentra en estadio de mórula a blastocisto y es el mejor momento para colectarlos en forma no-quirúrgica y obtener resultados óptimos de preñación (26, 52, 87) (Fig. 8). Posteriormente se transfieren a vacas de menor mérito genético (62, 77, 100), después de haber sido evaluados, para lo cual se utilizan uno o varios de los distintos métodos existentes (52), siendo el más ampliamente usado, el que toma en cuenta las características morfológicas (27, 52, 87).

#### B.- Inducción del Estro.

Además de la superovulación, se utiliza también FSH en vacas con ovarios inactivos (anestro), es decir, en animales que no muestran actividad cíclica. Generalmente se aplican alrededor de 10 mg s.c. en una sola inyección.

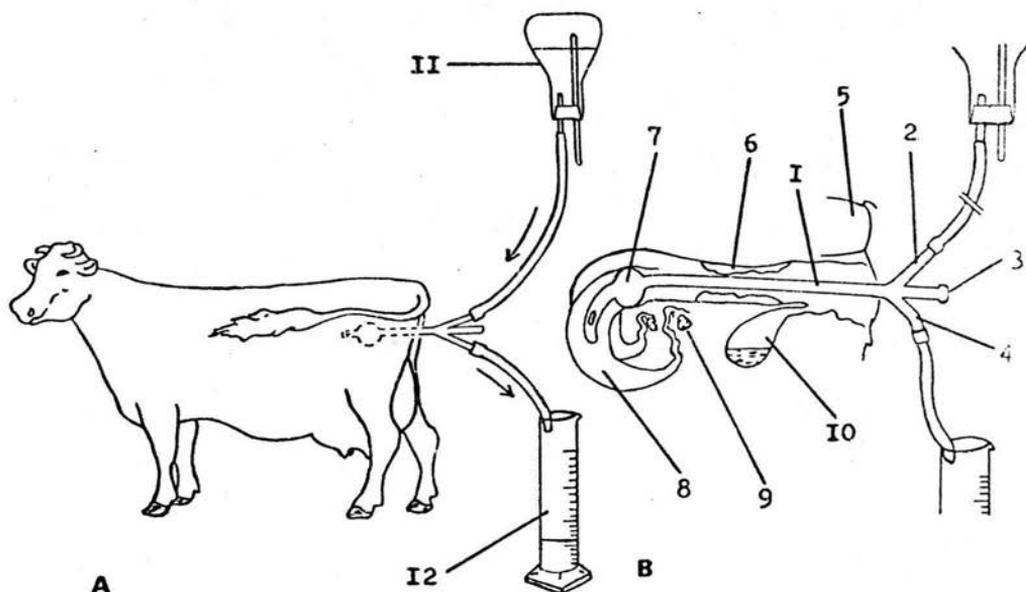


Figura 8. Recolección No-Quirúrgica de Embriones. Adaptado de la literatura.

1.- Sonda de Foley de tres vías. 2.-Tubo de entrada de la solución amortiguadora. 3.-Tubo para inflar el globo. 4.-Tubo de salida de la solución amortiguadora. 5.-Recto. 6.-Cuello uterino. 7.-Globo. 8.-Cuerno uterino izquierdo. 9.- Ovario. 10.- Vejiga urinaria. 11.- Matraz con solución salina amortiguada con fosfatos suplementada. 12.-Probeta en la que por lavado uterino se recogen los embriones.

Existe un intervalo entre el parto y el siguiente estro. La vaca de raza lechera vuelve a entrar en celo entre los 30 y 40 días y la de raza de carne, entre los 40 y 60 días. Cuando una vaca no muestra signos de estro alrededor de 60 días después del parto se dice que se encuentra en condición de anestro. Esta muchas veces es propiciada por deficiencias hormonales, está también relacionada con desbalances nutricionales y probablemente factores climáticos adversos como las altas temperaturas (54).

El anestro es un desorden reproductivo debido a un periodo prolongado de quiescencia gonadal, se presenta en el 48% de las vacas (21), dependiendo de la raza y la edad. En ésta condición, generalmente se pueden palpar folículos regularmente desarrollados en uno de los ovarios y algunas veces en ambos, éstos persisten sin ovular o continuar su desarrollo, durante un periodo considerablemente largo en algunos animales, por requerir factores ovulatorios favorables.

Otro método para la inducción del estro y ovulación en animales con problemas de anestro, consiste en la aplicación de Citrato de Clomifeno. En un tratamiento a vacas que no exhibieron estro 3 a 7 meses después del parto, el 53.6% entraron en calor 4 a 8 días después (21). En otros trabajos se han obtenido incluso mejores porcentajes (24, 44).

El problema del anestro se ha resuelto también mediante el tratamiento con una combinación de progesterona y cipionato de estradiol, con buenos resultados (19).

Se habla de inducción del estro y ovulación, debido a que con un tratamiento determinado, los animales pueden entrar en calor y además ser capaces de quedar gestantes, Dugwekar (24) lo refiere como la inducción de estro fértil u ovulatorio.

### Justificación

Es evidente la importancia de contar con una preparación adecuada de FSH producida en el país. En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES Cuautitlán), ha existido la inquietud por desarrollar una línea de trabajo conducente a obtener FSH purificada y evaluada como un agente útil en la producción animal.

Hemos optado por trabajar con las hipófisis de caballo, puesto que ha sido menos difícil conseguir las de ésta especie. Consideramos que éste no debe constituir un factor adverso, pues la hormona usada comunmente proviene de hipófisis de cerdo (FSH-P:Burns-Biotec y Armour), así, la de origen equino resulta ser también heteróloga respecto a la vaca y además, ha demostrado ser eficaz cuando se administra en forma de extracto.

### OBJETIVOS

- 1.- Obtener una preparación de FSH equina purificada.
- 2.- Estimar su potencia biológica y mediante radio inmuno análisis heterólogo, su potencia inmunológica.
- 3.- Evaluar la actividad de la hormona como inductora del estro en vacas.

## MATERIAL Y METODOS

### I.- Recolección y Conservación de las Hipófisis.

Un total de 300 hipófisis de caballo recolectadas en acetona a 4° C, se adquirieron en el rastro de Iztapalapa de la Ciudad de México, de éstas sólo se utilizaron los lóbulos anteriores.

### II.- Purificación.

El procedimiento está basado en la técnica que se utilizaba en el banco de Hormonas Proteicas del IMSS (81, 82), con algunas modificaciones (Fig. 9), éste se realizó a 4°C, como sigue:

#### a.- Preparación del Polvo Acetónico.

Los lóbulos anteriores se pesaron retirando el exceso de acetona con papel filtro, se molieron en una licuadora con 1 litro de acetona y se homogenizaron, el macerado se lavó con acetona y con éter por filtración en un embudo de Buchner y se dejó secar durante 24 horas.

#### b.- Extracción de las Glucoproteínas (FSH, LH, TSH).

La extracción se efectuó agregando al polvo acetónico previamente pesado, acetato de amonio ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) al 10%, pH 5.1 y etanol al 96% (3:2 v/v, 10 ml/g de polvo), se mantuvo en agitación durante 24 horas y se centrifugó. Se hizo una reextracción bajo el mismo procedimiento. Se mezclaron los sobrenadantes de ambas extracciones, se le agregaron 2 volúmenes de etanol al 96% por goteo con agitación constante y se dejó reposar durante 48 horas. Después de la precipitación etanólica, se centrifugó a 4000 rpm por 30 minutos. El precipitado se lavó con tres volúmenes de éter centrifugando a 4000 rpm durante 30 minutos, se secó al vacío, se



pesó, se resuspendió en 145 ml de acetato de amonio 0.005 M, pH 5.5, se dializó contra el mismo amortiguador durante 24 horas y se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos.

c.- Separación de FSH.

Se realizó por cromatografía de intercambio iónico usando una columna (Pharmacia) de 2.6 x 40 cm, de Carboxi Metil-celulosa (CM-celulosa, Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.), previamente activada con NaOH 0.1 N, Agua y HCl 0.1 N en forma sucesiva y equilibrada con acetato de amonio 0.005 M, pH 5.5. Antes y después de preparar la columna, la CM-celulosa se ajustó a pH 5.5 como describe Hartree (36). Se aplicaron 500 y 437 mg (75 y 65 ml) del extracto glucoproteico para ser eluidos con acetato de amonio 0.005 M, pH 5.5, 1 M, pH 6.8 y 1 M, pH 9.5. Se recolectaron fracciones de 10 ml a una velocidad de 0.5 ml por minuto.

Para trazar el cromatograma, se leyó la absorbancia de las fracciones a 280 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21.

La concentración de proteínas se determinó por medio del método de Lowry (68), utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar.

### III.- Bioensayo.

La potencia biológica de los productos finales se determinó por medio de la técnica de Steelman y Pohley (91), en términos de FSH-P:Burns-Biotec (FSH-P)<sup>+</sup>. Se utilizaron ratas hembras Wistar de 21 a 23 días de edad. Las dosis de FSH-P y muestras problema fueron de 100 y 200 µg. A cada dosis se le agregaron 50 Unidades Internacionales (UI) de hCG y se llevó a 2.5 ml con NaCl al 0.9%. Se aplicó una inyección subcutánea de 0.5 ml, dos veces al día durante tres días, para un total de 5 inyecciones. Cada rata recibió al final 100 o 200 µg de hormona más 50 UI de hCG. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última inyección, se retiraron los ovarios eliminando el exceso de tejido graso y se pesaron los dos juntos de cada rata.

La distribución de muestras y animales fué la siguiente:

Grupo	Muestra	Régimen	No. Animales (Total)
Problema	Extracto (+hCG)	2 dosis (100 y 200 µg)	4/dosis (8)
"	CM-1 "	"	" "
"	CM-2 "	"	" "
"	CM-3 "	"	" "
Estándar	FSH-P "	"	" "
Control	hCG	1 dosis (50 UI)	" (4)

Las muestras de los grupos problema son las fracciones derivadas del proceso de purificación.

+ FSH-P:Burns-Biotec, es una preparación de FSH de origen porcino, de importación que en el país se usa al dar tratamientos de inducción de estro y superovulación, por eso se tomó como referencia.

#### IV.- Radioinmunoanálisis.

El radioinmunoanálisis (RIA) se efectuó con la finalidad de corroborar la existencia de FSH en los productos finales, además estimar su potencia inmunológica. Este se hizo por duplicado usando tubos de vidrio de 10 x 75 mm. Fué heterólogo debido a que los reactivos disponibles en el laboratorio eran de rata.

##### a.- Yodación de FSH.

A 2.5  $\mu$ g de FSH de rata (NIADDK-rFSH-I-5) en 25  $\mu$ l de amortiguador salino de fosfatos (PBS) 0.01 M, pH 7.4, se le agregaron 10  $\mu$ l (1 mCi) de yodo-125 (I-125) (Amersham, England), resultando 734,524 cuentas por minuto (cpm). Se adicionaron 10  $\mu$ l de Cloramina T (5 mg en 20 ml de PBS), se agitó durante 60 segundos, se agregaron 50  $\mu$ l de Metabisulfito de Sodio (10 mg en 10 ml de PBS), y se agitó durante 10 segundos. La mezcla se depositó en una columna de Sephadex G-100 (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) de 1 x 18 cm, a la que previamente se le habían pasado 2 ml de BSA al 5% y 15 ml de PBS. Se contó la radiactividad que se mantuvo impregnada en el tubo donde se hizo la mezcla y en la punta de la pipeta con que se depositó en la columna, constituyendo éste el residuo que fué de 165,272 cpm. Eluyendo con PBS, se recogieron 30 fracciones de 10 gotas cada una, en tubos con 200  $\mu$ l de BSA al 5% mantenidos sobre hielo. Se contaron las fracciones en un contador AMES, Gammacord II y se graficaron (Fig. 10). La hormona yodada (FSH-I-125) tuvo una actividad específica de 100  $\mu$ Ci/ $\mu$ g.

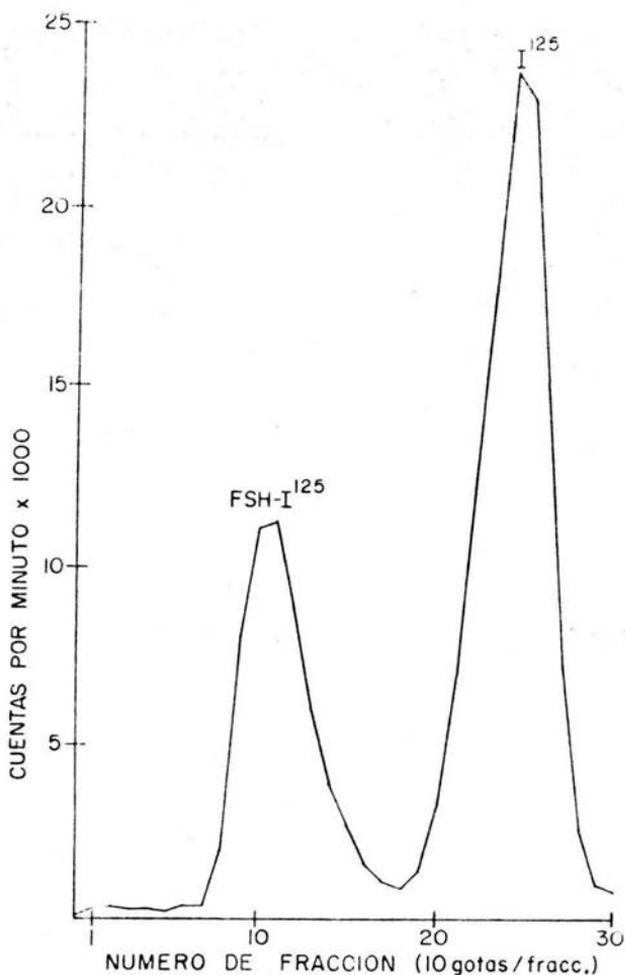


Figura 10. Grafica de separación FSH yodada por cromatografía en Sephadex G-100.

b.- RIA de FSH.

El procedimiento se esquematiza en la figura 11. Se utilizó PBS 0.01 M, pH 7.4, con 0.01 M EDTA, 50 mg/L gama globulina de conejo y 0.2% BSA (amortiguador de ensayo), para todas las diluciones a excepción del segundo anticuerpo. El primer

Numerar los tubos y ordenarlos.

Preparar los reactivos y pipetearlos como sigue:

Reactivos	Bo	Unión no Especifica	Estándar, Problema o Pool	Cuenta Total	Tubos
Amortiguador de Ensayo	100 $\mu$ l	300 $\mu$ l	-	-	
ier. Ac	200 $\mu$ l	-	200 $\mu$ l	-	
FSH-I-125	100 $\mu$ l (10,000cpm)	100 $\mu$ l (10,000cpm)	100 $\mu$ l (10,000cpm)	100 $\mu$ l (10,000cpm)	
Estd., Problema o Pool	-	-	100 $\mu$ l	-	
Agitación	Si	Si	Si	-	

Incubar 18-24 horas a temperatura ambiente.

2do. Ac	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	-
Agitación	Si	Si	Si	-

Incubar 18-24 horas a temperatura ambiente.

Agua Desionizada	1 ml	1 ml	1 ml	-
------------------	------	------	------	---

Centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos.

Decantar el sobrenadante.

Secar la pared interna de los tubos.

Contar la radiactividad del precipitado.

Calcular los resultados.

Figura 11. Esquema de Radio Inmuno Análisis.

anticuerpo (1er. Ac) (NIADDK-anti-rFSH-S-11), suero de conejo anti-FSH de rata, se uso a una dilución inicial 1:62,500 y el segundo (2do. Ac), suero de borrego anti-gama globulina de conejo, dilución inicial 1:10, éste último con PBS 0.01 M, pH 7.4. De la hormona yodada (FSH-I-125) se emplearon 10,000 cpm en cada tubo. Como referencia o estándar se utilizó FSH de rata (NIADDK-rFSH-RP-1), haciendo dobles diluciones seriadas (entre 1000 y 15.625 ng/ml), se hizo lo mismo para cada muestra problema (concentrado-1:160). Se colocó suero de rata ovariectomizada, a tres diferentes concentraciones (pooles), como control de calidad.

El conteo de la radiactividad se efectuó en un contador Packard Auto-Gama 500 y el cálculo de los resultados mediante un programa basado en análisis de regresión, usando una calculadora Hewlett-Packard 97. Se graficó Logit del porcentaje de unión específica (Logit  $(B/B_0 \times 100)^+$  contra logaritmo de la dosis. Para determinar si existe paralelismo entre la curva estándar y las problema, se consideraron las pendientes y se compararon mediante análisis de varianza.

Las siguientes preparaciones utilizadas en el RIA, son aportadas por National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive Kidney Diseases (NIADDK): FSH de rata altamente purificada para yodación (NIADDK-rFSH-I-5). Suero de conejo anti-FSH de rata (NIADDK-anti-rFSH-S-11). FSH de rata, preparación de referencia (NIADDK-rFSH-RP-1).

+ Logit =  $2.303 \log Y/100-Y$ .

B = cpm del estándar o problema.

B<sub>0</sub> = cpm de  $\bar{X}B_0$  definido en la figura 11.

#### V.- Inducción del Estro.

Se utilizaron 45 vacas criollas sin actividad cíclica por más de 60 días (en anestro), libres de infecciones o anormalidades genitales. Por palpación rectal se confirmó la ausencia de cuerpos lúteos. Los animales se dividieron en dos grupos y estuvieron distribuidos en los Ranchos "El Terremoto" en Teoloyucan Estado de México y "Los Claveles" en San Juan del Río Querétaro. Los tratamientos se llevaron a cabo entre los meses de mayo a julio. El Grupo A (20 animales) recibió una inyección subcutánea de 10 mg de FSH-P y el Grupo B (25 animales) una inyección s.c. de 21 mg de la fracción CM-1. La dosis de CM-1 se calculó en base a la potencia biológica estimada (CM-1= 47.8% de FSH-P). La detección de estros se efectuó por la mañana de 7:00 a 8:00, al medio día y por la tarde de 17:00 a 18:00 horas, en forma visual. Las vacas que entraron en estro fueron inseminadas artificialmente 12 horas después de detectado el mismo. El diagnóstico de gestación se llevó a cabo por palpación rectal alrededor de 45 días después del servicio (inseminación). Los resultados se compararon empleando la prueba de Chi cuadrada.

## RESULTADOS

### Purificación y Bioensayo.

El proceso de purificación se esquematiza en la figura 9. Es un método desarrollado por Hartree (36) y retomado por Salas (81, 82) para extraer y separar las glucoproteínas hipofisiarias (FSH, LH y TSH), aunque en éste trabajo sólo se evaluó a una de ellas (FSH).

De los 300 lóbulos anteriores cuyo peso total fué de 230 g, se obtuvieron 64 g de polvo acetónico y 3 g en peso seco de extracto glucoproteico, el cual poseía 0.971 g de proteína. Considerando el equivalente a 100 g de polvo acetónico, se tendrían 4.7 y 1.5 g de extracto, en peso y contenido de proteínas, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento y actividad FSH en cada una de las fracciones principales.

Parámetro	Fracción			
	Extracto Glucoproteico	CM-1	CM-2	CM-3
Peso Seco (g)	3.0(0.971) <sup>a</sup>	0.744(0.337)	0.503(0.396)	0.361(156)
Potencia Biológica				
1.- (% de FSH-P)	38.9	47.8	27.0	25.8
2.- (U/mg) <sup>b</sup>	0.389	0.478	0.270	0.258
3.- U Totales	1167.0	355.6	135.8	93.1
Recuperación (%)	100	30.4	11.6	5.7
g/100 g de polvo acetónico	4.7(1.5)	1.2(0.53)	0.78(0.62)	0.56(0.24)
g/Kg de hipófisis	13.0	3.2	2.2	1.6

a) Entre paréntesis se indican los valores correspondientes al contenido de proteínas en gramos. b) En relación a FSH-P que posee 1 U/mg, estandarizado éste en base al estándar Armour.

La cromatografía del extracto glucoproteico (Fig. 12), rindió tres fracciones (tres picos) denominadas CM-1, CM-2 y CM-3. CM-1 constituye la fracción con mayor actividad de FSH, siendo ésta 47.8% de FSH-P según el bioensayo (Fig. 13). De la misma, resultaron 0.744 g en peso que corresponderían a 1.2 g por cada 100 g de polvo acetónico y que representan un rendimiento de 3.2 g por Kg de hipófisis (Tabla 4).

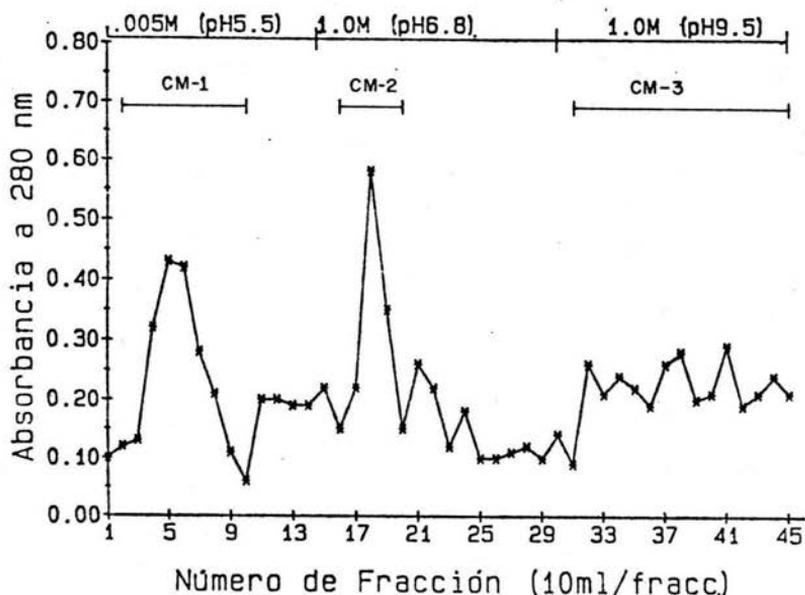


Figura 12. Cromatografía del extracto glucoproteico en una columna de CM-celulosa de 2.6 x 40 cm. Se eluyó con  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  0.005 M, pH 5.5, 1 M, pH 6.8 y 1 M, pH 9.5, a una velocidad de 0.5 ml por minuto. Se obtuvieron tres fracciones CM-1, CM-2 y CM-3.

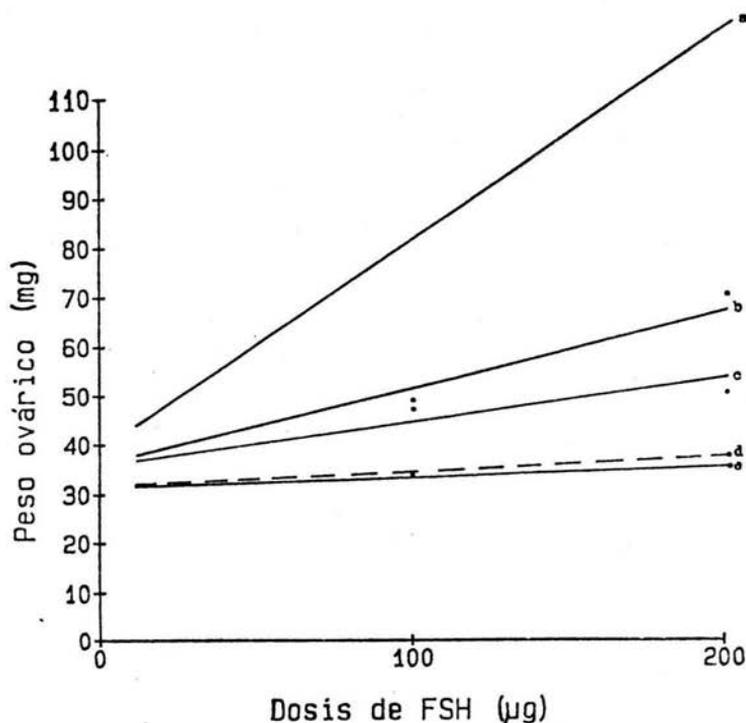


Figura 13. Bioensayo. Curvas dosis-respuesta de los productos finales, suplementados con 50 U hCG, en ratas hembras de 21-23 días de edad, según el método de Steelman y Pohley (91). a) FSH-P, b) CM-1, c) Extracto Glucoproteico, d) CM-2, e) CM-3.

#### Radioinmunoanálisis

En relación con el RIA, la figura 14 muestra las curvas de desplazamiento de las fracciones extracto glucoproteico y CM-1, además de FSH-P, relacionadas con el estándar de rata (rFSH-RP-1). Se observa que las del extracto y CM-1 no son paralelas ( $P < 0.05$ ) con respecto a rFSH-RP-1 y FSH-P. Entre el extracto y CM-1 si

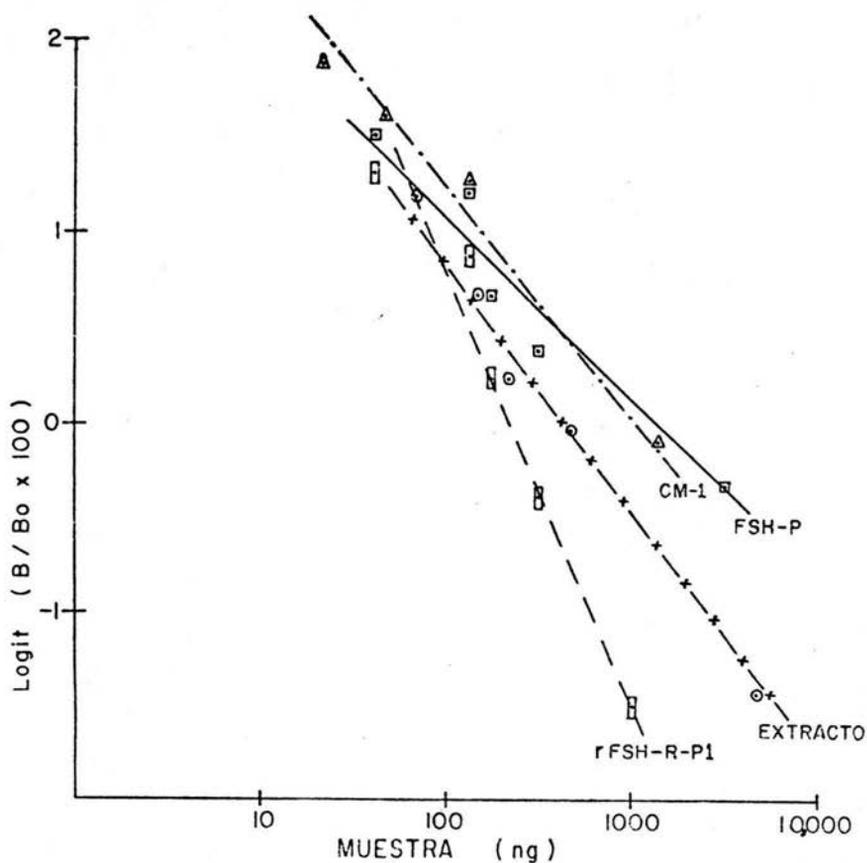


Figura 14. RIA de FSH. Curvas de paralelismo (Logit vs Log) para FSH-P ( $\square$ , ecuación de regresión lineal  $y = -0.97x + 3.13$ ), Extracto Glucoproteico ( $\odot$ ,  $y = -1.35x + 3.7$ ) y CM-1 ( $\triangle$ ,  $y = -1.27x + 3.8$ ) contra el estándar rFSH-RP-1 ( $\square$ ,  $y = -2.29x + 5.6$ ).

existe paralelismo ( $P > 0.05$ ), las pendientes de éstas son semejantes ( $-1.35$  y  $-1.27$ , respectivamente) y son diferentes a las de rFSH-RP-1 ( $-2.29$ ) y FSH-P ( $-0.97$ ). Tomando en cuenta la cantidad de hormona necesaria para inhibir el 50% de unión

específica (cero en la fig. 14), el extracto glucoproteico y CM-1 resultan con una potencia inmunológica (PI) del 218% y 150% de FSH-P y del 53% y 37% de rFSH-RP-1, respectivamente. Al compararla con la potencia biológica (PB), en relación a la misma hormona de referencia (FSH-P), resulta un cociente PI/PB de 5.6 y 3.1, respectivamente. Al considerar la potencia inmunológica en relación a rFSH-RP-1, el cociente es 1.4 y 0.8, para las mismas fracciones (Tabla 5).

La validación o precisión del RIA está representado por los coeficientes de variación (CV) derivados del suero (pools) de control de calidad. El CV intraanálisis fué de 8.6 y el CV interanálisis de 20.0.

Tabla 5. Comparación entre la potencia inmunológica (PI) y la potencia biológica (PB).

Parámetro	Muestra		
	FSH-P	Extracto Glucoproteico	CM-1
Potencia Inmunológica (RIA)			
1 .- (% de FSH-P) (PIa)	-	218	150
2 .- (% de rFSH-RP-1) (PIb)	24	53	37
Potencia Biológica (Bioensayo)			
(% de FSH-P)	-	38.9	47.8
PIa/PB	-	5.6	3.1
PIb/PB	-	1.4	0.8

### Inducción del Estro.

De las vacas tratadas con FSH-P (Grupo A) y con la preparación de FSH obtenida en éste trabajo (fracción CM-1, Grupo B), 19 (95%) y 23 (92%) respectivamente, respondieron, entrando en estro 10 a 15 días después. De esas, el 63.16% y 61% respectivamente quedó preñada a primer servicio, llegando a término y produciendo partos simples (Tabla 6). No hubo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en la presentación de estros y fertilidad entre ambos grupos.

Tabla 6. Inducción del estro y fertilidad en vacas tratadas con FSH-P y la fracción CM-1.

Parámetro	Grupo	
	A (FSH-P)	B (CM-1)
No. de Animales Tratados	20	25
No. de Animales que mostraron signos de estro	19 (95%)	23 (92%)
No. de Animales que quedaron gestantes	12 (63.16%) <sup>a</sup>	14 (61%) <sup>a</sup>

No hubo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre grupos.

a) tomando como 100% el número de animales que entró en estro.

## DISCUSION

El rendimiento en extracto glucoproteico correspondiente a 100 g de polvo acetónico de 4.7 g es ligeramente superior a los 3.5 g que menciona Hartree (37) aunque está por debajo de 6.2 g reportados por Rathnam (69).

Como se mencionó en material y métodos, hubo dos corridas sobre CM-celulosa, con 500 y 437 mg de extracto glucoproteico. La separación fué muy semejante y una de ellas es la que se esquematizó (Fig. 12). Las fracciones obtenidas en ambas corridas se mezclaron para llegar a las cantidades totales de CM-1, CM-2 y CM-3 que aparecen en la tabla 4.

Los 0.744 g de la fracción CM-1, que hacen un 30.4% de recuperación, es inferior al 51% de Hartree (37), al 56%, 52%, 71% y 95% de Salas (81) (quien trabaja con hipófisis humanas), Combarnous (17), Braselton (9) y Rathnam (69), respectivamente, éstos tres últimos en un paso similar del proceso de purificación, ya que siguen una metodología un tanto diferente a la descrita aquí para la separación de las glucoprotefnas. El rendimiento en peso obtenido de 3.2 g/Kg de hipófisis es inferior a los que reportan Combarnous y Hartree (17, 37) y es superior a los de Braselton y Rathnam (9, 69).

La fracción CM-2 podría corresponder básicamente a LH y TSH y CM-3 a TSH, según se ha mencionado (36, 79, 81, 83) aunque éstas, en el presente estudio no fueron caracterizadas.

El extracto glucoproteico, CM-1 y FSH-P mostraron afinidad por el anticuerpo produciendo un desplazamiento de las curvas significativo. El desplazamiento sigue una trayectoria que no es paralela respecto a la del estándar (rFSH-RP-1) y FSH-P, debido a ésto, la estimación de la potencia inmunológica es menos precisa que si las curvas fueran paralelas. Los resultados del bioensayo son inferiores a los del RIA, cuando éstos se comparan tomando como referencia común a FSH-P, tal discrepancia se ha observado en otros trabajos (8, 15). Si por el contrario, se considera a la potencia inmunológica en términos de rFSH-RP-1, los resultados son semejantes. Akbar (1) hace algo parecido, él utiliza un estándar para el bioensayo, de una especie diferente a la del estándar del RIA y compara los resultados. Whitley (97) usa estándares diferentes pero de la misma especie.

Las curvas del extracto glucoproteico y CM-1 son paralelas entre si, lo cual coincide con su origen común. El primero mostró una potencia inmunológica 1.4 veces mayor que la del segundo, ésto es contrario a lo que se observó en el bioensayo, aunque la actividad biológica del extracto fué cercana a la de CM-1.

El que no se haya observado paralelismo entre rFSH (rFSH-RP-1), eFSH (extracto glucoproteico y CM-1) y pFSH (FSH-P), coincide con otros reportes, ya que generalmente las preparaciones de FSH de especies diferentes muestran desplazamientos no-paralelos entre si (8, 15, 85, 97). Cuando las especies están más emparentadas evolutivamente, las curvas pueden ser paralelas, ésto se manifiesta por ejemplo, entre pFSH y bFSH, eFSH y oFSH o bien entre eFSH y dFSH (FSH de burro) (8, 76, 85).

En ensayo radio receptor, eFSH y rFSH han mostrado paralelismo (80), aparentemente los receptores celulares no discriminan entre FSH de especies diferentes, produciendo curvas que siguen una trayectoria paralela (13, 14, 51, 80).

Los coeficientes de variación intra e interanálisis están dentro de los límites permitidos para éste tipo de análisis, ésto es, menores de 10 para el intraanálisis y de 25 para el interanálisis.

Al hacer la dosificación de CM-1 para inyectar a las vacas se tomó el valor de la potencia biológica debido a que los resultados del RIA mostraron ser imprecisos y contradictorios como ya se mencionó. De antemano, el RIA se planeó tratando de aprovechar la metodología y reactivos disponibles y comparar los resultados con los del bioensayo, habiéndose manifestado una marcada discrepancia entre ambas pruebas.

Tomando en cuenta los resultados observados en la presentación de calores, el elevado porcentaje en los dos grupos sugiere que, la falta de ciclicidad se debía a un desbalance endócrino. Los porcentajes de gestación están dentro de los límites reportados (19, 24, 54), éste depende de varios factores entre ellos, la fertilidad del semen y la eficiencia del inseminador, por lo que no siempre se logra la inducción de un estro fértil. Al respecto, influye mucho también, la habilidad de la persona encargada de la detección del estro.

Los porcentajes de presentación de estros obtenidos, son parecidos a los que se mencionan en otros trabajos, en los cuales se siguen

tratamientos diferentes. Con Clomifeno, Dugwekar (24) observó un 87.5%, 0 a 15 días postratamiento y específicamente en una de las razas tratadas, el 100%. Mediante una combinación de progesterona y cipionato de estradiol se han reportado el 88% (54), 93.7% (19), en un periodo de 45 días y 92.3% (20), 0 a 21 días después del tratamiento.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo una preparación de FSH (fracción CM-1) de hipófisis de caballo con un rendimiento en peso, porcentaje de recuperación y actividad biológica, cercanos a los resultados observados en otros trabajos. Al respecto, es posible de acuerdo a la experiencia, en un siguiente proceso de purificación y siguiendo en esencia la metodología descrita, lograr un mejor preparado hormonal.

La potencia biológica de la preparación de FSH equina es inferior a la de FSH-P lo cual indica una mayor homogeneidad o pureza de ésta última. Esto deberá ser confirmado determinando el patrón electroforético o grado de pureza de ambas preparaciones.

El valor de la potencia biológica no corresponde con el de la potencia inmunológica cuando éstas se comparan en relación a FSH-P. Se obtienen valores menos discrepantes entre ambas pruebas, al compararse en términos de hormonas de referencia diferentes (FSH-P y rFSH-RP-1, respectivamente). Posiblemente sea necesario probar nuevamente con el RIA heterólogo descrito, para corroborar que mediante el mismo, los valores de la potencia biológica e inmunológica no coinciden y desidir sobre la posibilidad de desarrollar un RIA homólogo o bién un ensayo radio receptor que nos permita además, estimar el contenido de FSH en preparaciones hipofisiarias y plasma equinos.

Los resultados muestran que la preparación de FSH de origen equino derivada de éste estudio, puede constituir un agente útil en el tratamiento del anestro, pues demuestra su eficacia al inducir el estro y ovulación en el ganado bovino.

El presente estudio marca la pauta para continuar con ésta línea de trabajo. Es recomendable evaluar la actividad de la preparación hormonal al inducir superovulación en bovinos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Akbar, A.M., Reichert, L.E. and Dunn, T.G. 1974. Serum levels of follicle-stimulating hormone during the bovine cycle. *J. Anim. Sci.* 39: 360-365.
- 2.- Alcivar, A.A., Maurer, R.R. and Anderson, L.L. 1983. Superovulatory responses in FSH or Pergonal treated heifers. *Theriogenology*. 19: 109.
- 3.- Allen, W.R. and Moor, R.M. 1972. The origin of the equine endometrial cups. *J. Reprod. Fertil.* 29: 313-316.
- 4.- Armstrong, D.T. and Papkoff, H. 1976. Stimulation of aromatization of exogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats *in vivo* by follicle stimulating hormone. *Endocrinology*. 99: 1144-1151.
- 5.- Avila, J. 1984. La utilización masiva del trasplante de embrión. *Ganadero*. 18: 23.
- 6.- Bamba, C.S., Lynch, S.S. Foxcroft, G.R., Robinson, G. and Amoroso, E.C. 1984. Purification and characterization of guinea-pig chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.* 71: 227-233.
- 7.- Bell, J.J., Candfield, R.E. and Sciarra, J.J. 1969. Purification and characterization of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 84: 298-307.
- 8.- Bolt, D.J. and Rollins, R. 1983. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. *J. Anim. Sci.* 56: 146-154.
- 9.- Braselton, W.E., and McShan, W.H. 1970. Purification and properties of follicle-stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. *Arch. Biochem. Biophys.* 139: 45-58.
- 10.- Chappel, S.C., Ulloa-Aguirre, A. and Ramaley, J.A. 1982. Sexual maturation in female rats: time course of the appearance of multiple species of anterior pituitary FSH. *Biol. Reprod.* 28: 196-205.
- 11.- Chappel, S.C., Ulloa-Aguirre, A. and Coutifaris, Ch. 1983. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endo. Rev.* 4: 179-211.
- 12.- Chappel, S.C., Bethea, C.L. and Spies, H.G. 1984. Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of *Cynomolgus* monkeys. *Endocrinology*. 115: 452-461.

- 13.- Cheng, K-W. 1975. A radioreceptor assay for follicle-stimulating hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 581-589.
- 14.- Cheng, K-W. 1976. Purification and properties of bovine pituitary follitropin. Biochem. J. 159: 651-659.
- 15.- Cheng, K-W. 1978. Development and characterization of a homologous radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. J. Endocr. 77: 185-193.
- 16.- Chupin, D. and Procureur, R. 1982. Use of pituitary FSH to induce superovulation in cattle: effect of injection regimen. Theriogenology. 17: 81.
- 17.- Combarrous, I. and Henge, M-H. 1981. Equine follicle-stimulating hormone: Purification, acid dissociation, and binding to equine testicular tissue. J. Biol. Chem. 256: 9567-9572.
- 18.- De Los Santos, S.V., Sánchez, A.A. y Monterrubio, G.S. 1982a. Superovulación en ganado bovino empleando hormona foliculo estimulante a diferentes dosis. Reunión Anual de Investigación Pecuaria en México, INIP-UNAM. 729-731.
- 19.- De Los Santos, S.V. 1982b. Combinación de hormonas esteroides y manejo de la lactación en la inducción del estro en vacas productoras de carne con cría al pié. Reunión Anual de Investigación Pecuaria en México, INIP-UNAM. 654-658.
- 20.- De Los Santos, S.V. y Jiménez, H.S. 1984. Utilización de compuestos hormonales y manejo de la lactancia en la inducción del estro en vacas con cría al pié en anestro. Reunión Anual de Investigación Pecuaria en México, INIP-UNAM. 318.
- 21.- Deshpande, B.R., Hukeri, V.B., Velhanker, D.P. and Sane, C.R. 1976. Preliminary observations on "Fertivet" in induction of estrus in anestrus cows and buffaloes. Indian Vet. J. 53: 561-563.
- 22.- Donaldson, L.I.E. and Perry, B. 1983. Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. Theriogenology. 20: 163-168.
- 23.- Donner, M.L. and Oxender, W.D. 1980. Efficacy of an equine pituitary extract to superovulated cows. Theriogenology. 13: 94.
- 24.- Dugwekar, Y.G., Pangawkar, G.R. and Sharma, R.D. 1980. Induction of estrus in anestrus cows treated with "Fertivet". Theriogenology. 13: 123-126.

- 25.- Elsdon, R.P., Lewis, S., Cumming, I.A. and Lawson, R.A.S. 1974. Superovulation in the cow following treatment with PMSG and prostaglandin F2-alfa. *J. Reprod. Fertil.* 36: 455-456 (Abstr.).
- 26.- Elsdon, R.P., Hasler, J.F. and Seidel, G.E. 1976. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology.* 6: 523-532.
- 27.- Elsdon, R.P., Nelson, L.D. and Seidel, G.E. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mares' serum gonadotropin. *Theriogenology.* 9: 17-26.
- 28.- Faith, M.R. and Pierce, J.G. 1975. The carboxylic acid groups of bovine LH. *J. Biol. Chem.* 250: 6923-6929.
- 29.- Fevold, Hisaw, F.L. and Leonerd, S.L. 1931. En: Wolstenholme, G.B.E. and Knight, J.B.A. (Eds.). *Gonadotropins.* p 3. J. and A. Churchill LTD.
- 30.- Goldstein, D.P., Kosasa, T.S. and Skarim, A.T. 1974. The clinical application of a specific radioimmunoassay for human chorionic gonadotropin trophoblastic and nontrophoblastic tumors. *Surg. Gynecol. Obstet.* 138: 747-751.
- 31.- Grimek, H.J., Gorski, J. and Wentworth, B.C. 1979. Purification and characterization of bovine follicle-stimulating hormone: comparison with ovine follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 104: 140-147.
- 32.- Hansel, W. and Echterkamp, S.E. 1972. Control of ovarian function in domestic animals. *Am. Zoologist.* 12: 225-243.
- 33.- Hansel, W. and Convey, E.M. 1983. Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 57 (Suppl. 2): 404-424.
- 34.- Hara, K., Rathnam, P. and Saxena, B.B. 1978. Structure of the carbohydrate moieties of alfa subunit of human follitropin, lutropin and tyrotropin. *J. Biol. Chem.* 253: 1582-1591.
- 35.- Hart, P.J., Squires, E.L., Imel, K.J. and Nett, T.M. 1984. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. *Biol. Reprod.* 30: 1055-1062.
- 36.- Hartree, A.S. 1966. Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. *Biochem. J.* 100: 754-761.
- 37.- Hartree, A.S., Mills, J.B., Welch, R.A.S. and Thomas, M. 1968. Fractionation of protein hormones from horse pituitary glands. *J. Reprod. Fertil.* 17: 291-303.

- 38.- Heap, R.B., Fleet, I.R. and Hamon, M. 1985. Prostaglandin F2-alpha is transferred from the uterus to the ovary in the sheep by lymphatic and blood vascular pathways. *J. Reprod. Fertil.* 74: 645-656.
- 39.- Herbert, D.C. 1976. Immunocytochemical evidence that luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) are present in the same cell type in the rhesus monkey pituitary gland. *Endocrinology.* 98: 1554-1557.
- 40.- Holy, L.D. 1975. Sistema y regulación de la actividad sexual de la hembra bovina, según los conocimientos modernos. Colegio Superior de Agricultura Tropical, México. p 26.
- 41.- Jackson, R.D., Wortsman, J. and Malarkey, W.B. 1985. Characterization of a large molecular weight prolactin in women with iodopathic hyperprolactinemia and normal menses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 258-263.
- 42.- Jacobs, M.M. and Ward, D.N. 1976. Studies on the isolation and chemical properties of porcine follicle-stimulating hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151: 568-570.
- 43.- Kesner, J.S., Padmanabhan, V. and Convey, E.M. 1982. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. *Biol. Reprod.* 26: 571-578.
- 44.- Kodagali, S.B., Deshpande, B.R. and Sane, G.R. 1978. Trial with "Fertivet" (Ar-Ex Lab.) for inducing ovulations in anestrus cows with standing follicles. *Indian. Vet. J.* 55: 339-341.
- 45.- Kotwica, J. and Williams, G.L. 1982. Relationship of plasma testosterone concentrations to pituitary-ovarian hormone secretion during the bovine estrous cycle and the effects of testosterone propionate administered during luteal regression. *Biol. Reprod.* 27: 790-801.
- 46.- Landefeld, T.D. and McShan, W.H. 1974. Isolation and characterization of subunits from equine pituitary follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* 249: 3527-3531.
- 47.- Laster, D.B. 1972a. Disappearance and uptake of I-125-FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J. Reprod. Fertil.* 30: 407-415.
- 48.- Laster, D.B. 1973. Ovulation, fertility and prenatal mortality in heifers treated with PMSG or porcine FSH. *J. Reprod. Fertil.* 33: 275-282.
- 49.- Li, C.H., Simpson, M.E. and Evans, H.M. 1949. En: Wolstenholme, D.B.E. and Knight, J.B.A. (Eds.). *Gonadotropins.* p 6. J. and A. Churchill LTD.

- 50.- Liao, T-H. and Pierce, J.G. 1971. The primary structure of bovine tyrotropin. *J. Biol. Chem.* 246: 850-865.
- 51.- Licht, P., Bona-Ballo, A., Aggarwal, B.B., Farmer, S.W., Castelino, J.B. and Papkoff, H. 1979. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophin. *J. Endocrinol.* 83: 311-322.
- 52.- Lindner, M.G. and Wright, W.R. 1983. Bovine embryo morfology and evaluation. *Theriogenology.* 20: 407-416.
- 53.- Looney, C.R., Boutte, B.W., Archabald, L.F. and Godke, R.A. 1981. Comparison of once daily and twice daily FSH injection for superovulating beef cattle. *Theriogenology.* 15: 13-22.
- 54.- Lozano, F.D., Roman-Ponce, H., Castillo, H.R. y González, E.P. 1984. Tratamiento del anestro postparto en vacas de ordeña en el trópico. *Tec. Pec. Méx.* 46: 19-24.
- 55.- McNatty, K.P., Heath, D.A., Lun, S., Fannin, J.M., McDiarmid, M. and Henderson, K.M. 1984. Steroidogenesis by bovine theca interna in an *in vitro* perfusion system. *Biol. Reprod.* 30: 159-170.
- 56.- Miller, C., Ulloa-Aguirre, A., Hyland, L. and Chappel, S.C. 1983. Pituitary FSH heterogeneity: Assesment of biological activities of each FSH form. *Fertil. Steril.* 40: 242-247.
- 57.- Monniaux, D., Chupin, D. and Saumande, J. 1983. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology.* 19: 55-81.
- 58.- Moor, R.M., Cahill, L.P. and Stewart, F. 1980. Ovarian stimulation or egg production as a limiting factor of egg transfer. IX Congreso Internacional de Reproduccion Animal e Inseminacion Artificial. España. 1: 43-58.
- 59.- Moore, W.T. and Ward, D.N. 1980a. Pregnant mare serum gonadotropin: Rapid chromatografic procedures for the purification of the intact hormone and isolation of subunits. *J. Biol. Chem.* 255: 6923-6929.
- 60.- Moore, W.T. and Darrel, W.N. 1980b. Pregnant mare serum gonadotropin: An *in vitro* characterization of the lutropin-foliotropin dual activity. *J. Biol. Chem.* 255: 6930-6936.
- 61.- Morell, A.G., Gregoriadis, G., Sheinberg, I.H., Hickman, J. and Ashwell, G. 1971. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.* 246: 1461-1467.
- 62.- Newcomb, R. 1979. Surgical and non-surgical transfer of bovine embryos. *Veterinary Record.* 105: 432-434.

- 63.- Nwokoro, N., Chen, H-C. and Chrambach, A. 1981. Physical, biological and immunological characterization of highly purified urinary human chorionic gonadotropin components separated by gel electrofocusing. *Endocrinology*. 108: 291-299
- 64.- Papkoff, H., Gospodarowicz, D. and Li, C.H. 1967. Purification and properties of ovine follicle-stimulating hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* 120: 434-439.
- 65.- Peckham, W.D. and Parlow, A.F. 1969. The isolation of human pituitary follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 84: 953-957.
- 66.- Pierce, J.G., Liao, T-H., Carlsen, R.B. and Reimo, T. 1971. Comparisons between the alfa chain of bovine Thyrotropin and the C1 chain of Luteinizing hormone. *J. Biol. Chem.* 246: 866-872.
- 67.- Pierce, et al. 1976. En: Zaneveld, L.T.D. and Chatterton, R.T. (Eds.). *Biochemistry of Mammalian Reproduction*. p 317. John Wiley and Sons, Inc.
- 68.- Plummer, D.T. 1978. An introduction to practical biochemistry. McGraw-Hill, Great Britain. p 145.
- 69.- Rathnam, P., Fujiki, Y., Landefeld, T.D. and Saxena, B.B. 1978a. Isolation and amino acid sequence of the alfa subunit of follicle-stimulating hormone from equine pituitary glands. *J. Biol. Chem.* 253: 5355-5362.
- 70.- Rathnam, F.Y. and Saxena, B.B. 1978b. Amino acid sequence of the beta-subunit of the follicle-stimulating hormone from equine pituitary glands. *J. Biol. Chem.* 253: 5363-5368.
- 71.- Reddy, P.V. and Menon, K.M.J. 1981. Existence of multiple molecular forms of luteinizing hormone in rat: differences in immunological and biological activities between stored and circulating forms. *Acta Endocrinol.* 97: 33-41.
- 72.- Reichert, L.E. and Parlow, A.F. 1963. Preparation of ovine follicle-stimulating hormone having a high degree of biological purity. *Endocrinology*. 73: 224-229.
- 73.- Reichert, L.E. and Jiang, N.S. 1965. Studies on bovine pituitary follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 77: 124-127.
- 74.- Reichert, L.E., Kathan, R.H. and Ryan, R.J. 1968. Studies on the composition and properties of immunochemical grade human pituitary follicle stimulating hormone (FSH): comparison with luteinizing hormone (LH). *Endocrinology*. 82: 109-114.
- 75.- Rennels, E.G. and Herbert, D.C. 1979. The anterior pituitary gland its cells and hormones. *BioScience*. 29: 408-413.

- 76.- Roser, J.F., Papkoff, H., Murthy, H.M.S., Chang, Y-S., Chloupec, R.C. and Potes, J.A.C. 1984. Chemical biological and immunological properties of pituitary gonadotropins from the donkey (*Equis asinus*): Comparison with the horse (*Equis caballus*). *Biol. Reprod.* 26: 571-578.
- 77.- Rowe, R.F., Del Campo, M.R., Critser, J.K. and Ginther, O.J. 1980. Embryo transfer in cattle: Non-surgical transfer. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1024-1028.
- 78.- Rowlands, I.W. 1965. Introduction to general discussion on pregnant mares' serum gonadotropin. En: Wolstenholme, D.B.E. and Knight, J.B.A. (Eds.). *Gonadotropins*. pp 62-69. J. and A. Churchill, LTD.
- 79.- Sairam, M.R., Chretien, M. and Li, C.H. 1978. On the isolation of human pituitary hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47: 1002-1008.
- 80.- Sairam, M.R. 1979. Evaluation of the bovine testicular radioreceptor assay for pituitary follicle-stimulating hormone. *J. Endocr.* 82: 253-262.
- 81.- Salas, A.V., Sánchez, H.V.M., Nieto, C.S., Cervantes, C.C. y Parra, C.A. 1980. Concentración y heterogeneidad de las hormonas hipofisarias en la infancia. *Arch. Invest. Méd. (Méx)*. 11: 507-521.
- 82.- Salas, A.V., Lomelí, B.A., Salas, A.R., Gómez, C.M.A. y García, A.G. 1983. Análisis de la técnica de Raben para hormona del crecimiento humana. *Arch. Invest. Méd. (Méx)*. 14: 207-219.
- 83.- Saxena, B.B. and Rathnam, P. 1967. Purification of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. *Biol. Chem.* 242: 3769-3775.
- 84.- Saxena, B.B. and Rathnam, P. 1971. Dissociation phenomenon and subunit nature of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. *J. Biol. Chem.* 246: 3549-3554.
- 85.- Schams, D. and Schallenberger, E. 1976. Heterologous radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone and its application during the oestrous cycle in cattle. *Acta Endocrinol.* 81: 461-473.
- 86.- Shally, A.V., Arimura, A. and Kastin, A.J. 1973. Hypothalamic regulatory hormones. *Science.* 179: 341-350.
- 87.- Shea, B.F. 1981. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology.* 15: 31-42.
- 88.- Sherwood, O.D., Grimek, H.J. and McShan, W.H. 1970. Purification and properties of follicle-stimulating hormone from sheep pituitary glands. *J. Biol. Chem.* 245: 2328-2336.

- 89.- Siris, E.S., Nisla, B.C., Catt, K.J., Horner, K., Birken, S., Canfield, R.E. and Ross, G.T. 1978. New evidence for intrinsic follicle-stimulating hormone like activity in human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Endocrinology*. 102: 1356-1361.
- 90.- Spicer, L.J. and Echternkamp, S.E. 1986. Ovarian follicular growth function and turnover in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 62: 428-451.
- 91.- Steelman, S.L. and Pohley, F.M. 1953. Assay of the follicle-stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 53: 604-616.
- 92.- Swaminathan, N. and Bahl, D.P. 1970. Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 422-427.
- 93.- Ulloa-Aguirre, A. and Chappel, S.C. 1982. Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J. Endocrinol.* 95: 257-266.
- 94.- Ulloa-Aguirre, A., Miller, Ch., Hyland, L. and Chappel, S. 1984. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol. Reprod.* 30: 382-387.
- 95.- Ward, D.N., Adams-Mayne, M., Ray, N., Balke, D.E., Coffey, J. and Showalter, M. 1967. Comparative studies of luteinizing hormone from beef, pork, and sheep pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* 8: 44- 53.
- 96.- Weick, R.F. 1977. A comparison of the disappearance rates of luteinizing hormone from intact and ovariectomized rats. *Endocrinology*. 101: 157-161.
- 97.- Whitley, R.J., Keutmann, H.T. and Ryan, R.J. 1978. Studies on follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 102: 1874-1886.
- 98.- Wise, P.M., Rance, N., Barr, G.D. and Barraclough, C.A. 1979. Further evidence that luteinizing hormone releasing hormone also is follicle stimulating hormone. *Endocrinology*. 104: 940-947.
- 99.- Wolfenson, D., Thatcher, W.W., Drost, M., Caton, D., Foster, D.B. and LeBlanc, M.M. 1985. Characteristic of prostaglandin F measurements in the ovarian circulation during the oestrous cycle and early pregnancy in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 75: 491-499.
- 100.- Wright, J.M. 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*. 15: 43-50.