

00346

6  
2y



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**" ESTUDIO DE ALGUNAS CARACTERISTICAS  
BIOQUIMICAS Y BIOLÓGICAS DE LA HORMONA  
ESTIMULANTE DEL FOLICULO BOVINA (bFSH) "**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A :

**MARTHA ELIZABETH CARRANZA SALAS**

DIRECTORA DE TESIS: MED. CIR. Y PART. ANGELICA SALAS VALDES

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Angélica Salas Vaidés.**

*A MIS PADRES*

*A MIS HERMANOS*

*A MIS AMIGOS*

*Y AHORA, OH AMIGOS,  
OÍD EL SUEÑO DE UNA PALABRA:  
CADA PRIMAVERA NOS HACE VIVIR,  
LA DORADA MAZORCA NOS REFRIGERA,  
LA MAZORCA ROJIZA SE NOS TORNA UN COLLAR  
¡ SABEMOS QUE SON VERDADEROS  
LOS CORAZONES DE NUESTROS AMIGOS!*

*TECAYEHUATZIN.*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Dra. Angélica Salas Valdés por la dirección de este trabajo, así como por las valiosas lecciones brindadas durante mi estancia en su laboratorio.
- Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por la revisión de este trabajo, así como por su apoyo y comprensión.
- A los Doctores Carlos Valverde Rodríguez y Roberto Domínguez Casala por la tutoría en el desarrollo de este trabajo, así como por la revisión del mismo.
- A los Doctores Enrique Pedernera Asteglano, Gerardo Vázquez Nin y Luis Felipe Jiménez, por la revisión de este trabajo.
- A la Biol. Rosario Neri Basurto por su inapreciable ayuda en la colecta de las hipófisis, así como por su apoyo técnico.
- Al Biol. Fernando Moreno Plaza y Rosa Ma. Rodríguez por su colaboración en la colecta de las hipófisis y ayuda en la realización de los bioensayos.
- A la MVZ Laura Zapata, y al Químico Felino Ortiz por su ayuda en la purificación de la bFSH.
- Al Dr. Pedro Nicolás Velázquez por su gentileza en permitirme utilizar su microscopio estereoscópico y cámara fotográfica.
- A la MVZ Hilda Martínez Coria por facilitarme su impresora láser.
- A los Sres. José Avilés Garduño (fotógrafo), Rafael Avila Maturano (dibujante) y Jorge Hernández (fotógrafo) por su valiosa colaboración en los trabajos de fotografía y dibujo.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por su amable disposición en el otorgamiento de una beca para realizar mis estudios y tesis de maestría.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>i</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
La reproducción en mamíferos	5
La Hormona estimulante del folículo (FSH)	6
Función de la FSH	6
Mecanismo de acción de la FSH	15
Formas de estudio de la actividad biológica de la FSH	16
Ontogenia de la FSH	17
Estructura Química	18
Biosíntesis	21
Regulación de la secreción de la FSH	23
Evolución de la FSH	25
Purificación de la FSH	26
La FSH bovina (bFSH)	29
<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL Y METODO</b>	<b>34</b>
Material	34
Metodo	35
Obtención de la bFSH a partir de glándulas almacenadas en acetona	35
Deslipidización	35
Extracción	35
Precipitación etanólica	37
Purificación	37
Obtención de la bFSH a partir de hipófisis congeladas	39
Extracción	39
Precipitación etanólica	40
Purificación	41
Caracterización bioquímica	43
Determinación de la cantidad de proteínas	43
Electroforesis analítica en condiciones nativas, al 7 %, pH 8.3	43
Electroforesis analítica en condiciones desnaturizantes	44
Caracterización inmunológica	44

Caracterización biológica	45
<b>RESULTADOS</b>	<b>46</b>
Obtención de la bFSH a partir de hipófisis deslipidizadas	46
Deslipidización y extracción	46
Precipitación etanólica	46
Purificación	46
Caracterización bioquímica	51
Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida	51
Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	54
Caracterización Biológica	58
Bioensayo en presencia de hCG	58
Bioensayo en ausencia de hCG	58
Obtención de la bFSH a partir de hipófisis congeladas	66
Extracción	66
Precipitación etanólica	66
Purificación	66
Caracterización bioquímica	69
Electroforesis en TRIS-PAGE	69
Electroforesis en SDS-PAGE	74
Caracterización inmunológica	79
Slot-ELISA	79
Inmunoelectrotransferencia	79
Caracterización biológica	84
<b>DISCUSION</b>	<b>87</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>APENDICE</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>109</b>

## RESUMEN

La hormona estimulante del folículo (FSH) se secreta en la adenohipófisis de casi todos los vertebrados. Se trata de una glicoproteína que está constituida por dos subunidades, la  $\alpha$  y la  $\beta$ , de las cuales la  $\alpha$  es igual a la de otras hormonas glicoproteínicas como son la hormona luteinizante (LH) y la estimulante de la tiroides (TSH) de la misma especie, mientras que la subunidad  $\beta$  determina la especificidad funcional de cada una de estas hormonas.

La FSH está involucrada en la fisiología reproductiva de los organismos. En la hembra interviene en el crecimiento y desarrollo folicular, mientras que en el macho junto con los andrógenos induce la espermatogénesis en el testículo.

Se ha purificado la FSH de diferentes especies de mamíferos, de las cuales se ha informado un baj rendimiento. Por otro lado, cuando se estudia la actividad biológica de la FSH, de acuerdo al bioensayo de Steelman y Pohley (1953), se observa que la hormona induce aumento del peso ovárico en la rata. Para el caso de la FSH de origen bovino (bFSH) se ha informado también un rendimiento bajo y parece tener poca bioactividad. Esto sugiere que la bFSH debe tener alguna característica particular que induce una respuesta diferente a la producida por la hormona de otras especies.

Puesto que la bFSH tiene un comportamiento diferente en el bioensayo de Steelman y Pohley y se ha dicho que podría explicarse en relación a su estructura. Para abordar el estudio de la estructura y la bioactividad de la FSH es necesario disponer de cantidades razonables de la hormona, por lo que el propósito de este trabajo fue purificar FSH de hipófisis bovinas, así como su caracterización bioquímica y biológica.

Se procesaron 2 lotes de adenohipófisis bovinas, a partir de los cuales se extrajo y purificó la bFSH según la técnica de Stockel H. (1975) con modificaciones.

El lote b4 se procesó como sigue: se partió de hipófisis (258.29 g) almacenadas en acetona, las cuales se deslipidizaron y el polvo de acetona obtenido (50.64 g) se extrajo con acetato de amonio 10 % / etanol pH 5.1 en una relación 6:4; éste a su vez se precipitó con etanol donde se obtuvieron 358.66 mg de extracto glicoproteínico, el cual se purificó en una columna de Carboximetil-celulosa (CM-celulosa). La fracción no adsorbida que contiene a la bFSH (CM-1ab) produjo 110.4 mg de polvo (149  $\mu$ g de proteína/ mg de polvo). En electroforesis con geles de poliacrilamida (PAGE) al 7 % en condiciones no desnaturizantes se observaron 2 bandas con movilidades relativas (Rf) de 0.46 y 0.55. La electroforesis en PAGE al 12.5 y 15 % en condiciones desnaturizantes y no reductoras se obtuvieron varias bandas con pesos moleculares (PM) aparentes de: 54, 50, 46, 38, 20, 17 y 10 kDa, mientras que en los mismos geles pero en condiciones reductoras: 61, 57, 50, 38, 20, 17 y 10 kDa. La actividad biológica se estudió con el criterio de Steelman y Pohley (1953), en el que se mide el aumento del peso ovárico en respuesta a dosis crecientes de FSH; las dosis estudiadas fueron desde 0.013  $\mu$ g hasta 200  $\mu$ g, en donde se observó una tendencia a la linealidad a dosis de 0.125 a 1  $\mu$ g con aumentos del 40 a 104 % con respecto al control.

El lote b8 se procesó de la siguiente manera: se partió de 611.21 g de hipófisis congeladas, las que se licuaron y homogeneizaron en una solución acuosa que contenía un inhibidor de proteasas (PMSF). Después de la centrifugación, el sobrenadante se dializó con acetato de amonio 10 % / etanol pH 5.1 en una relación de 6:4 respectivamente, seguido de una centrifugación. El segundo sobrenadante resultado de esta centrifugación se precipitó con etanol y se obtuvieron 2.97 g de extracto glicoproteínico, el cual se purificó en una columna de CM-celulosa; la fracción no retenida (CM-1ab) produjo 187 mg (600  $\mu$ g de proteína/ mg de polvo), la cual se sometió a una repurificación en una columna de dietilaminoetil-celulosa. La fracción retenida, que contiene a la FSH (CM-1ab-DEAE-3ab) produjo 58.12 mg (631  $\mu$ g de proteína/ mg de polvo). El análisis electroforético en PAGE al 7 % en condiciones no desnaturizantes mostró un Rf de 0.34 y 0.48, mientras que en PAGE al 12.5 y 15 % en condiciones desnaturizantes y no reductoras los PM calculados fueron: 102, 54, 50, 42, 28, 20, 17 y 16 kDa; en condiciones reductoras: 102, 50, 61, 43, 20, 17 y 16 kDa. La caracterización inmunológica consistió de un Slot-Blot y un Western blot para los cuales se utilizó un anticuerpo estándar para bFSH (anti bFSH $\beta$  USDA 5 pool). Con el Slot-blot se determinó que la dilución óptima de anticuerpo a utilizar fue 1:5000, mientras que en el western-blot las bandas reconocidas fueron: 102, 74, 61 y 50 kDa, mismas que se identificaron en un extracto crudo. La potencia biológica de la bFSH purificada de acuerdo al bioensayo de Steelman y Pohley se calculó contra oFSH estándar (USDA-oFSH-18) y fue de 152 UI/mg para un bioensayo balanceado 3 + 3.

Los resultados obtenidos mostraron que la técnica utilizada para purificar el lote b8 produjo un mejor rendimiento que aquella usada para purificar el lote b4. En ambos lotes se obtuvo un patrón electroforético heterogéneo semejante en PAGE-ND, así como en PAGE-SDS. En ambos lotes la bFSH obtenida fue activa en el bioensayo de Steelman y Pohley. Por otro lado la bFSH purificada en el lote b8 fue reconocida por un anticuerpo dirigido contra y bFSH $\beta$ . El rendimiento de la hormona es razonable para continuar con su purificación con otras estrategias como la cromatografía de inmovilización entre otras, así como con su caracterización bioquímica y biológica.

## INTRODUCCION

Todos los sistemas vivos están adaptados a su medio gracias a la interacción de los procesos fisiológicos del propio organismo con el medio que los rodea. Las funciones corporales son el resultado de la comunicación coordinada entre los elementos que forman parte de los diferentes niveles de integración funcional. Dicha integración está bajo el control del Sistema Nervioso y Neuroendócrino y se lleva a cabo por medio de mensajeros químicos. En esta comunicación están involucrados mecanismos de convergencia y de divergencia de los mensajes, de tal manera que mensajeros con características químicas distintas puedan converger en la mediación de una misma función, lo cual garantiza que la función se lleve a cabo. Asimismo un determinado mensajero químico puede ejercer distintas funciones. (Clapp y col., 1993). La divergencia funcional puede deberse a la heterogeneidad del mensajero químico, a la diversidad estructural de los receptores, o bien a las dos posibilidades anteriores (Clapp y col., 1993).

Algunos de estos mensajeros químicos son los mismos a los que se refería Claude Bernard cuando generó el concepto de "secreción interna" (sustancias químicas que en los organismos se vacían a la sangre) y se denominan hormonas, las que se producen en las células endócrinas o neuroendócrinas, de tal manera que se secretan hacia el interior del organismo a través del torrente circulatorio. Las células endócrinas pueden constituir órganos o glándulas específicas o encontrarse distribuidas de manera difusa en diferentes tejidos y órganos del individuo (Pearse, 1971).

Las hormonas controlan no solamente diferentes aspectos del metabolismo, sino también otras muchas funciones como por ejemplo: el crecimiento celular y de los tejidos, el ritmo

cardíaco, la presión de la sangre, la función renal, la movilidad del tracto gastrointestinal, la lactancia y el sistema reproductor (Lehninger, 1991).

Desde el punto de vista químico, las hormonas y otros mensajeros intercelulares pueden ser de tres tipos:

- a) Aminoácidos simples y moléculas derivadas de aminoácidos, como el ácido glutámico, las catecolaminas y las hormonas tiroideas.
- b) Moléculas derivadas de ácidos grasos y lípidos modificados, como las prostaglandinas y los esteroides.
- c) Péptidos y proteínas, como la tiro liberina, la hormona estimulante del folículo y la GH.

En los mamíferos se conocen nueve glándulas endócrinas (Tabla 1). La hipófisis (Fig. 1) se localiza en la base del encéfalo, debajo del hipotálamo con el que está vinculada anatómico-funcionalmente; está constituida por el lóbulo anterior o adenohipófisis, el lóbulo posterior o neurohipófisis y la pars intermedia. (Junqueira, 1981).

En la adenohipófisis, las células epiteliales funcionan como efectores del sistema neuroendócrino y sintetizan hormonas proteínicas de las cuales se han descrito las siguientes: hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de los melanocitos (MSH),  $\beta$ -endorfina y  $\beta$ -lipotropina (Everett, 1988).

Tabla 1. Glándulas Endócrinas y Sus Principales Productos de Secreción

Glándula	Secreción
Hipófisis	Hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de los melanocitos (MSH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), hormona estimulante de la tiroides (TSH), beta lipotropina ( $\beta$ -LPH), $\beta$ -endorfina
Pineal	Melatonina, indoles.
Tiroides	Tiroxina (T <sub>4</sub> ), Triyodotironina (T <sub>3</sub> )
Paratiroides	Hormona paratiroidea
Suprarrenales	
Médula	Catecolaminas, péptidos opioides.
Corteza	Aldosterona, cortisol, corticosterona, deshidroepiandrosterona y androstenediona
Páncreas	Insulina, glucagon, somatostatina, polipéptido pancreático
Gónadas	
Ovario	Estrógenos, progesterona, inhibina, folistatina, activina, relaxina
Testículo	Testosterona y otros andrógenos, inhibina
Timo	Timosina, timopoyetinas I y II.

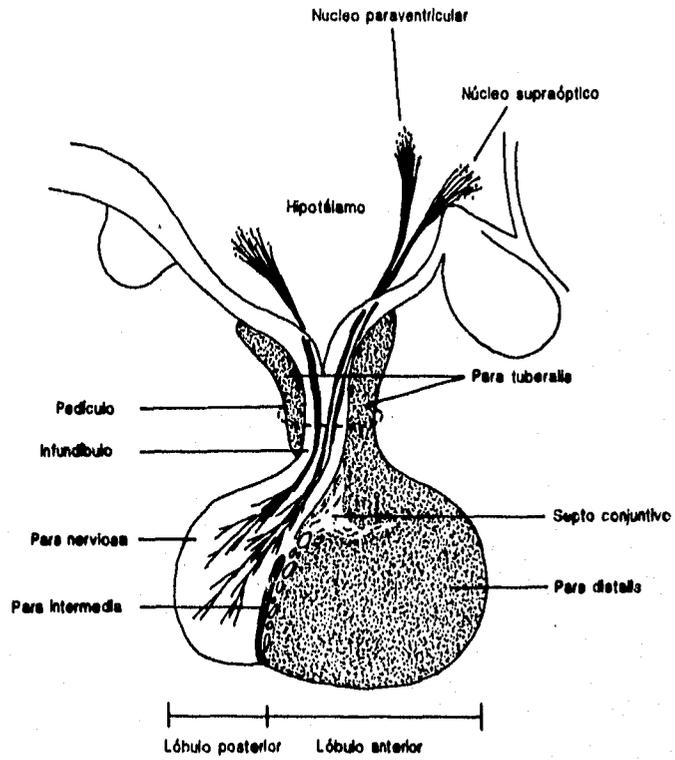


Fig. 1.- Hipófisis de mamífero (de Junqueira, 1981).

### **La reproducción en mamíferos**

La reproducción es el proceso por medio del cual un organismo genera un nuevo miembro de la misma especie (Bolander, 1989). Esta función implica la integración precisa de diferentes factores ambientales como el fotoperíodo, la temperatura o la disponibilidad de sitios de anidamiento, así como de diversos factores y mecanismos fisiológicos como el estado nutricional y endócrino del individuo. De esta manera, el sistema reproductor es uno de los principales objetivos de los agentes selectivos, ya que la eficiencia reproductiva es el determinante principal de los sucesos evolutivos (Norris, 1980).

En los mamíferos las adaptaciones reproductivas han alcanzado un grado de elaboración que poco se ve en otros vertebrados. El logro más importante ha sido la viviparidad, en la que el alimento para el embrión en desarrollo es aportado continuamente por la madre vía la placenta. Otra característica única en los mamíferos es la lactancia (McFarland, 1979)

Los mamíferos muestran una gradación de adaptaciones de la oviparidad a la viviparidad. Así, los monotremas (por ejemplo el ornitorrinco y el equidna) mantienen su herencia reptiliana de poner huevos. Los ovarios son más grandes que en otros mamíferos, ya que producen huevos con gran contenido de yema. Los huevos fertilizados llegan al útero en donde empieza la diferenciación y el recubrimiento con una cubierta coriácea mineralizada, posteriormente son ovopositados (McFarland, 1979).

En los metaterios (marsupiales), el tracto reproductivo de las hembras combina las características estructurales de monotremas y euterios. La cantidad de yema en el huevo es menor que en monotremas, pero mayor que en euterios. Se forma un saco placentario y la implantación

es muy breve. El recién nacido es prematuro y se arrastra desde la vagina media hasta el marsupio en donde se ase fuertemente con su boca a la glándula mamaria (Mc Farland, 1979).

En los euterios, en donde los oviductos pareados se fusionan y dan lugar a la vagina, el huevo fertilizado es conducido al útero donde se implanta y se desarrollan las conexiones materno-embriónicas (placenta). Así, los embriones en el cuerpo materno permanecen protegidos y se desarrollan en un medio con temperatura controlada. El feto puede alcanzar un mayor tamaño y grado de desarrollo al nacimiento, sin embargo el cuidado parental es crucial para la sobrevivencia de las crías (Mc Farland, 1979).

El sistema reproductor incluye a las gónadas, al eje hipotálamo-hipófisis y a numerosas y conexiones nerviosas y endócrinas que convergen hacia el hipotálamo (Norris, 1980). Igualmente en todos los mamíferos se conoce que participan un grupo de hormonas proteínicas denominadas genéricamente como gonadotropinas. De éstas se conocen dos de origen hipofisiario -FSH y LH- y una de origen placentario -la gonadotropina coriónica (GC)- (Pierce y Parsons, 1981). Además de las gonadotropinas, las hormonas esteroides, la GH, la PRL, la ACTH y las hormonas tiroideas entre otras también están relacionadas con los procesos reproductivos (Hsueh y col., 1984).

### **Hormona estimulante del folículo (FSH)**

#### **Función de la FSH**

La FSH es esencial en la fisiología reproductiva de los mamíferos. En la hembra induce el desarrollo del folículo, en donde actúa de manera altamente específica en las células de la

granulosa. En el macho, junto con los andrógenos estimula la espermatogénesis en el testículo, donde el blanco son las células de Sertoli. Hasta ahora no se ha encontrado otro tejido efector para la FSH. En el ovario la FSH se une a su receptor y desencadena una serie de procesos bioquímicos que conducen al crecimiento y desarrollo folicular.

Anterior al desarrollo folicular, las células germinales primordiales migran hacia las gónadas en desarrollo, donde tras un período de proliferación mitótica, se diferencian a ovocitos y sufren una meiosis (Alberts, 1994). En la mayoría de los mamíferos el desarrollo folicular consta de dos fases: la primera se refiere al crecimiento del ovocito sin crecimiento del folículo y la segunda al crecimiento folicular, período en el cual ocurre un fenómeno de latencia para el desarrollo del ovocito (Sairam y Papkoff, 1974).

Durante la meiosis, cuando el ovocito alcanza el diploteno, éste es encapsulado por células epiteliales, las que adquieren una forma plana y tienden a separarlos, formando así los primeros folículos. Este fenómeno se inicia en la región cortical profunda. En la mayoría de las especies, los ovocitos están rodeados por células de la granulosa, delimitadas por una lámina basal. Después del nacimiento, los folículos primordiales son gradualmente separados por el cada vez más abundante tejido estromático de tipo conectivo y vascular. Así, algunos de los folículos que iniciaron su crecimiento en el feto, alcanzan al nacer un tamaño considerable debido a la proliferación de las células foliculares y al depósito del líquido folicular. Primero aparece la teca interna formada por células mioideas, células indiferenciadas, fibroblastos y células esteroideogénicas. Después se establece la teca externa formada por tejido conectivo fibroso. Ambas tecas están irrigadas por vasos sanguíneos (Byskov y Høyer, 1988).

El tiempo en el que se forman los folículos en diferentes especies, depende de cuándo los ovocitos alcanzan la etapa de diploteno, lo cual puede ocurrir durante la vida fetal (hombre, cerdo, cobayo, vaca, hamster) o después del nacimiento (ratón, rata, conejo, hurón) (Merchant, 1991)

El número de folículos en el nacimiento varía considerablemente entre las especies, pero la mayoría de los folículos sufren el fenómeno de atresia. La rata alcanza el número máximo de folículos a los 17.5 días de gestación con 71 000 y a los dos días de nacidas el número disminuye a 12 000 aproximadamente (Peters, 1978). En la especie humana los folículos fetales alcanzan su número máximo aproximadamente al 5º mes de gestación con 7 millones en los dos ovarios, pero a partir de entonces se inicia un proceso de degeneración masiva y en el nacimiento hay aproximadamente 2 millones de folículos, los cuales se reducen a la mitad durante la infancia y pubertad por el fenómeno de atresia (Merchant, 1991)

No se conoce el mecanismo que dispara el crecimiento folicular inicial, pero se ha informado que las gonadotropinas exógenas estimulan dicho crecimiento en ratón y además parecen apoyar el crecimiento folicular "in vivo" e "in vitro" (Byskov y col., 1988). Además de la FSH y LH, la GH también parece intervenir en la foliculogénesis (Peters, 1978). Aunado a esto, se han encontrado receptores para la FSH en los folículos primarios, lo que indica que las gonadotropinas también tienen efecto durante la transformación de folículos primordiales a folículos en crecimiento (Hsueh y col., 1984).

Desde el momento en que los folículos inician el proceso de crecimiento y fundamentalmente en la etapa de fólculo maduro o antral, se pueden distinguir dos capas celulares que forman la pared folicular: la capa de la granulosa que está en contacto con el

ovocito primario por medio de uniones comunicantes tipo hendidura (Gilula y col., 1978) y la capa de la teca que la envuelve, ambas separadas por una membrana basal bien definida (Anderson y col., 1978; Hertig y col., 1967) (Fig. 2). Para facilitar su estudio, varios autores han dividido el desarrollo folicular en diferentes etapas. Así, Hafez (1993) clasifica las diferentes etapas del desarrollo folicular de la siguiente manera:

- a) Foliculo primordial.- Corresponde al ovocito rodeado de una capa de células planas de la granulosa.
- b) Foliculo primario.- Se refiere al ovocito rodeado de una capa única de células planas de la granulosa y la formación de la zona pelúcida, la cual separa al ovocito de las células de la granulosa.
- c) Foliculo secundario.- Foliculo en crecimiento en el que aumenta el número de las células de la granulosa y su forma cambia de plana a poligonal; se forman la teca externa e interna.
- d) Foliculo terciario.- Foliculo de mayor tamaño en el que se forma una cavidad llamada antro folicular que contiene un fluido secretado por las células de la granulosa.
- d) Foliculo de DeGraaf.- En esta etapa el foliculo ha madurado completamente, el antro ocupa la mayor parte del mismo y se forma la corona radiada. El foliculo se dispone en la superficie del ovario.

La mayoría de los estudios sobre los efectos de la FSH, se han realizado en los foliculos preantrales y antrales. Se sabe que esta hormona induce el crecimiento y desarrollo de las células de la granulosa, induce la esteroidogénesis, estimula la formación de sus propios receptores así

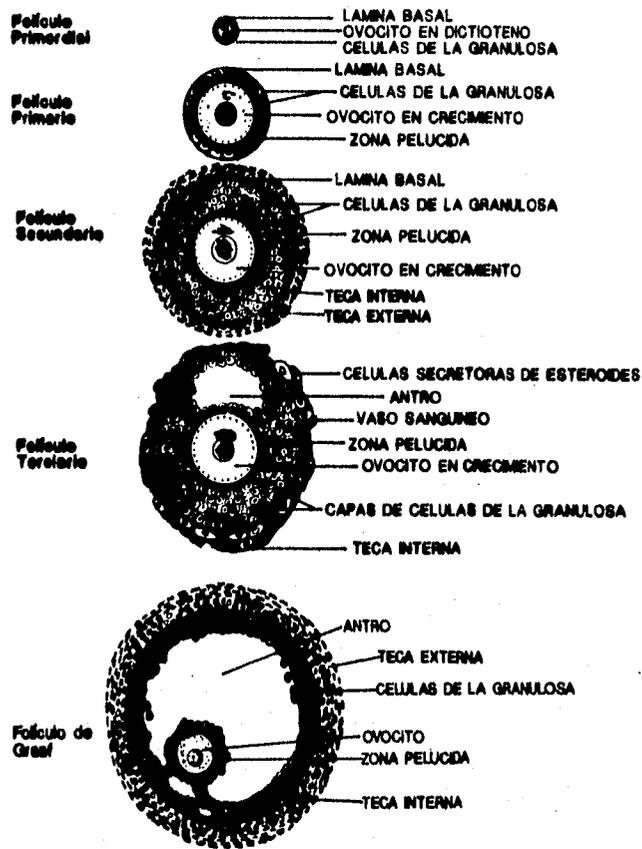


Fig. 2.- Clasificación morfológica de los folículos ováricos en mamíferos (de Hafez, 1993).

como los de la LH, PRL y  $\beta$ -lipotropina, la secreción de la inhibina, la síntesis del activador del plasminógeno, la síntesis de prostaglandinas y proteoglicanos, entre otros (Tabla 2) (Hsueh y col., 1984).

Ahora bien, para explicar la esteroidogénesis, la cual es uno de los principales efectos de la FSH, se ha propuesto la hipótesis de dos células-dos gonadotropinas (Fig. 3). Esta hipótesis afirma que los folículos ováricos en crecimiento sintetizan estrógenos y que en la producción de éstos intervienen tanto las células de la teca como las de la granulosa. Este concepto fue planteado por Falk en 1959 con experimentos en los que combinando la teca y la granulosa, mostraba que la asociación de ambas era necesaria para lograr la máxima acción estrogénica. A partir de entonces, numerosos investigadores han analizado la participación de diferentes poblaciones celulares en la producción de estrógenos y actualmente se acepta que las dos poblaciones celulares (reguladas particularmente por la FSH y la LH), intervienen en la biosíntesis de los estrógenos (Erickson y col., 1985; Ireland, 1987; Pedernera, 1993).

La FSH y LH aumentan la captación de lipoproteínas -principalmente las de baja densidad (LDL)-, la liberación de colesterol de las lipoproteínas, su movilización, la conversión de éste a pregnenolona a través de la activación del sistema de enzimas que hidroxilan y cortan las uniones C-C del colesterol (SCC) en la mitocondria y la conversión de pregnenolona a progesterona por medio de la activación de la  $3\beta$ -hidroxlesteroide deshidrogenasa y  $\Delta^{5,4}$ - isomerasa en las células de la granulosa. Aunque las células de la granulosa responden a la LH aumentando la producción de progesterona y estradiol, es necesaria la sensibilización de la FSH para que se lleve a cabo el efecto esteroideogénico (Hsueh y col., 1984).

Tabla 2. Principales Acciones de la FSH en las Células de la Granulosa  
(Hsueh, 1989)

1. Aumento de la esteroidogénesis
  - a) Biosíntesis de estrógenos  
Inducción de la aromatasas
  - b) Biosíntesis de 20  $\alpha$ -OH-P  
Inducción de las enzimas catalíticas de la cadena lateral del colesterol y de la actividad de citocromo P-450 mitocondrial  
Inducción de la 3  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa  
Inducción de la 20  $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
2. Inducción de Receptores de membrana específicos para
  - a) LH
  - b) Prolactina
  - c) Lipoproteínas
  - d) FSH
  - e) Factor de Crecimiento Epidemal
3. Productos de Secreción no Esteroidales
  - a) Inhibina
  - b) Activador del Plasminógeno
  - c) Prostaglandinas
  - d) Proteoglicanos (mucopolisacáridos)
4. Estimulación de Funciones Celulares Generales
  - a) Síntesis de ADN
  - b) Síntesis de proteínas
  - c) Captación de glucosa y formación de lactato
  - d) Agregación y redondeamiento celular
  - e) Formación de uniones celulares tipo "gap junction"
  - f) Formación de microvelosidades
5. Procesos Relacionados a la Membrana Plasmática
  - a) Activación de la adenilato ciclasa y formación de cAMP
  - b) Formación de la proteína unidora de cAMP
  - c) Activación de la fosfodiesterasa
  - d) Aumento de la microviscosidad en la membrana plasmática.

Abreviaturas:

20  $\alpha$ -OH-P: 20  $\alpha$  hidroxipregnenolona.

LH: hormona luteinizante.

FSH: hormona estimulante del folículo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

cAMP: monofosfato de adenosina cíclico.

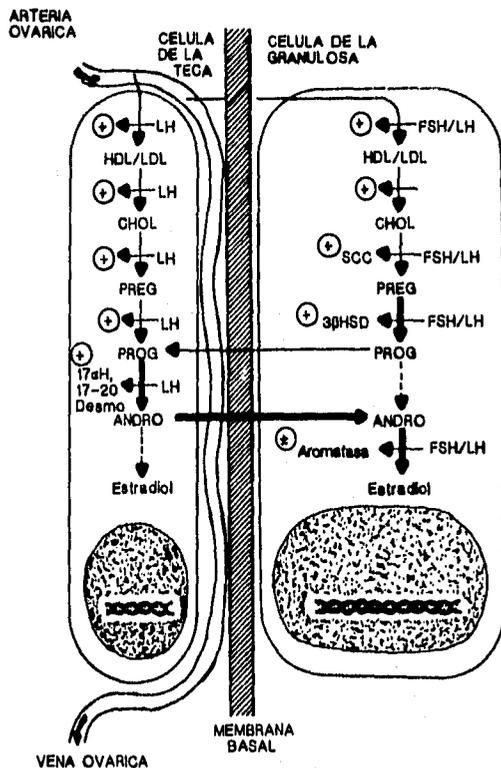


Fig. 3.- Rutas esteroidogénicas según la hipótesis "Dos células-Dos gonadotropinas" en las células de la granulosa y de la teca en el folículo ovárico de mamífero. Las flechas más oscuras representan la síntesis primaria de esteroides. Las flechas que señalan a las enzimas indican si la actividad enzimática es estimulada (+) o inhibida (-) por la hormona estimulante del folículo (FSH) o por la hormona luteinizante (LH). Las flechas que van de una célula a otra representan la difusión de esteroides de una célula a otra o a través de la red capilar que rodea al folículo. La flecha de la arteriola representa la captación de lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL).

Abreviaturas: CHOL = colesterol; PREG = pregnenolona; PROG = progesterona; ANDRO = andrógenos; SCC = enzimas mitocondriales catalíticas de la cadena lateral del colesterol; 3βHSD = 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17αH, 17-20 DESMO = 17α hidroxilasa y 17-20-desmolasa (de Ireland J.J., 1987).

Las células de la teca interna tienen las enzimas que le permiten sintetizar los andrógenos partiendo del colesterol, siendo su principal producto la androstenediona. La secreción de los andrógenos por las células de la teca es estimulada por la LH. El paso limitante está a nivel de la 17-hidroxilasa, 17-20-liasa (P-450 C17) y su aumento está relacionado al efecto de LH, la cual también aumenta la cantidad de la enzima P-450<sub>scc</sub> mitocondrial. La androstenediona es el principal andrógeno sintetizado.

Las células de la granulosa tienen la capacidad de aromatizar los andrógenos a estrógenos; esta actividad si bien no es exclusiva de las células de la granulosa, es la más importante y es la fuente principal de los estrógenos circulantes. La actividad de la aromatasa en las células de la granulosa depende de la FSH; de manera que el estímulo de esta hormona implica la síntesis de ARN y de proteínas para la producción de la citocromo P-450-aromatasa (Wang y col., 1982; Mendelson y col., 1985; Richards y col., 1987; Richards y col., 1988).

Por otro lado, las células de la granulosa pueden sintetizar progesterona de novo en folículos antrales grandes, lo cual es estimulado por la FSH (Jones and Hsueh, 1982).

La hipótesis de dos células-dos gonadotropinas está ampliamente apoyada por experimentos "in vivo" e "in vitro" en varias especies de mamíferos incluyendo la humana (Ryan y col., 1968; Dorrington y Armstrong, 1979). En la mayoría de las especies las células de la granulosa poseen la mayor actividad de aromatasa (Leung y Armstrong, 1980).

Por otro lado, se ha descrito la actividad lipolítica "in vitro" para la oFSH en tejido adiposo de rata y de conejo; curiosamente cuando se trata a la hormona con neuraminidasa, se conserva su actividad lipolítica. En contraste con lo que sucede "in vivo", en donde la hormona desializada pierde rápidamente su actividad. Esto sugiere que el ácido siálico protege a la FSH de la

degradación enzimática, lo que conlleva a que se mantengan las concentraciones de FSH en la circulación sanguínea (Farmer y col., 1972).

### **Mecanismos de acción de la FSH**

Cuando la hormona se une a su receptor, se transmiten diferentes señales fisiológicas en las células blanco. La parte proteínica se une al receptor en la membrana plasmática, mientras que los carbohidratos se cree que al interactuar con lectinas en la membrana, permiten el acoplamiento del complejo receptor-FSH con la adenilato ciclasa, la cual cataliza la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP) a monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (Hsueh y col., 1989).

El receptor para FSH sólo se ha encontrado en las células de la granulosa y de Sertoli; está formado por 4 monómeros unidos entre sí por enlaces disulfuro. El dominio amino-terminal, el cual es extracelular, es hidrofílico y está glicosilado, mientras que el dominio carboxi-terminal consta de 7 segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana y termina en el citoplasma, además tiene secuencias homólogas a los receptores acoplados con proteínas G; la fosforilación en esta región es importante para la regulación de la actividad del receptor. Hay dos clases de unión entre la FSH y su receptor: de *alta afinidad* ( $K_d = 7 \times 10^{-11} \text{ M}$ ) y de *baja afinidad* ( $K_d = 2 \times 10^{-9} \text{ M}$ ). La unión entre la FSH y el receptor es estimulada por el  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Ca}^{++}$ , mientras que el  $\text{Co}^{++}$  y  $\text{Ni}^{++}$  la inhiben (Sprengel and Braun, 1992).

En folículos preovulatorios la FSH provoca el aumento de la transcripción del ARNm de la subunidad reguladora de la protein-quinasa tipo II dependiente de cAMP. El cAMP inducido por la FSH se une a la subunidad reguladora de la protein-quinasa, liberando a la subunidad catalítica, la

cual a su vez interviene en la fosforilación de proteínas no caracterizadas, que tienen que ver con la activación de genes que codifican para diferentes proteínas.

Así, los genes que se inducen por acción de la FSH son los de: enzimas esteroideogénicas, principalmente los de la P450<sub>sc</sub> y la P450 aromatasa; la inhibina; la subunidad reguladora II de la proteína-quinasa A; la renina; los receptores de LH; los receptores de FSH; los receptores de PRL; la proteína de uniones comunicantes tipo hendidura; la fosfodiesterasa; la proteína de las microvellosidades; la proteína de los proteoglicanos y se ha demostrado que la FSH induce también la transcripción del ARNm del protooncogen "c-fos" en células de Sertoli, el cual codifica para una proteína de 55 kDa, cuya función se desconoce (Hsueh y col., 1989).

#### **Formas de estudio de la actividad biológica de la FSH**

La actividad biológica de la FSH se ha estudiado tanto en sistemas "in vivo" como en sistemas "in vitro". Los estudios "in vivo" fueron los primeros en desarrollarse y han sido ampliamente explorados, mientras que los estudios in vitro son más recientes y actualmente tienen gran aceptación. Uno de los más utilizados es el bioensayo "in vivo" basado en la respuesta del crecimiento folicular en el ovario de ratas intactas como respuesta a diferentes dosis de FSH (Steelman y Pohley, 1953).

Cuando se estudia la actividad biológica de la FSH de diferentes especies de mamíferos, según el criterio de Steelman y Pohley (1953), se observa que la hormona induce aumento del peso ovárico en la rata; sin embargo, cuando se estudia con este criterio la FSH bovina parece

tener una bioactividad muy baja. Esto sugiere que la bFSH debe tener alguna característica particular que induce una respuesta diferente a la producida por otras hormonas de mamífero.

Por otro lado, para aumentar la sensibilidad, reproducibilidad y sencillez, se han desarrollado varios ensayos "in vitro" para medir la bioactividad de la FSH. Con estos métodos se pueden medir diferentes actividades de la FSH en diferentes tejidos blanco. Estas incluyen la captación de timidina tritiada en ovarios de ratón (Ryle y col., 1970), la incorporación de glucosamina radiomarcada en proteoglicanos en las células de la granulosa (Ax, 1979), la producción de activador de plasminógeno en las células de la granulosa (Beers, 1978), y la estimulación de la aromatasa en células de la granulosa y de Sertoli (Jia and Hsueh, 1985; Van Damme y col., 1979).

#### **Ontogenia de la FSH**

En el suero de ratas se ha detectado FSH en un intervalo de edad de 1 a 7 días. En la etapa infantil que va de los 7 a los 21 días, la concentración de FSH es baja, pero aumentan en el día 14; en la etapa juvenil que va de los 21 a los 35 días de edad, la concentración de FSH disminuye y permanece baja también en el período prepúber (35 a los 40 días de edad) (Hsueh y col., 1989). En el ovario la FSH se ha detectado en los receptores de folículos primordiales (Sairam y Papkoff H. 1974).

En la adenohipófisis se han encontrado tanto la FSH como la LH en fetos humanos de 10 a 12 semanas del desarrollo embrionario (Berne, y col. 1988).

### **Estructura Química.**

La estructura química de la FSH se ha estudiado en los porcinos (Segaloff y Steelman, 1959), en los equinos (Braselton y col., 1970), los ovinos (Grimeck y col., 1979), la rata (Foulds y Robertson, 1983), el ser humano (Schneyer y col., 1986) y los bovinos (Wu y col., 1993).

En 1922, Long y Evans describieron el efecto de extractos hipofisarios en el ciclo estral y la ovulación. Posteriormente, Zondek y Aschein y de manera independiente Smith en 1925, demostraron que en animales hipofisectomizados, los implantes de adenohipófisis frescas tenían la capacidad para estimular la función y el desarrollo de las gónadas. Poco después, en 1931 Fevold reportó la separación, en dos fracciones de extractos hipofisarios a las que llamó prolan A y prolan B; una de ellas inducía el crecimiento y desarrollo folicular y la otra la luteinización folicular en la hembra (Pierce, 1988), por lo que llamó a cada una de estas fracciones hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH), respectivamente (Sairam y Papkoff, 1974).

Estas hormonas glicoproteínicas consisten de dos subunidades, la alfa ( $\alpha$ ) y la beta ( $\beta$ ), las cuales están unidas por enlaces no covalentes; para la FSH humana (hFSH) se ha descrito que la subunidad  $\alpha$  tiene de 90 a 96 aminoácidos y la  $\beta$  de 115 a 121 (Guyton, 1983). La subunidad  $\alpha$  es común para la FSH, LH y TSH de la misma especie, mientras que la  $\beta$  es específica para cada hormona, aunque muestra cierto grado de homología, por lo que se pueden preparar híbridos de las tres hormonas glicoproteínicas (Ryan y col., 1988). También se ha señalado que las cadenas  $\alpha$  no tienen actividad biológica por sí mismas y que las  $\beta$  presentan muy poca actividad, pero desarrollan su potencia total si se combinan entre sí (Cheng, 1978; Ryan y col., 1988).

Ambas subunidades tienen una gran cantidad de puentes disulfuro intracatenarios. Las posiciones de los puentes disulfuro se conocen con relativa certeza para las subunidades de la hFSH: alfa7-31, alfa10-32, beta93-100, beta23-72, beta26-110 (Pierce y Parsons, 1981 y Ryan., 1988).

Las hormonas gonadotrópicas son algunas de las moléculas más complejas que se conocen debido a que su estructura química incluye una parte proteínica y otra de carbohidratos. Cada subunidad está glicosilada en residuos específicos. Se han estudiado dos tipos de enlaces glicosídicos: el N-glicosídico en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , el cual se establece entre el grupo amino de la asparagina (Asn) y el azúcar N-acetilglucosamina y corresponde a un complejo biantenarico (hCG) o triantenarico (FSH), con un centro de manosa y ramificaciones que terminan en galactosa-ácido siálico o galactosa-sulfato. El enlace O-glicosídico se encuentra en la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana (hCG) y se establece entre el grupo OH de la serina (Ser) y el azúcar N-acetilgalactosamina. Para la FSH humana se han descrito 2 sitios de glicosilación en la subunidad  $\beta$  y cuatro para la hormona completa (Ryan y col., 1988).

La función de los carbohidratos está relacionada con la vida media de la FSH y por lo tanto con su potencia biológica. "In vivo", la remoción de carbohidratos con exoglicosidasas produce la pérdida de la actividad biológica de la hormona, sin afectar su unión al receptor ni su actividad inmunológica. La remoción de los carbohidratos de la subunidad  $\alpha$  da lugar a un aumento en la unión a los receptores y la hormona desglicosilada se comporta como un antagonista de su propia actividad (Ryan, 1988). Sin embargo, "in vitro" la desglicosilación no afecta la actividad biológica de la hormona (Chappel y col., 1983a; Ulloa y col., 1986). Estos hallazgos permiten sugerir que los carbohidratos, como el ácido siálico, tienen una función protectora contra la degradación de la FSH (Pierce y Parsons, 1981).

La secuencia de aminoácidos de la FSH se ha determinado en algunas especies desde comienzos de los 70's (Saxena y Rathman, 1971; Papkoff y col., 1973; Sairam, 1981). Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de las subunidades entre diferentes especies, se observa que para la subunidad  $\alpha$  las regiones conservadas están entre los residuos 27 al 67 y del 82 al 92; en lo que se refiere a la subunidad  $\beta$  se han encontrado regiones conservadas entre los residuos 16 al 38 y 56 al 100 (Ryan y col., 1988; Stewart y Stewart, 1977).

La FSH de diferentes especies presenta heterogeneidad en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes (Parsons y Pierce 1984) y cuando se analiza en un gradiente de pH, se hacen evidentes múltiples formas de la hormona: la humana tiene puntos isoeléctricos (pI) que van de 3.7 a 5.5, la FSH ovina (oFSH) tiene pI de 4.42 y 5.42, la equina (eFSH) de 3.5-5.5 (Reichert, 1971), la de hamster y la de rata de 4.42 a 5.42 (Ulloa y col., 1983).

El peso molecular (PM) calculado para la FSH de diferentes especies va desde 21.8 kDa hasta 52.5 kDa (Steelman y Segaloff, 1959; Reichert y Jiang, 1965; Reichert y col., 1968; Reichert y Lawson, 1973; Papkoff y col., 1967; Ryan y col., 1969; Saxena y Rathman, 1971; Grimek y col., 1979; Schneyer y col., 1986).

Para la bFSH, además de la heterogeneidad de masa observada, también se ha descrito heterogeneidad de carga. Así, Reichert (1971) encontró que cuando se analiza esta hormona en un gradiente de pH, se manifiestan varias bandas con puntos isoeléctricos de 4.25, 4.68, 4.82 y 5.55, de las cuales la más intensa es la de 4.68. Dicha heterogeneidad se ha atribuido al procesamiento posttraduccional de la molécula, en el que puede estar involucrado el diferente grado de incorporación de ácido siálico en la hormona (Chappel y col., 1984; Chappel y col., 1982; Peckham y col., 1973).

Aunque no se han cristalizado las gonadotropinas para su análisis con difracción de rayos X y el subsecuente estudio de su estructura terciaria, existen estudios físicos indirectos como el difracción circular y el análisis por resonancia magnética nuclear, que han permitido deducir la estructura secundaria de estas hormonas. Así, se ha descrito un bajo contenido de  $\alpha$ -hélice, que va del 5 a 19 % y uno de entre el 25 y el 43 % para la conformación  $\beta$  plegada. Además se deben tomar en cuenta las torciones en  $\beta$  y al azar que están entre el 11 y 27 % (Pierce y Parsons, 1981). Para la hFSH se ha encontrado un contenido del 19 % de  $\alpha$ -hélice, 28 % de conformación  $\beta$  plegada y 52 % de estructura secundaria al azar (Ryan y col., 1988).

### **Biosíntesis**

La FSH se sintetiza en células basófilas llamadas gonadotropos localizadas en la adenohipófisis, la LH se produce también en algunas de estas poblaciones celulares. La subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se sintetizan independientemente y la  $\beta$  limita la elaboración de la hormona completa (Pierce, 1988).

En varias especies se ha obtenido el DNA complementario (cDNA) de ambas subunidades. El gen de la subunidad  $\alpha$  está formado por cuatro exones y tres intrones y existe gran homología entre el gen del hombre y el del bovino (Fiddes y Goodman, 1980; Godine y col., 1980; Godine y col. 1982; Boorstein y col., 1982; Chin y col., 1983; Pierce, 1988).

Para la subunidad  $\beta$  se ha obtenido el cDNA de la FSH humana (Beck y col., 1985), de porcino (Kato, 1988) y de rata (Maurer, 1987). Además, para la hCG se han descrito siete genes de los cuales sólo se expresan tres (Pierce, 1988). Para la subunidad  $\beta$  de la FSH bovina se

secuenció el gen que la codifica e identificó el ARN mensajero (ARNm) correspondiente, así como también se predijo la secuencia de aminoácidos de esta subunidad; se encontró que el gen de la subunidad  $\beta$  está formado por tres exones y dos intrones. Cuando se compararon el ADN complementario (cADN) de la subunidad  $\beta$  del bovino con otras especies, se encontró que la secuencia del bovino está altamente conservada, pues comparte el 90 % de homología con la subunidad  $\beta$  del ovino y equino y más del 90 % con el humano; no obstante, la secuencia nucleotídica del extremo 5' tiene poca similitud con respecto a otras glicoproteínas hipofisarias (Esch y col., 1986; Maurer y Beck, 1986; Kim y col., 1988).

La gran homología de la subunidad  $\alpha$  entre diferentes especies y el hecho de que esta subunidad la compartan tres de las glicoproteínas hipofisarias, apoya la hipótesis que asevera que la subunidad  $\beta$  interactúa tanto con la subunidad  $\alpha$  como con el receptor correspondiente.

La biosíntesis de la FSH incluye la transcripción del ADN y la traducción de los exones en polipéptidos incluyendo la secuencia señal y el procesamiento de las dos subunidades traducidas. El procesamiento comprende: el rompimiento del péptido señal; el transporte al retículo endoplásmico en donde se le unen los oligosacáridos al péptido - aunque se cree que la glicosilación inicial es cotraduccional-; el plegamiento de cada subunidad, el cual ocurre durante el transporte o en el mismo aparato de Golgi; la formación de los puentes disulfuro y finalmente la formación del complejo  $\alpha$ - $\beta$  en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y principalmente en el aparato de Golgi. Se ha demostrado que para que ocurra el plegamiento y el ensamblaje de  $\alpha$ - $\beta$  debe haber cierto grado de glicosilación (Pierce, 1988).

### **Regulación de la secreción de la FSH**

En los mamíferos, la síntesis y secreción de la FSH está controlada por mecanismos de retroalimentación que involucran al sistema nervioso central (SNC), la hipófisis y las gónadas, los cuales están influenciados por factores externos e internos. Entre los factores externos están la duración del día, la temperatura, la disponibilidad de alimento y la receptividad sexual. Entre los internos se pueden citar el metabolismo, el peso, el control hormonal, etc (Pierce, 1988) (Fig. 4).

La síntesis y liberación de la FSH es estimulada por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), un decapeptido secretado de manera pulsátil por neuronas localizadas en el hipotálamo. La GnRH estimula la secreción de FSH así como también la de LH, pero a altas dosis inhibe la secreción de FSH (Fink, 1988). Por otro lado, se discute la existencia de un factor hipotalámico, el cual estaría involucrado únicamente en la secreción de la FSH por lo que se le ha llamado factor liberador de la FSH (FSHRL) (Mizunuma y col., 1983).

La prolactina (PRL) inhibe la secreción de la FSH, mediante la disminución de la sensibilización de la hipófisis a la GnRH o mediante la inhibición de la liberación de esta última (Fink, 1988).

La inhibición o estimulación en la síntesis de la FSH por los estrógenos y progesterona depende de la duración, tiempo y nivel de exposición a los esteroides. En la rata, el borrego y el hombre ambos esteroides actúan sinérgicamente en la inhibición de la secreción de la FSH (Luderer y Schwartz, 1992). Se ha reportado que la estimulación de la secreción de la FSH por los estrógenos se lleva a cabo por sus efectos sobre la hipófisis y neuronas que regulan la liberación de la GnRH (Weick y col., 1971).

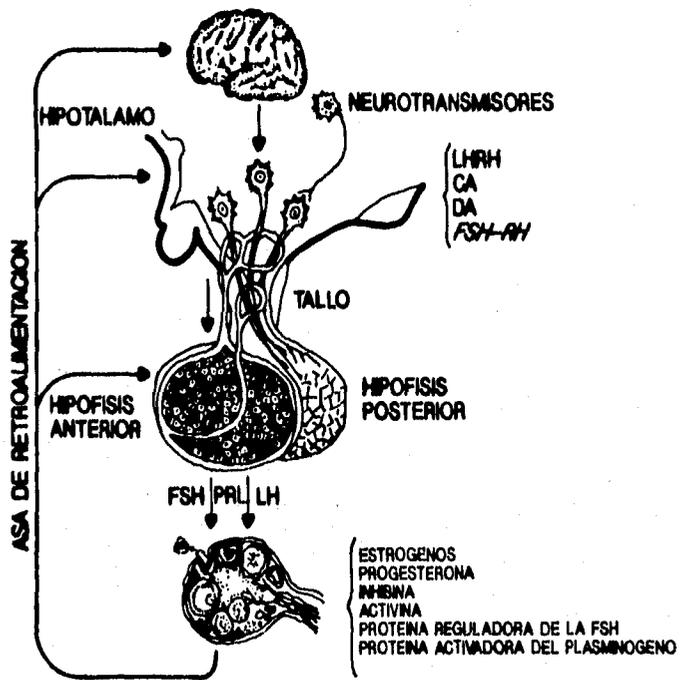


Fig. 4.- Regulación de la secreción de la FSH (de Hafez, 1993).

La activina, polipéptido de origen gonadal, estimula la secreción de la FSH (Kitaoka y col. 1988).

La secreción de la FSH se regula de manera inhibitoria por dos péptidos de origen ovárico: la inhibina y la folistatina, ambas glicoproteínas encontradas en el líquido folicular (Hsueh y col., 1989). Se ha informado que los glucocorticoides también inhiben la secreción de FSH (Hsueh y col., 1984).

Además, la síntesis y secreción de la FSH está regulada por varios sistemas de neurotransmisión. El más estudiado es el catecolaminérgico, en particular la participación de la noradrenalina como regulador de la secreción de la GnRH y por lo tanto de la FSH (Dominguez, 1993), aunque también se ha reportado la estimulación de la secreción de la FSH por la adrenalina. La  $\beta$ -endorfina y el factor liberador de ACTH inhiben también la liberación de la GnRH y por lo tanto de FSH. La morfina y posiblemente la dopamina tienen un efecto inhibitorio en la secreción de la FSH (Fink, 1988).

En los mamíferos la liberación de la FSH varía durante el ciclo estral y menstrual en respuesta a variaciones de la secreción de la GnRH y de las modificaciones que presentan los gonadotropos por efectos de la propia GnRH y de las hormonas ováricas, en particular los estrógenos (Ulloa, 1991).

### **Evolución de la FSH**

Se ha postulado que en el origen evolutivo de las gonadotropinas, una hormona ancestral dió lugar a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de manera separada. La  $\alpha$  evolucionó y dió origen a la

subunidad que se conoce en la actualidad, mientras que la  $\beta$  divergió en la correspondiente de las gonadotropinas (Hsueh, 1989) (Fig. 5).

#### **Purificación de la FSH.**

De las glicoproteínas hipofisarias, la FSH es la más difícil de purificar, lo cual se puede deber a varios factores: que el contenido de FSH en muchas especies es muy bajo en comparación con la LH; otro factor puede ser su labilidad, lo que redundaría en un bajo rendimiento; y finalmente se piensa que el polimorfismo de la hormona también puede ser responsable de la escasa recuperación que se obtiene al purificarla (Sairam y Papkoff, 1974).

La FSH se ha obtenido de anfibios, reptiles, aves y mamíferos. En peces no se ha encontrado la actividad de la FSH separada de la de LH, por lo que se piensa que en éstos, ambas hormonas están incluidas en una sola gonadotropina (Farmer y Papkoff, 1979). En anfibios, reptiles, aves y mamíferos, la FSH es una molécula químicamente distinta a la LH, sin embargo, en algunos vertebrados como los lagartos y las serpientes, la actividad gonadotrópica está incluida en una sola molécula. Además de la existencia de las dos gonadotropinas en los tetrápodos, estudios químicos y fisiológicos demuestran que ambas hormonas son homólogas a la FSH y LH de mamíferos (Licht y col., 1977).

De entre las clases de vertebrados, aquella en la que se ha estudiado más ampliamente a la FSH es la de los mamíferos y entre éstos, los seres humanos. Sin embargo, el rendimiento de la FSH hipofisaria incluso en la especie humana ha sido bajo, por lo cual se ha tratado de obtener la

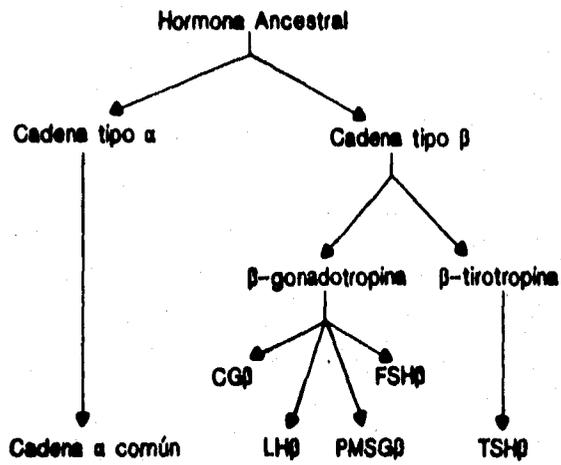


Fig. 5.- Origen Evolutivo postulado para la FSH y glicoproteínas relacionadas (de Hsueh, 1989).

hormona de otras fuentes como la orina de mujeres postmenopáusicas (van Hell y den Hollander, 1972) o utilizando técnicas de ingeniería genética (Boime y col., 1992).

La FSH humana (hFSH) ha sido purificada por varios grupos. Peckham y Parlow (1969) utilizaron las técnicas de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular, además de centrifugaciones en gradientes de densidad; dichos autores obtuvieron una actividad biológica de la hFSH de 300 X NIH-FSH-S1. Stockell (1966) partió de hipófisis almacenadas en acetona, a las que sometió a una deslipidización rompiendo el tejido en presencia de acetona y haciendo extracciones con acetato de amonio al 10 % y un pH de 5.1 en presencia de etanol al 96 %, seguido de una precipitación con etanol y purificación mediante cromatografía en una columna de intercambio iónico (CM-celulosa); obtuvo una fracción no retenida a la que llamó CM-I con una actividad de 3 X NIH-FSH-S1 (Stockell, 1966). Papkoff y colaboradores (1967) partieron de hipófisis congeladas a las que homogeneizaron en solución salina y precipitaron con sulfato de amonio  $[(NH_4)_2SO_4]$ , seguido de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular (Sulfoetil-Sephadex, Sephadex y CM-Sephadex); el rendimiento fue de 55 mg y la potencia de 40 a 60 X NIH-FSH-S1.

Además también se han aislado y caracterizado las isoformas de la hFSH (Stanton P. y col. 1992), para lo cual se partió de lotes de 50 hipófisis congeladas. Estas se homogeneizaron en un amortiguador de fosfatos a un pH neutro y se centrifugó a alta velocidad; el sobrenadante tuvo una actividad por radioreceptor de 15 700 UI (con respecto al estándar NIH-hFSH-I-3, con una potencia de 2350 UI/mg), mismo que se purificó en pasos subsecuentes en una columna de exclusión molecular (Sephacril S 200) y en un sistema de cromatoenfoque. La recuperación obtenida fue del 82 % y la bioactividad de 10 050 UI de FSH.

La FSH ovina (oFSH) se purificó por primera vez en 1949 por Li y colaboradores. Se partió de glándulas congeladas, las cuales se extrajeron con hidróxido de calcio  $[Ca(OH)_2]$  y se llevaron a cabo fraccionamientos por precipitación con etanol y con  $(NH_4)_2SO_4$ ; este procedimiento produjo un rendimiento de aproximadamente 25 mg/Kg de tejido con una actividad biológica de 30-60 x NIH-FSH-S1. Woods y col. (1960) utilizaron hipófisis almacenadas en acetona y las extrajeron con etanol al 40 %, después precipitaron con  $(NH_4)_2SO_4$  y el precipitado obtenido se aplicó a una cromatografía de intercambio catiónico (DEAE-celulosa), de la que se obtuvieron 55 mg/Kg de tejido y una potencia biológica de 1.7  $\mu$ g con respecto al estándar de Armour. Por otro lado, Papkoff (1967) purificó a la oFSH partiendo de hipófisis congeladas, las que después de homogeneizadas, se precipitaron secuencialmente con  $(NH_4)_2SO_4$ , por precipitación isoelectrica y etanólica, para finalmente purificar en cromatografías de intercambio iónico y de exclusión molecular (CM-celulosa, Sephadex G-100 y Sulfoetil-Sephadex C50); el rendimiento que obtuvo fue de 5 a 6 mg/Kg de tejido y una actividad biológica de 46 x NIH-FSH-S1.

La FSH de cerdo (pFSH) fué purificada por primera vez por Greep y col. (1942) y más tarde por Steelman y Segaloff (1959). El procedimiento para su obtención consistió en una extracción con etanol y una cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa); ellos informaron una actividad para la hormona de 11-12 x NIH-FSH-S1.

Braselton y col. (1970) purificaron la FSH equina (eFSH), siguiendo una extracción con etanol, precipitación con ácido metafosfórico ( $HPO_3$ ) y cromatografías en Sephadex G-100 y CM-Sephadex; obtuvieron un rendimiento de 26 mg/Kg de tejido y una actividad biológica de 90 x NIH-FSH-S1. Después Bousfield y Ward (1984) la purificaron a partir de hipófisis congeladas,

las cuales sometieron a extracciones con acetato de sodio y etanol, precipitaciones salinas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular (CM-Sephadex y QAE-Sephadex); el rendimiento fue de 12-31 mg/Kg de tejido y su actividad biológica de 116-156 x NIAMDD-oFSH-13.

#### **La FSH bovina (bFSH).**

La bFSH es una de las hormonas menos estudiada debido probablemente a la dificultad para su obtención a partir de su fuente natural. El primer reporte de su aislamiento corresponde a los trabajos de Ellis en 1961. El trabajó con hipófisis congeladas, mismas que sometió a una homogeneización y extracción con agua a pH 5.5, precipitaciones salinas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y cromatografía en DEAE-celulosa. Posteriormente, Reichert (1965) purificó la hormona de la siguiente manera: las hipófisis congeladas se extrajeron con agua a pH 5.5, luego se precipitaron secuencialmente con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se sometieron a un fraccionamiento con solventes orgánicos (cloroformo y butanol) y finalmente se realizó una cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100; el rendimiento obtenido fue de 2040 mg/Kg de tejido, el cual corresponde a una fracción parcialmente purificada y una bioactividad de 50 x NIH-FSH-S1 de acuerdo al bioensayo de Steelman y Pohley (1953). En realidad este es el primer trabajo en donde se intenta purificar a la bFSH y se proporcionan datos de su rendimiento y bioactividad.

Posteriormente Cheung (1976) purificó la bFSH de manera más exhaustiva. También partió de hipófisis congeladas, que homogeneizó y extrajo con agua a pH 6-6.5, después sometió el extracto a precipitaciones secuenciales con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; la fracción rica en FSH la purificó en

cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular (CM-celulosa, DEAE-celulosa y Sephadex G-100). El rendimiento obtenido fue de 2.7-3.2 mg de bFSH/Kg de hipófisis, con una potencia de 164 x NIH-FSH-S1. Cuando analizó la hormona purificada en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, el patrón electroforético dió lugar a una movilidad relativa (Rf) de entre 0.5 y 0.6 y por otro lado, de la cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100 se calculó un PM de 45 kDa; la contaminación con LH y TSH fue de 0.1-0.2 % y el análisis de aminoácidos mostró que la hormona tiene un alto contenido de lisina (Lys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu) y cisteína (Cys).

El mismo autor aisló y caracterizó las subunidades de la bFSH por medio de un tratamiento con ácido propiónico, seguido de congelación y descongelación de la hormona; después llevó a cabo una cromatografía en DEAE-celulosa en presencia de urea y otra en Sephadex G-100. Las subunidades independientes no mostraron bioactividad en un sistema de radioreceptor, mientras que cuando se recombinaron, recuperaron la actividad de FSH (Cheng, 1978).

Después Grimek y col. (1979) obtuvieron también la bFSH. Trabajaron con glándulas congeladas que extrajeron con acetato de sodio en etanol, seguido de una precipitación isoelectrica a pH 4.3 y con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; realizaron cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular (Sephadex G-150, Hidroxiapatita) y finalmente electroforesis preparativa. El rendimiento fue de 1.3 mg/Kg de tejido y la bioactividad fue de 25-73 x NIH-FSH-S1. La caracterización bioquímica de la hormona pura indicó un PM de 42 kDa cuando se sometió a ultracentrifugación, mientras que la composición de aminoácidos fue muy similar a la obtenida por Cheng (1976).

Recientemente, Miller (1987) y Wu (1993) informaron la purificación y caracterización de la bFSH. Miller y col. (1987) obtuvieron la bFSH mediante una homogeneización de adenohipófisis en PBS, seguida de una precipitación isoeléctrica a pH 4.3 y una cromatografía de afinidad en la que se usaron anticuerpos monoclonales altamente específicos para bFSH, adsorbidos en Sepharosa 4B activada con CNBr. Los anticuerpos monoclonales se produjeron previamente contra bFSH altamente purificada (USDA-FSH-BP3) en ratones BALB/c. El rendimiento obtenido de la bFSH purificada fue de 22.2 mg/Kg de tejido con una potencia biológica de 40 U/mg de proteína cuando se analizó la hormona en un sistema de radioreceptor. En electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se obtuvo un PM de 18 -20 kDa. Este es el primer trabajo en el que se producen anticuerpos monoclonales y se utilizan para purificar a la bFSH.

Wu y col. (1993) partieron de hipófisis congeladas, a las que homogeneizaron y extrajeron con agua a pH 5; después realizaron precipitaciones salinas secuenciales con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y la purificación se realizó con cromatografías de afinidad en Affi-gel, cromatografía de afinidad inmovilizada y acoplada con zinc (Zn) (IDA-Sepharosa), cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y exclusión molecular en Sephadex G-100. Obtuvieron 5.7 mg de bFSH/Kg de tejido con una bioactividad de 29-61 U/mg calculada a partir de un ensayo de radioreceptor. EL patrón electroforético de la bFSH purificada analizado en una electroforesis en SDS-PAGE fue heterogéneo mostrando un intervalo de PM de 65-14.8 kDa.

Se ha pensado que el bajo rendimiento y poca actividad de la bFSH se puede deber a diferentes causas: problemas técnicos de su extracción y purificación, una selección o

interpretación inadecuada del bioensayo o bien, a características estructurales particulares de la hormona.

Esta última posibilidad exige un estudio más profundo de las características bioquímicas y biológicas de la bFSH. Para entender este peculiar comportamiento de la bFSH, es necesario disponer de la hormona pura en cantidades razonables para proseguir después con su caracterización bioquímica, inmunológica y biológica, tanto de la hormona nativa como de las posibles variantes cuya presencia se ha informado para otras especies.

## **OBJETIVOS**

- 1) Desarrollar un método eficiente para la purificación de la hormona estimulante del foliculo bovina (bFSH).**
- 2) Caracterización bioquímica de la bFSH nativa, utilizando como parámetros la movilidad relativa (Rf), el peso molecular (PM) y la identificación inmunológica.**
- 3) Caracterización biológica de la bFSH nativa, mediante un ensayo in vivo.**

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL.

#### Biológico.

Para la extracción, purificación y caracterización de la hormona estimulante del folículo bovina (bFSH):

Se obtuvieron hipófisis bovinas en el rastro de Ferrería de la ciudad de México. Las glándulas se colectaron de dos maneras: en acetona y en nitrógeno líquido mientras se transportaban al laboratorio, en donde aquellas inmersas en acetona, se cambiaron a acetona limpia y se almacenaron a 4 °C, mientras las glándulas colectadas en nitrógeno líquido, se almacenaron en un ultracongelador Forma Scientific a -70°C.

#### Para el bioensayo:

Hormona estimulante del folículo bovina purificada en el laboratorio.- Se utilizaron dos lotes de hormonas: uno obtenido de hipófisis almacenadas en acetona a 4 °C y deslipidizadas; el otro lote se obtuvo de hipófisis almacenadas en congelación a -70°C y no deslipidizadas.

Gonadotropina coriónica humana (hCG).- Se utilizó una hormona comercial, "Gonadotropl-C" Roussel, con una actividad de 2500 UI/ml, lote 0003.

Hormona Estimulante del Folículo ovina (oFSH).- Esta fue una hormona estándar, USDA-oFSH-18, AFP 5862D con una potencia de 1640 UI/mg de proteína.

Animales.- Para determinar la actividad de la bFSH obtenida en este trabajo, se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, prepúberes de 22 a 23 días de edad.

#### Reactivos.

Los reactivos fueron de grado analítico y se empleó agua desionizada en un aparato Milli-Q (Millipore).

## **MÉTODOS**

### **Obtención de bFSH a partir de glándulas almacenadas en acetona y deslipidizadas.**

La obtención de la bFSH se realizó según el método de Stockel-Hartree (1966) con algunas modificaciones (Fig. 6).

### **Deslipidización.**

Se tomó un lote de 280 glándulas, las cuales se procesaron de la siguiente manera:

Las adenohipófisis se licuaron con aproximadamente 400 ml de acetona en presencia de hielo seco, después se hicieron tres lavados con aproximadamente 300 ml cada uno del mismo disolvente y finalmente con éter utilizando el mismo volumen. En cada lavado se filtró en un embudo Buchner con papel filtro Whatman No. 1. El tejido deslipidizado constituyó el "polvo de acetona", el cual se dejó bajo campana durante 96 horas para remover los disolventes mencionados (Fig. 6).

### **Extracción**

El "polvo de acetona" se resuspendió en un amortiguador de acetato de amonio ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) al 10 % (p/v) Etanol absoluto, pH 5.1 en una relación 6:4 (v/v), en presencia del inhibidor de proteasas PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) al 0.02 % (p/v). Se agitó enérgicamente durante 48 horas, se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos a 4 °C en un rotor de ángulo fijo GSA y una centrifuga Sorvall RC5-B. Se recuperó el sobrenadante ( $S_1$ ) y el precipitado ( $R_1$ ) se extrajo en las mismas condiciones. De esta segunda extracción se obtuvo un sobrenadante ( $S_2$ ) y un precipitado ( $R_0$ ). El precipitado ( $R_0$ ) se dializó contra agua, se liofilizó (en una liofilizadora LabConco 75050) y se almacenó a 4 °C, mientras que los sobrenadantes ( $S_1$  y  $S_2$ ) se precipitaron con etanol absoluto (Fig. 6).

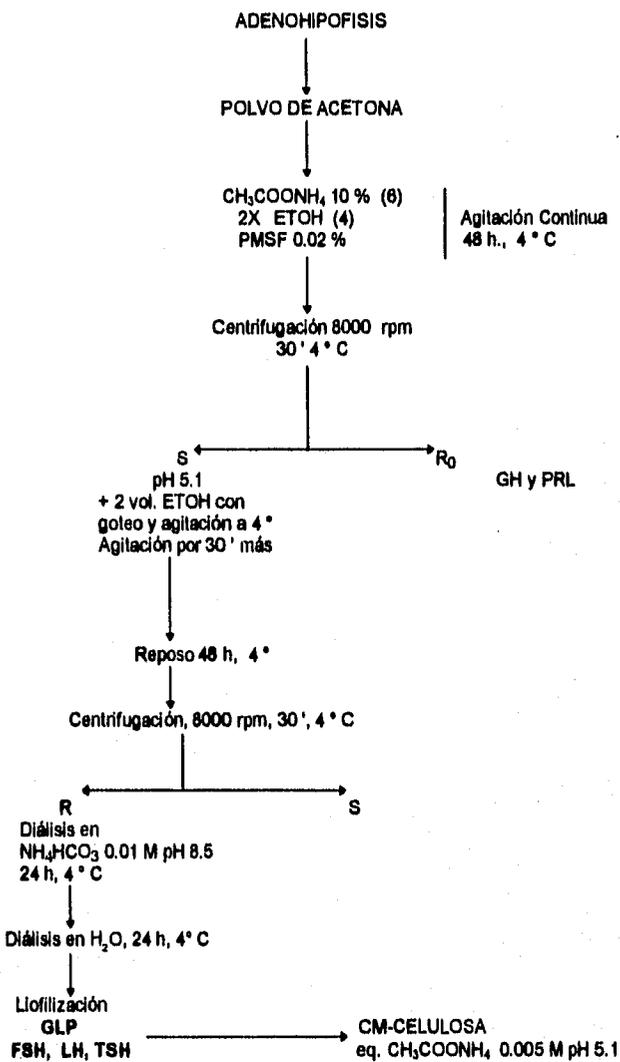


Fig. 6.- Procedimiento utilizado para la extracción y purificación del lote b4 de la bFSH.

### Precipitación Etanólica

Al S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> se añadieron por separado dos volúmenes de etanol, gota a gota y con agitación magnética constante, la que se prolongó 30 minutos después de añadido el etanol. Estas soluciones se dejaron reposar por 48 horas después de las cuales se separaron los sobrenadantes con ayuda de un sifón, los precipitados se recuperaron por centrifugación a 8000 rpm en un rotor de ángulo fijo GSA y una centrífuga Sorvall. Estos constituyeron los "extractos glicoproteínicos" 1 y 2 (GLP<sub>1</sub> y GLP<sub>2</sub>) respectivamente, mismos que se dializaron contra bicarbonato de amonio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 0.01 M pH 8.5 por 24 horas y luego contra agua durante 24 horas y finalmente se liofilizaron.

Los sobrenadantes se precipitaron con cloruro de sodio (NaCl) y acetona de la siguiente manera: por cada 245 ml de sobrenadante se añadieron 100 ml de acetona y 1 ml de NaCl 5 M. Se agitó manualmente y se dejó en reposo durante 48 horas a 4°C, el precipitado se dializó contra agua y se liofilizó (Fig. 6).

### Purificación

Previa a la purificación, la CM-celulosa (Carboximetil-celulosa) se precició con NaOH 0.5 N, H<sub>2</sub>O y HCl 0.5 N, después se equilibró con acetato de amonio 0.005 M pH 5.1 y posteriormente se desgasificó.

Los extractos glicoproteínicos (GLP<sub>1</sub> y GLP<sub>2</sub>) se purificaron en una columna empacada con CM-celulosa, según la técnica de Stockel-Hartree (1966) con modificaciones. Las muestras se eluyeron secuencialmente con un gradiente escalonado de la siguiente manera: acetato de amonio 0.005 M pH 5.1, acetato de amonio 0.1 M pH 6.8 y acetato de amonio 1M/Gly 0.1 M pH 9.5; la modificación consistió en el cambio en la molaridad del segundo amortiguador, es decir, el CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> no se empleó a la concentración de 1M como lo indica Stockell (1966), sino a la concentración aquí indicada. La presencia de proteína se determinó por absorbencia a 280 nm en un espectrofotómetro Gilford Instrument 250.

Debido a la gran cantidad de GLP<sub>1</sub>, para su purificación fue necesario realizar 3 cromatografías.

El GLP se resuspendió en el amortiguador de cargado y se aplicó a la columna bajo las siguientes condiciones:

**Cromatografía No. 1**

del GLP<sub>1</sub>

Dimensiones de la columna : 2.4 X 42 cm  
Flujo : 26 ml/h  
Cantidad de muestra aplicada : 127.4 mg de polvo  
63.77 mg de proteína  
Volumen de la muestra : 6.9 ml  
Volumen de cada fracción : 3 ml

**Cromatografía No. 2**

del GLP<sub>1</sub>

Dimensiones de la columna : 2.4 X 37 cm  
Flujo : 17 ml/h  
Cantidad de muestra aplicada : 132 mg de polvo  
66 mg de proteína  
Volumen de la muestra : 11.2 ml  
Volumen de cada fracción : 3 ml

### Cromatografía No. 3

#### del GLP<sub>2</sub>

Dimensiones de la columna	:	2.4 X 41	cm
Flujo	:	23	ml/h
Cantidad de muestra aplicada	:	99.4	mg de polvo
		47.71	mg de proteína
Volumen de muestra aplicada	:	54.4	ml
Volumen de cada fracción	:	3	ml

Se reunieron las fracciones correspondientes a cada pico y se dializaron contra agua desionizada, haciéndose cambios a intervalos de 2 ó 3 horas durante aproximadamente 40 horas y posteriormente se liofilizaron. Finalmente se almacenaron a 4°C.

#### Obtención de bFSH a partir de hipófisis congeladas

Con el objeto de obtener una bFSH más pura y de mejor calidad biológica, se procedió a purificarla a partir de glándulas almacenadas a -70 °C. Se partió de un lote de 500 glándulas, de las que se disecaron los lóbulos anteriores y se pesaron (Fig. 7).

#### Extracción

Las adenohipófisis se licuaron y homogeneizaron con una solución acuosa que contenía al inhibidor de proteasas PMSF al 0.02 % , pH 7.2. El homogeneizado se centrifugó a 5 000 rpm durante 30 minutos, a 4 °C y se obtuvieron un sobrenadante (S<sub>1</sub>) y un precipitado. El S<sub>1</sub> se dializó contra acetato de amonio 10 % / etanol absoluto pH 5.1 en una relación 6:4 (v/v), durante 48 horas; mientras que al precipitado se le extrajo con el mismo amortiguador y por el mismo tiempo con agitación mecánica constante. En el S<sub>1</sub> dializado se formó un precipitado (R<sub>1</sub>) el cual se eliminó por centrifugación a 5 000 rpm; al sobrenadante se le llamó S<sub>1</sub>'.

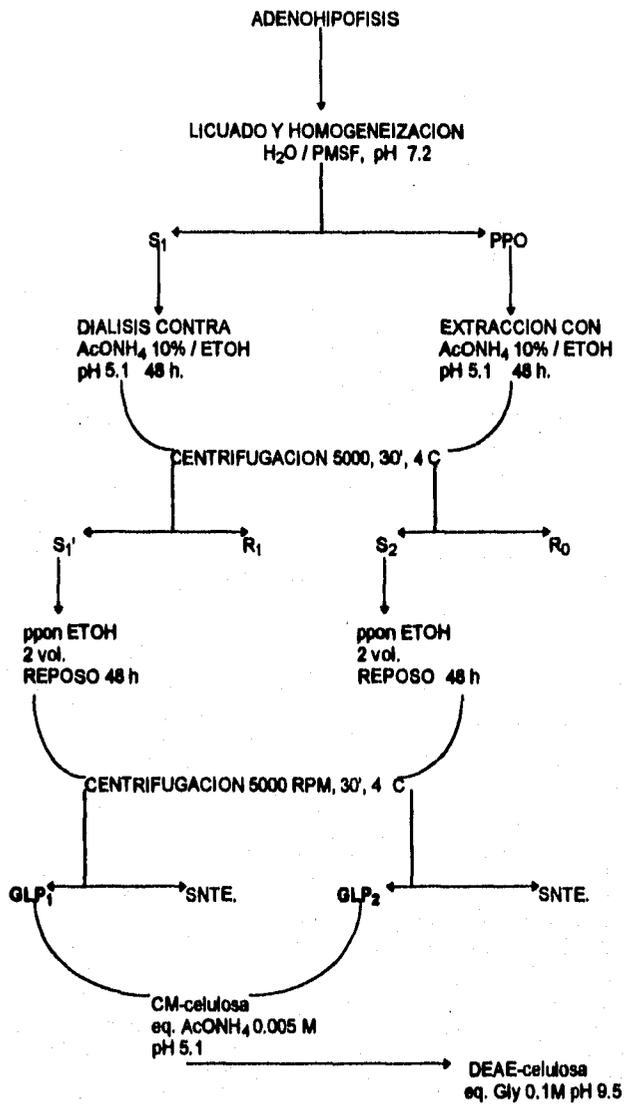


Fig. 7.- Procedimiento utilizado para la extracción y purificación del lote b8 de la bFSH.

El precipitado extraído se centrifugó y se obtuvo un sobrenadante ( $S_2$ ) y un precipitado, el cual se reextrajo en las mismas condiciones que el primer precipitado. Esta otra extracción dió lugar a un sobrenadante ( $S_3$ ) y a un precipitado ( $R_0$ ) (Fig. 7).

#### Precipitación Etanólica.

El  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  se precipitaron por separado con 2 volúmenes de etanol, añadido gota a gota y con agitación magnética constante, la que se prolongó 30 minutos después de añadido el etanol. Posteriormente se dejó reposar por 48 horas. Los precipitados formados se separaron por sifoneo y centrifugación y constituyeron los "extractos glicoproteínicos" 1, 2 y 3 ( $GLP_1$ ,  $GLP_2$ ,  $GLP_3$ ) respectivamente. Estos se dializaron contra bicarbonato de amonio ( $NH_4HCO_3$ ) 0.01 M pH 8.5 durante 36 h, luego contra agua por 12 horas y finalmente se liofilizaron.

A los sobrenadantes se les dió el mismo tratamiento que a los provenientes de los GLPs obtenidos de hipófisis almacenadas en acetona (Fig. 7).

#### Purificación

El  $GLP_1$  y  $GLP_2$  se purificaron en dos cromatografías secuenciales, CM-celulosa y DEAE-celulosa, según la técnica de Stockel-Hartree con modificaciones.

En CM-celulosa.- El  $GLP_1$  y  $GLP_2$  se juntaron y se resuspendieron en amortiguador de  $CH_3COONH_4$  0.005 M pH 5.1; se agitó durante 30 minutos y se centrifugó a 8 000 rpm por 30 minutos; el tratamiento se repitió con el precipitado formado. Los sobrenadantes se juntaron y se aplicaron a la columna previamente activada y equilibrada con  $CH_3COONH_4$  0.005 M, bajo las siguientes condiciones:

Dimensiones de la columna	:	4.5 X 43.5	cm
Flujo	:	30	ml/h
Cantidad de muestra aplicada	:	2.97	g de polvo
		2.50	g de proteína
Vol. de la muestra	:	60	ml

Vol. de las fracciones : 5 ml

La elución de la columna se hizo con un gradiente escalonado:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  0.005 M pH 5.1,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  0.1 M pH 6.8 y  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1 M / Gly 0.1 M pH 9.5.

En DEAE-celulosa (Diethyl-ethyl-aminoethyl-celulosa).- Se realizó según la técnica de Butt y col. (1961) con modificaciones. La DEAE-celulosa se activó con HCl 0.5 N y NaOH 0.5 N y posteriormente se equilibró con amortiguador de Glicina (Gly) 0.1 M pH 9.5. En esta se repurificó la fracción CM-1ab, la cual, por los datos reportados en la literatura (Stöckel-Hartree, 1966), se sabe que contiene a la bFSH. La fracción mencionada se resuspendió en el amortiguador de cargado (Gly 0.1 M pH 9.5), se agitó por 30 minutos, se centrifugó a 8 000 rpm por 15 minutos. El precipitado se trató de la misma manera. Los sobrenadantes se juntaron y se aplicaron a la columna bajo las siguientes condiciones:

Dimensiones de la columna : 1.3 X 40 cm  
Flujo : 20 ml/h  
Cantidad de muestra aplicada : 170.88 mg de polvo  
102.5 mg de proteína  
Vol. de la muestra : 3 ml  
Vol. de las fracciones : 3 ml

En la cromatografía se eluyó con el siguiente gradiente escalonado: Gly 0.1 M pH 9.5,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  0.1 M pH 6.8 y  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1 M pH 5.1.

En ambas cromatografías, la proteína se determinó por absorbencia a 280 nm en un espectrofotómetro Gilford. Las fracciones correspondientes a cada pico cromatográfico se dializaron contra agua y se liofilizaron.

Cabe hacer notar que todos los pasos de extracción y purificación para ambos lotes estudiados, se llevaron a cabo a 4 °C.

### Caracterización Bioquímica

Tanto la hormona purificada de hipófisis deslipidizadas, como aquella obtenida de glándulas congeladas, se sometieron a los mismos criterios de caracterización bioquímica, excepto en los casos indicados.

#### Determinación de la cantidad de proteína.

Esto se realizó según la técnica de Lowry (1951) modificada por Hartree (1972). En cada etapa de la purificación de la bFSH se determinó la cantidad de proteína obtenida. Para esto se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA, Calbiochem, fracción V), cuyo intervalo fue de 20 a 100 µg.

#### Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones nativas al 7 %, pH 8.3.

Esta se hizo según la técnica de Nicoll (1969), utilizando geles cilíndricos de 0.6 X 6 cm (ver apéndice); se analizaron las diferentes etapas de la purificación así como las fracciones purificadas.

Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 y se destiñeron por difusión haciendo varios cambios de solución decolorante.

La movilidad relativa (Rf) de las bandas de proteína se determinó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{longitud del gel resolvidor antes de teñir}}{\text{distancia de migración del frente antes de teñir}} \times \frac{\text{distancia de migración de la muestra después de teñir}}{\text{longitud del gel resolvidor después de teñir}}$$

Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12.5 % y al 15 %, pH 8.6.

El patrón electroforético y los pesos moleculares (PM) aparentes se determinaron con electroforesis en placa según la técnica de Laemmli (1970) en 2 cámaras para electroforesis vertical: Hoefer Scientific Instruments (HSI) y Mini-Protean II (Bio-Rad) (ver apéndice). Los marcadores de peso molecular empleados fueron de rango bajo, Bio-Rad: fosforilasa B (92.5 kDa), albúmina sérica bovina (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y lisozima (14.4 kDa).

También se corrieron geles al 12.5 % en presencia de Urea 4 M, en condiciones reductoras y no reductoras. En este caso los geles se prepararon según la técnica de Laemmli (1970) y añadiendo urea 4 M al amortiguador de la muestra y de los geles.

Caracterización Inmunológica

La bFSH obtenida de hipófisis congeladas, se analizó con las siguientes técnicas: inmuno-electrotransferencia y Slot-ELISA.

a) Slot-ELISA

Se realizó utilizando 100 ng de bFSH aplicada sobre papel de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m con un anticuerpo específico para bFSH- $\beta$  utilizado a diferentes diluciones y un segundo anticuerpo anti IgG conjugado con peroxidasa en una dilución 1:500 (ver apéndice).

b) Inmuno-electrotransferencia.

Se llevó según la técnica de Towbin (1979) con modificaciones. Se analizó solamente la bFSH obtenida de hipófisis congeladas.

### Caracterización Biológica

La actividad biológica de la bFSH obtenida se determinó en ratas Wistar prepúberes de 22 a 23 días de edad, con un ciclo de luz:oscuridad de 14:10 horas, respectivamente; las ratas se alimentaron con tabletas "Purina Chow" y se les proporcionó agua "ad libitum". El diseño experimental fue 3 + 3 con 5 animales por dosis y un testigo al que se inyectó solución salina. El bioensayo se realizó según el criterio de Steelman y Pohley (1953), en el que se mide el aumento del peso relativo de los ovarios en respuesta a dosis crecientes de FSH. El bioensayo se hizo en dos modalidades, en presencia y ausencia de hCG.

En presencia de hCG.- Se estudiaron dosis desde 0.013 µg hasta 200 µg de bFSH obtenida de hipófisis deslipidizadas, en presencia de 25 U.I. de hCG. Los animales se inyectaron diariamente con una solución de hCG y bFSH, durante cuatro días y se sacrificaron al quinto por decapitación o con CO<sub>2</sub>.

En el caso de la hormona obtenida de hipófisis congeladas, solamente se determinó su potencia a dosis de 1, 2 y 4 µg de bFSH y 25 U.I. de hCG, para lo cual se utilizó como hormona estándar a la oFSH (USDA-oFSH-18, AFP 5862D) con una potencia de 1640 UI/ mg. La potencia biológica de la bFSH purificada, se determinó con un programa manual diseñado en la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Centro Médico Nacional del IMSS, por Alatorre F.S. (1976); para lo cual se utilizaron análisis para bioensayos balanceados 3+3 y 2+2. La potencia biológica de la hormona con el 95 % de límites de confianza, se obtuvo con el análisis de varianza de los contrastes para la fuente de variación, tratamientos, preparaciones, regresión, paralelismo, curvatura, curvatura opuesta y error experimental; estos cálculos se hicieron utilizando los pesos relativos de los ovarios, es decir, el peso ovárico relacionado a 100 g de peso corporal. Cabe mencionar que dada la gran variabilidad del bioensayo, la optimización del mismo se obtuvo con los criterios de validez y confiabilidad, los cuales son: "lambda" (índice de precisión) con un valor menor de 0.28 y "g" (índice de significancia de la pendiente) con un valor menor de 1.

En ausencia de hCG.- En este caso, se estudiaron dosis desde 0.013 µg hasta 64 µg de la hormona obtenida de hipófisis almacenadas en acetona.

## RESULTADOS

Por razones de orden y claridad, los resultados correspondientes a los lotes de glándulas deslipidizadas y congeladas, se tratarán en forma separada.

### **Obtención de bFSH a Partir de Hipófisis Deslipidizadas.**

El peso de 280 glándulas deshidratadas fue de 236.71 g y el peso de los lóbulos anteriores hidratados fue de 258.29 g.

#### Deslipidización y Extracción.

El "Polvo de Acetona" proveniente del tratamiento con acetona y éter, produjo 50.64 g de polvo.

La primera extracción con  $\text{AcONH}_4$  0.005 M/Etanol, pH 5.1, dió lugar a 362 ml del sobrenadante ( $S_1$ ), mientras que la segunda extracción dió origen a 590 ml de sobrenadante ( $S_2$ ).

#### Precipitación Etanólica

Después de precipitar con etanol los sobrenadantes  $S_1$  y  $S_2$ , se obtuvieron los extractos glicoproteínicos  $\text{GLP}_1$  y  $\text{GLP}_2$ . El  $\text{GLP}_1$  produjo 259.26 mg de polvo con una concentración de proteína de 500  $\mu\text{g}$  por mg de polvo; el  $\text{GLP}_2$ , 99.4 mg de polvo y una concentración de proteína de 480  $\mu\text{g}$  de proteína por mg de polvo. Ambos extractos se mezclaron, de tal manera que el rendimiento total de ellos fue de 358.66 mg de polvo, con una concentración de proteína de 494  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de polvo (Tabla 3)

#### Purificación en CM-celulosa

La purificación de la bFSH a partir de los extractos glicoproteínicos realizada en CM-celulosa, se llevó a cabo en tres corridas cromatográficas (Figs. 8, 9 y 10): 2 corridas para el  $\text{GLP}_1$

Tabla 3.- Rendimiento en polvo y proteína de la bFSH, lote b4.

Muestra	Cantidad Total de polvo o vol.	Cantidad Total de proteína (mg)	Concentración de proteína (µg/mg polvo)
Adenitipósis hidratadas (280)	258.29 g		
Polvo de acetona	50.64 g		
S <sub>1</sub>	362 ml		
S <sub>2</sub>	590 ml		
GLP <sub>1</sub>	259.26 mg	129.63	500
GLP <sub>2</sub>	99.4 mg	47.71	480
GLP <sub>1</sub> + GLP <sub>2</sub>	358.66 mg	177.18	494
CM-lab	110.4 mg	16.49	149

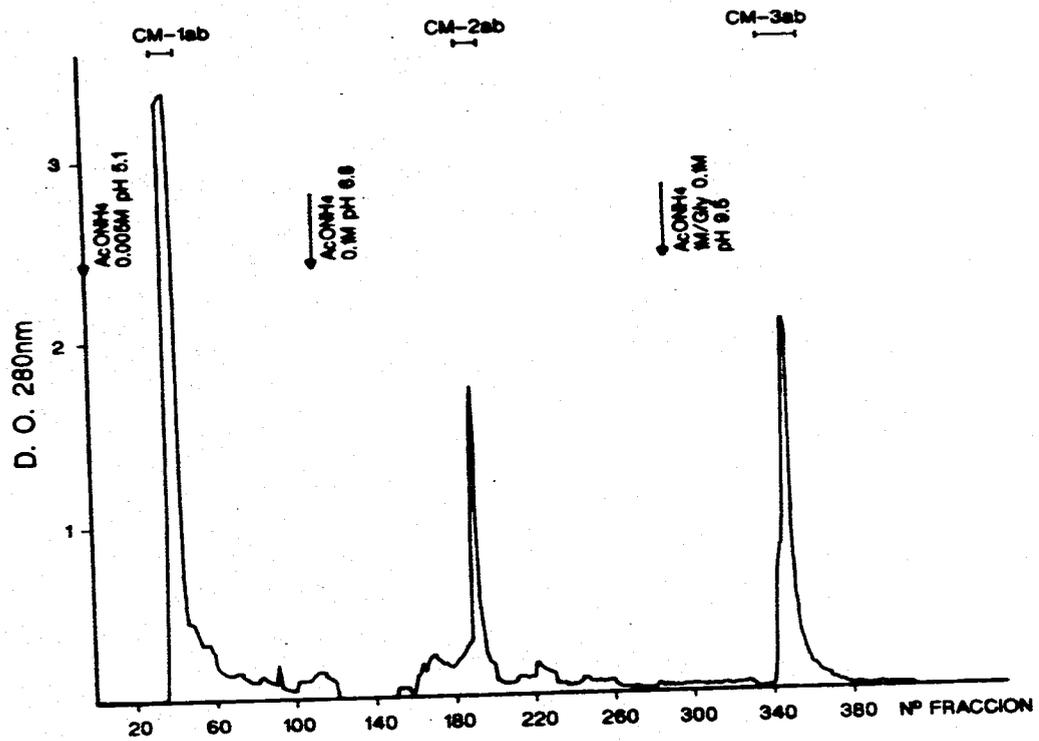


Fig. 8.- Cromatografía preparativa del extracto glicoproteínico 1 (GLP<sub>1</sub>) del lote b4, en CM-celulosa. Condiciones: flujo, 26 ml/h; vol. muestra, 6.9 ml; vol. fracción, 3 ml; dimensiones de la columna, 2.4 X 42 cm.

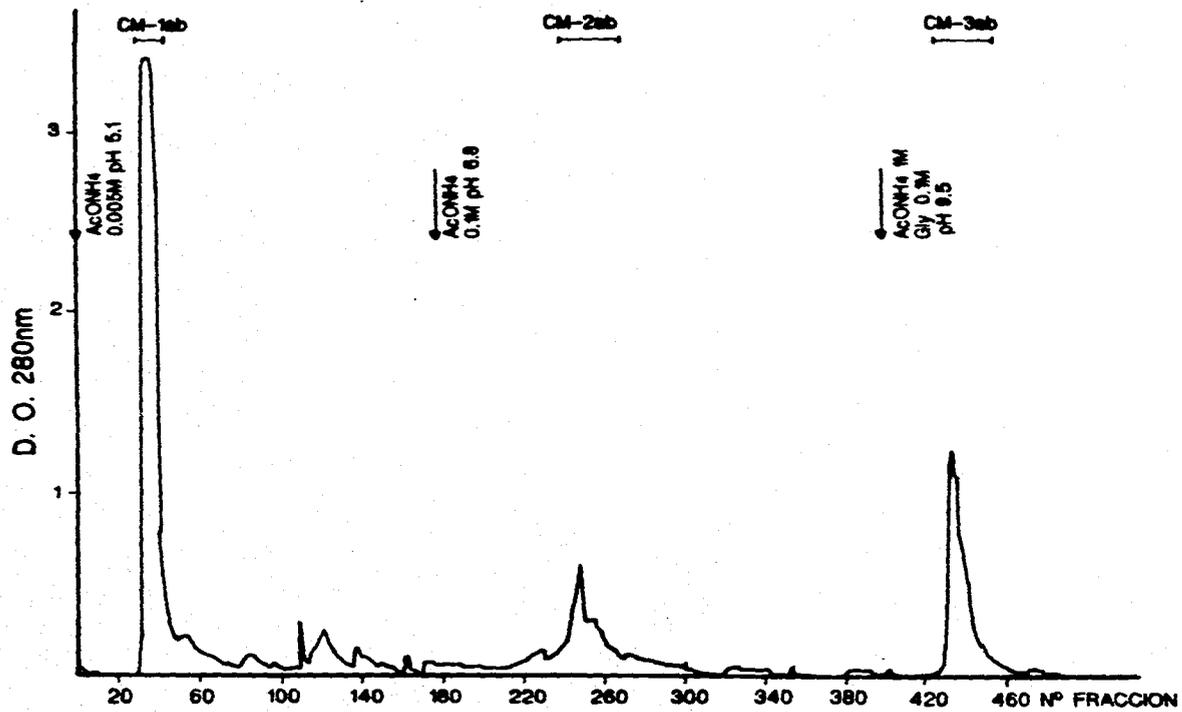


Fig. 9.- Cromatografía preparativa del extracto glicoproteínico 1 (GLP<sub>1</sub>) del lote b4, en CM-celulosa. Condiciones: flujo, 17 ml/h; vol. muestra, 11.2 ml; vol. fracción, 3 ml; dimensiones de la columna, 2.4 X 37 cm.

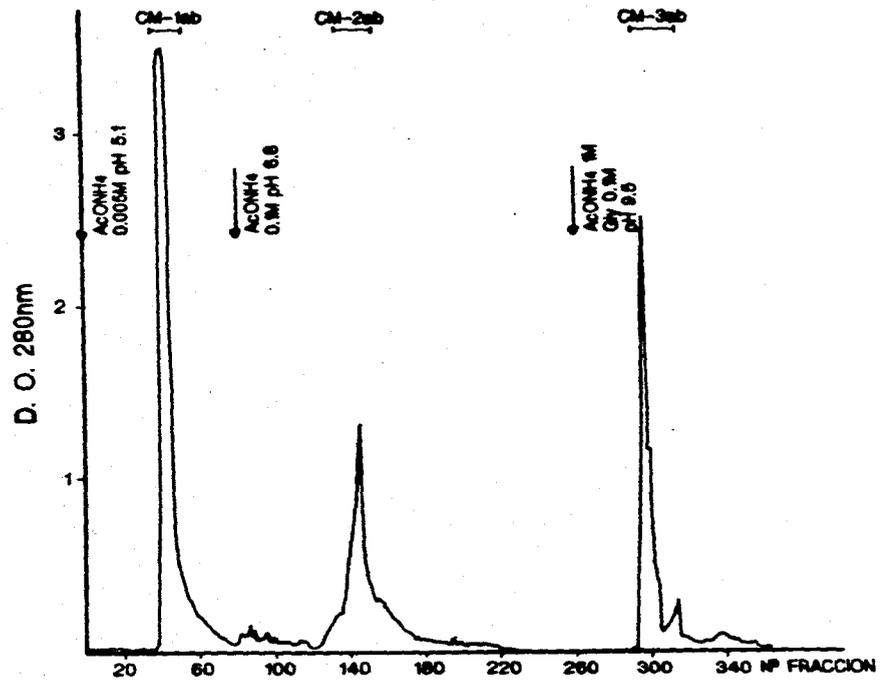


Fig. 10.- Cromatografía preparativa del extracto glicoproteínico 2 (GLP<sub>2</sub>) del lote b4, en CM-celulosa. Condiciones: flujo, 23 ml/h; vol. muestra, 54.4 ml; vol. fracción, 3 ml; dimensiones de la columna, 2.4 X 41 cm.

y una para el GLP<sub>2</sub>. En las tres cromatografías, el patrón de elución de los extractos glicoproteínicos fue muy similar. El gradiente escalonado dió origen a tres fracciones principales: con AcONH<sub>4</sub> 0.005 M pH 5.1, se obtuvo la fracción CM-1ab; con AcONH<sub>4</sub> 0.1 M pH 6.8, se obtuvo la fracción CM-2ab y con AcONH<sub>4</sub> 1 M/ Gly 0.1 M pH 9.5, se eluyó la fracción CM-3ab.

La fracción de interés para los fines de este trabajo fue la CM-1ab, ya que su comportamiento cromatográfico así como su patrón electroforético coinciden con los informados en la literatura para la bFSH (Stockell H., 1966; Cheng K., 1976). Por el patrón cromatográfico y electroforético, se piensa que las fracciones CM-2ab y CM-3ab podrían corresponder a las que contienen la LH y TSH respectivamente.

La modificación en el gradiente escalonado, después de obtener la fracción CM-1ab dió lugar a la fracción CM-3ab; la caracterización de esta fracción será motivo de otro trabajo en el laboratorio.

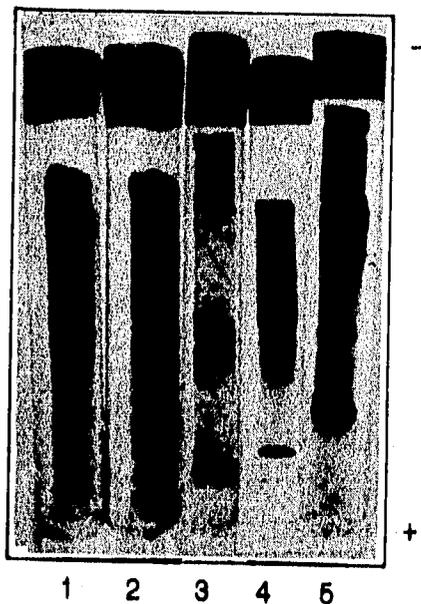
El rendimiento total de la fracción CM-1ab fue de 110 mg de polvo con una concentración de proteína de 149 µg por mg de polvo (Tabla 3).

### Caracterización Bioquímica.

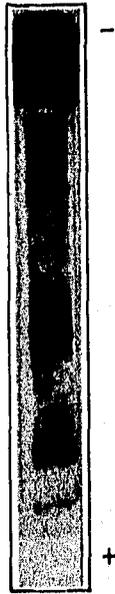
#### a) Electroforesis Nativa en Geles de Poliacrilamida.

Para conocer el grado de purificación de la fracción CM-1ab, se corrieron alícuotas de los diferentes pasos de purificación (Fig. 11), así como de la fracción CM-1ab, de las cuales se aplicaron de 50 a 80 µg de proteína. Se puede apreciar que hay una reducción de bandas a medida que se avanza en la purificación de la hormona.

La fracción CM-1ab mostró un patrón electroforético de dos bandas, cuyas movilidades relativas (Rf) fueron 0.46 y 0.55 (Fig. 12).



**Fig. 11.- Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS al 7% pH 8.3 (según Nicoll y col., 1969), de cada etapa de la purificación de la bFSH del lote b4. 1) GLP<sub>1</sub>; 2) GLP<sub>2</sub>; 3) CM-1ab; 4) CM-2ab; 5) CM-3ab.**



**Fig. 12.- Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS al 7% pH 8.3 (según Nicoll y col., 1969), de la fracción CM-1ab (lote b4).**

#### **b) Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.**

Se analizaron el GLP y las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de la bFSH; se determinó el PM aparente de la fracción CM-1ab, la cual se sabe que contiene a la FSH según su comportamiento cromatográfico y patrón electroforético en condiciones nativas, comparados con datos de la literatura (Stockell, 1966; Cheng, 1976; Grimek, 1979).

Las electroforesis se corrieron en geles al 12.5 % y al 15 % en condiciones reductoras y no reductoras, así como en presencia y ausencia de urea.

#### **En Geles al 12.5 %**

Si se compara la fracción CM-1ab con el GLP en condiciones no reductoras, se aprecia una reducción en el número de bandas después de realizar la cromatografía, mientras que algunas bandas se intensifican (Fig. 13). Las bandas principales para la fracción CM-1ab tuvieron un PM de: 50.1, 46.7, 20.4, 17.9 y 10.4 kDa.

La fracción CM-1ab analizada en condiciones no reductoras y reductoras, mostró que: en el caso de las condiciones no reductoras, las bandas resueltas tienen un peso molecular (PM) aparente de: 54.95, 50.12, 46.77, 38.90, 20.41, 17.98 y 10.47 kDa, siendo la más intensa la de 17.98 kDa (Fig. 14). En condiciones reductoras, algunas de estas bandas aumentan ligeramente de tamaño y otras lo conservan: 61.65, 57.54, 50.69, 38.90, 20.41, 17.98 y 10.83 kDa; en este caso, la banda de 17.98 kDa también resultó ser la más intensa (Fig. 14)

#### **Geles al 15 %**

El patrón electroforético en condiciones reductoras y no reductoras es muy semejante. El PM de las bandas más importantes fue de: 57.54, 50.12, 46.77, 38.90, 20.41, 17.98 y 10.47 kDa en condiciones no reductoras, mientras que para las reductoras, de: 61.65, 57.54, 50.69, 38.90, 20.41, 17.98 y 10.83 kDa (Fig. 15). En ambos casos, la banda más intensa fue la que correspondió a 17.98 kDa.

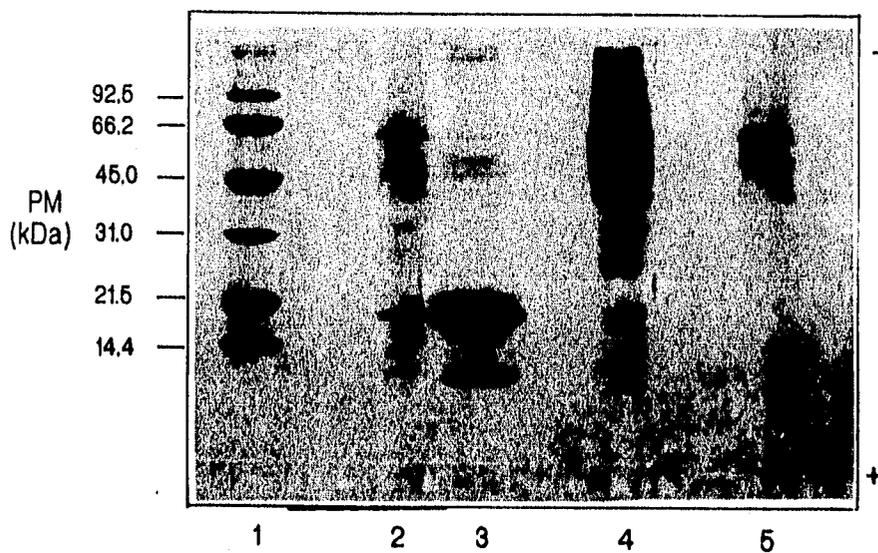
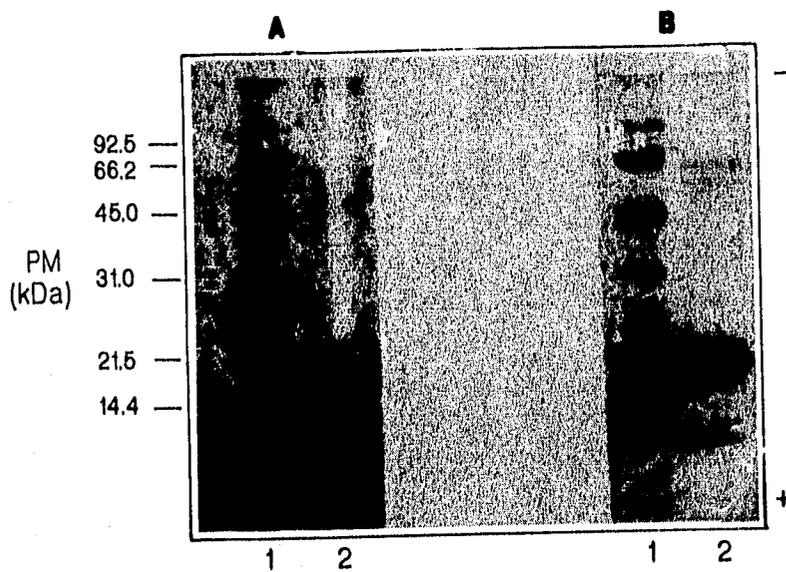
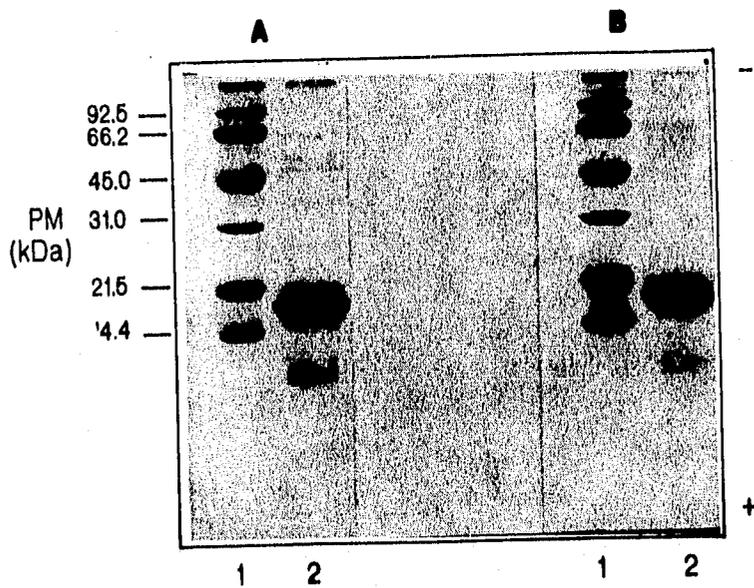


Fig. 13.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 12.5%, pH 8.6 en condiciones no reductoras (según Laemmli, 1970), que muestra el patrón electroforético de cada etapa de la purificación del lote b4. 1) Marcadores de PM; 2) GLP1; 3) CM-1ab; 4) CM-2ab; 5) CM-3ab.



**Fig. 14.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 12.5%, pH 8.6 (según Laemmli, 1970) del lote b4. A: condiciones no reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-lab. B: condiciones reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-lab.**



**Fig. 15.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 15%, pH 8.6 (según Laemmli, 1970) del lote b4. A: condiciones no reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-lab. B: condiciones reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-lab.**

**Geles al 12.5 % en presencia de urea.**

En condiciones no reductoras la banda de 38.90 kDa aumenta de intensidad y en condiciones reductoras, la de 37.54 kDa se intensifica también y desaparece la banda de 46.7 kDa. Se observa nuevamente que la banda de 17.98 kDa es la más intensa en ambos casos (Fig. 16).

#### **Caracterización Biológica.**

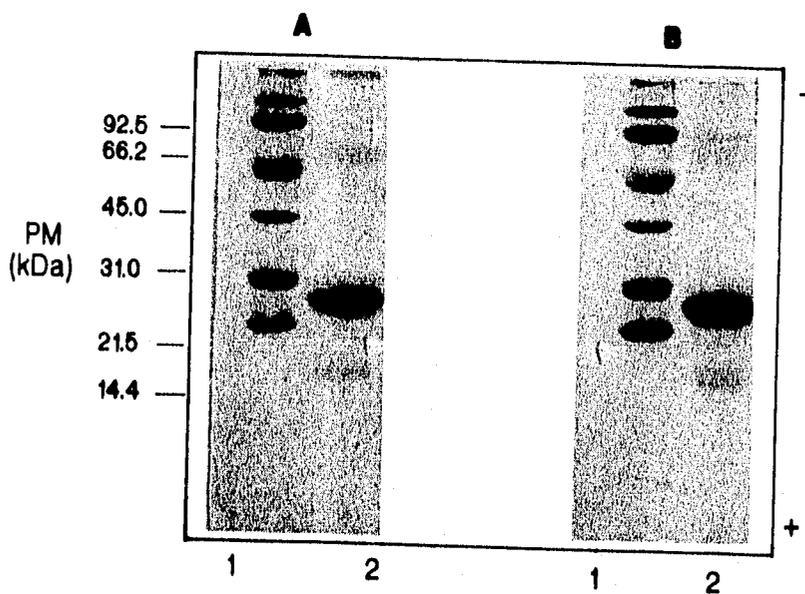
Esta se llevó a cabo según el bioensayo de Steelman y Pohley (1953) y se realizó en presencia y ausencia de hCG.

#### **En Presencia de hCG (25 U.I.).**

Cada bioensayo se realizó con 3 dosis de la fracción CM-1ab y un lote testigo. Los resultados indican que aunque el peso ovárico no aumenta considerablemente conforme aumenta la dosis de la hormona, sí se nota una tendencia a la linealidad en el rango de dosis que va desde 0.125 µg a 1 µg de la fracción CM-1ab (Fig.17 y 18). Se debe señalar además que macroscópicamente era extraordinario el desarrollo folicular de los ovarios de las ratas tratadas con la hormona, con respecto a los testigos (Fig. 19).

#### **En ausencia de hCG.**

En este caso, las dosis estudiadas de la fracción CM-1ab fueron desde 0.013 µg hasta 64 µg. Como se aprecia en las Figs. 20, 21 y 22, el aumento del peso ovárico con respecto a la dosis, fue mínimo en la mayoría de los bioensayos; sin embargo, se observó una tendencia a la linealidad en las dosis de 2 a 8 µg de la hormona (Fig. 21).



**Fig. 16.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE a 12.5%, pH 8.6 (según Laemmli, 1970) en presencia de urea 4M, del lote b4. A: condiciones no reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-lab. B: condiciones reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-lab.**

Peso ovárico (mg)/ Peso corporal(100 g)

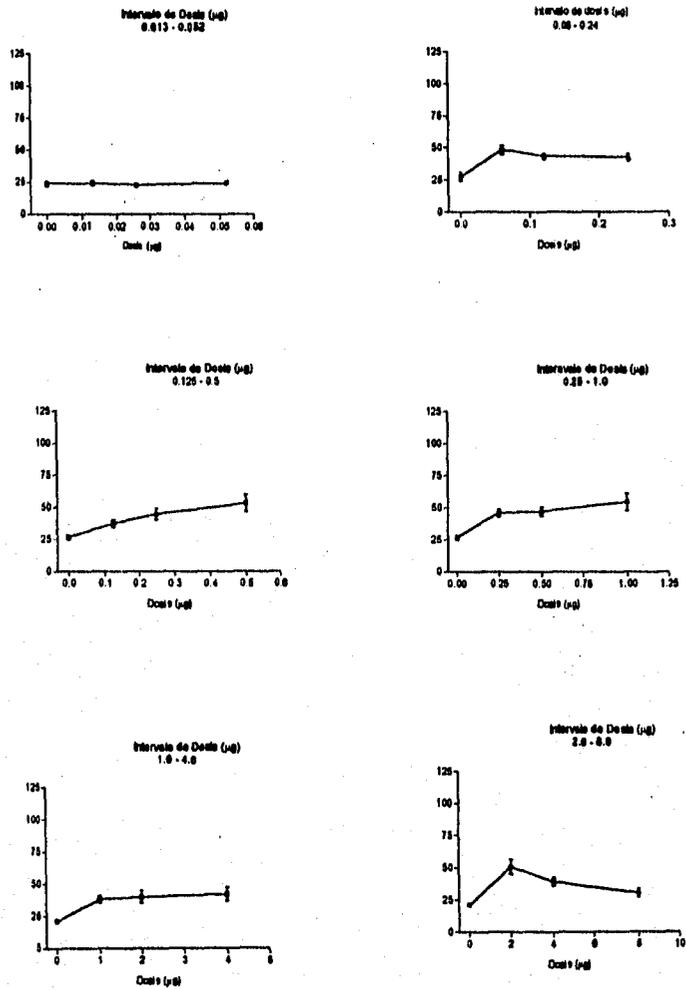
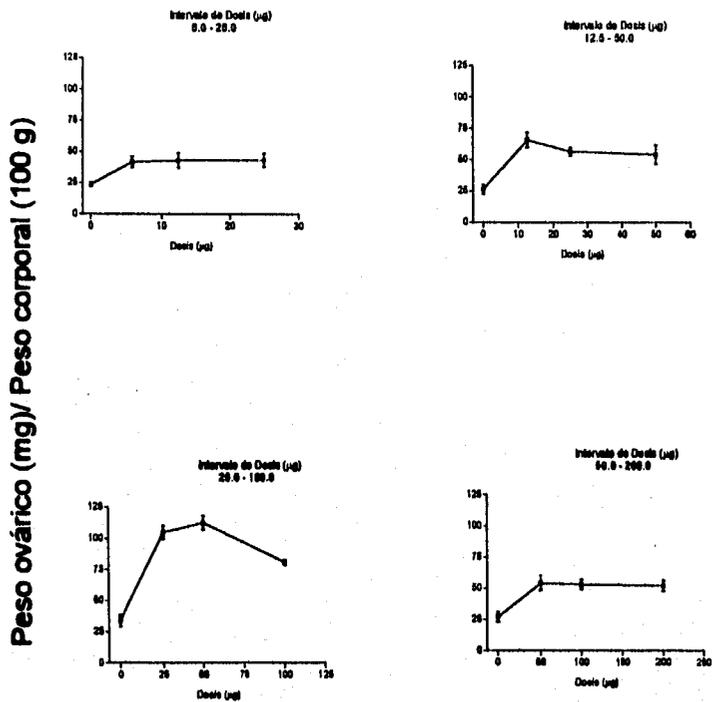


Fig. 17.- Respuesta en el peso ovárico a la administración de dosis crecientes de bFSH (lote b4) en presencia de 25 UI de hCG (según el criterio de Steelman y Pohley, 1953).



**Fig. 18.- Respuesta en el peso ovárico a la administración de dosis crecientes de bFSH (lote b4) en presencia de 25 UI de hCG (según el criterio de Steelman y Pohley, 1953).**



Fig. 19.- Ovarios de ratas Wistar prepúberes (22 a 23 días). A: tratamiento con 1  $\mu$ g de bFSH (b4) y 25 IU de hCG; B: Testigo (solución salina). Aumentos 8 X

Peso Ovárico (mg)/Peso Corporal (100g)

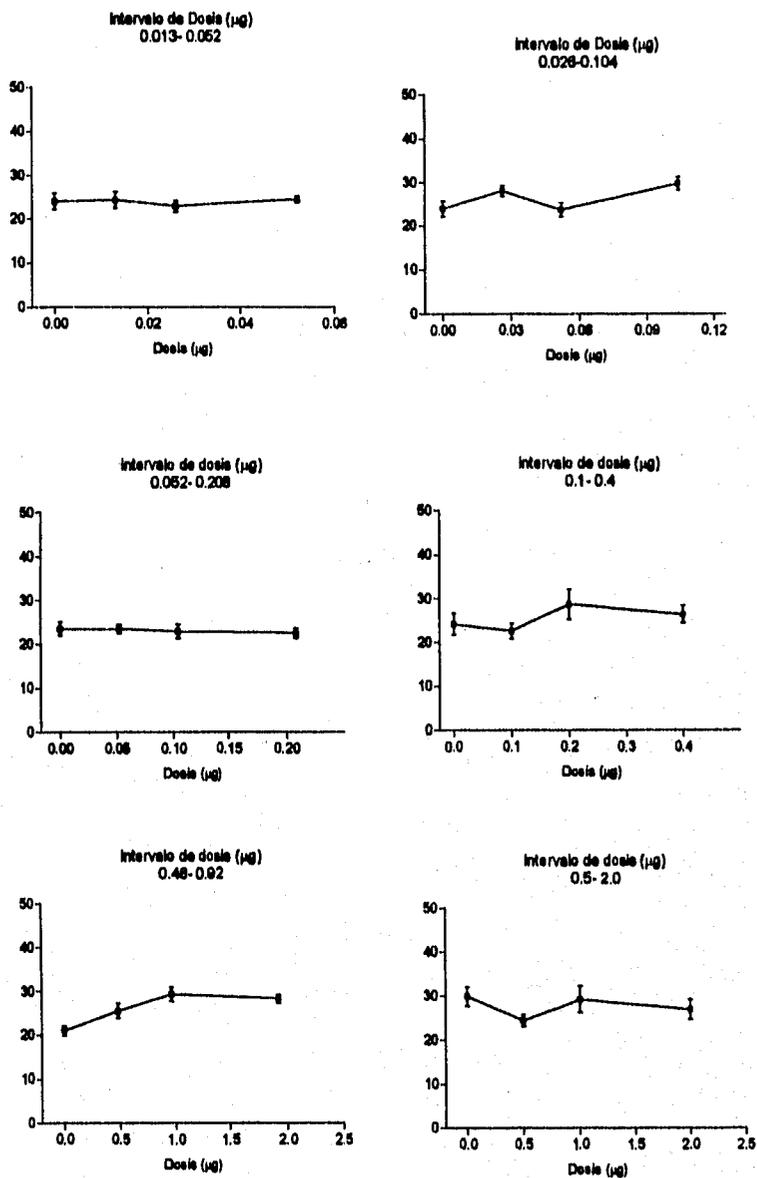


Fig. 20.- Respuesta en el peso ovárico a la administración de dosis creciente de bFSH (b4) en ausencia de hCG.

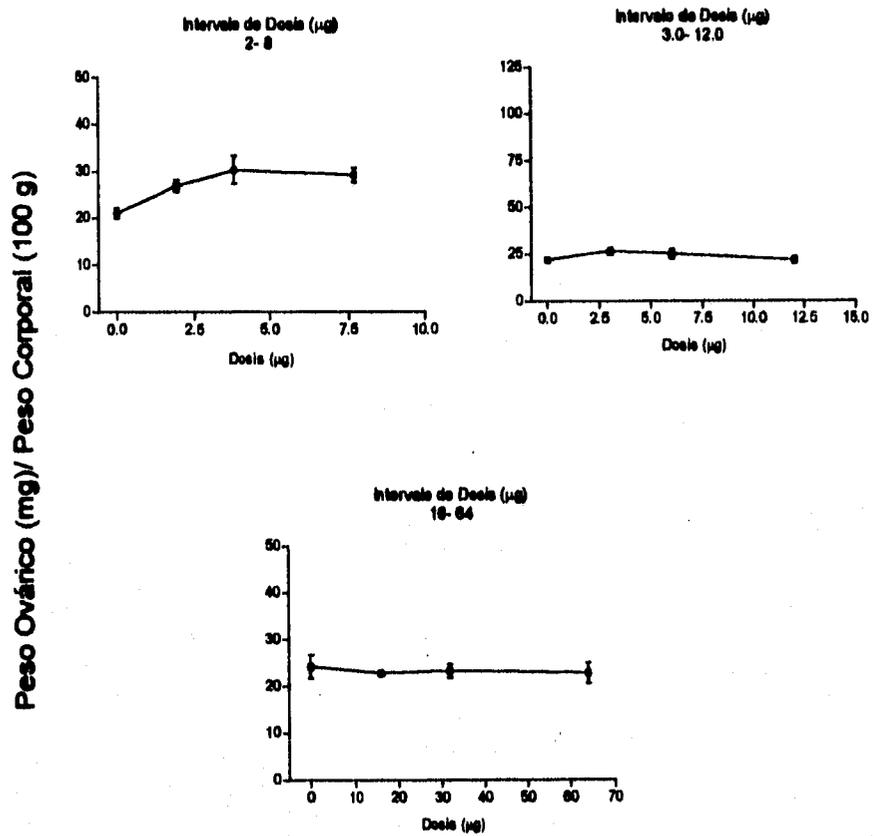


Fig. 21.- Respuesta en el peso ovárico a la administración de dosis crecientes de bFSH (lote b4) en ausencia de hCG

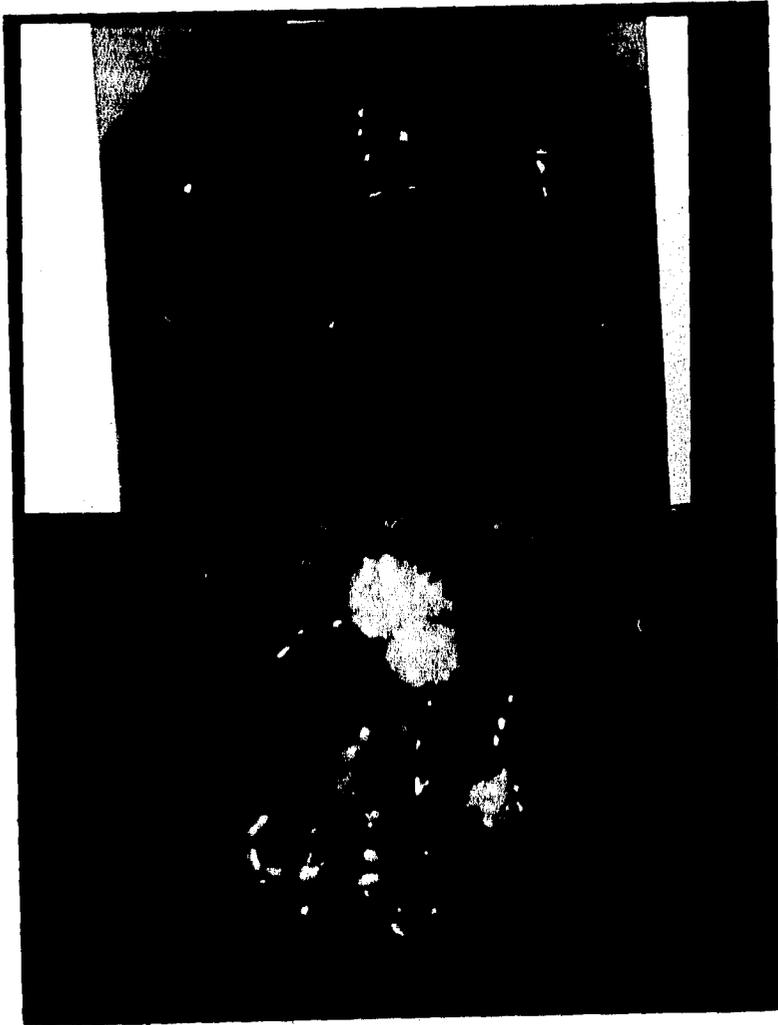


Fig. 22.- Ovarios de ratas Wistar prepúberes (22 a 23 días). A: tratamiento con 1  $\mu$ g de bFSH (b4) en ausencia de hCG; B: Testigo (solución salina). Aumentos 8 X

## **Obtención de la bFSH a Partir de Hipófisis Congeladas.**

### **Extracción**

El peso húmedo de las adenohipófisis fué de 611.21 g. Las glándulas licuadas y homogeneizadas con la solución acuosa que contenía PMSF, dieron lugar a 1960 ml de "Extracto Crudo". Después de la centrifugación, se obtuvieron 760 ml de sobrenadante ( $S_1$ ), el cual al dializarlo, a su vez produjo 650 ml de sobrenadante ( $S_1'$ ) y un precipitado ( $R_1$ ).

La extracción del primer precipitado obtenido, produjo 1540 ml de sobrenadante ( $S_2$ ) y un precipitado, mismo que se reextrajo dando lugar a 985 ml de sobrenadante ( $S_3$ ) y 82.42 g de precipitado ( $R_0$ ) (Tabla 4).

### **Precipitación Etanólica.**

Con la precipitación etanólica de los  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$ , se obtuvieron los "Extractos Glicoproteínicos"  $GLP_1$ ,  $GLP_2$  y  $GLP_3$  respectivamente. El  $GLP_1$  con un rendimiento de 2.18 g de polvo, y una concentración de proteína de 1 g por g de polvo; el  $GLP_2$ , de 791 mg de polvo y una concentración de proteína de 400  $\mu$ g por mg de polvo; el rendimiento del  $GLP_3$  fue de 410.8 mg de polvo con una concentración de proteína de 400  $\mu$ g por mg de polvo (Tabla 4).

### **Purificación.**

La purificación de la bFSH se realizó a partir del  $GLP_1$  y  $GLP_2$ , por medio de cromatografías en CM-celulosa y DEAE-celulosa.

### **Cromatografía en CM-celulosa.**

Dado que el patrón electroforético en condiciones nativas para el  $GLP_1$  y  $GLP_2$  era muy similar, éstos se aplicaron juntos en una columna de CM-celulosa. En el cromatograma (Fig. 23) se puede apreciar que la fracción CM-1ab se eluyó con el amortiguador de cargado, mientras que

Tabla 4.- Rendimiento en polvo y proteína de la bFSH, lote b8.

Muestra	Cantidad Total de polvo o vol.	Cantidad Total de proteína (mg)	Concentración de proteína (mg de proteína/volumen o polvo)
Adenohipófisis hidratadas (500)	611.21 g		
Extracto Crudo	1960 ml	59680	30.6 /ml
S1	760 ml	11930	15.7 /ml
S1'	650 ml	3250	5 / ml
S2	1540 ml	2120	1.4 /ml
S3	985 ml	561.45	0.570 /ml
GLP1	2.180 g	2180	1.0 /mg
GLP2	791 mg	3211	0.4 /mg
GLP3	410.8 mg	165.27	0.4 /mg
CM-lab	187.08 mg	112.25	0.6 /mg
CM-lab-DEAE-3ab	58.12 mg	36.69	0.631 /mg

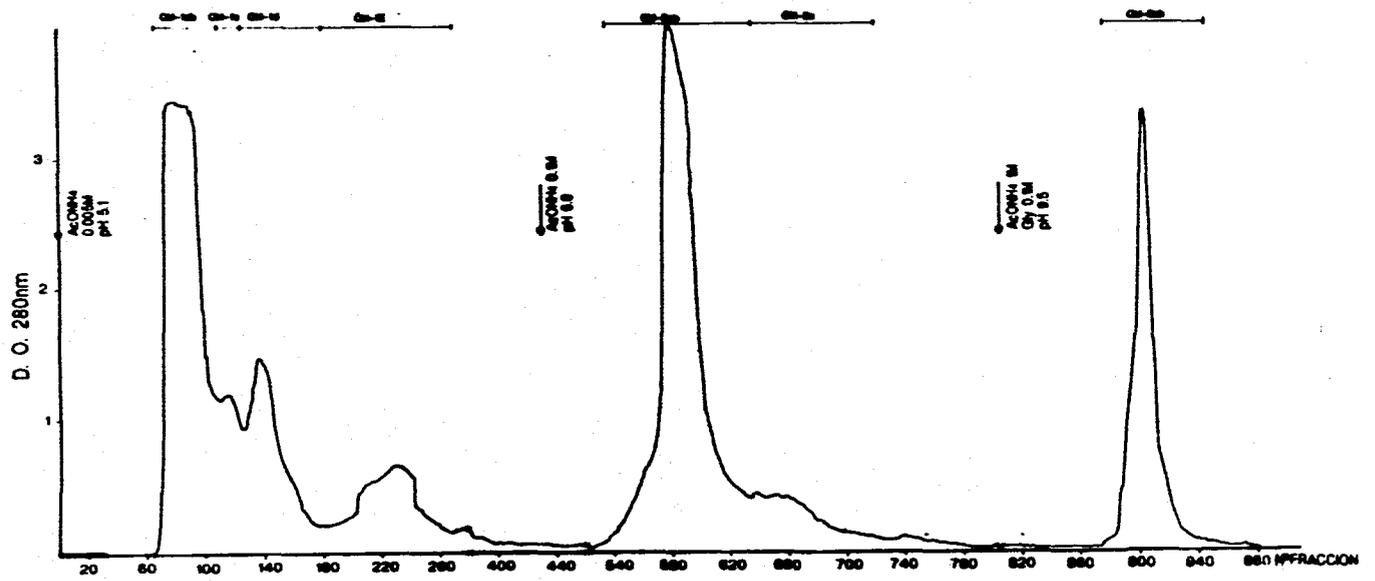


Fig. 23.- Cromatografía preparativa de los extractos glicoprotéicos 1 y 2 (GLP<sub>1</sub> y GLP<sub>2</sub>) del lote b8 en CM-celulosa. Condiciones: flujo, 30 ml/h; vol. muestra, 60 ml; vol. fracción, 5 ml; dimensiones de la columna, 4.5 X 43.5 cm.

la CM-2ab y CM-3ab, se eluyeron con los amortiguadores de mayor fuerza iónica y pH; como se ve, la elución de las fracciones es muy similar a la que se obtuvo con las hipófisis deslipidizadas.

Como se indicó antes, la fracción CM-1ab es la de interés, pues su patrón de elución y movilidad relativa (Rf), coinciden con lo informado en otros trabajos para la FSH (Stockell, 1966; Cheng, 1976; Grimek, 1979).

El rendimiento de la fracción CM-1ab fue de 187.08 mg de polvo, con una concentración de proteína de 600 µg por mg de polvo.

#### Cromatografía en DEAE-celulosa.

La fracción CM-1ab se repurificó en una columna de DEAE-celulosa, la cual se eluyó con un gradiente escalonado (ver Material y Métodos). En el patrón cromatográfico (Fig. 24) se pueden apreciar las tres fracciones mayoritarias eluidas, de las cuales la CM-1ab-DEAE-3ab, que se retiene en la columna y se eluye con  $\text{AcoNH}_4$  1M pH 5.1, se considera como aquella que contiene a la bFSH por su comportamiento cromatográfico.

El rendimiento de la fracción CM-1ab-DEAE-3ab fue de 58.12 mg de polvo y una concentración de proteína de 631 µg por mg de polvo (Tabla 4). El rendimiento del GLP y bFSH en el lote b8 es mayor que en el lote b4 (Tabla 5).

#### Caracterización Bioquímica.

##### Electroforesis en TRIS-PAGE.

En condiciones nativas se corrieron alícuotas de los diferentes pasos de purificación (Fig. 25). Como se ve, conforme se avanza en la extracción de la hormona, se enriquecen aquellas bandas consideradas como FSH, LH y TSH.

Cuando se corrieron las diferentes fracciones purificadas en CM-celulosa (Fig. 26), se ve que la fracción CM-1ab se resuelve en varias bandas, dos intensas con una movilidad relativa (Rf)

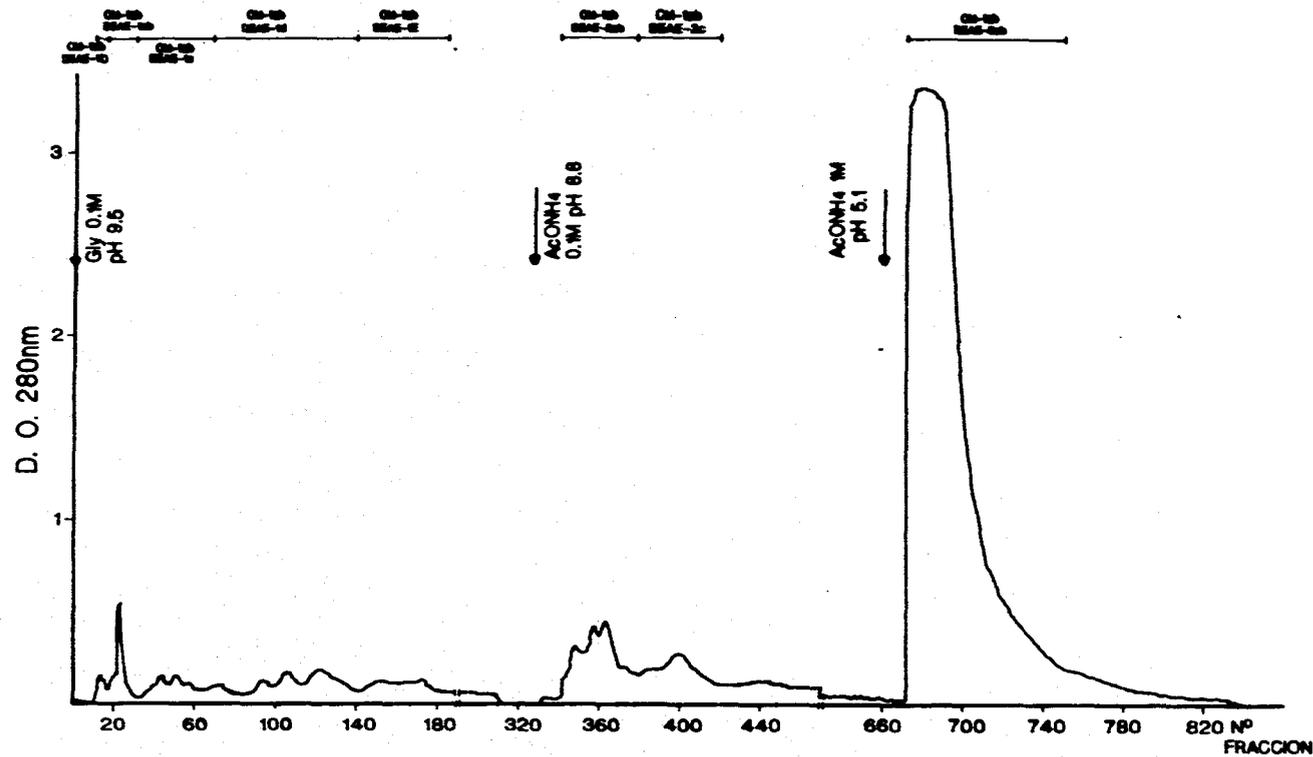
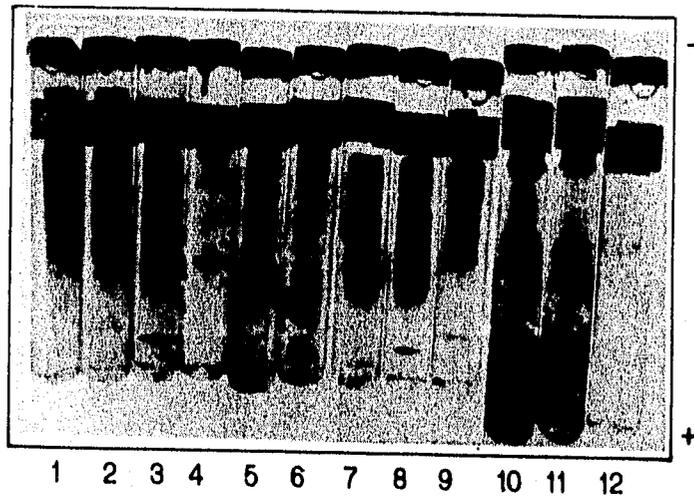


Fig. 24.- Cromatografía preparativa de la fracción CM-1ab del lote b8, en DEAE-celulosa. Condiciones: flujo, 20 ml/h; vol. muestra, 3 ml; vol. fracción, 3 ml; dimensiones de la columna, 1.3 X 40 cm.

**Tabla 5.- Rendimiento obtenido de bFSH en los lotes b4 y b8. Los datos se refieren a mg de proteína por Kg de adenohipófisis.**

<b>Muestra/Lote</b>	<b>b4</b>	<b>b8</b>
<b>GLP1 + GLP2</b>	<b>686</b>	<b>412.5</b>
<b>CM-1ab</b>	<b>63.8</b>	<b>183.6</b>
<b>CM-1ab-DEAE-3ab</b>		<b>60</b>



**Fig. 25.- Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS al 7% pH 8.3 (según Nicoll, 1969) de cada etapa de la purificación de la bFSH del lote b8. 1) Extracto crudo; 2) S1; 3) S1'; 4) R1; 5) S2; 6) S3; 7) GLP1; 8) GLP2; 9) GLP3; 10) CM-1ab; 11) CM-1ab-DEAE-3ab; 12) R0.**

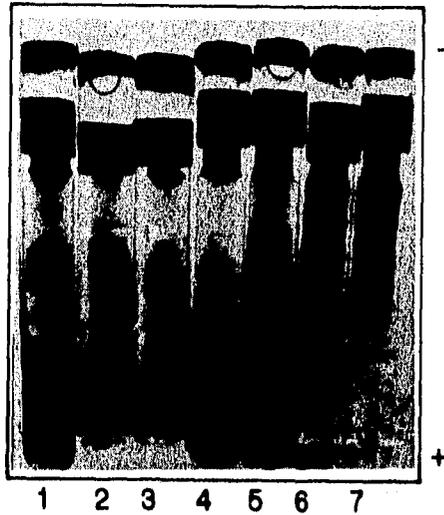


Fig. 26.- Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS al 7% pH 8.3 (según Nicoll, 1969) de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de los GLP1 y 2 en CM-celulosa del lote b8. 1) CM-1ab; 2) CM-1c; 3) CM-1d; 4) CM-1e; 5) CM-2ab; 6) CM-2c; 7) CM-3ab.

de 0.34 y 0.48 y una de menor intensidad con un Rf de 0.40; estas bandas corresponden al patrón electroforético reportado para la FSH de diferentes especies (Cheng, 1976). Las otras bandas intensas con Rf de 0.87 y 0.95, probablemente correspondan a la albúmina, pues el Rf coincide con lo observado en el laboratorio cuando se analiza la albúmina sérica bovina (BSA). La banda menos intensa, cuyo Rf fue de 0.13, puede corresponder a la LH (Carranza M. 1994).

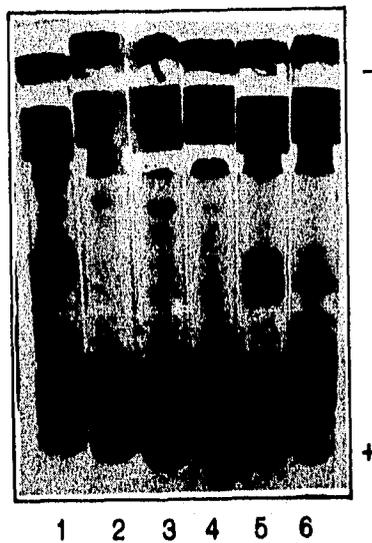
Aunque la fracción CM-1c también presenta un patrón electroforético muy similar a la fracción CM-1ab, parece estar contaminada con otras proteínas, pues su patrón electroforético demuestra la existencia de otras bandas con Rf de 0.13, 0.25 y 0.59, además de la considerada como albúmina (Fig. 26).

El patrón electroforético de las fracciones obtenidas después de repurificar la CM-1ab, muestra que: es la fracción CM-1ab-DEAE-3ab (Fig. 27) la que contiene a las bandas representativas de bFSH más enriquecida; esta fracción tiene un Rf de 0.34, 0.40 y 0.48, mientras que las bandas consideradas como albúmina, tienen un Rf de 0.87 y 0.95. Se debe señalar además que la banda que podría corresponder a la LH (Rf = 0.13) ha disminuido considerablemente su intensidad (Fig. 28).

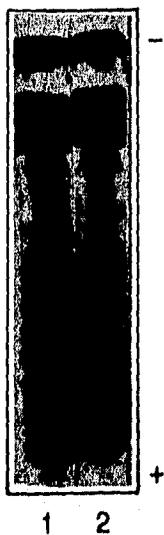
#### Electroforesis en SDS-PAGE.

En este caso se corrieron alícuotas de los diferentes pasos de purificación en geles al 12.5 % bajo condiciones no reductoras. Se puede apreciar en la Fig 29 que hay una reducción de bandas conforme se avanza en la purificación de la bFSH.

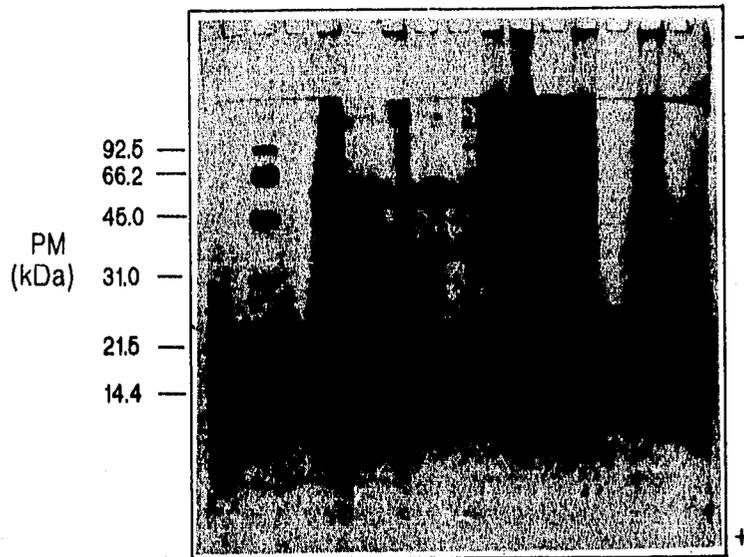
En condiciones no reductoras la fracción CM-1ab-DEAE-3ab se resolvió en las siguientes bandas: 102.33, 54.95, 50.11, 42.65, 28.18, 20.41, 17.98 y 16.03 kDa; de éstas la más intensa fue la de 17.98 kDa. En condiciones reductoras, las bandas de 54.95 y 42.65 kDa aumentaron ligeramente de tamaño a 61.65 y 43.65 kDa, respectivamente, mientras que las otras conservaron su tamaño, pero la de 28.18 kDa ya no se observó (Fig. 30).



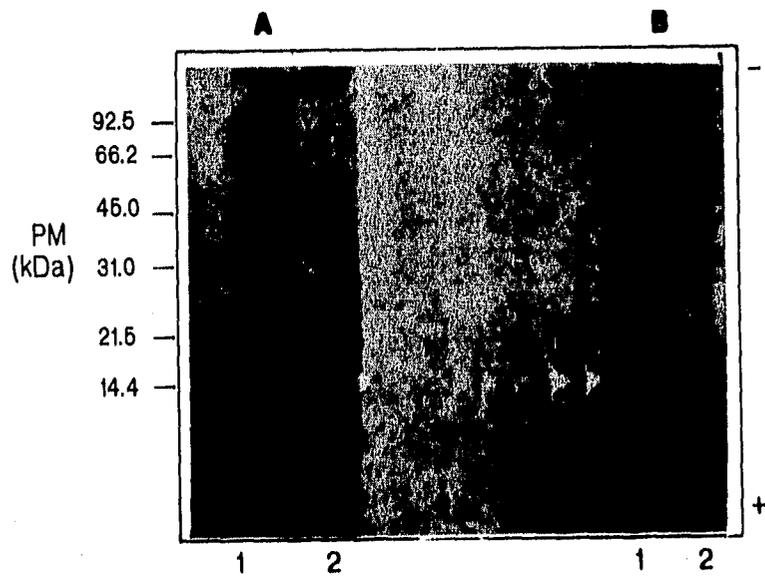
**Fig. 27.- Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS al 7% pH 8.3 (según Nicoll, 1969) de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de la fracción CM-1ab del lote b8, en DEAE-celulosa. 1) CM-1ab; 2) CM-1ab-DEAE-10; 3) CM-1ab-DEAE-1ab; 4) CM-1ab-DEAE-1c; 5) CM-1ab-DEAE-3ab; 6) CM-1ab-DEAE3c.**



**Fig. 28.- Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS al 7% pH 8.3 (según Nicoll, 1969) de la bFSH purificada del lote b8. 1) CM-1ab; 2) CM-1ab-DEAE-3ab.**



**Fig. 29.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 12.5% pH 8.6 (según Laemmli, 1970) en condiciones no reductoras que muestra el patrón electroforético de cada etapa de purificación del lote b8. 1) Marcadores de PM; 2) S1; 3) S1'; 4) R1; 5) S2; 6) S3; 7) GLP1; 8) GLP2; 9) GLP3; 10) precipitado de GLP3; 11) R0.**



**Fig. 30.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 12.5% pH 8.6 (según Laemmli, 1970) de la bFSH (lote b8). A: condiciones no reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-1ab-DEAE-3ab. B: condiciones reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-1ab-DEAE-3ab.**

En geles al 15 %, en condiciones reductoras y no reductoras, se observó el mismo patrón electroforético que en geles al 12.5 % (Fig. 31).

En presencia de Urea 4 M se observó que:

En condiciones no reductoras se intensifican las bandas de 54.95 y 42.65 kDa y desaparece la de 28.18 kDa. En condiciones reductoras se intensifica la banda de 43.65 kDa y aparece la de 35.89 kDa (Figs. 30 y 32).

#### Caracterización Inmunológica.

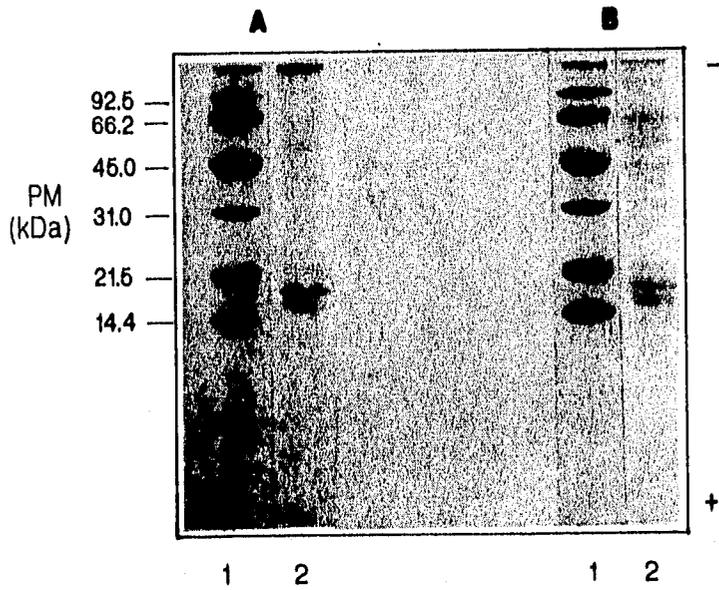
##### Slot-ELISA.

La fracción CM-1ab-DEAE-3ab, fue reconocida por un anticuerpo estándar específico para bFSH- $\beta$  (USDA-5-pool), el cual se probó a diferentes diluciones (Fig. 33). La máxima dilución del anticuerpo en la que se pudo observar una reacción positiva diferente del testigo, fue 1:5000; a diluciones menores, la reacción positiva es todavía más conspicua. Esto indica que la fracción CM-1ab-DEAE-3ab contiene bFSH.

##### Inmunoelectrotransferencia.

En una inmunoelectrotransferencia se analizaron el "Extracto Crudo", "Extracto Glicoproteínico" (GLP), las fracciones CM-1ab y CM-1ab-DEAE-3ab, así como una oFSH estándar (USDA-oFSH-18), para ello se utilizó un anticuerpo estándar específico para bFSH (USDA-5-pool-bFSH- $\beta$ ) (Fig. 34).

Las bandas reconocidas tanto para la fracción CM-1ab como para la CM-1ab-DEAE-3ab fueron las que presentaron un PM aparente de 102.3, 74.1, 61.6 y 50.1 kDa.



**Fig. 31.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 15% pH 8.6 (según Laemmli, 1970) de la bFSH (lote b8). A: condiciones no reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-lab-DEAE-3ab. B: condiciones reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-lab-DEAE.3ab.**

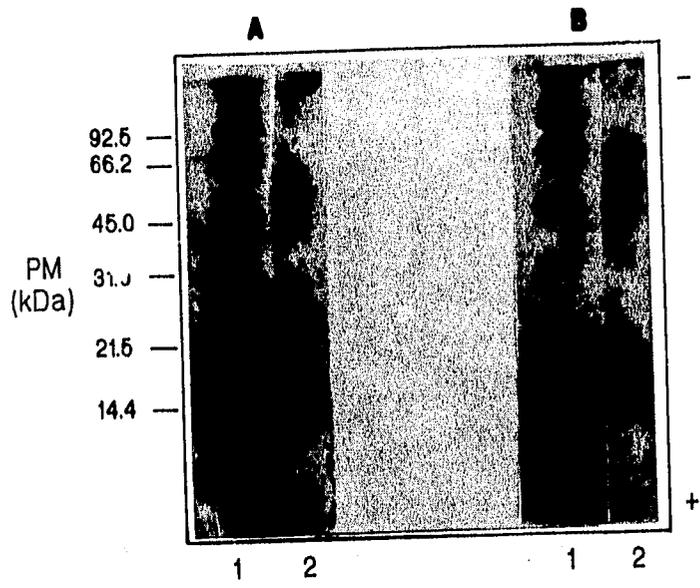


Fig. 32.- Electroforesis discontinua e SDS-PAGE al 12.5% pH 8.6 (según Laemmli, 1970) en presencia de 4M de urea, de la bFSH (lote b8). A: condiciones no reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-1ab-DEAE-3ab. B: condiciones reductoras; 1) Marcadores de PM; 2) CM-1ab-DEAE-3ab.

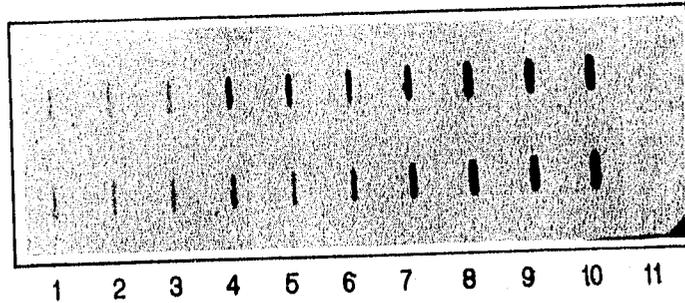


Fig. 33.- Slot-Blot de la bFSH (CM-1ab-DEAE-3ab, lote b8) en el que se utilizó una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m, un primer anticuerpo específico para la bFSH (USDA-5-pool-bFSH  $\beta$ ) a diferentes diluciones y un segundo anticuerpo anti IgG conjugado con peroxidasa de rábano 1: 500. Diluciones del primer anticuerpo: 1) 1:30 000; 2) 1: 20 000; 3) 1: 10 000; 4) 1: 5000; 5) 1: 4000; 6) 1: 3000; 7) 1: 2000; 8) 1: 1000; 9) 1: 500; 10) 1: 100; 11) control.

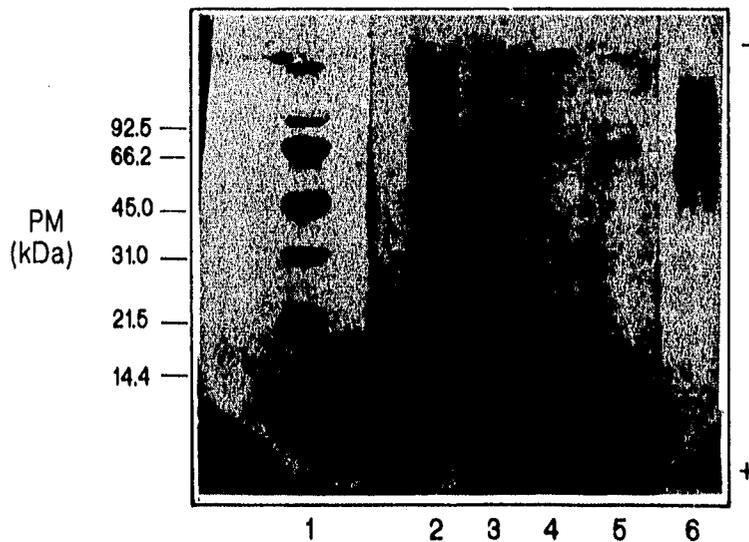


Fig. 34.- Western-Blot de la bFSH (CM-1ab-DEAE-3ab, lote b8) en el que se utilizó una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m, un primer anticuerpo específico para bFSH (USDA-5-pool-bFSH  $\beta$ ) 1: 500 y un segundo anticuerpo anti IgG conjugado con peroxidasa de rábano 1: 500. 1) Marcadores de PM; 2) Extracto crudo; 3) GLP; 4) CM-1ab; 5) CM-1ab-DEAE-3ab; 6) oFSH estándar (USDA-oFSH-18).

Estas mismas bandas se identificaron en el GLP, en el cual además se inmunotizaron otras bandas de menor PM, una de 35.8 y otra de 17.9 kDa. En el "Extracto Crudo" se reconocieron bandas que caen en un intervalo que va desde 14 kD hasta 90 kD aproximadamente (Fig. 34).

#### Caracterización Biológica.

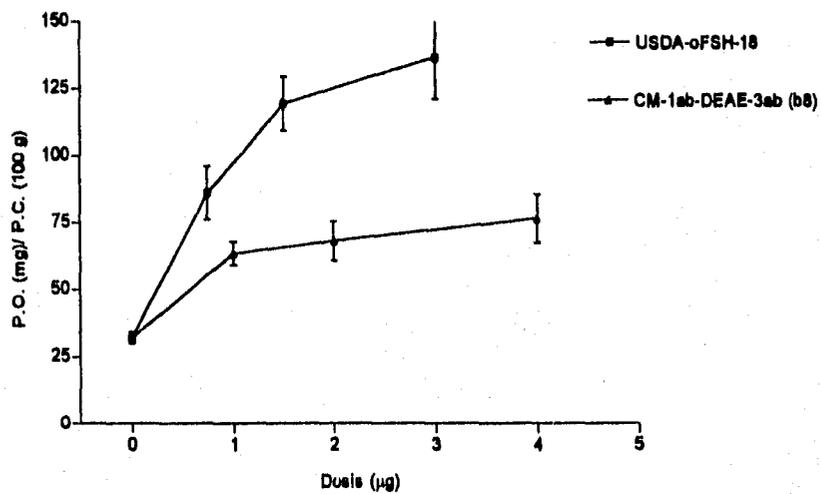
Se realizó siguiendo el criterio de Steelman y Pohley (1953). La fracción CM-1ab-DEAE-3ab se ensayó a dosis totales de 1, 2 y 4  $\mu\text{g}$  por rata, mientras que la oFSH estándar (USDA-oFSH-18, con una potencia biológica de 1640 UI/mg) se aplicó a dosis de 0.75, 1.5 y 3  $\mu\text{g}$  totales.

La fracción CM-1ab-DEAE-3ab mostró linealidad en el intervalo de dosis estudiado, aunque con una pendiente menor que la mostrada por la oFSH estándar (Fig. 35). El análisis estadístico para un bioensayo balanceado de 3 + 3, mostró que la fracción CM-1ab-DEAE-3ab tiene una potencia biológica de 152 UI/mg de proteína con límites de confianza de 8.35 UI/mg y 2765 UI/mg, la lambda tuvo un valor de 0.279 y la "g" de 0.3331.

En un bioensayo balanceado de 2 + 2, el análisis estadístico demostró que la fracción CM-1ab-DEAE-3ab tiene una potencia biológica de 223.14 UI/mg de proteína, con límites de confianza de 32.69 UI/mg y 1523 UI/mg y valores para lambda y "g" de 0.265 y 0.699 respectivamente.

Otra forma de expresar la potencia biológica de la bFSH purificada, es: 6.13 X NIH oFSH-S1 para el bioensayo 3 + 3 y de 9 X NIH oFSH-S1 para el bioensayo 2 + 2.

La respuesta biológica de la bFSH purificada en este trabajo con el criterio de S & P, no es espectacular comparada con la hormona estándar (USDA-oFSH-18). Sin embargo el desarrollo folicular es evidente como se aprecia en la Fig. 36. Esto indica que la bFSH es activa y que probablemente dicha actividad se manifestaría mejor con un bioensayo homólogo, ya que se sabe que la especificidad de especie es un factor importante a considerar cuando se analiza la bioactividad de una hormona.



**Fig. 35.-** Respuesta en el peso ovárico a la administración de dosis crecientes de bFSH (lote b8) con 25 UI de hCG (según el criterio de Steelman y Pohley, 1953), en presencia de oFSH estándar (USDA-oFSH-18). Abreviaturas: PO, peso ovárico; PC, peso corporal.

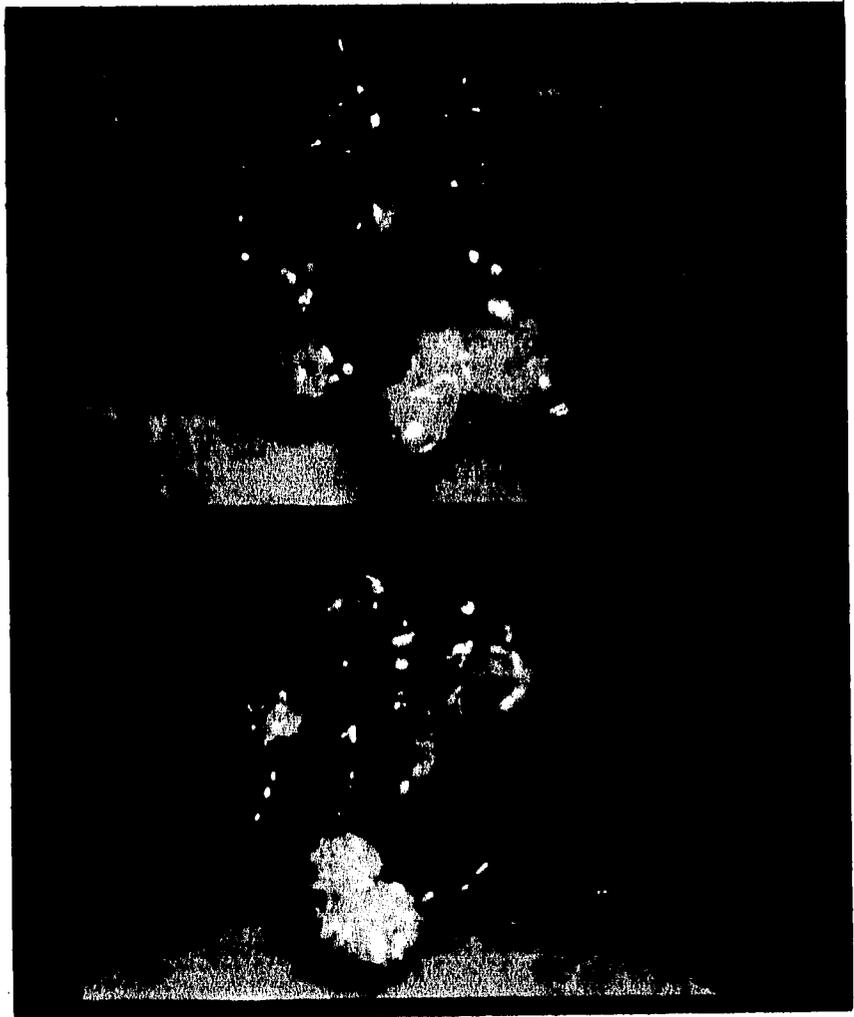


Fig. 36.- Ovarios de ratas Wistar prepúberes (22 a 23 días). A: tratadas con 2  $\mu$ g de bFSH (lote b8) y 25 UI de hCG; B: Testigo (solución salina). Aumentos 8 X.

## DISCUSION

La bFSH se obtuvo parcialmente pura mediante dos procedimientos (Tabla 6) que difieren en la forma de recolección, almacenamiento y rompimiento del tejido.

Cuando las hipófisis se colectaron en  $N_2$  líquido y almacenaron a  $-70^\circ C$ , para luego homogeneizarlas con agua (en presencia de PMSF) y posteriormente seguir el tratamiento recomendado por Stockel Hartree (lote b8), el rendimiento en cantidad de proteína total de la fracción CM-1ab fue tres veces mayor que para el lote b4, además cuando dicha fracción se sometió a otro paso de purificación (en DEAE-celulosa), se obtuvo casi la misma cantidad de proteína que para la CM-1ab del lote b4 (Tabla 5). El mayor rendimiento de bFSH para el lote b8 se puede deber al manejo del tejido al principio de la extracción.

En lo que respecta a la recolección y almacenamiento de las hipófisis del lote b4 se puede decir que: no hubo control en su colecta pues no se hizo personalmente; el rompimiento del tejido se llevó a cabo con solventes orgánicos, que si bien el objetivo de utilizarlos era la deslipidización, se sabe que pueden desnaturalizar a las proteínas (Cooper, 1977).

Por lo que se refiere al lote b8, se tuvo mayor cuidado en la recolección y almacenamiento de las glándulas, pues después del sacrificio de los animales, el tejido se colectaba inmediatamente en  $N_2$  líquido y luego en el laboratorio se almacenaban a  $-70^\circ C$  hasta su utilización. El rompimiento del tejido se hizo con agua en presencia de PMSF, para provocar una lisis osmótica y tratar de recuperar la mayor cantidad de proteína. A partir de aquí, la extracción con  $CH_3COONH_4$  10 %/EtOH pH 5.1, fue muy similar al procedimiento seguido para el lote b4.

Es evidente que las condiciones para obtener la bFSH en el lote b8, fueron menos drásticas que para el lote b4, lo cual redundó en un mejoramiento en el rendimiento de proteína, así como en la concentración de la misma con respecto al polvo pesado.

El rendimiento para la bFSH parcialmente purificada obtenida en este trabajo fue de 63.8 mg/Kg de tejido para el lote b4 y de 60 mg/Kg de tejido para el lote b8; este valor es más alto que

Tabla 6.- Comparación de la metodología utilizada para la extracción y purificación de la bFSH en los lotes b4 y b8.

Tratamiento	Lote b4	Lote b8
Almacenamiento	En acetona a 4 C	A - 70 C
Deslipidización	Con acetona y éter	No se hizo
Homogeneización	En presencia de acetona y éter.	En solución acuosa en presencia del inhibidor de proteasas PMSF
Extracción	2 completas con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , 10%/EtOH 96%, pH 5.1, por 48 h.	Una parcial (diálisis con el mismo amortiguador por 48 h.) y una completa con el mismo amortiguador, durante 48 h.
Purificación	En CM-celulosa. Se eluyó con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , 0.005 M pH 5.1	En CM-celulosa y DEAE-celulosa. En la primera se eluyó con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , 0.005 M pH 5.1 y en la segunda con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , 1 M/ Gly 0.1 M pH 5.1

el obtenido por otros autores (Tabla 7). Este resultado se puede atribuir a las óptimas condiciones en las que se extrajo y purificó a la hormona del lote b8 y a que la purificación no fue exhaustiva como en el caso de otros autores (Cheng, 1976; Grimek y col., 1979; Miller, 1987 y Wu y col., 1993). Para otras especies el rendimiento de la FSH es mayor (Papkoff, 1967; Stanton y col., 1992; Woods y col., 1960)

El tratamiento del tejido con  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  10 %/EtOH pH 5.1, permite mantener solubles a las hormonas glicoproteínicas (FSH, LH y TSH), pero provoca la precipitación de la hormona de crecimiento (GH) (Stockel y Butt, 1961). Durante la precipitación etanólica, la bFSH se obtuvo en el precipitado; la estrategia de utilizar etanol para precipitar proteínas, se basa en las propiedades de los disolventes orgánicos que disminuyen la solubilidad de las proteínas al disminuir la constante dieléctrica del medio.

En la purificación en CM-celulosa, la fracción que contiene a la bFSH (CM-1ab) no se retuvo en la columna, sino que se eluyó como la primera fracción tanto en el lote b4 como en el b8, lo que indica que al pH al que se eluyó la hormona, ésta tiene una carga neta negativa. Las fracciones retenidas en la columna mostraron un patrón cromatográfico muy semejante en ambos lotes (Figs. 8, 9, 10, 23). En la cromatografía del lote b8 se hicieron más evidentes algunas fracciones (CM-1c, CM-1d, CM-1e) (Fig. 23) probablemente debido a que en este caso se aplicó mayor cantidad de proteína a la columna.

Es importante señalar que, en este trabajo, la proteína retenida en la columna de CM-celulosa se eluyó aplicando  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  0.1 M pH 6.8 y  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1 M/Gly 0.1 M pH 9.5, en lugar de aplicar un solo amortiguador ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1 M) como lo señala Stockel Hartree (1961). Esta modificación en el gradiente escalonado provocó la resolución de dos fracciones: CM-2ab y CM-3ab; la CM-2ab contiene a la LH (Carranza y col. 1994), mientras que la CM-3ab probablemente sea una mezcla de FSH, LH, y contaminantes, dado que su patrón electroforético en geles nativos muestra bandas con  $R_f$  semejantes a dichas hormonas, no obstante su caracterización continúa en estudio (Figs. 11 y 26).

Tabla 7.- Rendimiento obtenido por varios autores para la bFSH.

Autor	Rendimiento mg prot./Kg hipófisis
Cheng K. y col. (1976)	2.7
Grimeck G. y col. (1979)	1.3
Miller K. y col. (1987)	22.2
Wu J. y col. (1993)	5.7
Carranza S.M. y col. (1996, este trabajo)	60

En lo que se refiere a la caracterización bioquímica de la bFSH, se obtuvo lo siguiente:

La movilidad relativa de la bFSH obtenida en este trabajo, tanto del lote b4 como del b8, coinciden con lo informado para la hFSH (Papkoff, 1967), la oFSH (Saxena, 1971), la FSH de mono rhesus (Matteri, 1992) y la FSH porcina (pFSH) (Steelman y Segaloff, 1959).

Ahora bien, la banda con Rf de 0.13 puede corresponder a la LH, pues es muy semejante a la movilidad relativa para la LH reportada en otros trabajos (Cheng 1979; Carranza y col., 1994). Las bandas con Rf de 0.87 y 0.95 podrían corresponder a la albúmina (datos observados en el laboratorio) o al "Componente de Movilidad Rápida" (FMC) que se ha observado cuando se analiza la LH en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (Reichert, 1973), el cual puede ser el resultado del rompimiento proteolítico.

La diferencia en el patrón electroforético entre el lote b4 y el b8, se puede deber a que dichos lotes se trataron de manera diferente en las primeras etapas de la extracción de la bFSH. No sería raro que las bandas de la bFSH observadas en estos lotes, con movilidades relativas de 0.34 a 0.55, constituyeran isoformas de la bFSH, pues se ha demostrado que existe heterogeneidad de carga para la bFSH (Reichert, 1971) y para la FSH de otras especies (Ulloa y col., 1983; Wakabayashi y col., 1984; Pierce y Parsons, 1981; Parsons y Pierce, 1984).

Por otro lado, de los resultados obtenidos del análisis en electroforesis en SDS-PAGE, de la bFSH purificada de los lotes b4 y b8, se aprecia que hay semejanza en el patrón electroforético (Figs. 14 y 30).

Con estos patrones electroforéticos se podría pensar que el monómero de la bFSH estaría entre 61 y 43 kDa y que las subunidades corresponderían a las bandas de 20.4 y 17.9 kDa, pues se ha informado por varios autores que el PM de esta hormona está entre 65 y 32.7 kDa (Wu y col., 1993; Cheng, 1976; Grimek y col., 1979).

Las glicoproteínas suelen tener un comportamiento anómalo en presencia de SDS debido a que éste se une en menor cantidad a este tipo de proteínas, lo que provoca la disminución en la relación carga/masa y esto redundaría en la menor movilidad relativa durante la electroforesis y por

lo tanto se observa un PM aparentemente mayor (Segrest y Jackson, 1972). Para evitar este problema, se recomienda incrementar la concentración del gel de tal manera que la variable predominante sea el tamaño molecular. Por esta razón se analizaron las fracciones CM-lab del lote b4 y la CM-lab-DEAE-3ab del lote b8, en geles al 15 % en condiciones reductoras y no reductoras.

Los patrones electroforéticos en estos geles para la hormona purificada de ambos lotes fue el mismo que el observado en geles al 12.5 % (Figs. 15 y 31). Estos resultados permiten concluir que la cantidad de carbohidratos que contiene la bFSH, no afecta su corrimiento en SDS-PAGE.

Por otro lado, cuando se analizó la bFSH purificada de los lotes b4 y b8, en presencia de urea, se obtuvo lo siguiente:

Los resultados obtenidos en las electroforesis en presencia de urea, indican que el grado de desagregación de la hormona purificada tanto del lote b4 como b8, es muy bajo, o bien, que se trata de moléculas de la hormona en diferente etapa del procesamiento biosintético.

Si se comparan los lotes b4 y b8 en las electroforesis en presencia y ausencia de urea, se notará que los patrones electroforéticos son muy similares; las diferencias de corrimiento se pueden deber a diferencias en el grado de agregación de la bFSH en cada uno de los lotes.

La banda de 10.83 kDa observada en el lote b4, podría ser el resultado de la proteólisis de la hormona o bien tratarse de un contaminante.

El  $\beta$ -mercaptoetanol no afectó el patrón electroforético en presencia de urea, lo que hace pensar que los agregados moleculares de la hormona purificada no son el resultado de uniones covalentes como los puentes disulfuro.

Existen controversias para definir el PM del monómero de la bFSH, pues mientras Miller y col. (1987) reportaron un PM de 18 a 20 kDa y Wu y col. (1993) bandas mayoritarias de 19.50 y 15.80 kDa en SDS-PAGE, los mismos autores informaron un PM para la bFSH de 45 kDa determinado en Sephadex G-100; así mismo, Grimek y col. reportaron un PM de 37.3 kDa utilizando la técnica de ultracentrifugación. Es evidente que el resultado dependerá de la técnica

utilizada para determinar el PM. Una mayor precisión de este parámetro se tendrá con el análisis de aminoácidos y carbohidratos de la hormona.

Hay semejanza entre las bandas de alto PM para la bFSH purificada en este trabajo y la FSH de otras especies; así, para la oFSH se ha informado un PM que va desde 33 a 21 kDa (Papkoff y col., 1967; Grimek y col., 1971), para la pFSH, de 22.9 kDa (Steelman y Segaloff, 1959) y para la hFSH, de 52 a 32 kDa (Reichert y Jinag, 1965; Saxena y Rathman, 1971; Reichert y col., 1968; Ryan, 1969; Reichert y Lawson, 1973).

En lo que se refiere a la fracción CM-1ab-DEAE-3ab, ésta tuvo reacción positiva con un anticuerpo específico para bFSH (USDA-5 pool-anti bFSH- $\beta$ ), tanto en un Slot-ELISA como en una inmunoelectrotransferencia. En este último caso, es interesante notar que las bandas reconocidas por dicho anticuerpo fueron las que presentaron mayor PM (102.32, 74.13, 61.65 y 50.11 kDa), no así las bandas mayoritarias (17.98, 16.03 y 20.41 kDa) (Fig. 34). A este respecto se podría pensar que estas últimas bandas no son reconocidas porque aunque corresponden a la bFSH, podrían estar modificadas en su estructura o bien podrían corresponder a contaminantes.

Es evidente que las bandas de 74.13, 61.65 y 50.11 kDa no son el resultado de modificaciones durante el proceso de extracción y purificación, ya que estas bandas también son reconocidas en el extracto crudo y el extracto glicoproteínico (Fig. 34).

Dado que también hubo reacción positiva en el caso de la FSH estándar de origen ovino (USDA-oFSH-18), se demuestra la similitud antigénica entre la bFSH y la oFSH. Esta observación no es rara y concuerda con lo informado sobre las semejanzas antigénicas existentes entre diferentes especies de vertebrados (Licht y Bons-Gallo, 1978; Berger y col., 1988). En este caso, las bandas que coinciden son las de 102.32, 74.13 y 50.11 kDa, lo que permite suponer que la oFSH estándar también presentó heterogeneidad de masa. Es interesante hacer notar que el PM reportado para el estándar utilizado es de aproximadamente 22 kDa en SDS-PAGE en condiciones reductoras, pero en la inmunoelectrotransferencia se reconocieron bandas de mayor PM, semejantes a las obtenidas para la bFSH purificada en este estudio.

La bFSH purificada en este trabajo, tanto del lote b4 como del b8, tiene actividad biológica según al bioensayo de Steelman y Pohley (1953).

En el caso de la bFSH obtenida del lote b4, aunque no se determinó su potencia biológica -por carecer de estándar en el momento oportuno- y pese a que el aumento de peso ovárico no fue espectacular, sino que sólo se observó una tendencia a la linealidad en un intervalo estrecho de las dosis estudiadas (de 0.125 a 1 µg), se obtuvo un incremento del peso ovárico del 40 al 104 % con respecto al testigo y por otro lado cuando los ovarios se observaron macroscópicamente (Fig. 19), el desarrollo folicular fue muy evidente

Aunque en las otras dosis estudiadas no se observó tendencia a la linealidad, sí fue claro el aumento de peso ovárico con respecto al testigo; así, la mayor respuesta se observó en las dosis de 25 y 50 µg con un aumento del peso ovárico de 210 y 232 % con respecto al testigo. Estos datos demuestran que la bFSH en el lote b4, es activa.

Cuando se estudió el aumento de peso ovárico en ausencia de hCG, la respuesta fue mínima o casi nula si se compara con el bioensayo en presencia de hCG. En este experimento, solo se observó una ligera tendencia a la linealidad en el intervalo de dosis de 1.92 a 7.6 µg. Esta mínima respuesta también quedó apoyada por la observación macroscópica de los ovarios (Fig. 22) en donde casi no hay diferencias en la morfología con respecto al testigo.

La diferencia en la respuesta biológica entre los lotes tratados con bFSH + hCG y los tratados con bFSH sin hCG, apoyan la hipótesis de "dos gonadotropinas- dos células" (Ireland, 1987), la cual propone que para que los folículos se desarrollen adecuadamente, se requieren tanto de la FSH como de la LH, así como de la presencia de las células de la teca y de la granulosa.

La bFSH obtenida en el lote b8 es activa con el criterio de Steelman y Pohley (1953); la hormona mostró un aumento del peso ovárico del 97 %, 114 % y 137 % para las dosis de 1, 2 y 4 µg respectivamente, mientras que el estándar utilizado (USDA-oFSH-18), mostró un aumento en el peso ovárico del 167 %, 270 % y 323 % para dosis de 0.75, 1.5 y 3 µg respectivamente.

La potencia biológica de la bFSH del lote b8, fue de 6.13 X NIHoFSH-S1 y de 9 X NIHoFSH-S1 para los bioensayos de 3+3 y 2+2 respectivamente, mientras que el estándar tenía una potencia biológica de 65.6 X NIHoFSH-S1. Es evidente que la hormona purificada en este lote, mostró una bioactividad aparentemente baja; sin embargo, cuando se observó la morfología de los ovarios, quedó claro que la hormona es activa (Fig.36).

La potencia biológica de la bFSH del lote b8 es el doble que la reportada para la bFSH (EX-169C) (Hsueh y col., 1983). Sin embargo, es menos activa cuando se compara con la bFSH obtenida por otros autores; Cheng (1976) reportó una actividad de 164 X NIH-FSH-S1; Grimek y col. (1979) reportaron una de 25-30 X NIH-FSH-S1 y Wu y col. (1993) informaron una potencia para la bFSH de 217 X NIH-FSH-S1.

La baja actividad observada para la bFSH de los lotes b4 y b8, se puede deber a que la pureza de la hormona es muy baja, a que se modificó durante el proceso de extracción y purificación o a la especificidad de especie. Sin embargo, estos datos coinciden con lo informado por otros autores (Reichert, 1965; Papkoff, Mahloman y Li 1967; Papkoff y Gospodarwicz, 1967; Grimek y col., 1979) quienes también han dicho que la bFSH tiene una bioactividad menor con respecto a la de otras especies.

La especificidad de especie es un aspecto importante a considerar cuando se evalúa la bioactividad de una hormona, siendo los ensayos homólogos los más adecuados para dicho propósito; sin embargo, no siempre se cuenta con la disponibilidad de los animales como en el caso de este trabajo -es muy difícil conseguir bovinos para experimentación, dado que se trata de una especie con importancia alimenticia y comercial-. Otra alternativa es utilizar a la rata de laboratorio ya que es un animal fácil de conseguir y de manejar. Esta fue la manera de evaluar la bioactividad de la bFSH purificada en este trabajo. No obstante, es necesario evaluar otros parámetros en los bioensayos "in vivo", como son la medición de los folículos, la relación de las diferentes poblaciones de foliculares y la determinación de estradiol, entre otras.

Por otro lado, también sería importante la determinación de la bioactividad de la bFSH en bioensayos "in vitro", tales como: medir la actividad de la aromataasa, tanto en tejido homólogo

como heterólogo, la utilización de marcadores moleculares, como son el ARNm de la subunidad reguladora de la adenilato ciclasa y la propia medición del cAMP. Estas son algunas de las estrategias que ayudarían a fundamentar mejor la interpretación de la respuesta biológica de la bFSH.

## CONCLUSIONES

1) Se desarrolló un método de extracción y purificación eficiente para la obtención de la hormona estimulante del folículo bovina a partir de glándulas adenohipofisarias. Mediante ella se obtienen cantidades razonables (60 mg/Kg tejido) de la hormona, lo que permitirá disponer de la bFSH para continuar con su caracterización bioquímica y biológica.

2) De los métodos empleados para obtener a la bFSH, aquella con la que se obtuvo un mejor rendimiento de la hormona consistió de: a) recolección de las glándulas de animales recién sacrificados y congelación en nitrógeno líquido; b) almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; c) homogeneización en presencia de un inhibidor de proteasas; d) extracción ácida en acetato de amonio 0.005 M pH 5.1; e) precipitación etanólica; e) cromatografías en CM-celulosa y DEAE-celulosa.

3) El rendimiento de la bFSH parcialmente purificada (fracción CM-1ab) fue de 63.8 mg de proteína por Kg de tejido para el lote b4 y de 183.6 mg de proteína por Kg de tejido para el lote b8.

4) El rendimiento de la bFSH repurificada (CM-1ab-DEAE-3ab) fue de 60 mg de proteína por Kg de tejido.

5) Con electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, la bFSH purificada mostró heterogeneidad en el patrón electroforético, con una movilidad relativa para la hormona del lote b4 de 0.46 y 0.55 y para la hormona del lote b8, de 0.34, 0.40, y 0.48. Esta movilidad es muy semejante a la de la hFSH, oFSH, pFSH y FSH de mono.

6) Con electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, la bFSH purificada tanto del lote b4 como del b8, mostraron heterogeneidad de masa. El PM probable para el monómero de la bFSH purificada puede estar en el rango de 61 a 50 kDa.

7) La bFSH del lote b8 es reconocida por un anticuerpo contra bFSH $\beta$  en un "western-blot". Las bandas detectadas fueron tuvieron una masa de: 102, 74, 61 y 50 kDa de la

8) Tanto la bFSH purificada del lote b4 como del lote b8 son activas en un bioensayo heterólogo, según el criterio de Steelman y Pohley (1953). La potencia biológica para la bFSH del lote b8 fue de 6.13 X NIH<sub>o</sub>FSH-S1 en un bioensayo balanceado 3 + 3.

9) Es necesario analizar la actividad biológica de la bFSH utilizando otros criterios diferentes del peso ovárico, como son la producción de estradiol, así como la cuantificación y/o medición de los folículos, entre otros.

## APENDICE

### **Electroforesis**

#### **Electroforesis discontinua en geles nativos de poliacrilamida al 7 % pH 8.3 (Nicol, 1969).**

##### **Solución A<sub>1</sub>**

**Acido clorhídrico (HCl) 1N                    48    ml**

**TRIS (Hidroximetil aminometano)        36.3   g**

**N,N,N'-tetrametilendiamina (TEMED)    0.230 ml**

**Después de ajustar el pH a 9.4, se llevó a 200 ml con agua.**

##### **Solución A<sub>2</sub>.**

**Acrilamida                                        28    g**

**N,N'-metilen-bis-acrilamida            0.735 g**

**Después de disolver, se llevó a un volumen final de 100 ml con agua y se filtró en papel filtro**

**Whatman No. 1.**

##### **Solución B**

**HCl 1N    48    ml**

**TRIS        5.989 g**

**TEMED    0.46 ml**

**Después de ajustar el pH a 7.4, se aforó a 100 ml con agua.**

**Solución C**

**Persulfato de Amonio al 0.14 %**

**Solución D.**

**Acrilamida 10 g**

**N,N'-metilen-bis-acrilamida 2.5 g**

**Después de disolver, se llevó a un volumen final de 100 ml con agua y se filtró.**

**Solución E**

**Riboflavina al 0.004 %**

**Gel de la muestra**

**Se preparó igual que el gel concentrador.**

**Amortiguador de corrida 5 X**

**Cámara inferior**

**TRIS 3 g**

**Glicina (Gly) 14.4 g**

**Después de ajustar el pH a 8.3, se aforó a 1 l con agua.**

**Cámara superior**

**TRIS 3 g**

**Gly 14.5 g**

Después de ajustar el pH a 8.3, se aforó a 1 l con agua. Para correr las electroforesis, se añadieron 5 ml de azul de bromofenol al 0.005 %.

#### Preparación de los geles

**Gel resoledor.-** Se mezclaron 6.5 ml de la solución A<sub>1</sub> con 6.5 ml de la solución A<sub>2</sub> y se desgasificó en un matraz kitazato durante 10 minutos. Después se agregaron 13 ml de la solución C e inmediatamente se aplicó a los tubos. Para evitar la formación de menisco se añadió un poco de agua sobre la solución de gel y se dejó polimerizando durante aproximadamente 45 minutos.

**Gel concentrador.-** Se mezclaron 1.5 ml de la solución B con 3 ml de la solución D y 1.5 ml de la solución E. Se desgasificó en un matraz kitazato cubierto con papel aluminio durante 10 minutos. Después se aplicó rápidamente a los tubos; en este caso también se añadió agua sobre la solución y se dejó polimerizando durante 20 minutos en presencia de luz natural o con un negatoscopio.

Las muestras se resuspendieron en 100 µl de solución para gel concentrador e inmediatamente se aplicaron a los tubos; para evitar el menisco se agregó un poco de amortiguador de corrida sobre las muestras..

La electroforesis se corrió a corriente constante: 1.5 mA por gel (en el concentrador) y 3 mA por gel (en el resoledor). Al finalizar la corrida, se midió la longitud del gel y del frente del colorante.



**Solución E**

**Amortiguador de la muestra**

<b>Condiciones reductoras</b>	<b>Vol. (ml).</b>
Solución C	1.25
SDS al 10 %	0.1
Glicerol	1
Azul de bromofenol al 0,05 %	0.4
$\beta$ -mercaptoetanol al 10 %	1

Estos reactivos se mezclaron y se llevaron a un volumen final de 10 ml con agua.

**Condiciones No Reductoras Vol. (ml)**

Solución C	1.25
SDS al 10 %	0.1
Glicerol	1
Azul de bromofenol al 0.05 %	0.4

Estas sustancias se mezclaron y se llevaron a un volumen final de 10 ml con agua.

**Solución F**

**Persulfato de amonio al 10 %**

Las proporciones de cada solución para preparar el gel resoledor al 12,5 % y al 15 %, fueron las siguientes:

Concentración	12.5 %	15 %
	Vol. (ml)	
Sol.B	1.5	1.5
Sol.A	2.5	3.0
H <sub>2</sub> O	2	1.5
TEMED	0.005	0.005
Sol.F	0.02	0.02

**Preparación del Gel Concentrador al 4 %.**

	Vol. (ml)
Sol C	0.63
Sol. A	0.33
Agua	1.54
TEMED	0.0025
Sol. F	0.0125

**Tratamiento de las muestras:**

- a) En condiciones reductoras: las muestras se llevaron a un volumen de 20 a 40  $\mu$ l con el amortiguador de la muestra (Sol.E) en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol y se calentaron en baño maría a 92 C durante 5 a 10 minutos.
- b) En condiciones no reductoras: el tratamiento de las muestras fue similar que en condiciones reductoras, excepto que en este caso, el amortiguador de la muestra (Sol. E) no contenía  $\beta$ -mercapto-etanol.

**Tinción de Geles.**

Azul brillante de Coomassie R-250	0.02 %
Acido Acético	10 %
Isopropanol	25 %

**Decoloración de Geles.**

Acido acético	10 %
Isopropanol	10 %

**Slot-ELISA**

**a) Amortiguador de fosfatos (PB 0.5 M)**

**Solución A**

Fosfato de sodio monobásico 3.45 g  
( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

Aforar a 50 ml con agua.

**Solución B**

Fosfato de Sodio Dibásico 12.78 g  
( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

Aforar a 180 ml con agua.

Para obtener una solución de PB 0.5 M pH de 7.4, se mezclaron 38 ml de la solución A con 162 ml de la B.

**b) PBS 0.05 M**

Se diluyó diez veces la solución de PB 0.5 M y se añadió NaCl 0.14 M.

**c) PBS-Tween**

**PBS 0.05 M**

**Tween 0.3 %**

**d) PBS-Albúmina sérica bovina (BSA)**

**PBS 0.05 M**

**BSA 3 %**

**e) Solución reveladora**

**4-cloro-1-naftol** 30 mg

**Metanol** 10 ml

**PBS** 50 ml

**Peróxido de hidrógeno 30 % (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** 0.05 ml

**f) Papel de nitrocelulosa Bio-Rad con un tamaño de poro de 0.45 µm**

**g) Primer anticuerpo contra bFSH-B (USDA-5-pool).**

**h) Segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Bio-Rad).**

**i) Cámara Hybri-Slot (BRL).**

**Procedimiento**

**Aplicación de la muestra.-** Después de humedecer el papel de nitrocelulosa con PBS 0.05 M, se colocó en la cámara Hybri-Slot y se secó con vacío durante 3 minutos. Se añadieron 100 ng de la bFSH obtenida de hipófisis congeladas, disuelta en 100 µl de PBS 0.05 M y se procedió a secar durante un minuto.

**Bloqueo.**- Se realizó con 200 µl de PBS-BSA, durante 15 horas a 4 C. Luego se secó durante aproximadamente 3 minutos y se hicieron varios lavados con 200 µl de PBS-Tween.

#### Incubación

1:5000; 1:10 000; 1:20 000 y 1: 30 000. La incubación se mantuvo durante 3 horas a 4 C.  
**Lavados.**- Se hicieron 3 lavados con PBS-Tween y 2 con PBS 0.05 M, de 10 minutos cada uno.

**Incubación con Segundo Anticuerpo Conjugado con Peroxidasa.**- Se añadieron 200 µl de este anticuerpo, diluido 1:500 en PBS-BSA y se incubó durante 1 hora a 4 C. Después se repitieron los lavados como se describe anteriormente.

**Revelado.**- Se preparó el revelador fresco y se vació en un recipiente limpio. Luego se colocó el papel de nitrocelulosa en el revelador y se agitó manualmente hasta observar la reacción positiva. La reacción se paró con varios lavados de agua desionizada.

#### Immunoelectrotransferencia.

a) Papel de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad).

b) Amortiguador de transferencia, pH 8.3.

TRIS (Tris[hidroximetil]amino-metano) 25 mM.

Gly 192 mM

Metanol 20 %

c) PBS 0.05 M, PBS-Tween, PBS-BSA y solución reveladora.

Se prepararon de la misma manera que para el Slot-ELISA.

d) Primer anticuerpo contra bFSH-β (USDA-5-pool).

- e) Segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Bio-Rad).
- f) Cámara para geles en placa Mini-Protean II (Bio-Rad).
- g) Cámara para transferencia Mini Trans-Blot (Bio-Rad).

#### **Procedimiento**

Después de realizar una electroforesis en SDS-PAGE al 12.5 % en condiciones reductoras, se llevó a cabo la transferencia en papel de nitrocelulosa en las siguientes condiciones: 200 mV durante 1 hora a 4 C.

**Bloqueo.-** Para evitar reacciones inespecíficas con el primer anticuerpo, la membrana de nitrocelulosa se saturó con PBS-BSA 3 %, , durante 15 horas aproximadamente.

**Incubación con el primer anticuerpo (Anti bFSH- $\beta$ -USDA-pool-5).**- Esta se llevó a cabo con el anticuerpo diluido 1:500 durante 24 horas aproximadamente a 4 C.

**Lavados.-** Se hicieron 3 lavados con PBS-Tween y 2 con PBS, de 10 minutos cada uno.

**Incubación con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa.-** El segundo anticuerpo se diluyó 1:500 y se incubó por 20 horas aproximadamente a 4 C. Luego se hicieron lavados como se menciona anteriormente.

**Revelado.-** Este se llevó a cabo como se describe para el Slot-ELISA.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. 1994 Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York. pp 1022-1023
- 2.- Anderson E., Wilkinson R., Lee G., and Meller S. 1978. A correlative microscopical analysis of differentiating ovarian follicles of mammals. *Journal of Morphology*. 156: 339-366
- 3.- Ax R.L. and Ryan R. J. 1979. FSH stimulation of <sup>3</sup>H-glucosamine incorporation into proteoglycans by porcine granulosa cells in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 49: 646 - 648
- 4.- Beck A., Vellucci V. and Curry K. 1985. Cloning and expression of DNAs coding for follicle-stimulating hormone. *DNA* 4: 76-76.
- 5.- Berger P., Panmoung W., Khaschabi D., Mayregger B. and Wick G. 1988. Antigenic features of human follicle stimulating hormone delineated by monoclonal antibodies and construction of an immunoradiometric assay. *Endocrinology* 123 : 2351-2359.
- 6.- Beers W.H. and Strickland S. 1978. A cell culture assay for follicle-stimulating hormone. *Journal and Biological Chemistry*. 253: 3877-3881
- 7.- Berne R.M. and Levy M.N. 1988 *Physiology*. The C.V. Mosby Company, Washington D.C. 1077 p.
- 8.- Block E. 1952. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. *Acta Anatomica*. 14: 108-123.
- 9.- Boime I., Keene J., Galway A.B., Fares F.A.M., LaPolt P., and Hsueh A.J.W. 1992 Expression of recombinant human FSH, LH and CG in mammalian cells: a model for probing functional determinants. In "Follicle stimulatig hormone". *Serono Symposia USA* (Hunzicker-Dunn M and Schwartz N., eds.), Norwell, Massachusetts pp. 120-128.
- 10.- Bolander F.F. 1989. *Molecular Endocrinology*. Academic Press, Inc., New York pp. 11.
- 11.- Boorstein W.R., Vamvakopoulos N.C. and Fiddes J.C. 1982. Human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem and inverted pairs. *Nature* 300: 419-422.
- 12.- Bousfield G. and Ward D.N. 1984. Purification of lutropin and follitropin in high yield from horse pituitary glands. *Journal of Biological Chemistry*. 259: 1911-1921.

- 13.- Braselton W.E. Jr. and Mc Shan W.H. 1970. Purification and properties of follicle-stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 139: 45-58.
- 14.- Butt W.R., Crooke A.C. and Cunningham F.J. 1961. Studies on human urinary and pituitary gonadotrophins. *Biochemistry Journal* 81: 596-605.
- 15.- Byskov A.G. and Høyer P.E. 1988. Embryology of mammalian gonads and ducts. In "The Physiology of Reproduction" (Knobil E. and Neill J.D.eds.) Vol. I. Raven Press, New York pp. 265-302.
- 16.- Carranza S.M.E., Villagómez A.M.E., Neri B.R. y Salas V.A. 1994. Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Técnica Pecuaria en México*. 32: 5-17.
- 17.- Chappel S.C., Ulloa-Aguirre A. and Coutifaris C. 1983a. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology Review*. 4: 179-211.
- 18.- 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
- 19.- Chappel S.C., Coutifaris C., Jacobs S.J. 1982. Studies on the microheterogeneity of FSH present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology* 110: 847-854.
- 20.- Cheng K.W. 1976. Purification and properties of bovine pituitary follitropin. *Biochemistry Journal*. 159: 651-659.
- 21.- Cheng K.W. 1978. Isolation and characterization of the subunits of bovine follitropin. *Biochemistry Journal*. 175: 29-34.
- 22.- Chin W.W., Godine J. E., Klein D.R., Chang A.S., Tan L.K. and Habener J.F. 1983. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of the  $\beta$ -subunit of rat lutropin. *Proceedings of the National Academic Science, USA* 80: 4649-4653.
- 23.- Clapp C., Tomer L., Gutiérrez Ospina G., Alcántara E., del Río T. y López F. 1993. Divergencia funcional de mensajeros proteicos. En "Comunicación Neuroendócrina". Soc. Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México pp.165-181.
- 24.- Cooper T.G. 1977. *The Tools of Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York p 355- 391.
- 25.- Domínguez R. 1993. Las secreciones periódicas y la regulación de la ovulación. En "Comunicación Neuroendócrina", Soc. Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México pp.251-259.

- 26.- Dorrington J.H., Armstrong D.T. 1979. Effect of FSH on gonadal functions. *Recent Progress in Hormone Research* 35: 301-342.
- 27.- Ellis S. 1961. Studies on the serial extraction of pituitary proteins. *Endocrinology*. 69: 554-570.
- 28.- Erickson G.F., Magoffin D.A., Dyer C.A. and Hofeditz C. 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrinology Review* 6: 371-399.
- 29.- Esch F.S., Mason A.J., Cooksey K., Mercado M. and Shimasaki S. 1986. Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the  $\beta$  chain of bovine follicle stimulating hormone. *Proceedings National Academic Science USA* 83: 6618-6621.
- 30.- Everett W. J. 1988. The hypophysis and hypothalamus: perspectives and overview. In "The Physiology of Reproduction" (Knobil E. Neill J.D., eds.) Vol I. Raven Press, New York. pp. 1143-1161.
- 31.- Falk B. 1959. Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiologica Scandinavica Supplement* 47. 163: 1-101.
- 32.- Farmer S.W. Papkoff H. 1979. Comparative biochemistry of pituitary growth hormone, prolactin and the glycoprotein hormones. In "Hormones and Evolution" (Barrington E.J. W, ed.) Academic Press, New York 2: 525-560.
- 33.- Farmer S.W., Ramachandran J. and Papkoff H. 1972. Lipolytic activity of gonadotropins and their subunits. *Endocrinology* 91: 543-548.
- 34.- Fevold H.L., Hisaw F.L. and Leonard S.L. 1931. The Gonad-stimulating and luteinizing hormones of the anterior lobe of the hypophysis. *American Journal of Physiology* 97: 29-301.
- 35.- Fiddes J. and Goodman H. 1981. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *Journal of Molecular Applied Genetic*. 1: 3-18.
- 36.- Fiddes J. and Goodman H.M. 1980. The cDNA for the  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by read through into the 3'-untranslated region. *Nature* 286: 684-687.
- 37.- Fink G. 1988. Gonadotropin secretion and its control. In "The Physiology of Reproduction" (Knobil E. and Neill J.D., eds.) Raven Press, New York pp. 1349-1377.
- 38.- Foulds L.M. and Robertson D.M. 1983. Electrophocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone from male and female rats. *Molecular Cell Endocrinology*. 31: 117-130.

- 39.- Gilula N., Epstein M. and Beers W. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cummulus cell-oocyte complex. *Journal of Cell Biology*. 78: 58-75.
- 40.- Godine J.E., Chin W.W. and Habener J.F. 1980. Luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Journal of Biological Chemistry* 255: 8780-8783.
- 41.- Godine J.E., Chin W.W. and Habener J.F. 1982.  $\alpha$ -subunit of rat pituitary glycoprotein hormones. primary structure of the precursor determined from the nucleotide sequence of cloned DNAs. *Journal of Biological Chemistry* 257: 8368-8371.
- 42.- Greep R.O., van Dyke H.B. and Chow B.F. 1942. Gonadotropins of the swine pituitary I. Various biological effects of purified thylokentrin (FSH) and pure metakentrin (ICSH). *Endocrinology*. 30 635-649.
- 43.- Grimek H.J., Gorsky J. and Wentworth B.C. 1979. Purification and characterization of bovine follicle-stimulating hormone: comparison with ovine follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 104: 140-147.
- 44.- Guyton A.C., 1983. *Endocrinología y Reproducción*. En "Fisiología Humana". Interamericana, México pp. 477-514.
- 45.- Hafez E.S.E. 1993. *Reproduction in Farm Animals*. Lea & Febiger, Philadelphia pp. 27-30.
- 46.- Hartree E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Annals of Biochemistry*. 48: 422-427.
- 47.- Hertig A., and Adams E. (1967) Studies on the human oocyte and its follicle. Ultrastructural and cytochemical observations on the primordial follicle stage. *Journal of Cell Biology*. 34: 647-675
- 48.- Hsueh A.J.W., Erickson G.F. and Papkoff H. 1983. Effect of diverse mammalian gonadotropins on estrogen and progesterone production by culture rat granulosa cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 225 : 505-511.
- 49.- Hsueh A., Adashi E. Y., Jones P.B.C. and Welsh T.H. Jr. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrinology. Reviews*. 5: 76-127.
- 50.- Hsueh A.J., Bicsak T.A., Jia X.C., Dahl K.D., Fauser B.C.J.M., Galway A.B., Czekala N., Pavlou S.N., Papkoff H., Kreene J. and Boime I. 1989. Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*. 45: 209-277.
- 51.- Ireland J.J. 1987. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 34 : 39-54.

- 52.- Ishi S. 1991. Gonadotropins. In "Vertebrate Endocrinology": Fundamentals and Biomedical Implications (Pang P.K.T. and Schreiber M.P. eds.) Academic Press, Inc., New York. pp. 33
- 53.- Jia X.C., and Hsueh A.J.W. 1985. Sensitive in vitro bioassay for the measurement of serum follicle-stimulating hormone. *Neuroendocrinology* 41:445-448
- 54.- Junqueira L.C. y Carneiro J. 1981. *Histología Básica*. Salvat Editores S.A. México pp. 437-459.
- 55.- Kato Y. 1988. Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of porcine follicle-stimulating hormone (FSH)  $\beta$  subunit. *Molecular Cell Endocrinology* 55: 107-112.
- 56.- Kim K.E., Gordon D. and Maurer R.A. 1988. Nucleotide sequence of the bovine gene for follicle-stimulating hormone  $\beta$ -subunit. *DNA* 7: 227-233.
- 57.- Kitaoka M., Kojima J., Ogata E. 1988. Activin A: A modulator of multiple types of anterior pituitary cells. *Biochemistry and Biophysical Research Communication*. 157: 48-54.
- 58.- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 59.- Lehninger A.L. 1991 *Bioquímica*. Omega S.A., Barcelona. pp 721.
- 60.- Leung P.C.K. and Armstrong D.T. 1980. Interactions of steroids and gonadotropins in the control of steroidogenesis in the ovarian follicle. *Annual Review of Physiology* 42: 71-82.
- 61.- Li C.H., Simpson M.E., and Evans H.M. 1949. Isolation of pituitary follicle-stimulating hormone (FSH). *Science* 109: 445-446.
- 62.- Licht P., Papkoff H., Farmer S.W., Muller Ch.H., Tsui H.W., and Crews D. 1977a. Evolution of gonadotropin structure and function. *Recent Progress in Hormone Research*. 33: 169-248.
- 63.- Licht P. and Bona Gallo A. 1978. Immunochemical relatedness among pituitary follicle-stimulating hormones of tetrapod vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 36: 575-584.
- 64.- Long J.A. and Evans H.M. 1922. The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California* 6: 1-111.
- 65.- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- 66.- Luderer U. and Schwartz N. 1992 An overview of FSH. Regulation and action. In "Follicle Stimulating Hormone", Serono Symposia, USA (Hunzicker-Dunn M. and Schwartz N.B., eds), Norwell, Massachusetts pp. 1- 25.

- 67.- McFarland W.N., Pough F.H., Cade T.J., Heiser J.B. 1979. *Vertebrate Life*. McMillan Publishing Co., New York, pp 513-523.
- 68.- Matteri R.L., Warikoo P.K., Bavister B.D. 1992. Biochemical and biological hormone (FSH) from the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology* 22: 205-213.
- 69.- Maurer R.A. 1987. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of complementary deoxyribonucleic acid for the  $\beta$ -subunit of rat follicle stimulating hormone. *Molecular Endocrinology* 1: 717-723.
- 70.- Maurer R.A. and Beck A. 1986. Isolation and nucleotide sequence analysis of a cloned cDNA encoding the  $\beta$ -subunit of the bovine follicle-stimulating hormone. *DNA* 5: 363-369.
- 71.- Mendelson C.R., Durham C. Evans C., Simpson E.R. 1985. The induction of aromatase activity in estrogen-producing cells is mediated by the increase of aromatase cytochrome P-450. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of The Endocrine Society pp. 77 (Abs. 307).
- 72.- Merchant H. pp. 1991 Gametogénesis. En "Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción" (R. Domínguez Casallá, coord.). UNAM y Porrúa, México pp.11-39).
- 73.- Miller K.F., Goldsby R.A. and Bolt D.J. 1987. Immunoaffinity chromatography of bovine FSH using Monoclonal antibodies. *Journal of Endocrinology*. 127: 283-288.
- 74.- Mizunuma H., Samsom W.K., Lumpkin M.D., Maltz J.H., Fawcett C.P. and Mc Cann S.M. 1983. Purification of a bioactive FSH-releasing factor (FSHRF). *Brain Research Bulletin* 10 623-629.
- 75.- Nicoll C.S., Parsons J.A., Fiorindo R.P. and Nichols C.W. Jr. 1969. Estimation of prolactin and growth hormone levels by polyacrylamide disc electrophoresis. *Journal of Endocrinology* 45: 183-196
- 76.- Norris D.O. 1980. The Endocrinology of Reproduction. In "Vertebrate Endocrinology". Lea and Febiger. Philadelphia pp. 333-391.
- 77.- Papkoff H., Gospodarwicz D. and Cho H. L. 1967. Purification and properties of ovine follicle-stimulating hormone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 120: 434-439.
- 78.- Papkoff H., Mahlmann L.J., and Li C.H. 1967. Some chemical and physical properties of human pituitary follicle-stimulating hormone. *Biochemistry* 6: 3976-3982.
- 79.- Papkoff H., Sairam M.R., Farmer S.W. and Li C.H. 1973. Studies on the structure and function of interstitial cell-stimulating hormone. *Recent Progress in Hormone Research*. 29: 563-590.

- 80.- Parsons T.F. and Pierce J.G. 1984. Free  $\alpha$  - like material from bovine pituitaries. *Journal of Biological Chemistry* 259: 2662-66.
- 81.- Pearse A.G.E: 1971 The endocrine polypeptide cells of the APUD series (structural and functional correlations). En Heller H. y Lederis K. (comps.), *Memoirs of the Society for Endocrinology*, núm. 19, pp. 543- 557, Cambridge University Press.
- 82.- Peckham W.D. and Parlow A.F. 1969. Isolation from human pituitary glands of three discrete electrophoretic components with high luteinizing Hormone Activity. *Endocrinology* 85: 618-22.
- 83.- Peckham W.D., Yamaji T., Dierschke D., Knobil E. 1973. Gonadal function and the biological and physicochemical properties of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 92: 1660-1666.
- 84.- Pedernera E.A. 1993 Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En "Comunicación Neuroendócrina". Soc. Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México pp. 33-47.
- 85.- Peters H. 1978. Folliculogenesis. In "Mammals. In "The Vertebrate Ovary Comparative Biology and Evolution". Plenum Press, New York pp. 121-144.
- 86.- Pierce J.G. 1988. Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. In "The Physiology of Reproduction" (Eds. Knobil E., Neill J.D.,eds.). Vol I. Raven Press, New York pp. 1335-1349.
- 87.- Pierce J.G. and Parsons T.F. 1981. Glycoprotein Hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry* 50: 465-495.
- 88.- Reichert L.E. Jr. 1971. Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrophocusing. *Endocrinology*. 88: 1029-1044.
- 89.- Reichert L.E. Jr. and Lawson G.M. Jr. 1973. Molecular weight relationships among the subunits of human glycoprotein hormones. *Endocrinology* 92: 1034-1042.
- 90.- Reichert L.E. Jr. and Jiang N.S. 1965. Studies on bovine pituitary follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 77: 124-127.
- 91.- Reichert L.E. Jr., Kathan R.H. and Ryan R.J. 1968. Studies on the composition and properties of immunological grade human pituitary follicle stimulating hormone (FSH): comparison with luteinizing hormone. *Endocrinology* 82: 109-114.
- 92.- Richards J.S. and Hedin L. 1988. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *American Review of Physiology*. 50:441-463.

- 93.- Richards J.S., Johansen T., Hedin L., Lifka J., Ratoosh S., Durica J.M. and Goldrin N.B. 1987. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Progress in Hormone Research* **43**: 231-276.
- 94.- Ryan K.J., Petro Z., Kaiser J. 1968. Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and theca cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **28**: 355-358.
- 95.- Ryan R.J. 1969. Stokes radius of human pituitary hormones and demonstration of dissociation of luteinizing hormone. *Biochemistry* **8**: 495-501.
- 96.- Ryan R.J., Charlesworth M.C., McCormick D.J., Milius R.P. and Keutmann H.T. 1988. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **2**: 2661-2669.
- 97.- Ryle M., Chaplan M.F., Gray C.J., and Kennedy J.F. 1970. Gonadotropins and Ovarian Development Livingstone Edinburg. pp. 98-106
- 98.- Sairam M.R. 1981. Primary structure of the ovine pituitary follitropin  $\alpha$ -subunit. *Biochemistry Journal* **197**: 535-539.
- 99.- Sairam M.R. and Papkoff H. 1974. Chemistry of pituitary gonadotropins. In "Handbook of Physiology", section 7: Endocrinology (Greep R., Astwood E.B., Knobil E., Sawyer W.H. and Geiger S.R., eds.). American Physiological Society, Washington D.C. pp. 111-131.
- 100.- Saxena B.B. and Rathman P. 1971. Dissociation phenomenon and subunit nature of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. *Journal of Biological Chemistry* **246**: 3549-3554.
- 101.- Schneyer A.L., Sluss P.M., Bosukonda D. and Reichert L.E. Jr. 1986. Electrophoretic purification of radioiodinated follicle-stimulated hormone for radioligand receptor assay and radioimmunoassay. *Endocrinology* **119**: 1446-1453.
- 102.- Segaloff A. and Steelman S.L. 1959. The human gonadotropins. *Recent Progress in Hormone Research* **15**: 127-142.
- 103.- Segrest J.P. and Jackson R.L. 1972. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. In "Methods in Enzymology" (Ginsburg V., ed.) vol. 28 B pp. 54-63.
- 104.- Stanton P.G., Robertson D.M., Burgon P.G., Schmauk-White B. and Hearn T.W. 1992. Isolation and physicochemical characterization of human follicle-stimulating hormone isoforms. *Endocrinology*. **130**: 2820-2832.
- 105.- 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.

- 106- Steelman S.L. and Segaloff A. 1959. Recent studies on the purification of the pituitary gonadotropins. *Recent Progress in Hormone Research*. 15: 115-125
- 107.- Stewart M., Stewart F. 1977. Constant and variable regions in glycoprotein hormone beta subunit sequences: implications for receptor binding specificity. *Journal of Molecular Biology* 116: 175-179.
- 108.- Stockell H.A. 1975. Purification of human pituitary glycoprotein hormones. In "Methods of Enzymology", Vol. 37. part. 13 pp. 380-389.
- 109.- Stockell Hartree. 1966. Separation and partial purification of protein hormones from human pituitary glands. *Biochemistry Journal*. 100: 754-761.
- 110.- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. *Proceedings of National Academic of Science USA*. 76: 4350-4354.
- 111.- Ulloa-Aguirre A. 1991. Aspectos bioquímicos-funcionales de la hormona estimulante del folículo. En "Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción". (Roberto D. Casali, coordinador). Mig. A. Porrúa, México. pp.83-92.
- 112.- Ulloa-Aguirre A., Coutifaris C., Chappel S.C. 1983. Multiple species of FSH are present within hamster anterior pituitary cells cultured in vitro. *Acta Endocrinologica*. 102: 343-350.
- 113.- Ulloa-Aguirre A., Mejía J.J., Domínguez R., Guevara-Aguirre J., Díaz-Sánchez V. and Larrea F. 1986. Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *Journal of Endocrinology* 110: 539-549.
- 114.- Van Damme M.P., Robertson D.M., Marano R., Ritzen E.M., Diczfaluzi E. 1979. A sensitive and specific in vitro bioassay method for the measurement of follicle-stimulating hormone activity. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)* 91: 224-237
- 115.- van Hell H. Schuur's A.H.W.M., and den Hollander F.C. 1972. Purification and some properties of human urinary FSH and LH. In "Gonadotropins". (B.B. Saxena, C.G. Beling, H.M. Gandy Eds.) Wiley Intersci, New York. pp.185-199.
- 116.- Wakabayashi K., Hattori M., Sakamoto K. and Minegishi T. 1984. Mammalian gonadotropins-polymorphism, biosynthesis and release. *Gunna Symposia on Endocrinology* 21: 93-106.
- 117.- Wang C., Hsueh A.J.W. 1982 The role of cyclic AMP in the induction of estrogen and progesterin synthesis in cultured granulosa cells. *Molecular Cell Endocrinology* 25: 73-83.
- 118.- Weick R.F., Smith E.R., Domínguez R., Dhariwal A.P.S., Davidson J.M. 1971. Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology*. 88: 293-301.

119.- Woods M.C., Simpson M.E. 1960. Purification of sheep pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) by ion exchange chromatography on diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose. *Endocrinology* 66: 575-584.

120.- Wu J.B., Stanton P.G., Robertson D.M. and Hearn M.T.W. 1993. Isolation of FSH from bovine pituitary Glands. *Journal of Endocrinology* 137: 59-68.