



01694
3
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

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

**PATRON DE DISTRIBUCION DE ISOFORMAS DE LA
HORMONA LUTEINIZANTE (LH) INTRAHIPOFISARIA
Y SERICA EN LA ESPECIE BOVINA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

JOSE GERARDO PERERA MARIN

TUTOR:

DR. EVERARDO GONZALEZ PADILLA

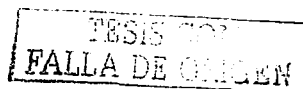
COMITE TUTORAL:

DR. CARLOS VALVERDE RODRIGUEZ

DR. LUIS ZARCO QUINTERO

DRA. CARMEN ACEVES VELASCO

DRA. ANGELICA SALAS VALDES †



MEXICO, D. F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo en MEMORIA a dos mujeres triunfadoras e incansables, hoy ya no se encuentran entre nosotros, sin embargo, siempre formarán parte de mi vida,

¡Nunca las olvidaré!

A mi Madre: Leonor Marín Zamora, ¡gracias! por motivarme.

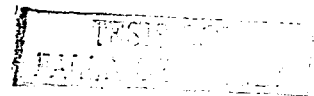
A mi Maestra: Dra. Angélica Salas Valdés, gracias por creer en mi y no tengo palabras para agradecerle lo mucho que hizo durante gran parte de mi vida académica, ¡gracias Angélica!

UNA DEDICATORIA ESPECIAL

A mi Esposa, Clara Murcia Mejía, Clara, gracias por ser mi esposa y compañera en todos estos momentos, este trabajo es tuyo.

A mi Hija, María Alejandra Perera Murcia, cuando llegaste llenaste parte de mi vida, cuidate y triunfemos juntos.

A mi Hijo, Gerardo Rodrigo Perera Murcia, eres y siempre serás mi orgullo en cualquier momento de mi vida.



AGRADECIMIENTOS

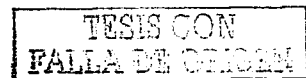
Por supuesto a la familia Murcia Mejía, Uribe Murcia y Sergio Santiago, por permitirme formar parte de su familia, gracias por su apoyo en los momentos más difíciles de mi vida.

Al personal Académico, estudiantes y administrativos del Departamento de Reproducción, por su ayuda en cada parte de este trabajo. En particular al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar por su apoyo y comentarios en la realización de este trabajo, gracias, Carlos.

Un agradecimiento muy especial, al Dr. Everardo González Padilla, por ser un gran tutor y por confiar en mi, gracias.

Susana Rojas Mayas, gracias por compartir este camino difícil que es la Ciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la aprobación de la Beca-crédito, además del financiamiento del proyecto 25748-B



ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	III
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Función de las gonadotropinas	4
2.2 Gonadotropos	4
2.2.1 Identificación de los gonadotropos en la hipófisis	5
2.2.2 Regulación de los gonadotropos	5
2.2.3 Proporción de gonadotropos en el ciclo estral	6
2.3 Estructura de la LH	7
2.3.1 Subunidad α	7
2.3.2 Subunidad β	8
2.3.3 Estructura polipeptídica	9
2.4 Estructura-función de los oligosacáridos	10
2.4.1 Mecanismo de glicosilación	11
2.4.2 Modificación química de los oligosacáridos en el Aparato de Golgi	11
2.4.3 Tipo de oligosacáridos de la LH	12
2.4.4 Función de los oligosacáridos	15
2.5 Mecanismo de acción	16
2.5.1 Tipo de receptor de la LH	16
2.5.2 Características del receptor	17
2.5.3 Mecanismo de acción	18
2.6 Síntesis y regulación de la LH	19
2.6.1 Síntesis	19
2.6.2 Regulación	20
2.6.2.1 GnRH	20
2.6.2.2 Estradiol	22
2.6.2.3 Progesterona	23
2.6.2.4 Sistema activina-inhibina-folistatina	25
2.7 Vida media de la LH	27

2.8 Heterogeneidad estructural y funcional de la LH	28
2.8.1 Isoformas de la LH en los rumiantes	29
CAPITULO 3. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	34
CAPITULO 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
CAPITULO 5. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS CIRCULANTES DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH) BOVINA, DURANTE LA ETAPA DE ESTRO Y DIESTRO.	37
CAPITULO 6. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS INTRAHIPOFISARIAS DE LAS GONADOTROPINAS EN VAQUILLAS CEBÚ X SUIZO.	57
CAPITULO 7. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CINCO ISOFORMAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE BOVINA (bLH). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, BIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA.	71
CAPITULO 8. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.	89
REFERENCIAS	95
APENDICES I, II	110

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

José Gerardo Perera Marín: PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE ISOFORMAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH) INTRAHIPOFISARIA Y SERICA EN LA ESPECIE BOVINA (Bajo la dirección del Ph.D. Everardo González Padilla)

El polimorfismo de las gonadotropinas en la hipófisis, suero y orina, se debe en parte, a la variada estructura de sus oligosacáridos que las constituyen, lo que repercute en sus propiedades inmunológicas y biológicas. Este fenómeno es regulado por la GnRH, los péptidos gonadales y el estradiol, cuyas evidencias, se han documentado en múltiples especies, que incluyen a los rumiantes, sin embargo, los estudios de la heterogeneidad de la LH en bovinos, se han limitado a conocer este pleomorfismo en la hipófisis y bajo el efecto del estradiol y la GnRH. Por ello, en este trabajo, se examinó, el patrón de distribución de las isoformas de la LH circulantes en dos etapas del ciclo estral (estro vs diestro), por otro lado, se analizó el efecto de la progesterona sobre el patrón de la LH y FSH intrahipofisarias y se aislaron y purificaron isoformas de la LH de adenohipófisis bovinas. Para ello, se utilizó suero de vaquillas Holstein, colectado en la etapa de estro y diestro; hipófisis de vaquillas Cebú X Suizo, obtenidas después del tratamiento con progesterona y para la purificación de isoformas de la LH, se utilizaron adenohipófisis bovinas en diferentes condiciones fisiológicas. La concentración de la LH y FSH presente en suero e hipófisis, se determinó por medio del radioinmunoensayo específico para cada hormona y la heterogeneidad de las gonadotropinas se determinó por medio del cromatofoco, que se eluyó con un gradiente de pH de 10.3 a 3.5. La LH y FSH eluidas durante el cromatofoco, se agruparon en isoformas básicas (pH>7.5), neutras (pH 7.5-6.5) y ácidas (pH<6.5). así como por unidad de pH. Las isoformas básicas de la LH en la circulación fueron las más abundantes, esto fue significativamente mayor en el diestro ($78.4 \pm 4.2\%$) que en el estro ($57.1 \pm 6.2\%$); en contraste, las formas neutras ($13.7 \pm 2.6\%$) y ácidas ($28.5 \pm 2.8\%$) en el estro fueron superiores a lo observado en el diestro (3.0 ± 0.7 y 18.7 ± 3.4). Por otro lado la heterogeneidad de la LH y FSH presente en la hipófisis no se modificó con el efecto de la progesterona y finalmente se obtuvieron cinco isoformas de la LH con suficiente rendimiento y alta pureza. Estos resultados, indican que la condición ovárica afecta la proporción relativa de distintas isoformas de la LH que se sintetizan y secretan por la adenohipófisis, por otro lado, se demostró que la progesterona no modifica el patrón de distribución de la isoformas intrahipofisarias de las gonadotropinas y finalmente, se cuenta con una metodología sencilla de obtención y purificación de isoformas de la LH, lo que permitió la obtención de isoformas con suficiente rendimiento para el desarrollo de su correspondiente sistema analítico.

Palabras claves: Bovina, Diestro, Estro, Isoformas, Purificación

Abstract

José Gerardo Perera Marín: INTRAHYPOPHYSEAL AND SERUM LUTEINIZING HORMONE (LH) ISOFORMS DISTRIBUTION PATTERN IN COWS (Under the direction of Ph.D. Everardo González Padilla)

Gonadotropins polymorphism in the hypophysis, serum and urine is due, in part, to its varied oligosaccharide structure, which influences its immunological and biological properties. This phenomenon is regulated by GnRH, gonadal peptides and estradiol, as has been evidenced and documented in multiple species, including ruminants. However, studies on LH heterogeneity in cattle have been limited to knowing that said pleomorphism exists in the hypophysis and that it is under the effect of estradiol and GnRH. Thus, in this study, the LH isoform distribution pattern in two stages of the estrus cycle (estrus and diestrus) was examined. Furthermore, the effect of progesterone on the intrahypophyseal pattern of LH and FSH was analyzed, and cattle adenohipophyseal LH isoforms were purified. For this, Holstein heifer serum was collected during the estrus and diestrus stages. Furthermore, Zebu/Swiss heifer hypophyses, obtained following progesterone treatment were collected for purification of the LH isoforms; the bovine adenohipophyses used were under different physiological conditions. LH and FSH concentration present in serum and the hypophysis was determined using specific radioimmunoassay tests for each hormone. Gonadotropin heterogeneity was determined using chromatofocusing, eluted to a pH gradient ranging from 10.3 to 3.5. LH and FSH eluted during chromatofocusing were grouped in basic (pH>7.5), neutral (pH 7.5 to 6.5) and acidic (pH<6.5) isoforms, as well as by pH unit. The basic LH circulating isoforms were the most abundant, being significantly greater in diestrus ($78.4 \pm 4.2\%$) than in estrus ($57.1 \pm 6.2\%$). In contrast, neutral ($13.7 \pm 2.6\%$) and acidic ($28.5 \pm 2.8\%$) isoforms in estrus were greater than those observed in diestrus (3.0 ± 0.7 and 18.7 ± 3.4 , respectively). On the other hand, LH and FSH heterogeneity present in the hypophysis was not modified by the effect of progesterone. Finally, five LH isoforms of sufficient yield and high purity were obtained. These results indicate that ovaric condition affects the relative ratio of the different LH isoforms that are synthesized and secreted by the adenohipophysis. On the other hand, they also demonstrated that progesterone does not modify the pattern of distribution of the different intrahypophyseal gonadotropin isoforms, and, finally, that there is a simple method for obtaining and purifying LH isoforms that allows one to obtain isoforms of sufficient yield for the development of a corresponding analytic system.

Key works: Bovine, Diestrus, Estrus, Isoforms, and Purification

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Perfil de distribución de la LH en el suero de bovino, colectado en la etapa de estro y diestro. Cada gráfico representa el perfil de la LH de un animal y el círculo indica, la muestra utilizada para el análisis de la heterogeneidad de la LH por medio del cromatoenfoque. Las muestras sanguíneas obtenidas en cada animal en la etapa de estro, fueron colectadas cada dos horas después de la presentación del estro, hasta las 24h post-estro. En tanto que las muestras sanguíneas en la etapa de diestro, se obtuvieron cada 15 min., después del estímulo con la GnRH (250 μ g/i.v.animal) por un periodo de 5h.

Figura 2. Estandarización del sistema de radioinmunoensayo de la LH. **A)** Titulación del anticuerpo anti-oLH-26. Las diferentes diluciones de anticuerpo se mezclaron con suero normal de conejo (SNC) 1:400, 1:1600 y 1:3200, y se incubaron durante 48 h en presencia del antígeno marcado (USDA-bLH-B5). El sistema de separación de la fracción unida de la libre correspondió a segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo generado en burro). **B)** La curva de referencia, se desarrollo con el estándar USDA-bLH-b5, a las dosis de 0.03 a 32 ng/tubo en un volumen de 100 μ l, 200 μ l de primer anticuerpo (anti-oLH-26) a una dilución de trabajo de 1:20,000, en presencia de suero normal de conejo 1:1600 y 48 h después, se colocaron 100 μ l de hormona marcada (USDA-bLH-B5) que correspondió a 14,000 cpm y después de 48 h de incubación, se separó la fracción unida (antígeno-anticuerpo) con 2° Ab diluido 1:80, previa incubación de 24 h. Cada punto corresponde al promedio (n=5) \pm D.S. La validación del sistema se desarrollo con suero bovino, en un volumen de 500 μ l hasta 25 μ l. Cada volumen de suero se analizó por quintuplicado y los tubos se incubaron en las mismas condiciones para la curva estándar. **C)** Presenta la especificidad del sistema.

Figura 3. Patrón representativo de elución de la LH en el suero colectado durante la etapa de estro (A) y diestro (B). Veinte mg de proteína se aplicaron al intercambiador iónico (PBE-118), equilibrado con trietilamina 0.025M, pH 11.0. La columna se eluyó con un gradiente de pH de 10 a 3.5 y se colectaron fracciones de 2 ml. Las flechas señalan el cambio de amortiguador, durante la corrida cromatográfica y después de la aplicación de NaCl 1M.

Figura 4. Inmunotransferencia de la isoformas de la LH sérica, obtenidas por medio del cromatoenfoque. El anticuerpo (anti-oLH-NIDDK-26) se utilizó a una dilución 1:500, con un periodo de incubación por 24h. **A)** Marcadores de peso molecular, 92.5; 62.5; 45.0; 31.0; 21.5 y 14.4kDa. **B)** USDA-bLH-B5; **C)** 9.99-9.0, **D)** 8.99-8.0; **E)** 7.99-7.0; **F)** 6.99-6.0; **G)** 5.99-5.9; **H)** 4.99-4.0; **I)** 3.99-3.5. La flecha superior derecha señala la forma monomérica de la LH y las inferiores presentan la subunidad alfa y beta de cada proteína.

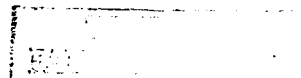


Figura 5. A) Presenta el patrón de elución del suero bovino, en etapa de diestro, durante la corrida cromatográfica del intercambiador iónico (PBE-118). **B)** Presenta el porcentaje de unión (B/Bo) determinado bajo diferentes concentraciones molares de NaCl. **C)** Patrón de elución de la USDA-bLH-B5, marcada con ^{125}I . Las flechas indican el cambio de amortiguador, durante el gradiente de pH. Los asteriscos denotan diferencia ($p < 0.05$) con relación a la unión máxima (Bo).

Figura 6. Perfil representativo del patrón de LH inmunoreactiva del extracto de adenohipófisis bovina del grupo testigo. Cuatro mg de proteína del extracto se analizaron en un gradiente de pH de 10.5 a 3.5. La flecha inicial muestra la aplicación del polybuffer 74, pH 3.5 y la segunda muestra la aplicación de NaCl 1M. Los recuadros señalan el detalle del patrón de elución de la LH inmunoreactiva en los rangos de pH 7.99-7 y 6.99 a NaCl respectivamente. Las diferentes isoformas se identificaron con letras comenzando con las formas más básicas (A).

Figura 7. Perfil representativo del patrón de LH inmunoreactiva del extracto de adenohipófisis bovina, del grupo estimulado con progesterona. 4 mg de proteína del extracto fueron analizados en un gradiente de pH de 10.5 a 3.5. La flecha inicial muestra la aplicación del polybuffer 74, pH 3.5 y la segunda flecha muestra la aplicación de NaCl 1M. Los recuadros señalan el detalle del patrón de elución de la LH inmunoreactiva en los rangos de pH 7.99-7 y 6.99 a NaCl respectivamente. Las diferentes isoformas se codificaron con letras comenzando con las formas más básicas (A).

Figura 8. Perfil representativo del patrón de FSH en el extracto de adenohipófisis bovina, en el grupo con progesterona (A) y solución salina (B). Cuatro mg de proteína del extracto fueron analizados en el cromatofoco, a través de un gradiente de pH de 10.0 a 3.5. La flecha inicial muestra la aplicación del polybuffer 74, pH 3.5 y la segunda flecha, muestra la aplicación de NaCl 1M. Las diferentes isoformas se identificaron con números romanos, comenzando con las formas más básicas.

Figura 9. A) Cromatografía de intercambio catiónico (CM-sepharosa) de la fracción glicoproteínica (GLP: 61.86 mg de proteína). La columna (1.5x 27cm) se equilibró con acetato de amonio 0.005 M, pH 5.1, con un flujo de 23 ml/h, se colectaron fracciones de 3 ml. La fracción no retenida (CM-1ab) eluyó con este amortiguador, mientras que las fracciones CM-2ab y CM-3ab se obtuvieron con acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8 y acetato de amonio 1 M más glicina 0.1 M, pH 9.5 respectivamente. **B)** Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel) de la fracción CM-2ab (7.6 mg de proteína), la columna (1.5x 25 cm) se equilibró con glicina 0.1 M pH 9.5, con un flujo de 18 ml/h, y se colectaron fracciones de 3 ml. La fracción 2ab (LH-I) eluyó con acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8 y la 3ab, eluyó con acetato de amonio 1 M, pH 5.1. **C)** Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-sephacel) de la fracción CM-3ab (27.72 mg de proteína), la columna (1.5x 24.5 cm), se equilibró con glicina 0.1 M pH 9.5, con un flujo 22.9 ml/h y se colectaron fracciones de 3 ml. Las fracciones 1ab (LH-II), 1cd (LH-III) y 1ef (LH-IV) eluyeron con el mismo amortiguador, la fracción 2ab (LH-V) eluyó con acetato de amonio 0.1 M pH 6.8 y las fracciones 3ab y 3cd eluyeron con acetato de amonio 1 M, pH 5.1.



Figura 10. Electroforesis discontinua en geles de tubo de poliacrilamida, al 7.0%, en condiciones nativas (TRIS-PAGE), pH 8.3. Se aplicaron de 100 μ g de proteína por gel, con un voltaje constante de 3mV. a) Fracción glicoproteínica (GLP); b) CM-1ab; c) CM-2ab y d) CM-3ab.

Figura 11. Electroforesis discontinua en geles de tubo de poliacrilamida al 7.0 %, en condiciones nativas (TRIS-PAGE), pH 8.3. Se aplicaron de 100 μ g de proteína por gel, con un voltaje constante de 3mV. a) USDA-bLH-b5; b) LH-I; c) LH-II; d) LH-III; e) LH-IV; f) LH-V. La flecha del lado izquierdo señala el Rf de 0.04 y 0.16 respectivamente. La flecha del lado derecho señala el Rf de 0.11.

Figura 12. Electroforesis discontinua en condiciones desnaturalizantes en SDS-PAGE, al 12.5%, pH 8.6. El panel A corresponde a las condiciones no reductoras (NR) y el panel B a las condiciones reductoras (R). a) marcadores de peso molecular; b) USDA-bLH-b5; c) LH-I; d) LH-II; e) LH-III; f) LH-IV y g) LH-V. La concentración de proteína en cada carril correspondió a 1 μ g. La tinción se realizó con nitrato de plata (BIO-Rad). Las flechas a la izquierda indican a los marcadores de peso molecular, correspondientes a 92.5, 62.5, 45.0, 31.0, 21.5 y 14.4 KD respectivamente. Las flechas de la derecha señalan la forma monomérica de la LH y las subunidades de cada glicoproteína.

Figura 13. Inmunotransferencia de las diferentes isoformas de la LH purificadas en este estudio. El anticuerpo (anti-oLH-CSU-204) se utilizó a una dilución 1:500, con un periodo de incubación de 24 h. a) USDA-bTSH; b) NIDDK-oLH-26; c) USDA-bLH-b5; d) LH-V; e) LH-IV; f) LH-III; g) LH-II; h) LH-I i) marcadores de peso molecular 92.5; 62.5, 45.0, 31.0, 21.5 y 14.4 KD. La flecha superior izquierda señala la forma monomérica de la LH y la inferior nos muestra la subunidad alfa de cada proteína. Las flechas de la derecha indican los marcadores de peso molecular.

Figura 14. Curva dosis-respuesta de las diferentes isoformas de LH en el sistema de Radioinmunoanálisis de la hormona luteinizante. El sistema se incubo durante 20 h. a 4°C, el estándar de referencia correspondió al NIDDK-oLH-26 a las dosis de 0.3 a 45 ng/tubo. El primer anticuerpo se utilizó a una dilución final de 1:500,000 y El complejo antígeno-anticuerpo se precipito con una solución de pansorbina (1.5 μ g/tubo). Las curvas presentan el promedio (n=4) de cada punto \pm desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadros

Cuadro 1. Tasa de depuración de la hormona luteinizante (LH) en diferentes especies

Cuadro 2. Porcentaje de distribución de las isoformas circulantes de la LH en vaquillas Holstein por grupo de isoformas. Las muestras de suero colectadas en estro y diestro, se analizaron por medio del cromatofluore, eluido en un rango de pH de 10-5 a 3.5; Para la etapa de diestro, se analizaron únicamente las muestras colectadas a los 60 min después de 250µg i.v. de GnRH, en tanto que las muestras colectadas en la etapa de estro, correspondieron a las del cenit del pico preovulatorio. Los resultados presentan el promedio \pm desviación estándar de cada grupo de isoformas en las etapas del ciclo analizadas; entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Cuadro 3. Porcentaje de distribución de las isoformas circulantes de la LH por unidad de pH en vaquillas Holstein. Las muestras de suero colectadas en estro y diestro, se analizaron por medio del cromatofluore, eluido en un rango de pH de 10-5 a 3.5; Para la etapa de diestro, se analizaron únicamente las muestras colectadas a los 60 min después de 250µg i.v. de GnRH, en tanto que las muestras colectadas en la etapa de estro, correspondieron a las del cenit del pico preovulatorio. Los resultados presentan el porcentaje promedio \pm desviación estándar de cada unidad de pH en las condiciones fisiológicas estudiadas; entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Cuadro 4. Resultados de la presencia de bandas de LH inmunoreactivas, determinadas por medio de la inmunotransferencia, en tres ensayos independientes de las fracciones agrupadas por unidad de pH, obtenidas después del análisis del suero por medio del cromatofluore.

Cuadro 5. Porcentaje de distribución de las isoformas intrahipofisarias de la LH en la especie bovina. El análisis se llevó a cabo por rango de pH. Los resultados presentan el promedio \pm error estándar de cada tipo de isoforma y entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Cuadro 6. Porcentaje de distribución de las isoformas intrahipofisarias de la LH y FSH en bovinos ovariectomizados (OVX) y ovariectomizados en presencia de progesterona (OVX-P₄). El análisis se llevó a cabo por grupo de pH. Los resultados presentan el promedio \pm error estándar de cada grupo de isoforma y entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Cuadro 7. Porcentaje de distribución de las isoformas intrahipofisarias de la FSH en la especie bovina. El análisis se llevó a cabo por rango de pH. Los resultados presentan el promedio \pm error estándar de cada tipo de isoforma y entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Cuadro 8. Rendimiento de los diferentes productos obtenidos durante la extracción y purificación de las isoformas de LH. Los resultados expresan el rendimiento/Kg de tejido.

Cuadro 9. Actividad biológica e inmunológica y la relación B/I, de las isoformas de LH bovina.

Cuadro 10. Inmunreactividad cruzada de las isoformas de LH purificadas, obtenida en el sistema de radioinmunoensayo para la FSH y la TSH.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

CAPITULO 1

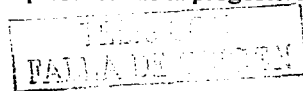
INTRODUCCIÓN

En la actualidad, es conocido que las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH), son proteínas heterodiméricas, formadas por dos subunidades (designadas α y β) glicosiladas. Cada hormona, está constituida por una familia de proteínas o isoformas, localizadas en la hipófisis, suero y orina (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Ulloa-Aguirre et al., 2001; Zambrano et al., 1995; Ropelato et al., 1999; Castro-Fernández et al., 2000; Padmanabhan et al., 1999). Este polimorfismo que presentan la LH y FSH, se debe en parte, a la variada estructura de los oligosacáridos incorporados a cada proteína, lo que repercute en cada miembro de la familia, en diferentes propiedades biológicas e inmunológicas, y en la vida media en circulación (Ropelato et al., 1999; Creus et al., 2001).

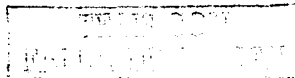
El polimorfismo de las gonadotropinas, es un fenómeno regulado por múltiples factores, entre los que destacan la GnRH, los péptidos y esteroides ováricos. Muchas de estas evidencias, se han obtenido en humanos y en roedores (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Padmanabhan et al., 1999); en contraste, poca información se ha descrito para los rumiantes, la cual se ha limitado a estudios de origen hipofisario (Cooke et al., 1996) y escasa información se ha documentado para las isoformas de las gonadotropinas presentes en la circulación (Hassing et al., 1993; Padmanabhan et al., 1992). Recientemente en este laboratorio (Rojas et al., 2001), se ha descrito el patrón de isoformas de la LH presente en el suero de la especie caprina en la etapa de estro y anestro, sin embargo el polimorfismo para la LH circulante en la especie bovina no se ha documentado. Como se ha señalado, las isoformas en la circulación es casi desconocida, posiblemente por las limitaciones que impone la concentración relativamente baja de estas hormonas en las diferentes condiciones fisiológicas, por lo tanto es difícil de valorar la participación de cada isoforma en el proceso reproductivo en los rumiantes.

Es por ello que uno de los objetivos de este trabajo, correspondió a examinar el patrón de distribución de las isoformas de la LH en la circulación en la especie bovina (de la que se pueden obtener grandes cantidades de sangre), en dos etapas del ciclo estral, la primera correspondió a la etapa del estro (momento del pico preovulatorio), que presenta un patrón de secreción de la LH con pulsos de baja amplitud y alta frecuencia en ausencia de progesterona. Por otro lado, se analizó el suero colectado en la fase de diestro, etapa caracterizada por una secreción de la LH con pulsos de amplitud alta pero de baja frecuencia, debido a la retroalimentación negativa que le impone la progesterona en esta etapa del ciclo estral. Con base en esto, se hipotetizo que el patrón de distribución de las isoformas circulantes de la LH en la etapa de estro y la etapa de diestro, serán diferentes, debido a las condiciones fisiológicas que dominan en cada etapa del ciclo estral. Un elemento adicional a estudiar fue la magnitud de la variabilidad del patrón de distribución de las isoformas de la LH entre individuos, sobre lo que tampoco existe información, que permita especular, sobre la magnitud de la variabilidad genética de esta característica.

Por otro lado, es conocido en la actualidad el papel que juega el estradiol en la regulación, síntesis, secreción y patrón de distribución de las gonadotropinas en diferentes condiciones fisiológicas (Gharib et al., 1990; Ulloa-Aguirre et al., 1995; Stumpf et al., 1992; Caraty y Skinner 1998), sin embargo, la participación de la progesterona (P_4) en el patrón de distribución de las gonadotropinas no se conoce, aunque se ha documentado que esta hormona, disminuye el número y la expresión del receptor de la GnRH tanto *in vivo* como *in vitro* (Hamernik et al., 1995); participa en la disminución en el número de receptores para estradiol (Koligian y Stormshak, 1977); a nivel de la transcripción, reduce el tamaño del ARNm para las subunidades β LH y α de las gonadotropinas, modificando la estabilidad del ARNm (Gina y Nett 1995). Con base en estos antecedentes, el segundo objetivo de este estudio se encaminó a conocer el patrón de distribución de la LH y FSH de origen intrahipofisario en vaquillas ovariectomizadas, en presencia y ausencia de progesterona, por lo tanto la hipótesis establecida correspondió a, el patrón de distribución de las isoformas de la LH y FSH en la adenohipófisis, se verá modificado en presencia de la progesterona.



Recientemente, se ha discutido la necesidad del desarrollo de sistemas analíticos, precisos y específicos para cada una de las isoformas de las gonadotropinas (Ulloa-Aguirre et al., 2001; Padmanabhan et al., 1999), ya que muchas de las evidencias, han presentado diferentes valores de actividad inmunológica para una misma hormona, cuyos resultados dependen fundamentalmente del tipo de sistema de análisis (homólogo o heterólogo) y tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) utilizado, luego entonces, existe la necesidad de obtener y purificar en cantidades suficientes cada una de las isoformas, lo que permitirá el desarrollo de sistemas analíticos, confiables, homólogos y específicos, para conocer con precisión, el patrón de secreción de estas isoformas en diferentes condiciones fisiológicas, es por ello, que el tercer objetivo de este estudio se refirió a la purificación de isoformas de la LH a partir de extractos glicoproteínicos de adenohipófisis bovinas, por medio de un método convencional y sencillo, basado en la carga de la proteína (intercambio iónico), que permitirá la obtención de isoformas de la LH con alto rendimiento, para el posible desarrollo de sistemas analíticos.



CAPITULO 2

REVISIÓN DE LA LITERATURA

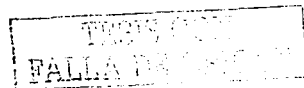
2.1) Función de las gonadotropinas

Las gonadotropinas, tienen funciones bien conocidas en la regulación de la función testicular y ovárica (Rao, 2001). En particular, la LH juega un papel crítico en la maduración folicular (Campbell et al., 1995), en la ovulación (Richards et al., 1998) y en el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo (Baird, 1992; Smith et al., 1994; Niswender et al., 2000); Modifica en los ovarios la síntesis de diversas moléculas como las hormonas esteroides, factores de crecimiento, citocinas, enzimas proteolíticas; La frecuencia de los pulsos de secreción de la LH se reduce durante el anestro prepuberal y el posparto en la vaca (Williams et al., 1996), así como en el anestro estacional de la oveja (Karsch, 1992) y la cabra (Chemineau et al., 1988); también se ha caracterizado durante la secreción preovulatoria y su relación temporal con la ovulación y el inicio del estro (Zarco y Hernández, 1996).

Recientemente se ha identificado la presencia de receptores para la LH en tejidos no gonadales como en los gametos, oviducto, útero, cerviz, placenta, membranas fetales, cordón umbilical, cerebro, piel, glándulas adrenales, hueso, próstata, y espermatozoides; Aunque no es conocido el mecanismo de regulación de la LH en estos tejidos, existen evidencias, que la hLH y hCG, incrementan la formación de prostaglandinas, glicoproteínas oviductales y la liberación de espermatozoides unidos a células epiteliales tubales. En el útero, la LH, influye en el inicio y mantenimiento de la preñez y en el parto (Rao, 2001).

2.2) Gonadotropos

En la adenohipófisis existen poblaciones celulares que se caracterizan por sintetizar y almacenar diferentes hormonas. Por ejemplo, los somatotropos se encargan de producir la hormona de crecimiento (GH), los tirotropos sintetizan a la hormona estimulante de la tiroides (TSH), los lactotropos a la prolactina (PRL) y los gonadotropos que producen a la FSH y LH. Los gonadotropos aparecen por primera vez en la glándula durante la fase



temprana del desarrollo fetal, y en estado adulto estas células representan del 7 al 15% del número de células de la adenohipófisis (Halvorson y Chin, 2001).

2.2.1) Identificación de gonadotropos en la hipófisis

Los gonadotropos, han sido estudiados en muchas especies entre las que se incluye a la especie humana, roedores, primates (Childs et al., 1980; Childs et al., 1999), y algunos ruminantes como el ovino (McNeilly, 2000; Crawford et al., 2000). Los gonadótropos son un grupo celular heterogéneo, que cambia en forma, tamaño y patrón de almacenamiento de gonadotropinas durante el ciclo estral y menstrual (Childs et al., 1998). Esta población celular, se ha identificado como células basófilas, por medio de la tinción celular con el reactivo ácido peryódico de Schiff (Childs, 1994), con el cual, se han identificado morfológicamente dos tipos celulares; aquellas que corresponden a células ovales pequeñas con un diámetro de 200 μm y un grupo de células cuboides con un diámetro mayor a 400 μm . Además, utilizando la técnica de inmunohistoquímica (basada en la detección de las gonadotropinas presentes en estas células por medio de anticuerpos específicos, anti-LH y anti FSH) en tejidos adenohiposarios, se han identificado dos tipos de gonadotropos: aquellos que almacenan un solo tipo de gonadotropina ya sea FSH o LH, conocidos como gonadotropos monohormonales, morfológicamente pequeños. En contraste, se han identificado un grupo de células de mayor tamaño que almacenan ambas gonadotropinas, conocidos como gonadotropos bihormonales (Childs, 1994).

2.2.2) Regulación de los gonadotropos en el ciclo estral

Con la técnica de inmunohistoquímica, en el tejido adenohipofisario de roedores (Childs, 1994) y de ovinos (Crawford et al., 2000, Taragnat et al., 1998), en diferentes estadios del ciclo estral, se han identificado cambios morfológicos en los gonadotropos, correspondientes al número de gránulos de almacenamiento y de secreción, que son regulados por el GnRH hipotalámico, esteroides y péptidos gonadales. Por ejemplo, en ovinos, la acumulación de los diferentes gránulos hacia la membrana plasmática del gonadotropo se observó previó al pico preovulatorio de la LH, así como un aumento en la

síntesis del ARNm que codifica para las subunidades β FSH y β LH. Posterior a este evento, la síntesis del ARNm de cada subunidad de las gonadotropinas disminuyó y la presencia de gránulos de secreción y almacenamiento se redujo, apareciendo pequeños gránulos inmunoteñidos con β LH y β FSH cerca del retículo endoplásmico rugoso (McNeilly, 2000), lo que sugiere que las hormonas liberadas a la circulación en el pico de LH, son solo aquellas proteínas “maduras” que han terminado su proceso de síntesis y procesamiento final y se encuentran almacenadas en gránulos de secreción, mientras que la hormona que se encuentra en vesículas cercanas al retículo endoplásmico rugoso, representan hormonas recién sintetizadas que aun esta en proceso.

2.2.3) Proporción de gonadotropos en el ciclo estral

El porcentaje de gonadotropos mono y bihormonales en la adenohipófisis, se han caracterizado en diferentes momentos del ciclo estral, en roedores (Childs et al., 1987) y ovinos (Taragnat et al., 1998). En dichos estudios, se identificó un alto porcentaje (62%) de gonadotropos monohormonal antes del pico de gonadotropinas, incrementándose este porcentaje (84%) después del pico y posteriormente disminuyó a valores del 57% después de la ovulación hasta el 42% en la fase lútea. En todas las etapas, el resto de los gonadotropos estuvo constituido por células bihormonales. Luego entonces se puede establecer un mecanismo celular de diferenciación en la secreción de las gonadotropinas, ya que en el momento del pico preovulatorio existe una mayor secreción de LH que de FSH, estimulada principalmente por la GnRH y los estrógenos; En contraste, después de la ovulación y en el transcurso de la fase lútea, la hormona más secretada es la FSH, en cuyas etapas la hormona ovárica dominante es la progesterona. Es posible entonces que el recambio de células monohormonales a bihormonales indique un cambio en el desarrollo diferencial en el patrón de almacenamiento de las gonadotropinas en los distintos tipos gonadotropos presentes en la adenohipófisis.



2.3) Estructura de la LH

2.3.1) Subunidad α

La subunidad α de las glicoproteínas es sintetizada en la adenohipófisis y en el sincitiotrofoblasto de la placenta. Esta subunidad es codificada por un mismo gen, localizado en la especie humana en el brazo corto del cromosoma seis (Gharib et al., 1990). El gen ha sido caracterizado en diferentes especies (Fiddes y Goodman 1981), por ejemplo, en la especie humana, bovina, ovina, rata y ratón; este gen esta constituido por 4 exones y 3 intrones, con una posición altamente conservada entre especies. Sin embargo, prevalecen diferencias entre las especies, como el tamaño del gen, que oscila entre 8 y 16.5 Kilobases (Kb), las cuales son debidas principalmente a diferencias en el tamaño del primer intrón que varía desde 5.4Kb hasta 13Kb (Gharib et al., 1990).

El ARNm maduro que codifica para la subunidad α , incluye a 730 a 800 nucleótidos, con una similitud del 70 al 90% entre especies. El α -ARNm codifica un péptido señal de 20 residuos de aminoácidos, y una proteína madura de 92 a 96 aminoácidos, dependiendo de la especie (Bousfield et al., 1994). Tal es el caso para las especies bovina y ovina, donde hay 96 residuos de aminoácidos, y 92 en el caso de la especie humana (Cooke et al., 1996).

La subunidad α presenta dos sitios de glicosilación altamente conservados entre las especies (por ejemplo en mamíferos, aves, anfibios y peces), ubicados en los residuos de aminoácidos en posición 56 y 83 (Combarous, 1988), con excepción de la especie humana que se encuentran localizados en los residuos 52 y 83 (Ulloa-Aguirre et al., 1995).

La secuencia de aminoácidos de la subunidad α se ha identificado desde mamíferos hasta teleósteos con resultados que han mostrado una alta homología (Bousfield, 1998), por ejemplo entre mamíferos, este porcentaje correspondió al 82%, entre aves del 98% y en peces del 68-91%. La comparación particular entre bovinos y ovinos fue del 100%, en tanto

que entre bovinos y equinos fue de aproximadamente el 82% y entre bovino y humano del 75% (Pierce y Parson, 1981).

Aunque en muchas especies se conoce una sola subunidad α , el reporte de Sairam (1998), señala la existencia de dos tipos de subunidades α en teleósteos estructuralmente relacionadas, denominada GTH-I, con actividad biológica de FSH, y una segunda subunidad llamada GTH-II, con actividad de LH.

Por otra parte, en mamíferos (Blithe et al., 1991, humana; Begeot et al., 1984 rata; Chabot et al., 2000, ovina) la presencia de una proteína semejante a la subunidad α de las glicoproteínas, se ha identificado, la cual se ha denominada subunidad α -libre. La síntesis de esta proteína, se realiza a partir del gen que codifica para la subunidad α de las glicoproteínas, sin embargo el tipo de glicosilación es diferente, predominado los oligosacáridos del tipo O-unido, lo que le proporciona características moleculares diferentes, como un mayor peso molecular, carga eléctrica diferente, así como una actividad biológica particular. A este respecto los estudios realizados por Begeot et al. (1984) demostraron que esta subunidad α -libre, induce el desarrollo de lactotropos en la hipófisis de ratas fetales, por otro lado Blithe et al. (1991), aislando la subunidad α -libre de suero de mujeres preñadas, reporto que esta proteína, estimula la liberación de prolactina en células decíduales humanas en cultivo y recientemente Chabot et al. (2000) informaron de la presencia de dos isoformas de esta subunidad en hipófisis ovina, con distintas capacidades de estimular la liberación de prolactina en hipófisis fetales ovinas. Estos resultados en conjunto confirman que esta subunidad α -libre presenta una estructura-función distinta a la subunidad α que forma parte de las glicoproteínas.

2.3.2) Subunidad β

El gen que codifica para la subunidad β LH en humanos, se encuentra en el cromosoma 19, mientras que el gen para la subunidad β FSH humana, está presente en el cromosoma 11



(Gharib et al., 1990). A diferencia del gen de la subunidad α , el gen para la subunidad β de cada una de las glicoproteínas es de tamaño pequeño (1.5Kb), y está formado por tres exones y dos intrones. El ARNm maduro de la subunidad β de la LH humana tiene 700 nucleótidos y codifica una secuencia líder de 24 residuos de aminoácidos y una proteína madura de 121 aminoácidos con una similitud de aproximadamente del 82% entre especies. La posición de los intrones es altamente conservada en todas las especies (Gharib et al., 1990).

El número de residuos de aminoácidos para la subunidad β de las glicoproteínas varía, por ejemplo la β FSH está formada por 110 a 111 residuos de aminoácidos; la β TSH por 112-118; β LH por 117-121, mientras que la β hCG y β eCG tienen entre 145-149 aminoácidos. Todas las subunidades estudiadas poseen 12 residuos de cisteína que forman 6 puentes disulfuro altamente conservados (Combarnous, 1992).

El tipo de glicosilación que predominan en la subunidad β de las gonadotropinas, corresponde a los N-unidos, cuya localización varía en cada hormona. Por ejemplo, en la LH de diversas especies (ovinos, bovinos, equinos, porcinos, conejos, ratón, rata, ballena y salmón) se localiza en el residuo Asn-13, mientras que en humanos se encuentra en la posición Asn-30 (Cooke et al., 1996). Un caso particular es la hCG, que presenta este tipo de glicosilación en las posiciones Asn-13 y Asn-30, además de cuatro sitios de glicosilación O-unidos localizados en la parte final de la secuencia de aminoácidos; En contraste, la FSH se caracteriza por presentar dos sitios de glicosilación localizados en las posiciones Asn-13 y Asn-30 en diferentes especies (bovinos, ovinos, porcinos, equinos y humanos); En el caso de la TSH, la glicosilación se localiza en la posición Asn-30 en bovinos, porcinos y humanos (Cooke et al., 1996).

2.3.3) Estructura polipeptídica

La estructura primaria de las gonadotropinas se caracteriza por una secuencia de residuos de aminoácidos altamente homóloga entre especies, con la posición idéntica de los residuos de

cisteína en todas las hormonas, en tanto que la estructura secundaria se caracteriza por una disposición del tipo β -conformación, generada por el alto contenido de prolina, y un bajo porcentaje de α -Helice (Garnier et al., 1975) y la estructura terciaria, esta caracterizada por los puentes disulfuro intracadena, de los cuales existen cinco en la subunidad α y seis para la subunidad β (Gharib et al., 1990); Estos puentes disulfuro, ayudan a una menor susceptibilidad a enzimas proteolíticas, como la tripsina, quimiotripsina y pepsina, por lo que estas subunidades son menos susceptibles a la proteólisis (Combarnous, 1988).

Finalmente, la estructura cuaternaria, corresponde a la unión de ambas subunidades por medio de fuerzas no covalentes, y de ella se deriva la actividad biológica de cada glicoproteína. Estudios *in vitro* han demostrado que las subunidades de manera aislada carecen de la actividad biológica característica de cada gonadotropina, lo que confirma que la unión de ambas subunidades es fundamental para la expresión de la actividad hormonal (Combarnous, 1988). Si bien no es claro el papel de cada subunidad en la expresión de la actividad biológica de las gonadotropinas, se han postulado dos hipótesis sobre el particular: La primera se refiere a que al combinarse la subunidad α con la subunidad β , se modifica la estructura conformacional de la proteína, lo que permite una interacción efectiva con el receptor. La segunda señala, que la subunidad β sólo adquiere un cambio de conformación activa después de la unión con la subunidad α . Por lo tanto, esto sugiere un papel importante de la subunidad β , que podría consistir en modificar la conformación de la subunidad α que permitirá la interacción de ambas subunidades con el receptor, para hacer efectivo el mecanismo (Halvorson y Chin, 2001).

2.4) Estructura-función de los oligosacáridos

La heterogeneidad que presentan las gonadotropinas, se debe a la estructura molecular de cada proteína y al tipo de oligosacáridos presentes en la molécula, los cuales se caracterizan por presentar diferentes estructuras (ramificación), así como grados de sulfatación y de sialización en los residuos terminales (Ulloa-Aguirre et al., 1999); estas características



juegan un papel importante en la tasa de depuración de las hormonas y en su unión al receptor (Fiete et al., 1991), de tal forma que la caracterización de estos oligosacáridos es fundamental para la identificación de las isoformas de las gonadotropinas (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Dias et al., 2001).

2.4.1) Mecanismo de glicosilación

La incorporación de los oligosacáridos N-unidos a cada subunidad, ocurre co-traduccionalmente en el Retículo Endoplásmico Rugoso (RER), en donde participa una molécula llamada Dolicol-pirofosforilo (molécula lipídica insaturada y fosforilada, de 75 átomos de carbono, altamente hidrofóbica) que se localiza dentro de la cara interna de la membrana del RER. Unida a esta molécula se encuentra un oligosacárido, formado de 2 residuos de N-acetil-glucosamina, 9 residuos de manosa y tres residuos de glucosa, que se incorpora al péptido naciente por medio de una enzima llamada glucosiltransferasa, cuando encuentra una secuencia Asp-X-Ser o Asp-X-Tre (donde X es cualquier aminoácido con excepción de la prolina) (Hirschberg y Snider, 1987).

Una vez sintetizado en su totalidad cada polipéptido y habiéndose incorporado el o los oligosacáridos en su posición correspondiente, las proteínas sufren modificaciones pos-traduccionales en la luz del RER. Dicho proceso se inicia con la separación del péptido señal a través de una enzima llamada peptidasa de la señal. Además en el RER ocurre la formación de los puentes disulfuro intracadena y posteriormente se realiza el ensamblaje de las subunidades α y β para formar el heterodímero de la proteína. (García-Crespo y Boime, 2000).

2.4.2) Modificación química de los oligosacáridos en el aparato de Golgi

Una vez concluida las modificaciones pos-traducción del polipéptido propiamente dicho, se inicia en el RER la primera modificación estructural del oligosacárido incorporado, comenzando con la eliminación de un residuo de glucosa por la enzima α -glucosidasa I; el proceso prosigue con la remoción de los dos siguientes residuos de glucosa por la enzima

α -glucosidasa-II y, finalmente, en este organelo participa la enzima α -manosidasa para realizar la eliminación de 4 monosacáridos de manosa (Baenzinger y Green, 1988; Cooke et al., 1996).

Posteriormente, los polipéptidos son transportados al aparato de Golgi, a la región conocida como Cis-Golgi, en donde participa la enzima α -1,2-manosidasa, encargada de eliminar residuos de manosa; Al alcanzar la proteína la región media del aparato de Golgi actúan las enzimas N-Acetil-galactosamina transferasa, que incorpora residuos de N-acetilgalactosamina, la α -manosidasa-II, que elimina residuos de manosa; la N-acetilglucosamina transferasa, que incorpora al monosacárido N-acetilglucosamina. Posteriormente, en la región Trans-Golgi participan las enzimas Galactosa transferasa (transfiere residuos de galactosa), Sialotransferasa (incorpora ácido siálico), N-acetilgalactosamina transferasa (incorpora N-acetilgalactosamina) y sulfotransferasa (incorpora grupos sulfato terminales) (Baenzinger, 2000).

Como se observa, el oligosacárido original presente en el RER, sufre modificaciones durante su recorrido en las tres regiones del aparato del Golgi, generando oligosacáridos complejos con residuos finales de sulfato y ácido siálico, que constituyen la parte final de la proteína madura, la cual se empaqueta en gránulos de almacenamiento y de secreción que serán expulsados por la célula por medio de exocitosis cuando esta recibe un estímulo adecuado.

2.4.3) Tipo de Oligosacáridos de la LH

En general los oligosacáridos que forman parte de las gonadotropinas presentan en su parte final ácido siálico y sulfato. Los oligosacáridos son de tres tipos: (i) sialisados (N), (ii) sulfatados (S) y (iii) una mezcla, sialisados/sulfatados (S-N). (Cooke et al; 1996). Los oligosacáridos no únicamente difieren en el grado de sulfatación y sialización, sino también en su estructura ramificada (Creus et al., 2001).



2.4.3.1) Oligosacáridos sulfatados: Estos oligosacáridos varían en el número de unidades sulfatadas y en la composición de su estructura ramificada. Los oligosacáridos unidos a la Asparagina (Asn) presentan un esqueleto formado por una cadena de 2 moléculas N-acetilglucosamina (GlcNac) y 5 moléculas de manosas (Man), a la que se le añade una rama constituida de una secuencia de manosa-N-acetilglucosamina (GlcNac)-N-acetilgalactosamina (GalNac)-SO₄, para formar el tipo monosulfatados (S-1); El segundo tipo de oligosacáridos disulfatados (S-2), está constituido por el tipo monosulfatado con la incorporación de una segunda rama que comienza con un residuo de manosa unida a otro dominio de manosa, continuando su estructura con la secuencia Man-GlcNac-GalNac-SO₄. La estructura que contiene residuos de sulfato siempre se encuentra asociada con N-acetil galactosamina.

Aunque la estructura general de los oligosacáridos N-unidos, que contienen residuos de sulfato en las hormonas gonadotrópicas en especies como la humana, ovina y bovina son similares, el porcentaje de este grupo varía considerablemente con relación a: Por ejemplo, los estudios realizados por Green et al. (1985), y Green et al. (1986) en la LH bovina, identificaron únicamente oligosacáridos sulfatados, con un porcentaje de ramas bisulfatadas del 38% (S-2); sin embargo identificaron cinco ramas monosulfatadas (S-1) que difieren en el número de residuos de manosas, que constituyen el 29% y no identificaron ramas con ácido siálico en su estructura. Para el caso de la FSH se determinó un porcentaje del 1 al 3% de ramas mono (S-1) y disulfatadas (S2). En el caso de TSH la forma predominante de oligosacáridos es del tipo disulfatada con un 59% (S-2), mientras que las ramas mono sulfatadas (S-1) solo correspondieron al 21%, y presentaron un 2% de oligosacáridos con estructura de ácido siálico-sulfato (S-N). Como se observa las formas predominantes de los oligosacáridos en la LH son del tipo sulfatadas.

2.4.3.2) Oligosacáridos sializados: El grado de complejidad en este grupo de oligosacáridos es mucho mayor que el de los oligosacáridos sulfatados. Existen tres tipos, mono (N-1), di (N-2) y trisializados (N-3); es decir, que contienen uno, dos o tres residuos

de ácido siálico en sus dos o tres ramas periféricas. La cantidad relativa de cada tipo de azúcares en las gonadotropinas varía; algún tipo particular de oligosacárido solo se ha encontrado en una hormona y una especie en particular; por ejemplo, se han identificado en FSH bovina oligosacáridos con dos (N-2) ramas sializadas, en el caso de la TSH humana solo se han identificado oligosacáridos con residuos de ácido siálico, a diferencia de la TSH bovina que presenta oligosacáridos del tipo neutro (N-S).

En resumen, la distribución de los diferentes tipos de oligosacáridos presentes en las glicoproteínas de la hipófisis varía de acuerdo a la especie y al tipo de hormona, así se pueden establecer tres patrones distintos de oligosacáridos: 1) oligosacáridos del tipo mono y/o disulfatados con nula presencia de ácido siálico, por ejemplo la LH, mientras que en la TSH bovina predominan las formas sulfatadas del tipo S-1 o S-2. En la LH ovina la forma predominante es la del tipo S-1, con un 2% del tipo S-N; 2) Oligosacáridos del tipo mono, di y tri-sializados con poca presencia de residuos sulfatados, por ejemplo la FSH bovina, y humana; 3) Oligosacáridos con presencia significativa de ambos residuos sulfatados y sializados como es el caso de la FSH ovina, LH y TSH humana.

Finalmente, se puede señalar que la marcada diferencia en el contenido de ácido siálico y sulfato en la estructura final de los oligosacáridos de cada una de las subunidades (α y β), que en conjunto forman heterodímeros funcionales, ha promovido interés en su investigación, particularmente en las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH), que son hormonas sintetizadas dentro de las mismas células hipofisarias (gonadotropas), que comparten una misma subunidad α y cuya función biológica es determinada por la subunidad β . Estas diferencias en el contenido y las características de los oligosacáridos, son la base de la microheterogeneidad molecular presente en las gonadotropinas, que pueden asociarse con su actividad biológica.

2.4.4) Función de los oligosacáridos

Los oligosacáridos presentes en las gonadotropinas desempeñan diversas funciones, por ejemplo el oligosacárido localizado en el residuo Asn-82 de la subunidad α , participa en el plegamiento de esta subunidad, lo que le permite una mayor estabilidad a la proteína y evita el agregado de formas moleculares; en tanto que oligosacárido localizado en el residuo Asn-56, participa en el reconocimiento al receptor de la LH y el oligosacárido localizado en el residuo Asn-13 de la β LH es necesario para inducir la respuesta biológica en las células blanco (Dias et al., 2001; Bousfield, 1998; Ulloa-Aguirre et al., 1995; Cooke et al., 1996; Baenzinger y Green, 1988).

Luego entonces, la participación de estos oligosacáridos en la actividad biológica de las glicoproteínas, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* se pueden resumir en tres aspectos: 1) Modifican la tasa de depuración de las hormonas en la circulación, 2) Modifican la constante de afinidad por su receptor y 3) Inducen la respuesta en la célula blanca. Estos hallazgos se demostraron a través de la eliminación de los residuos de ácido siálico (proteínas desializadas) por métodos enzimáticos en las hormonas como la CG, FSH y LH de origen humana, estos resultados mostraron una reducción, en forma importante, de la vida media de estas hormonas en la circulación, sin embargo no se modificó la afinidad por su receptor. Con base a estos puntos se puede decir que, la presencia de ácido siálico en estas hormonas es importante para regular la vida media en circulación de estas hormonas, sin modificar la unión a su receptor. Por otro lado, la remoción total de los oligosacáridos N-unidos (proteínas deglicosiladas), por medios químicos, con el ácido fluorhídrico, reduce la capacidad de estas hormonas para activar a las células blanco, pero no modifica la afinidad y la unión a sus receptores. Por ejemplo, la LH y la FSH pierden su capacidad de estimular la actividad de la adenilatociclasa, aunque retienen una alta afinidad de unión a sus receptores. Estas hormonas deglicosiladas pueden tener una función de antagonistas *in vitro* con respecto a la inducción de la formación de AMPc y la producción de otros segundos mensajeros intracelulares y en menor medida a la producción de hormonas esteroides (Ulloa-Aguirre et al., 1995). En el caso de la LH de origen bovino, los trabajos realizados

por Fiete et al., 1991, mostraron que la remoción del grupo sulfato de esta hormona, facilita la remoción de la hormona en circulación en una proporción de 4 a 5 veces más que la nativa o intacta, lo que sugiere que este residuo de sulfato tiene una función semejante al ácido siálico como el presente en la FSH. El estudio del comportamiento biológico de las diferentes isoformas, ha mostrado que las formas de la LH que eluyen a un pH más básico (más alcalinas) tienen una mayor actividad biológica en bioensayos *in vitro*, sin embargo su tasa de eliminación de la circulación es más rápida. Por el contrario las formas que eluyen a un pH ácido (más ácidas) presentan una menor actividad biológica en sistemas *in vitro*, pero presentan una menor tasa de depuración en la circulación (Barrios-De-Tomasi et al., 2002; Creus et al., 2001; Burgon et al., 1996; Robertson et al., 1991).

2.5) Mecanismo de acción

Los receptores de la LH se localizan en la membrana plasmática de su célula blanca. En el ovario, los receptores para estas hormonas se localizan en las células de teca y de granulosa, en el testículo interactúa con receptores localizados en las células de Leydig y en la de Sertoli. A pesar de su baja concentración en las células blanco, estos receptores se caracterizan por tener una alta afinidad y especificidad por su ligando (Halvorson y Chin, 2001).

2.5.1) Tipo de receptor de la LH

Los receptores de la LH, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G, entre los que se incluyen a los receptores de la FSH, TSH, GnRH, receptores α y β adrenérgicos, y receptores dopaminérgicos (Hillier, 2001). En particular, el receptor para la LH de origen humano ha sido el más estudiado (Dufau, 1998), y en conjunto con los receptores para la FSH y TSH forma una subfamilia que difiere de otros miembros de la superfamilia, debido al mayor tamaño del dominio extracelular (Kumar y Trant, 2001). El gen que codifica al receptor de la LH humana se localiza en el cromosoma 21 y está compuesto de 10 intrones y 11 exones. Los diez primeros exones codifican el dominio

extracelular y el exón once codifica el dominio transmembranal e intracelular (Roux y Milgron 2001).

2.5.2) Características del receptor

El receptor es una sialoglicoproteína formada por un polipéptido monocatenario de 674 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 80-90 kDa (Kilodaltones), de los cuales 15 kDa son contribuidos por la cadena de carbohidratos (Dufau, 1998). Estructuralmente está compuesto de un dominio extracelular con seis sitios de glicosilación potenciales, un dominio transmembranal formado por siete hélices conectadas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares y un dominio intracelular (Kumar y Trant, 2001). Una de las características de este tipo de receptor es la presencia de residuos de cisteína en la primera y segunda asa extracelular lo que le permite formar puentes disulfuro intramoleculares, que generan una mayor estabilidad de la estructura transmembranal de siete hélices. (Dufau, 1998).

2.5.2.1) Dominio extracelular: El dominio extracelular o dominio amino-terminal, está compuesto por 341 residuos de aminoácidos (Dufau, 1998), con seis sitios de glicosilación cuya función es dar una mejor estabilidad del receptor; catorce regiones de una repetición rica en leucina, que favorecen la formación de hélices anfipáticas, y diferentes residuos de cisteína que forman los puentes disulfuro intracadena del receptor. El sitio de unión con la LH se ha localizado entre la región repetida del aminoácido leucina, intercalada entre los residuos de cisteína, Cys¹⁰⁹ y Cys¹³⁴, y el oligosacárido N-unido de tipo complejo, con ácido siálico terminal, en la posición Asn¹⁷³. Esta unión tiene una alta afinidad ($K_d = 1.2 \times 10^{-10} M$) para la LH y hCG. A este respecto Dufau (1998), señala los estudios de Ji *et al.* (1994), que muestran una pérdida de unión al receptor del 95% cuando los oligosacáridos fueron desializados. Los estudios realizados por Tsai-Morris *et al.* (1990); Xie *et al.* (1990); y Ji y Ji (1991), demuestran que la región amino terminal truncada del receptor retuvo la capacidad de unirse a la LH en ausencia de la región transmembranal, indicando un papel importante de este dominio extracelular en el reconocimiento del ligando. Por otro lado, la

formación de receptores quiméricos, compuestos de la región amino terminal del receptor de la LH en unión al dominio transmembranal e intracelular de receptores para TSH, β -adrenergicos o para FSH, una específicamente a la LH y hCG, por otro lado cuando la región amino terminal del receptor para FSH y el resto del receptor para la LH, solo se unieron a la FSH y no a la LH. Estos resultados nos permiten concluir que el sitio de unión de la hormona al receptor está localizada en esta región amino terminal del receptor. La homología de los residuos de aminoácidos en este dominio del receptor de LH a los receptores para FSH y TSH es baja (46%), lo que sugiere que en esta región existe una alta especificidad por el reconocimiento a su ligando.

2.5.2.2) Dominio transmembranal: La región transmembranal está compuesta de 264 residuos de aminoácidos y presenta una homología en esta región, por ejemplo los receptores para la LH, FSH y TSH presentan un 54-65% de semejanza (Dufau, 1998).

2.5.2.3) Dominio intracelular: Si bien el dominio intracelular o dominio C-terminal es corto (compuesto de 69 residuos de aminoácidos), este presenta diferentes sitios de fosforilación necesarios para la activación y desactivación de proteínas en receptores relacionados. Por ejemplo, se conoce un sitio consenso de fosforilación de la proteína cinasa C y un sitio potencial para la fosforilación de tirosina cinasa. Por otro lado, se ha identificado que este sitio también contiene residuos de serina y treonina que son responsables de la fosforilación de la proteína cinasa A. (Dufau, 1998).

2.5.3) Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de múltiples hormonas, entre las que se incluyen a las gonadotropinas, requiere para la transducción de la señal de tres proteínas importantes a) un receptor hormonal, b) la proteína G (transductor) y c) la adenilato ciclasa (efector). La proteína G, es una proteína que presenta una alta capacidad de unir guanosintrifosfato (GTP) para su activación. La proteína G es un heterodímero formado por tres subunidades; una subunidad α (estimuladora y/o inhibitoria) con un peso molecular de 39-46kDa, una

subunidad β de 37 kDa y una subunidad γ , de 8 kDa. El mecanismo de acción se inicia con la unión de la hormona al receptor, formando un complejo hormona-receptor. La interacción del complejo hormona-receptor con la proteína G estimula el intercambio del guanosindifosfato (GDP) unido a la proteína G por GTP citoplasmático, este intercambio activa a la proteína G, la cual interactúa con el efector llamado adenilato ciclasa, estimulando la conversión de adenosintrifosfato (ATP) a adenosinmonofosfato ciclico o AMPc, el cual actúa como segundo mensajero. La formación de este mensajero intracelular desencadena la activación de proteína cinasa A, la cual modula la función de una gran variedad de proteínas intracelulares a través de la fosforilación a nivel de residuos de serina y treonina.

Aunque el mecanismo mas estudiado e identificado de acción de las gonadotropinas es la vía del AMPc-proteína cinasa A, como fue descrito arriba, se ha establecido una segunda posibilidad, la cual corresponde a la activación de la proteína cinasa C, a través del rompimiento de fosfolípidos de membrana para producir 1,4,5 trifosfato o IP_3 y 1,2 diacilglicerol (DAG). El IP_3 actúa a nivel de retículo endoplásmico liso para la liberación de calcio intracelular, incrementando la concentración de Ca^{++} citosólico, mientras que el DAG estimula a la proteína cinasa C. En consecuencia los receptores de las gonadotropinas pueden estimular la señalización por estos dos mecanismos, proteína cinasa A o C; sin embargo el requerimiento para desencadenar dichas funciones depende de la concentración de la hormona en circulación siendo requerida una mayor concentración de gonadotropinas para el mecanismo de proteína cinasa C (Halvorson y Chin 2001).

2.6) Síntesis y regulación de la LH

2.6.1) Síntesis

La síntesis de las gonadotropinas dentro del gonadotropo, ocurre de manera similar a lo descrito para otras glicoproteínas. En general, los genes para cada una de las subunidades de LH y FSH son transcritos en el núcleo para formar moléculas de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) específico, los cuales sufren modificaciones (por ejemplo adición de la

estructura CAP en la región 5', corte y empalmamiento de la secuencia nucleotídica y la adición de la cola de poly A en la región 3' de los transcritos) antes de ser translocados al citoplasma para ser traducido por los ribosomas para formar proteínas. Después de este evento, se llevan a cabo las modificaciones postraduccion en cada una de las subunidades recién sintetizadas en el gonadotropo, incluyendo la glicosilación descrita anteriormente (Hamernik, 1995).

2.6.2) Regulación

A la fecha ha sido ampliamente documentado que la regulación de la secreción de las gonadotropinas, se realiza por una serie de eventos altamente coordinados y orquestados. Estos eventos son modificados por diferentes factores, como los neuroquímicos y endocrinos que activan el sistema nervioso central, a la adenohipófisis y a los ovarios, cada uno de estos órganos a su vez sintetizan y liberan una serie de hormonas, por ejemplo la GnRH, a la LH y FSH, así como a los esteroides y péptidos gonadales respectivamente (Smith y Jennes 2001).

2.6.2.1) GnRH

La primera señal neuroendocrina que regula la síntesis y secreción de las gonadotropinas en la hembra es la GnRH, esta hormona es un decapeptido que es sintetizado y liberado de manera pulsátil por el hipotálamo (Bauer-Dantoni et al., 1995), actúa a nivel de la adenohipófisis, en particular en los gonadotropos, para inducir la síntesis de sus propios receptores y la expresión del gen para la subunidad α común de las gonadotropinas y la subunidad β específica para cada una de ellas. De manera importante también participa en la glicosilación de la LH (Liu et al., 1976 y Vogel et al., 1986), así como en el patrón selectivo de secreción de las gonadotropinas, de acuerdo a la frecuencia de pulsatilidad en las etapas del ciclo estral (Caraty et al., 1998), es decir, la expresión del mRNA para la subunidad α y β LH se ve favorecida cuando la pulsatilidad de GnRH es mayor (fase folicular, 1 pico cada 90 min), en contraste, cuando la pulsatilidad de la GnRH es poco frecuente (fase lútea temprana, un pico cada 4 horas, hasta la presencia de un pico cada 8 a

12 horas en la fase lútea tardía), la síntesis y expresión del ARNm para la subunidad β FSH se ve incrementada (Nett et al., 2002).

El mecanismo de acción de la GnRH en el gonadotropo, se inicia con la unión del decapeptido a su receptor de membrana. El receptor para la GnRH (rGnRH), es una proteína acoplada a la proteína G y forma parte de la familia de receptores heptacadenarios, que se caracteriza por la ausencia de un dominio intracelular y la traducción de la señal se realiza a través de la tercera asa intracelular de la proteína (Chabbert-Buffet et al., 2000). Con la formación del complejo hormona-receptor se continúa la activación de la fosfolipasa C, que cataliza la síntesis de segundos mensajeros como el fosfatidilinositol (IP_3) y diacilglicerol (DG) a partir de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2), y un acople directo del complejo hormona-receptor con los canales de calcio presentes en la membrana del gonadotropo (Chabbert-Buffet et al., 2000). IP_3 , produce movilización del calcio de almacenes intracelulares, mientras que DG incrementa la fosforilación de proteínas a través de la activación de proteína cinasa C (Anderson et al., 1996). Esta señal estimuladora es relevada al núcleo vía factores de transcripción, que se unen a unidades de secuencias discretas del DNA en la subunidad de las gonadotropinas, para activar la expresión del gen de las gonadotropinas o del gen para el receptor de la GnRH.

La regulación de la actividad neural de las células productoras de la GnRH en el hipotálamo, se realiza de manera indirecta, ya que diversos estudios han demostrado que las neuronas productoras de la GnRH carecen de receptores para el estradiol (E_2) y progesterona (P_4), dos hormonas que se encargan de la regulación de la pulsátilidad de la GnRH en diferentes estadios fisiológicos del animal. Por otro lado, se ha identificado la presencia de receptores para las hormonas esteroides en un grupo de neuronas aferentes interrelacionadas con las neuronas productoras de la GnRH, las cuales son estimuladas con E_2 y P_4 para producir sus correspondientes neurotransmisores y neuropeptidos, que se encargan de estimular o inhibir la síntesis y secreción de la GnRH de forma directa sobre las neuronas que sintetizan y liberan este decapeptido (Mahesh y Brann, 1998)

Recientemente con la utilización de técnicas de inmunohistoquímica de doble marcaje e hibridación *in situ*, se ha identificado la presencia de receptores para diferentes neurotransmisores y neuropéptidos dentro de las neuronas productoras de la GnRH (Smith et al., 2000). Por ejemplo se ha identificado receptores para catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), serotonina y aminoácidos excitatorios (glutamato y aspartato), que participan estimulando la síntesis y secreción de la GnRH. En contraste se conoce que el ácido aminobutírico (GABA), es el mejor inhibidor en la regulación de la secreción de la GnRH; Mientras que el neuropéptido Y, facilita la liberación de la GnRH y potencia la respuesta de los gonadotropos a la GnRH (Kalra, 1993). Neurotensina media el efecto estimulatorio en la secreción de la GnRH a través de los estrógenos (Herbison, 1998). Los péptidos opioides constituyen un importante componente inhibitorio en el circuito neural que regula la secreción de la GnRH. (Kalra, 1993).

2.6.2.2) Estradiol (E₂)

El estradiol es un importante regulador del eje hipotálamo-hipófisis en animales, de hecho se conoce que la administración aguda de estradiol a borregos ovariectomizados o anéstricos pre-sensibilizados con estradiol, induce un pico de LH y FSH semejante al pico preovulatorio (Nett et al., 1990; Hamernik et al., 1995). Este evento involucra dos parámetros; el primero corresponde, a un aumento en la síntesis e inserción de receptores de la GnRH en la membrana del gonadotropo, el que se realiza en un corto tiempo (4 a 6 h en la borrega, Gregg et al., 1990). El segundo evento, se refiere al estímulo sostenido de secreción de la GnRH por parte del hipotálamo, que se inicia de 12 a 15 h después de la administración del estradiol (Moenter et al., 1991), cuando horas antes se incremento el número de receptores en el gonadotropo. Así se puede establecer que el pico preovulatorio de las gonadotropinas inducido por el estradiol, se debe a una acción del estradiol en la hipófisis, incrementando la sensibilidad de la hipófisis al GnRH y una acción a nivel hipotálamico, induciendo un incremento sostenido en la liberación de la GnRH,

estimulando una liberación masiva de la LH por parte del gonadotropo necesaria para la inducción de la ovulación (Nett et al., 2002).

Por otro lado, la administración crónica de estradiol a animales ovariectomizados disminuye la cantidad de ARNm que codifica para las subunidades de las gonadotropinas (Nett et al., 1990). Sin embargo el mecanismo molecular de cómo el estradiol participa inhibiendo la transcripción de los genes de las gonadotropinas se está dilucidando. A este respecto, Nett et al. (2002), analizaron la acción directa del estradiol en gonadotropos aislados de borrego en la síntesis y secreción de la gonadotropinas, presentando que el estradiol actúa directamente sobre la hipófisis, modificando la expresión del gen de las gonadotropinas, influyendo en la cantidad de gonadotropinas secretadas, es decir que la secreción de la LH se incrementa hasta tres veces, mientras que la secreción de FSH es disminuida hasta un 60%, este patrón diferenciado en la secreción de las gonadotropinas al medio de incubación, se puede explicar en función de que en el gen de la subunidad β LH presenta un elemento de respuesta específico al estradiol que regula positivamente la expresión del gen, en contraste, no se ha identificado en la subunidad β FSH este elemento, de forma tal, que se puede inferir que la ausencia de este elemento de respuesta dentro del gonadotropo regula la síntesis y secreción de las gonadotropinas bajo la acción del estradiol (Hamernik,1995).

2.6.2.3) Progesterona (P_4)

Otro de los elementos que participan en la regulación de la síntesis y liberación de las gonadotropinas es la progesterona; Es una hormona secretada después de la ovulación por el cuerpo lúteo, bajo el control de la LH. El principal sitio de acción de la progesterona es el tracto reproductivo y el eje hipotálamo-hipófisis (Niswender et al., 2000). El mecanismo de acción de la P_4 se realiza a dos niveles, el primero corresponde a nivel genómico, en donde la progesterona se une a receptores nucleares específicos con factores de transcripción nucleares, que en conjunto, se unen a un elemento de respuesta específico a la progesterona presente en el ADN, para regular la expresión del gen (Chabbert-Buffet et al., 2000, Gina y



Nett, 1995). El segundo corresponde a nivel de membrana o de tipo no genómico, que envuelve la interacción de esta hormona con canales iónico, receptores de neurotransmisores o receptores de hormonas peptídicas como la oxitocina (Grazzini et al., 1998).

La participación de la progesterona en el ciclo reproductivo en diferentes especies ha sido bien establecido, por ejemplo, en la fase folicular, la progesterona en la circulación se presenta en bajas concentraciones, con un incremento en la circulación de estradiol que actúa a nivel del hipotálamo e hipófisis para estimular la liberación pulsátil de la LH con una baja amplitud y alta frecuencia, que resulta en una concentración elevada en la circulación. En contraste, después de la ovulación se inicia el desarrollo del cuerpo lúteo y con ello un incremento en la concentración de la progesterona, que restringe la secreción de la LH a pulsos de baja frecuencia y alta amplitud, que resultan en una reducida concentración promedio de LH en la circulación (Niswender et al., 2000).

Estos efectos de la progesterona son el resultado de una acción tanto en hipófisis como en el hipotálamo, es decir, la progesterona bloquea los picos de GnRH desde el hipotálamo; a nivel de la hipófisis, la progesterona reduce el número de receptores para la GnRH en el gonadotropo, por medio de la inhibición de la transcripción del gen que codifica el RNAm para el receptor de la GnRH.

En resumen, se puede establecer que la progesterona disminuye la cantidad de la LH liberada en respuesta a la GnRH, en parte, como resultado de la reducción en el número de receptores presentes en el gonadotropo. Por otro lado, altos niveles de progesterona resulta en una disminución en la expresión de los genes que codifican la subunidad β LH y la subunidad α , común de las glicoproteínas, a través de la reducción del tamaño del RNAm para las diferentes subunidades, presumiblemente modificando la estabilidad del RNAm por la remoción del tallo de polyA (Gina y Nett, 1995).



La regulación de la progesterona está íntimamente relacionada con el estradiol, existen múltiples evidencias que la expresión del receptor de la progesterona se regula positivamente por el estradiol en diferentes eventos. En contraste, la progesterona regula negativamente a sus propios receptores y los receptores para el estradiol. Por otro lado, se conoce que los receptores para la progesterona no se expresan en las neuronas productoras de la GnRH en especies como la ovina, bovina, rata y primates no humanos, de forma tal que la pulsátilidad de la GnRH regulada por la progesterona se realiza de manera indirecta, es decir que la interacción progesterona con neuronas productoras de GnRH se realiza a través de neuronas periféricas como el sistema opioide, colinérgico y ácido γ -aminobutírico (GABA).

2.6.2.4) Sistema Activina-Inhibina-Folistatina

La inhibina es una proteína dimérica glicosilada, secretada por las células de la granulosa (hembra) y en la células de Sertoli (macho) en respuesta a la FSH (Ying, 1988). Es un heterodímero de peso molecular de 32 kDa, formado por una subunidad α específica (peso molecular de 18kDa), unida por puentes disulfuro a las subunidad β A o β B (14 kDa), para formar la inhibina-A o inhibina-B respectivamente. (Calogero et al., 1998). Las subunidades aisladas no presentan actividad biológica (Ying, 1988). En el líquido folicular bovino, se han encontrado diferentes isoformas de inhibina con un peso molecular que va de 29 a >169 kDa, sin embargo la significancia biológica de estas múltiples formas de inhibina no es clara, y parece que las formas diméricas presentan la misma potencia biológica (Hopko et al., 1994).

La inhibina es sintetizada por una variedad de tejidos, que incluyen al ovario y la hipófisis, específicamente al gonadotropo. En el gonadotropo, la inhibina participa de manera paracrina, inhibiendo la síntesis de FSH, a través de regular negativamente la expresión del gen que codifica para β FSH (Schwall, 1998)

Las isoformas de la inhibina, se sintetizan y se liberan de manera diferencial de acuerdo a los estadios de desarrollo del folículo, por ejemplo en rumiantes, la concentración de la inhibina-A es mayor en los folículos en etapa de regresión o en folículos atrésicos, en contraste, la concentración de inhibina-B es alta en la fase folicular y va disminuyendo progresivamente hasta el momento de la ovulación (Knight et al., 1998). En la actualidad no se conoce exactamente cual es el mecanismo por el cual se realiza dicho evento, sin embargo, se han logrado identificar dos proteínas unidoras a la inhibina, por ejemplo la folistatina y la alfa-2 macroglobulina. La alfa-2 macroglobulina es una proteína que presenta alta capacidad de unión y baja afinidad por la inhibina, mientras que, la folistatina es de alta afinidad y baja capacidad de unión a la inhibina. Por otro lado, se ha identificado un dimorfismo en la secreción de las isoformas de inhibina, por ejemplo en la rata y humanos, la hembra secreta ambas isoformas de inhibina, en contraste, en el macho aparentemente se sintetiza y secreta exclusivamente inhibina-B (Price et al., 1995).

La síntesis y regulación de la inhibina se realiza principalmente por la FSH, por ejemplo, en rumiantes se ha confirmado que la FSH incrementa la concentración plasmática de inhibina-A, tanto *in vivo* como *in vitro*. Otros factores como el estradiol, han demostrado que influyen en la secreción de la inhibina, en particular en la isoforma inhibina-A pero no la inhibina-B, mientras que el factor de crecimiento tipo I (IGF-1), participa incrementando la expresión de la subunidad alfa que constituye a la inhibina (Price et al., 1995; Knight et al., 1998).

La activina, es una proteína homodimérica, formada por la unión de dos subunidades β . Se conocen tres diferentes formas moleculares de esta proteína: Activina A, que es un homodímero de subunidades βA , activina B, un homodímero de βB y la activina AB como un heterodímero (Ying et al., 1988). La función de estas proteínas consiste en incrementar la síntesis y liberación de la FSH por parte del gonadotropo (Anderson, 1996).

La folistatina, es una proteína glicosilada, formada por una cadena polipeptídica. Se conocen seis o más isoformas de esta proteína, que presenta un peso molecular de 31 a 45 kDa. Se ha documentado que esta isoformas presenta una región rica en cisteínas en la posición del amino terminal. En cuanto a su actividad biológica existen controversias ya que se ha documentado que las isoformas de mayor tamaño son las más bioactivas, en contraste existen evidencias que las isoformas de menos tamaño son las más bioactivas.

En el ovario, la folistatina se expresa en las células de la granulosa en el inicio de las células lúteas, con un aumento progresivo a través de la maduración folicular y una disminución en el folículo preovulatorio, después de la ovulación, desaparece con la luteólisis.

La regulación de la folistatina en el ovario se ha documentado en la rata, porcino, y la especie humana, en estudios que indican que la FSH y la activina regulan positivamente la expresión de la folistatina de manera individual o en sinergismo. Por otro lado el factor de crecimiento del tipo I o IGF, inhibe la expresión de la folistatina inducida por la FSH, mientras que la LH lo realiza con poco efecto. También es producida en la adenohipófisis, una proteína que une a la activina y puede disminuir la síntesis de la FSH por secuestrar a la activina. Un elemento que participa en la disminución de la secreción de la FSH es el estradiol, por inhibir la producción de activina por el gonadotropo, o estimulando la producción de folistatina (Meunier et al., 1988).

2.7) Vida media de la LH

La tasa de depuración de las gonadotropinas, es un proceso donde participan la tasa de filtración glomerular, la degradación de la proteína por medio de proteasas (neuraminidasas), y la remoción activa vía receptores específicos en el hígado (por ejemplo, el receptor a glicoproteínas sializadas y el receptor a glicoproteínas sulfatadas). Influyen en este proceso algunas características de la proteína, como el tamaño molecular, la distribución de cargas eléctricas en la molécula, su hidrofobicidad, y la estructura y

Cuadro 1. Tasa de depuración de la hormona luteinizante (LH) en diferentes especies

Hormona	Tasa de depuración (T½)			
	Nativa		Deglicosilada ⁷	
	Componente A (min)	Componente B (min)	Componente A (min)	Componente B (min)
bLH ^{1,2}	0.47; 1.2; 2.0	27	2.0	N.D.
bLHr-sializada ¹	3.4	64	2.0	N.D.
oLH ³	5.0; 31.3	39.3	----	N.D.
HLH ^{5,3}	5.0; 12.8; 17.1	58.9	N.D.	8.6
hCG ¹	2.0	119	4.2	N.D.

bLH = hormona luteinizante de origen bovino; bLHr-sializada = hormona luteinizante bovina recombinante con ácido siálico; oLH = hormona luteinizante ovina; hLH = hormona luteinizante de origen humano; hCG = Gonadotropina coriónica humana. ⁷Corresponde a formas desulfatada o desializadas, por métodos enzimáticos o químicos. N.D. corresponde al componente no identificado después de la modificación.

¹ Baenziger et al., 1992.

² Mi et al., 2002.

³ Ascoli, 1981.

⁴ Moore et al., 2000.

⁵ Burgon et al., 1996.

⁶ Robertson et al., 1991.

contenido de carbohidratos. En conjunto estas características pueden participar en la longevidad circulante de la proteína (Kronman et al., 2000; Drickamer, 1991).

La tasa de depuración de las gonadotropinas ha sido documentada (cuadro 1), y donde se ha establecido en general que la vida media de la LH presenta dos componentes, uno con mayor tasa de depuración metabólica, que corresponde a 0.48 minutos y uno de menor tasa metabólica de 2.04 minutos (Yiling et al., 2002).

2.8) Heterogeneidad estructural y funcional de la LH

Como ya se ha señalado en el capítulo 2, la hormona luteinizante al igual que otras glicoproteínas no es una estructura de forma única, sino que está constituida por un grupo de proteínas o isoformas, que comparten algunas características: 1) Son proteínas heterodiméricas, estructuralmente formadas por una subunidad α común, unida no covalentemente a la subunidad β , que es única en cualquier miembro de las gonadotropinas (Bousfield et al., 1998; Cole et al., 1987; Baenzinger y Green, 1988; Pierce y Parsons 1981; Cooke et al., 1996), 2) La síntesis y almacenamiento se realiza en el mismo tipo celular, el gonadotropo (Childs, 1994).

En los últimos años, se ha observado que esta heterogeneidad de las gonadotropinas, se debe a las unidades de carbohidratos presentes en la molécula, los cuales presentan variaciones en su composición, como el grado de sulfatación, el contenido de ácido siálico y el tipo de ramificación (Ulloa-Aguirre et al., 1999; Creus et al., 2001), sin embargo el origen del polimorfismo de las gonadotropinas no puede ser atribuido únicamente a la variabilidad de las cargas negativas de los residuos terminales de los oligosacáridos (Ulloa-Aguirre et al., 2001), sino también a la estructura molecular de la proteína (Kronman et al., 2000).

La heterogeneidad que presentan las gonadotropinas, se refleja en diferentes propiedades, fisicoquímicas y funcionales, que incluyen diferencias en su punto isoeléctrico, en la tasa de



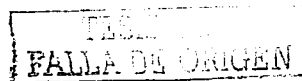
depuración metabólica, en la regulación de la potencia biológica *in vivo* e *in vitro*, e intensidad de respuesta de la célula blanco por diferencias en la traducción de la señal que lleva la hormona (Chappel et al., 1982; Ulloa-Aguirre et al., 1995; Ulloa-Aguirre et al., 2001).

2.8.1) Isoformas de la LH en los rumiantes

La distribución relativa de las isoformas de las gonadotropinas, se ha estudiado en hipófisis, suero y orina (Ulloa-Aguirre et al., 1995), utilizando diferentes herramientas, tales como el isoelectroenfoque, la electroforesis en suspensión de agarosa y el cromatoenfoque (Ulloa-aguirre et al., 1999). Con el cromatoenfoque, se han identificado en extractos hipofisarios de rumiantes, isoformas de la LH y FSH (Cooke et al., 1996, Ulloa-Aguirre et al., 1995), es con esta herramienta que se han descrito 13 isoformas de la LH (Zalesky y Grotjan 1992) y 9 isoformas para la FSH (Stumpf et al., 1992). Las isoformas predominantes de la LH, correspondieron a aquellas proteínas que eluyeron en el rango de pH de 9.2 a 8.5, en tanto que las isoformas de FSH predominantes, eluyeron en un rango de pH de 5.05 a 4.78.

La variación en el patrón de distribución de las isoformas de las gonadotropinas presente en el suero e hipófisis en la especie humana (Ulloa-Aguirre et al., 1995), ha sido documentada en diferentes condiciones fisiológicas, como en el inicio de la pubertad (Phillips et al., 1997), el ciclo menstrual (Padmanabhan et al., 1988; Zambrano et al., 1995) la senectud (Wide 1985; Anobile et al., 1998) y la obesidad (Castro-Fernández et al., 2000), en donde los diferentes estudios, enfatizan la importancia de la prevaencia del medio ambiente endocrino, que determina el tipo o tipos de gonadotropinas sintetizadas y secretadas.

La información referente al patrón de distribución de las isoformas de la LH en rumiantes ha sido documentado únicamente en extractos hipofisarios (Cooke et al., 1996), en donde se ha determinado la participación de las hormonas esteroides en la regulación de la



distribución de la LH, por ejemplo, Zalesky et al. (1992), identificaron el patrón isoformas de la LH en diferentes etapas del ciclo estral de la especie ovina, en particular, en la fase folicular (mañana del estro), fase lútea (día 11 del ciclo) y en la etapa de anestro. Los resultados mostraron que el patrón de distribución de las isoformas, tanto en la fase folicular como en la fase lútea no se modificaron, sin embargo, comparando la etapa de anestro con la etapa reproductiva, se presentó un incremento en el porcentaje de isoformas ácidas, así como de aquellas isoformas que eluyeron a pH 9.1 y <9.0-7.0, con una disminución en las isoformas más básicas. Por otro lado Keel et al. (1987), identificaron este patrón en ovinos castrados y estimulados crónicamente con esteroides gonadales, en particular con Dihidroxitestosterona (DHT) y estradiol (E₂). Los resultados mostraron un patrón de isoformas de elución a pH más básicos, cuando los animales se estimularon con DHT; en contraste el patrón se comporto hacía formas más ácidas cuando se estimularon con E₂, cuyos resultados fueron corroborados en otros estudios (Christianson et al., 1998, Stumpf et al., 1992).

Por otro lado, se ha identificado la participación de la GnRH en la regulación de la distribución de la LH, por ejemplo, Zalesky et al. (1993), identificaron el patrón de distribución de la LH en borregas inmunizados activamente contra GnRH. Los resultados mostraron que la inmunización disminuyó drásticamente el contenido de la LH intrahipofisaria y la heterogeneidad de la LH mostró un patrón predominante de elución a pH 9.2. En contraste, en este mismo estudio, el porcentaje de las isoformas que eluyeron en el rango de pH<9.0->7.0 fue mayor en animales castrados y castrados e inmunizados, cuando se compararon con animales intactos e intactos-inmunizados. El grupo de isoformas ácidas (≤ 7.0) fue menor únicamente en el grupo de animales castrados, en comparación a los otros grupos. Estos datos confirmaron que la eliminación del péptido hipotalámico (GnRH), reduce la cantidad de la LH presente en la hipófisis, también altera el patrón de distribución de las isoformas de la LH intrahipofisaria, en particular, incrementa el porcentaje de la isoforma que eluye a pH 9.2.

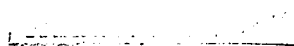
En la especie bovina, se ha analizado el patrón de distribución de la LH intrahipofisaria bajo el efecto de los esteroides gonadales, en particular con el estradiol, por ejemplo Stumpf et al. (1992), identificaron este patrón de distribución en vaquillas ovariectomizadas, en diferentes estadios de maduración sexual (prepúber, peripúber y pospúber) bajo el efecto del estradiol. En general, se observó que el grupo de vaquillas ovariectomizadas, presentó un patrón de distribución hacia isoformas básicas y un bajo porcentaje de isoformas ácidas, comparadas con el grupo de vaquillas intactas en un estado similar de maduración sexual. Por otro lado, el perfil de isoformas de la LH en el grupo de animales OVX en presencia de estradiol (OVXE) fue alterado como resultado de la concentración circulante de E_2 . Por ejemplo, cuando la concentración de E_2 fue similar en el grupo OVXE-peripúber y el grupo intacto-peripúber, el patrón de isoformas de LH fue similar. En contraste, la administración de E_2 al grupo OVXE-prepuberal, presentó un mayor porcentaje de isoformas ácidas de LH que el grupo intacto. Finalmente, el análisis del patrón de distribución de isoformas de la LH entre el grupo de animales intactos, en los tres estados de maduración sexual no mostró cambio alguno.

En otro estudio descrito por Kojima et al. (1995), en el cual analizaron, el efecto del estradiol sobre el patrón de distribución de las isoformas de LH y FSH intrahipofisaria durante la fase folicular del ciclo estral, previo al pico de las gonadotropinas. Los resultados obtenidos por medio del cromatofluorografía, en general, no mostraron diferencia en el patrón de distribución de isoformas de la LH, así como el contenido de la LH intrahipofisaria total entre el grupo control y los grupos OVXE y OVX. Aunque diversos estudios, han establecido que en animales gonadectomizados se incrementa significativamente el porcentaje de isoformas básicas, y que la terapia de reemplazo con estradiol, modifica este patrón hacia un mayor porcentaje de isoformas ácidas de la LH, los resultados de este estudio, no mostraron la respuesta de la misma magnitud a lo informado en otros estudios. Por otro lado, en este estudio, que simuló la fase folicular del ciclo estral en bovinos ovariectomizando que recibieron E_2 en diferentes momentos, previo al pico preovulatorio de la LH: con este modelo no se encontró un cambio significativo en la distribución de las

isoformas de la LH intrahipofisaria, aunque el patrón de la pulsátilidad de la LH fue diferente.

Pocos estudios en rumiantes, han analizado las diferencias entre la proporción de las diversas isoformas de las gonadotropinas presentes en la hipófisis y las que se encuentran en la circulación. Por ejemplo, Zalesky y Grotjan (1991), informan el patrón de distribución de las isoformas de la LH en la adenohipófisis bovina y ovina, en un sistema de perfusión *in vitro* que asemeja la dinámica de un ambiente *in vivo*, en condiciones basales y estimuladas con GnRH. por otro lado se analizó el patrón de heterogeneidad de la LH intrahipofisaria antes y después de la perfusión. La heterogeneidad de la LH en todas las muestras obtenidas en condiciones basales y estimuladas con GnRH, así como los extractos hipofisarios antes y después de la perfusión, presentó la isoforma predominante en los extractos de hipófisis de ambas especies, que correspondió a la isoforma que eluyó a pH 9.1, con un porcentaje semejante a las muestras después de la perfusión. La presencia de isoformas altamente básicas (pH >9.6) no fueron detectadas en las muestras de rebanas de hipófisis en condiciones basales e inducidas con la GnRH en bovinos. En contraste, solo la isoforma de elución a pH 10.6 en ovinos no fue detecta en estas condiciones, lo que demuestra que existe un patrón diferente de secreción de isoformas entre especies. Por otro lado, no se presentó diferencia entre las isoformas que eluyeron a pH 9.4 y 9.2 en las muestras de rebanadas de hipófisis bovinas en condiciones basales y estimuladas con GnRH en comparación a la de extractos hipofisarios antes y después del estímulo, no así para el ovino, en donde el porcentaje de estas dos isoformas fue inferior en las muestras perfundidas antes y después del estímulo con GnRH en comparación con las muestras intracelulares.

En resumen, se puede apreciar que la información de la heterogeneidad de la LH en los rumiantes, se ha limitado únicamente a estudios en la adenohipófisis, bajo el efecto de esteroides gonadales y en particular del estradiol, así como el efecto de la GnRH, y únicamente en un solo artículo, se relacionó con la presencia del tipo o tipos de isoformas



presente en la hipófisis, en comparación a las formas secretadas, luego entonces esta limitada información en los rumiantes hace a estas especies un modelo ideal para realizar estudios sobre la heterogeneidad de la LH *in vivo* .

CAPITULO 3

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El pleomorfismo que presentan las gonadotropinas, tanto en la hipófisis, suero y orina, ha sido documentado bajo diferentes condiciones fisiológicas, en humanos y roedores (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Padmanabhan et al., 1999). En contraste la información para los ruminantes, se ha limitado a estudios en la hipófisis y algunas evidencias se han presentado en suero en la especie ovina en particular para la FSH (Hassing et al., 1993; Padmanabhan et al., 1992). Recientemente en este laboratorio hemos descrito el patrón de elución de las isoformas de la LH para la especie caprina en dos etapas del ciclo estral (Rojas et al., 2001), cuyos resultados mostraron un patrón de distribución de las isoformas de la LH de tipo ácido en la etapa de anestro en contraposición a lo observado en etapa de estro. Sin embargo, la información referente a las isoformas presentes en la circulación para la especie bovina es desconocida, posiblemente por las limitaciones que impone la concentración relativamente baja de estas hormonas en las diferentes condiciones fisiológicas (Hassing et al., 1993), por lo que es difícil de valorar su participación de cada una de las isoformas en el proceso reproductivo en esta especie. Por otro lado, la información de la heterogeneidad de la LH obtenida de extractos hipófisarios en diestro y estro (Zalesky et al., 1992; Kojima et al., 1995) informaron, que no existe una diferencia en el patrón de distribución de las isoformas de la LH entre etapas analizadas, a pesar de haber encontrado un patrón de secreción de la LH completamente diferente. Con base en esto, este trabajo consistió en conocer el patrón de distribución de las isoformas de la LH presentes en la circulación en dos etapas importantes del ciclo estral, caracterizadas por un patrón de liberación de la gonadotropina contrastante entre una y otra de las etapas (estro vs diestro), así como analizar la variabilidad de respuesta entre individuos.

Aunque es conocido que el polimorfismo de las gonadotropinas es regulado por la GnRH, péptidos y esteroides gonadales, en particular por el estradiol (E_2) y Dihidrotestosterona (DHT), la información referente a la participación de la progesterona en este fenómeno es

desconocida. Con base en esto, el segundo objetivo que se desarrollo aquí, correspondió a conocer el efecto que pueda tener la progesterona sobre el patrón de distribución de isoformas de la LH y FSH intrahipofisarias en vaquillas Cebú X Suizo.

Recientemente, se ha discutido la necesidad del desarrollo de sistemas analíticos (RIA o ELISA), específicos y precisos para la identificación de las isoformas de las gonadotropinas (Ulloa-Aguirre et al., 2001; Padmanabhan et al., 1999), ya que muchas de las evidencias, han presentado diferentes valores de actividad inmunológica para una misma hormona, cuyos resultados dependen fundamentalmente del sistema y tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal), luego entonces, existe la necesidad de obtener y purificar en cantidades suficientes cada una de las isoformas, lo que permitirá el desarrollo de sistemas analíticos confiables, homólogos y específicos para cada isoforma, y conocer el patrón de secreción de las isoformas de la LH en diferentes condiciones fisiológicas, es por ello que aquí se presenta como tercer objetivo de este estudio, la purificación de cinco isoformas de la LH a partir de extractos glicoproteínicos de adenohipófisis bovinas, obtenidas a través de un método convencional y sencillo basado en la carga de la proteína (intercambio iónico), que permitirá la obtención de isoformas de la LH con alto rendimiento.

Es con todo esto, que en este trabajo se plantearon la siguiente hipótesis de trabajo y objetivos generales como particulares:

CAPITULO 4

HIPÓTESIS

- 1.- El patrón de distribución de las isoformas de la LH presentes en la circulación, se ve modificada en diferentes etapas del ciclo estral en la hembra bovina.
- 2.- El patrón de distribución de las isoformas de la hormona luteinizante y foliculo estimulante de origen hipofisario son modificadas por la presencia de progesterona.
- 3.- El método de purificación con intercambiadores iónicos, permitirá obtener isoformas de la LH, con actividad biológica e inmunológica.

OBJETIVO GENERAL

- 1.- Identificar el patrón de distribución de las isoformas de la hormona luteinizante (LH) intrahipofisarias y circulantes en la especie bovina bajo diferentes condiciones fisiológicas.
- 2.- Aislar y purificar isoformas de la hormona luteinizante a partir de extractos glicoproteínicos de adenohipófisis bovina con suficiente rendimiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el patrón de distribución de las isoformas circulantes de la hormona luteinizante bovina (bLH) durante la etapa de estro y diestro.
- 2.- Conocer el efecto de la progesterona sobre el patrón de distribución de las isoformas intrahipofisarias de la hormona luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH) en vaquillas F1.
- 3.- Obtención y purificación de isoformas de la hormona luteinizante bovina (bLH), su caracterización, físicoquímica, biológica e inmunológica.



Capítulo 5

**PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS CIRCULANTES
DE LA HORMONA LUTEINIZANTE DURANTE LA ETAPA DE
ESTRO Y DIESTRO EN VAQUILLAS HOLSTEIN**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

En este estudio, se analizó el patrón de distribución de las isoformas de la LH circulantes, en la especie bovina, en dos etapas del ciclo estral, correspondientes al estro y al diestro. En cada etapa, se utilizaron siete vaquillas Holstein ciclando, sincronizadas con PGF2 α . En el estro, una vez detectado el celo, se tomaron muestras de sangre cada 2 h durante 24 h. En el diestro, a los animales que presentaron cuerpo lúteo, se les administró i.v. 250 μ g de GnRH y se colectaron muestras sanguíneas cada 15 min. durante 5 h. La concentración de la LH presente en la muestras, se determinó por medio de un radioinmunoanálisis de segundo anticuerpo, específico para LH y solo aquellas muestras con mayor concentración de LH en el estro (pico preovulatorio) y las colectadas a los 60 min. después de la GnRH (diestro), se analizaron por medio del cromatofoco, el que se eluyó con un gradiente de pH de 10.5 a 3.5. La LH eluida, se agrupó en isoformas básicas (pH \geq 7.5), neutras (pH 7.4 a 6.5) y ácidas (pH \leq 6.5), así como por unidad de pH. En ambas etapas, las formas básicas fueron las más abundantes, esto fue significativamente mayor durante el diestro (78.4 \pm 4.2%) que en el estro (57.1 \pm 6.2%), en tanto que la proporción de las formas neutras (13.7 \pm 2.6%) y ácidas (28.5 \pm 2.8%) en el estro fue superior a lo observado en el diestro (3.0 \pm 0.7 y 18.7 \pm 3.4). Estos resultados, indican que la condición ovárica afecta significativamente la proporción relativa de distintas isoformas de la LH que se sintetizan y secretan por la hipófisis. La proteína que eluye después de la aplicación de NaCl en la columna, modifica la unión antígeno-anticuerpo del RIA y sin ser LH y se cuantifica como tal, lo que es un artificio de la técnica. La variación entre individuos para la proporción de LH eluida en cada unidad de pH fue mínima, lo que sugiere la poca importancia de la variabilidad genética para esta característica en la raza Holstein.

Introducción

Las gonadotropinas, existen como una serie de isoformas, presentes en la hipófisis, en el suero y la orina (Ulloa-Aguirre et al., 1995). La microheterogeneidad, se debe en parte, a la estructura interna de los oligosacáridos (Combarous, 1988; Baenzinger and Green, 1988; Manzella et al., 1996). Este polimorfismo, repercute en sus propiedades fisicoquímicas, en

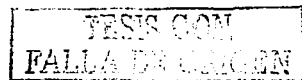
la actividad biológica *in vitro* (Creus et al., 2001; Barrios-De-Tomasi et al., 2002) e *in vivo* (Robertson et al., 1991; Burgon et al., 1996; Mi et al., 2002).

El patrón de distribución de las isoformas de las gonadotropinas, se ha estudiado en diferentes especies, en las que se incluyen el humano (Wide et al., 1993; Ropelato et al., 1999; Castro-Fernández et al., 2000), mono (Chappel et al., 1984), roedores (Chappel et al., 1982), equinos (Adams et al., 1986), cerdos (Nomura et al., 1989); ovinos (Zalesky et al., 1992; Hassing et al., 1993; Padmanabhan et al., 1992), bovinos (Zalesky and Grotjan 1991; Stumpff et al., 1992a; Kojima et al., 1995) y aves (Krishnan et al., 1994). En los rumiantes, el patrón de distribución de las isoformas de la LH, se ha identificado únicamente en el tejido hipofisiario en diferentes condiciones fisiológicas (Padmanabhan et al., 1992; Stumpff et al., 1992a; Cupp et al., 1995). Sin embargo, este polimorfismo no se conoce para la LH presente en la circulación en animales domésticos. Por lo tanto, en el presente estudio, se examinó el patrón de distribución de las isoformas de la LH en la circulación en la especie bovina, en dos etapas del ciclo estral; correspondientes al estro (momento del pico preovulatorio) y al diestro. Con base en esto, se hipotetizó que el patrón de distribución de las isoformas circulantes de la LH en las diferentes etapas del ciclo, serán diferentes. Un elemento adicional a estudiar fue la magnitud de la variabilidad de la proporción relativa de cada isoforma circulante de la LH entre individuos.

Material y métodos

Protocolo experimental y colección de suero

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Bovina y Caprina. "Rancho Cuatro Milpas" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM., ubicado en el Km 11.5 carretera Cuautitlán-Tepozotlán-San Esteban, Estado de México. El lugar se encuentra a una altura de 2450 msnm, tiene una precipitación pluvial anual de 630 mm y una temperatura media anual de 15.6°C (García, 1987).



Para el estudio en la etapa de estro, se utilizaron siete vaquillas de la raza Holstein, ciclando, con edad entre 12 y 14 meses, con un peso promedio de 270 ± 18 Kg. y una condición corporal de 3.0 (Edmonson et al., 1989). Los estros de los animales fueron sincronizados mediante la doble aplicación i.m. de PGF2 α con 11 d entre una y otra. Treinta seis horas después de la segunda dosis, se realizaron observaciones cada 4 h para la detección de celos y una vez detectado el celo, se les tomaron muestras sanguíneas cada 2 h durante las siguientes 24 h.

Para la etapa de diestro, se utilizaron siete vaquillas de la raza Holstein, con peso y condición corporal semejante a las del estudio en estro. A los 11 d después de la segunda dosis de PGF2 α , cuando presentaron un cuerpo lúteo (corroborado por valores mayores de ng/ml de progesterona en el suero), se les aplicó i.v. 250 μ g de GnRH (Fertagyl, Intervet) por animal, con el fin de incrementar la concentración de la LH en la circulación. Se colectaron dos muestras sanguíneas con un intervalo de una hora entre ellas antes del GnRH y, posteriormente se colectaron muestras cada 15 min. durante 5 h.

Muestras de suero para el cromatoenfoque

La concentración de la LH en los sueros colectados durante la etapa de estro, permitió identificar individualmente el pico preovulatorio y el que se indujo durante el diestro. Para el análisis de la heterogeneidad de la LH, se tomaron solo aquellas muestras identificadas en el cenit del pico preovulatorio, y las muestras colectadas a los 60 min. después de la aplicación de GnRH. Ambos grupos de muestras (4 ml de suero) fueron dializadas con membranas de un límite de exclusión de 12,000 a 14,000 daltones¹, durante un periodo de 48 h con cambios sucesivos de agua desionizada cada 8 h. Al término de este procedimiento, las muestras de cada suero fueron liofilizadas y almacenadas.

Cromatoenfoque

Las isoformas de la LH presentes en el suero, fueron separadas de acuerdo a su carga como fue previamente descrito (Castro-Fernández et al., 2000). En breve: Cada muestra dializada

y liofilizado (20 mg de proteína) se resuspendió en 4 ml con Pharmalyte (pH 8 a 10.5-HCl²)-HCL, diluido 1:45 con agua desionizada y ajustado a pH 7.0 y se aplicó a una columna (27cms X 0.7 i.d.) pre-empacada con una resina de intercambio iónico (PBE-118³), equilibrada previamente con 20 volúmenes de trietilamina-HCl, 0.025M (pH 11.0) y mantenida a 4°C. Las fracciones eluidas (2 ml), fueron colectadas con un flujo de 7 ml/h. El pH de cada fracción se midió, y cuando se llegó a pH 7.0 y se estabilizó durante más de diez fracciones, el amortiguador de elución fue cambiado por el polybuffer 74 (Pharmacia, Biotech), diluido 1:8 con agua desionizada (pH 3.5), con el fin de obtener las proteínas que eluyen de pH 7.0 a 3.5. Las proteínas unidas a la columna después de la elución con el pH inferior (pH 3.5), fueron recuperadas con la adición de 1.0 M de NaCl a la columna cromatográfica. Aquellas fracciones que eluyeron con el amortiguador Pharmalyte, se neutralizaron con una solución TRIS-HCl, 1.1M, pH 7.4 (200 µl), mientras que las fracciones eluidas con el polybuffer 74 y NaCl, se neutralizaron con imidazol 1.1M, pH 7.0 (200 µl). Todas las corridas cromatográficas se realizaron con amortiguadores desgasificados. A cada una de las fracciones sujetas a la neutralización del pH, se les determinó la concentración de LH, mediante el radioinmunoensayo (RIA) que se describe a continuación.

RIA de LH

La concentración de la LH en cada una de las muestras de suero colectadas durante la etapa de estro y diestro, así como las fracciones obtenidas durante el cromatofoco, se cuantificaron por triplicado, con un sistema de RIA en fase líquida, específico para la LH con 120 h de incubación a 4°C. En breve: El RIA se desarrollo empleando como trazador al USDA-bLH-B6, marcado con sodio[¹²⁵I] por medio de la técnica del IODO-GEN (Perera et al.,1996a); la preparación de LH de referencia correspondió al USDA-bLH-B5 a las dosis de 0.03 a 16 ng /tubo y el anticuerpo, se generó en conejo en este laboratorio, a partir del estándar NIDDK-oLH-26, el que se utilizó a una dilución final de 1:200,000 (previa

¹ Spectra/por #1; Spectrum Medical Industries

² Pharmalyte 0.36 meq/ml pH, Amersham Pharmacia Biotech AB

³ Polybuffer exchanger for chromatofocusing, capacity:50.4µmol. pH unit⁻¹ ml⁻¹



caracterización y titulación). La sensibilidad del ensayo fue de 0.03ng/tubo y el coeficiente de variación intra e interensayo, se determinó a partir de la dosis esperada con el 50 % de la relación logyt-log (Materi et al., 1986) y correspondió al 5% y 7% respectivamente. La especificidad del sistema se determinó con las siguientes hormonas: NIDDK-oLH-I-2 (100%), USDA-bLH-B5 (103%), NIDDK-oFSH-SRP2 (0.05%) y USDA-oTSH (0.02%); la NIDDK-bGH y NIDDK-oPRL no mostraron reacción cruzada. La separación de la fracción unida de la libre se realizó con segundo anticuerpo, diluido 1:80, previa incubación a 4°C por 24 h. El amortiguador del RIA, correspondió a fosfatos (0.05M, pH 7.2), NaCl 0.14 M y albúmina sérica bovina (BSA) 1% (peso/volumen).

Inmunotransferencia

Para corroborar lo observado mediante el RIA, de que las isoformas eluidas a distintas unidades de pH eran realmente LH, se procedió a procesar las fracciones obtenidas de tres corridas cromatográficas, agrupadas por unidad de pH. Para ello, cada grupo de fracciones se dializó (con membranas de un límite de exclusión de 12,000 a 14,000 Da, durante un periodo de 24 h con cambios sucesivos de agua desionizada cada 8 h) y liofilizó. Cada fracción dializada y liofilizada, se resuspendió en un volumen de 100 µl de agua desionizada, aplicando 10 µl de cada fracción en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Al término de la electroforesis, el gel se transfirió a un papel de nitrocelulosa, que se incubó durante 24 h con el anticuerpo utilizado en el RIA (1:500) y las bandas de proteína se revelaron con Biotina-Avidina, de acuerdo a lo informado por Perera et al. (1996b). El mismo procedimiento de inmunotransferencia se repitió, utilizando el anticuerpo USDA-βFSH (1:500). Finalmente, las fracciones ácidas se corrieron con un RIA de FSH previamente validado (Gong et al., 1995).

Análisis de las proteínas eluidas después de la aplicación a la columna de NaCl IM

Toda vez que en distintos estudios sobre isoformas de gonadotropinas en suero, se ha observado que luego de la aplicación a la columna de NaCl IM, eluyen una cantidad importante de proteínas inmunoreactivas a los anticuerpos contra LH o FSH (según el estudio), se procedió a corroborar que realmente se trata de gonadotropinas y no un

artefacto de la metodología. Para ello en la columna de intercambio iónico (PBE-118), se corrieron sueros de bovinos en diestro, con concentraciones de LH menores a 1 ng/ml de suero, que serían indetectables una vez distribuidas en 160 fracciones. Adicionalmente, se analizó el porcentaje de unión del anticuerpo a LH del RIA con suero bovino en diestro, en presencia de diferentes concentraciones molares de NaCl, desde 0.025M hasta 1.0M, previamente neutralizadas con 1.1M de imidazol. Finalmente se analizó el patrón de elución de la USDA-bLH-B5 marcada con sodio [¹²⁵I], por medio del cromatofluor, en las mismas condiciones como fueron analizados los sueros de diestro y estro.

Análisis estadístico

La información del porcentaje de la LH eluida en cada fracción, se agrupó en formas básicas (pH \geq 7.5), formas neutras (pH 7.4 a 6.5) y formas ácidas (pH \leq 6.4), así como en ocho rangos de pH de elución, que correspondieron a: pH \geq 10; 9.99-9.0; 8.99-8.0; 7.99-7.0; 6.99-6.0; 5.99-5.0; 4.99-4.0 y 3.99-3.5. Con el propósito de normalizar los datos, el porcentaje de la LH inmunoreactiva recuperada por grupo y por unidad de pH, se transformó a arcoseno y se sometió a un análisis de varianza, considerando los efectos de grupo de pH y estado fisiológico a que pertenecía la muestra (estro o diestro). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS.

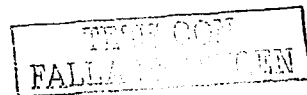
Resultados

El celo se observó en todos los animales a las 44.13 ± 5.27 h y la concentración máxima de LH sérica se identificó a las 50.19 ± 5.23 h. Los valores de la concentración máxima de LH sérica variaron entre 9.83 y 18.3 ng/ml en los animales muestreados durante el estro, en tanto que los valores de la LH en las muestras colectadas en la etapa de diestro, después de la aplicación de GnRH oscilaron entre 3.80 y 9.80 ng/ml. La Figura 1, presenta la distribución de la LH en los sueros bovinos, colectados durante la etapa de estro y diestro, respectivamente.



La Figura 2, presenta la validación del sistema de la LH desarrollado en este estudio, correspondiente a la curva estándar, el paralelismo con suero bovino y la especificidad del sistema.

El patrón de elución de los diferentes sueros analizados en el cromatofluorograma se presenta en la Figura 3A (estro) y en la Figura 3B (diestro). El análisis por grupo de pH (Cuadro 2), mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la proporción de formas básicas, neutras y ácidas entre la etapa de diestro y la de estro. En general las formas básicas fueron las más abundantes (78.4 ± 4.2 ; 57.8 ± 6.2), seguidas de las ácidas (18.7 ± 3.4 ; 28.5 ± 2.8) y las neutras que eluyeron en un pH más estrecho (7.4 a 6.5) mostraron la menor proporción tanto en el diestro como en el estro respectivamente (3.0 ± 0.7 ; 13.7 ± 2.6). El análisis por unidad de pH (Cuadro 3), mostró una isoforma de la LH de elución muy básica ($\text{pH} \geq 10$) que representó un porcentaje del $4.1 \pm 1.0\%$ del total de la observada durante el diestro, cercano a lo que ocurrió en el estro, donde esa forma correspondió a $3.2 \pm 0.2\%$ del total ($p > 0.05$). Las isoformas predominantes en ambas etapas del ciclo estral, correspondieron a las que eluyeron en el rango de pH 9.99-9.0: $38.4 \pm 4.1\%$ en diestro y del $30.2 \pm 2.8\%$ en estro ($p < 0.05$). Las que eluyeron a pH 8.99-8.0 representaron una proporción similar del total de la LH recuperada en cada etapa, es decir del $18.6 \pm 3.1\%$ en el diestro y del $21.5 \pm 2.6\%$, en el estro ($p > 0.05$). Las isoformas que eluyeron a pH neutro (7.99-7), mostraron un porcentaje significativamente mayor ($p < 0.05$) en la etapa de diestro ($17.4 \pm 6.7\%$) que en la etapa de estro ($9.9 \pm 0.3\%$), y las obtenidas a pH 6.99-6, correspondieron al $3.0 \pm 1.3\%$ en diestro, proporción significativamente menor ($P < 0.05$) a lo observado en estro ($7.2 \pm 0.3\%$). De las isoformas eluidas a pH más ácido, solo hubo diferencia entre el estro y el diestro en el rango de pH de 4.99 a 4.0. La variabilidad entre individuos, representada por los coeficientes de variación, entre el grupo de isoformas básicas, fue menor en la etapa de diestro (5.4%) que en estro (10.9%), en tanto que en las isoformas neutras y ácidas, la variabilidad en el diestro fue mayor (23.3% y 18.2%) que en el estro (19.3% y 9.9%), respectivamente. En cuanto a la variabilidad individual al hacer el análisis por unidad de



pH, el rango de coeficientes de variación fue más amplio en el diestro (10.7% al 43.3%) que en el estro (3.0% al 13.9%).

La inmunotrasferencia, mostró tres bandas inmunoreactivas con anti-oLH-26. La banda de peso molecular de 36.5 KDa, correspondió a la banda mayoritaria y dos bandas de peso molecular de 18 y 20 KDa, en las fracciones agrupadas por unidad de pH, patrón semejante al estándar USDA-bLH- B5 (Figura 4). Cuando se utilizó el anticuerpo a FSH, no se observaron bandas de reconocimiento (Cuadro 4).

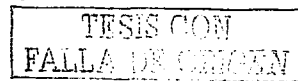
El patrón de elución de un suero, con concentraciones de LH < 1ng/ml por lo demás tratado como los sueros colectados en la etapa de estro, se presenta en la Figura 5A. Los resultados mostraron que solo después de la aplicación de NaCl 1M se obtuvieron fracciones con inmunoreactividad sostenida, similar a la LH, en tanto que en el panel B de la misma figura, se muestra que, las concentraciones molares crecientes de NaCl en presencia de suero y neutralizadas a pH fisiológico (pH 7.2), interfieren la unión entre la LH marcada y el anticuerpo, provocando un desplazamiento de la hormona marcada, lo cual se interpreta como presencia de LH no marcada inmunoreactiva. Finalmente en el panel C, se presenta el patrón de elución de la LH bovina marcada con sodio [¹²⁵I], el cual presentó el mismo patrón de elución de la LH nativa, sin observar fracciones de LH después de la aplicación de NaCl 1M.

Discusión

No existe información sobre el patrón de heterogeneidad de las isoformas de la LH presentes en el suero de animales domésticos en diferentes condiciones fisiológicas; en donde el pleomorfismo para esta hormona, se ha estudiado exclusivamente en la hipófisis. Por lo tanto, en este estudio se analizó la distribución de las isoformas de la LH sérica en dos condiciones fisiológicas (etapas de estro y de diestro) del ciclo estral de vaquillas Holstein, caracterizadas por un diferente patrón de secreción y mecanismo de regulación de la hormona (Caraty and Skinner, 1999).

En ambas etapas de estudio, el patrón cualitativo de elución de las isoformas de la LH secretadas a la circulación fue parecido, similar al encontrado en el suero humano (Castro-Fernández et al., 2000), así como en extractos hipofisarios bovinos (Perera et al., 2000) y ovinos (Christianson et al., 1998).

En términos cuantitativos el porcentaje de isoformas circulantes que eluyeron a pH básico ($\text{pH} \geq 7.5$) en la etapa de diestro (78.35 ± 4.17) y en la de estro (57.1 ± 6.20), presentaron diferencias significativas entre etapas, con resultados inferiores al porcentaje mostrado en adenohipófisis de ovinos y bovinos intactos, sin ningún tratamiento, tanto en machos como en hembras, colectadas en diferentes condiciones fisiológicas, donde los valores del porcentaje de isoformas básicas fluctuaron entre el 80.6 a 87.7% (Keel et al., 1987; Zalesky et al 1992; Zalesky et al., 1993; Kojima et al., 1995). En contraste, el porcentaje de isoformas acídicas en el estro (28.5 ± 2.8) y el diestro (18.7 ± 3.4), fueron diferentes entre etapas y superiores a lo determinado en extractos hipofisarios (7.48 % al 16.85%). Ninguno de los estudios en hipófisis, identificó cambios significativos en la proporción de isoformas básicas y acídicas cuando los animales fueron sometidos a tratamientos que podrían modificar la síntesis o secreción de la LH, incluyendo la gonadectomía, la aplicación de esteroides, la inmunización contra GnRH, o bien el obtener las hipófisis en diferentes etapas del ciclo ovárico. Estas posibles diferencias entre el suero y los extractos hipofisarios, pueden ser debidas al tipo de muestra analizada; por ejemplo, las isoformas de la FSH presente en extractos hipofisarios eluyen principalmente a pH menor a 5.5, en tanto que en el suero, la mayor proporción eluye a pH menor de 4.5, y en la orina, se han identificado isoformas de elución a pH 5.8 a 5.0 (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Padmanabhan et al., 1988). Existe también la posibilidad, que las diferencias entre la circulación y la hipófisis se deba a la tasa de depuración de las distintas isoformas circulantes, ya que las isoformas de elución a pH ácido, se eliminan más lentamente en la circulación, pero muestran una menor actividad biológica en bioensayos *in vitro* que las que eluyen a pH básico. Finalmente otra de las posibilidades para explicar las diferencias cuantitativas entre lo observado en la adenohipófisis y en la circulación en el pleomorfismo de la LH, es la existencia en la glándula de una serie de glicoproteínas que se encuentran en diferentes

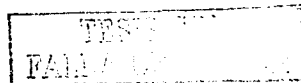


etapas de biosíntesis (“inmaduras”), incluyendo el procesamiento postraduccional, lo que puede enmascarar las diferencias relativamente sutiles entre las formas maduras, secretables por diferencias en el ambiente endocrino. Es por ello, que aunque todas las isoformas de la LH presentes en la adenohipófisis, aparecen en la circulación, hay diferencias entre estos dos compartimentos en cuanto a la proporción relativa de cada grupo de isoformas, posiblemente porque solo las formas “maduras”, son liberadas en condiciones fisiológicas a la circulación, o bien, porque la heterogeneidad identificada de la LH en el suero se vea afectada por la vida media en la circulación, particular para cada isoforma.

La proporción relativa de cada isoforma en la circulación fue diferente entre las etapas del ciclo estral analizadas. Se observó un incremento significativo en las formas básicas durante el diestro, en tanto que durante el estro, la proporción de las formas neutras y ácidas fue significativamente superior. Esta diferencia en la proporción de isoformas de la LH entre etapas del ciclo, puede ser debido a la condición fisiológica en el momento de colección de la muestra. La primera correspondió al estro (momento del pico preovulatorio), cuando se observaron las máximas concentraciones de la LH en la circulación con pulsos de alta frecuencia y baja amplitud, en un ambiente endocrino con bajas concentraciones séricas de progesterona y altas de estradiol, condiciones en que Norris et al. (1989), Analizando la actividad biológica *in vitro* de la LH sérica de la borrega, encontraron que la actividad específica de la LH, determinada por la relación de la actividad biológica (B) y la inmunológica (I) fue disminuida, al compararla con las demás etapas del ciclo estral, lo que indica que en esta etapa, las isoformas de la LH liberadas a la circulación, que según nuestros datos contienen mayor proporción de isoformas ácidas, con una relación B/I baja. Se ha documentado que el estradiol interviene en varias formas en la regulación de la secreción de las gonadotropinas (Ulloa-Aguirre et al., 1988; Robertson et al., 1991; Ulloa-Aguirre et al., 1995; Ropelato et al., 1999): modificando la tasa de síntesis y liberación de la GnRH (Gharib et al., 1990; Cowley et al., 1998; Nett et al., 2000); induciendo la síntesis y expresión del mRNA que codifica para la subunidad α y la subunidad β LH (Hamernik et al., 1995), y regulando la tasa de glicosilación de las

gonadotropinas (Dammers y Baenzinger, 1993; Helton y Magner, 1994; Damián-Matsumura et al., 1999) reduciendo la actividad de las enzimas glicosiltransferasas, en particular de N-acetilgalactosamina transferasa y sulfotransferasa (enzimas que participan en la incorporación de galactosa y sulfato en la estructura final de los oligosacáridos del tipo N-unido en las gonadotropinas, características de la isoformas de tipo básico). Es con este cuerpo de evidencias que se puede sugerir, que el incremento en la concentración de estradiol con bajas concentraciones de progesterona en la circulación en la etapa de estro, que se refleja en la secreción de la LH con pulsos de baja amplitud y alta frecuencia (Caraty y Skinner, 1999), favorece la síntesis y secreción de isoformas ácidas de la LH en el estro.

En contraste, la segunda condición analizada (diestro), se caracteriza por bajas concentraciones promedio de LH circulante por la secreción basal de la hormona con pulsos de alta amplitud y baja frecuencia, debido a la retroalimentación negativa que le impone la progesterona (P₄). Es por ello que en este estudio se recurrió a incrementar la concentración circulante de la LH en el diestro con la administración i.v., en dosis única de GnRH, para permitir la identificación del polimorfismo de la hormona que llega a la circulación. La administración de GnRH i.v., en dosis única, podría enmascarar las características de la LH secretada normalmente en el diestro, si GnRH tuviera como efecto, en muy corto plazo, inducir la síntesis de nueva LH en el gonodotrofo. Se ha documentado en niños que la infusión pulsátil de GnRH incrementa la proporción de isoformas básicas de LH en el suero (Wide y Bakos, 1993), así como la transcripción del gen para β LH (Burger et al., 2002). En contraste, la administración exógena de la GnRH a dosis única *in vitro* (Zalesky y Grotjan, 1991) e *in vivo* (; Zambrano et al., 1995; Castro-Fernández et al., 2000) no modifica el patrón de isoformas de la LH que secretan las gonadotropinas. En ovinos se ha documentado que la LH liberada a la circulación bajo un estímulo de la GnRH en la fase lútea, se acompaña de un incremento en la transcripción del gen para la β LH, este efecto genera niveles del mRNA de β LH inestable (Brown y McNeilly, 1997), por lo que no es evidencia de que GnRH administrada en forma aguda, modifique la calidad de la LH circulante en el diestro; una evidencia adicional en este sentido es que la administración de un bolo de GnRH i.v. en el diestro ni siquiera aumenta el mRNA para el receptor de la



GnRH en el gonodotropeo (Brown y McNeilly, 1997). Luego entonces, esto es un indicativo que el efecto agudo de la GnRH, difícilmente involucra la síntesis de *novoo* de la LH. Estos antecedentes permiten proponer, que la LH analizada en la etapa de diestro, es básicamente la hormona preformada, con las características de la secretada fisiológicamente en esta etapa del ciclo estral.

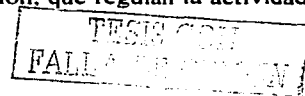
Por lo que respecta a la mayor proporción relativa de formas básicas de la LH circulante durante el diestro, se ha observado un alto porcentaje de isoformas de tipo básico de la LH intrahipofisaria en rumiantes gonadectomizados y en los sujetos a la inhibición de la GnRH mediante inmunización pasiva, evidencias que indican que el porcentaje de isoformas básicas intrahipofisarias se incrementan cuando la relación E_2/P_4 es baja (Robertson et al., 1991; Stumpff et al., 1992a; Ulloa-Aguirre et al., 1992). La participación de la progesterona en el polimorfismo de la LH sérica se desconoce; sin embargo, altas concentraciones de P_4 , modifican el patrón de distribución de las isoformas de la FSH humana en la circulación hacia las de tipo básico (Wide y Bakos, 1993), lo que coincide con lo observado para la LH en el suero de la etapa de diestro en la especie bovina. Por otro lado, P_4 , disminuye el número y la expresión del ARNm para el receptor de la GnRH *in vivo* e *in vitro* (Cowley et al., 1998), también participa en la disminución en el número de receptores para estradiol (Nett et al., 2002), y a nivel de la transcripción, reduce el tamaño del RNAm para las subunidades β LH y α de las gonadotropinas, debido a la remoción del tallo de poly (A)⁺ (Gina y Nett, 1995; Brown y McNeilly, 1997), lo que conduce a una menor estabilidad del mRNA. Entonces, es posible que en presencia de altas concentraciones de progesterona en la fase lútea, se observe un efecto opuesto al del estradiol, aumentando la presencia y actividad de las enzimas responsables de la incorporación de N-acetilgalactosamina y sulfatos en los residuos de oligosacáridos de la LH, lo que aumentaría en términos relativos las isoformas básicas.

Se ha reportado que el porcentaje de isoformas ácidas ($pH \leq 6.5$) en extractos hipofisarios de rumiantes varía del 7.48 % al 16.85% (Kell et al., 1987; Stumpf et al., 1992a; Perera et al., 2000), sin embargo en este estudio, se observó un incremento de este tipo de isoformas

en el suero ($18.7 \pm 3.4\%$, diestro; 28.5 ± 2.8 , estro). Para corroborar que la LH obtenida en las escalas menores de pH del cromatoenfoco era realmente LH, y no se trataba de FSH, que generalmente eluye a esos valores de pH, se verificó la especificidad del sistema de cuantificación (RIA), con resultados que confirmaron que el sistema utilizado es altamente específico para la LH. Adicionalmente, se analizaron las isoformas obtenidas a diferentes grados de acidez por inmunotransferencia (anti-oLH-26), observando en todos los casos una banda inmunoreactiva de peso molecular de 36.5 kDa, semejante al USDA-bLH-B5, en contraste, cuando las isoformas se incubaron con anti- β FSH, ninguna mostró unión específica positiva, ni en el sistema de radioinmunoensayo para FSH las identificó. Con base en estos resultados, podemos concluir que la presencia de isoformas de elución a pH ácido en el cromatoenfoco corresponde a proteínas ácidas de la LH.

Finalmente en este estudio, se observó un alto porcentaje de proteínas que eluyeron después de la aplicación de NaCl 1M, de manera semejante a lo informado en suero humano (Castro-Fernández et al., 2000), ovino (Keel et al., 1987; Zalesky et al., 1992) y que mostraron la inmunoreactividad propia de las gonadotropinas en estudio. Los resultados aquí presentados demuestran que las presencia de proteínas aparentemente con inmunoreactividad de LH, obtenidas luego de la aplicación a la columna cromatográfica de la alta fuerza iónica, corresponden a una alteración en el comportamiento de la interacción antígeno-anticuerpo, artefacto de la técnica, y no se trata realmente de LH, por lo que en este estudio, las fracciones colectadas después de la elución debida al NaCl, no se tomaron en cuenta para el análisis de resultados.

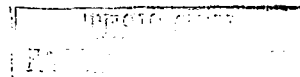
En conclusión, los resultados de este estudio, presentaron un patrón cuantitativo de isoformas de la LH en el suero, distinto al observado en extractos crudos y parcialmente purificados de adenohipófisis bovinas (Perera et al., 2000). En el estro las isoformas de la LH de tipo ácido se incrementaron con relación a las observadas en la etapa de diestro, donde hubo mayor presencia de isoformas de tipo básico, lo que permite inferir que el ambiente endocrino, particularmente la relación progesterona/estradiol, modifica el patrón de distribución de isoformas de la LH presentes en la circulación, que regulan la actividad



ovárica en bovinos; las isoformas básicas que predominan en la etapa de diestro, que son más rápidamente removidas de la circulación, participan básicamente en el mantenimiento de la función del cuerpo lúteo, en tanto que en el estro, las isoformas de tipo ácido, con depuración más lenta de la circulación, están involucradas en el complejo fenómeno de la ovulación. Aunque en este estudio no se analizaron las isoformas de la FSH, West et al. (2002), mostraron que las isoformas más ácidas de la FSH, son más eficaces para promover el desarrollo, maduración y función estrogénica del folículo preovulatorio. Luego entonces, podemos sugerir que el patrón diferencial de secreción de las isoformas de la LH en las diferentes etapas del ciclo estral, es acorde con el diferente papel que juega esta hormona para regular la función ovárica en esta especie en diferentes etapas del ciclo estral. Finalmente la poca variabilidad entre individuos en la proporción de las isoformas de la LH, es indicativa de que la microheterogeneidad de la hormona en diferentes condiciones fisiológicas, es una característica genética relativamente fija, al menos en la raza Holstein.

Referencias

- Adams, T.E., M.B. Horton, J.G. Watson and B.M. Adams. 1986. Biological activity of luteinizing hormone (LH) during the estrous cycle of mares. *Dom. Anim. Endocrinol.* 3:69-77.
- Baenzinger, JU and E.D.Green. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-like oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. Biophys. Acta.* 947:287-306.
- Barrios-De-Tomasi, J., C. Timosi, H. Merchant, A. Quintanar, J.M. Aválos, C.Y. Andersen, A. Ulloa-Aguirre. 2002. Assessment of the *in vitro* and *in vivo* biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. *Mol.Cell. Endocrinol.* 186:189-198.
- Brown, P and A.S. McNeilly. 1997. Steroidogenic Factor-1 (SF-1) an the regulation of expression of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone β -subunits in the sheep anterior pituitary *in vivo*. *Int.J.Biochem.Cell.Biol.* 29:1513-1524.
- Burger, L.L., A.C. Dalkin, K.W. Aylor, D.J. Haisenleder and J.C. Marshall. 2002. GnRH pulse frequency modulation and gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes-assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology.* 143:3243-3249.



Burgon, P.G., P.G. Stanton and D.M. Robertson. 1996. *In vivo* Bioactivities and Clearance Patterns of Highly Purified Human Luteinizing Hormone Isoforms. *Endocrinology*. 137:4827-4836.

Caraty, A., D.C. Skinner. 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*. 140: 165-170.

Castro-Fernández, C., A. Olivares, D. Soderlund, J.C. López-Alvarenga, E. Zambrano, J.D. Veldhuis, A. Ulloa-Aguirre and J.P. Méndez. 2000. A Preponderance of Circulating Basic Isoforms is Associated with Decreased Plasma Half-Life and Biological to Immunological Ratio of Gonadotropin-Releasing Hormone-Releasable Luteinizing Hormone in Obese Men. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 85: 4603-4610.

Chappel, S.C., C. Courtifaris, S.J. Jacobs. 1982. Studies on the microheterogeneity of follicle-stimulating hormone present whit the anterior pituitary gland of ovariectomized hamster. *Endocrinology*. 110: 847-854.

Chappel, S.C., C.L.Bethea and H.G. Spies. 1984. Existence of multiple forms of follicle stimulating hormone within the anterior pituitaries of cynomolgus monkeys. *Endocrinology*. 115:452-461.

Christianson, S.L., D.D. Zalesky, H.E. Grotjan. 1998. Ovine luteinizing hormone heterogeneity: Androgens increase the percentage of less basic isohormone. *Domest.Anim.Endocrinol.* 15:87-92.

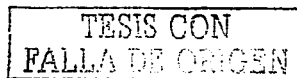
Combarnous, Y. 1988. Stucture and Structure-Function relationships in gonadotropins. *Reprod.Nutr.Dev.* 28:211-228.

Cowley, M.A., A. Rao, P.J.Wright, N. Illing, R.P.Millar and I.J.Clarke. 1998. Evidence for differential regulation of multiple transcripts of the gonadotropin releasing hormone receptor in the ovine pituitary gland; effect of estrogen. *Mol.Cell.Endocrinol.* 146:141-149.

Creus, S, Z. Chaia, E.H. Pellizzari, S.B.Cigorraga. A.Ulloa-Aguirre and S.Campo. 2001. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol.Cell.Endocrinol.* 174: 41-49.

Cupp, A.S., F.N. Kojima, M.S.Roberson. T.T. Stumpf, M.W. Wolfe, L.A. Werth. R.J. Kittok, H.E. Grotjan and J.E. Kinder. 1995. Increasing concentration of 17 β -estradiol has differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and amounts of mRNA for gonadotropin subunits during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol.Reprod.* 52: 288-296.

Damesh, S.M., J.U. Baenzinger. 1993. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides of lutropin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 90:11127-11131.



Damián-Matsumura, P., V. Zaga, A. Maldonado, C. Sánchez-Hernández, C. Timossi and A. Ulloa-Aguirre. 1999. Oestrogens regulate pituitary α 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J.Mol.Endocrinol.* 23:153-165.

Edmonson, J.A., J.I. Lean, D.L. Weaver, T. Farver and G.A. Webster. 1989. Body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J.Dairy.Sci.* 72:68-78.

García ME. Modificaciones al sistema de clasificación climatológica de Köppen. 4ª ed. México (DF): Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.

Gharib, S.D., M.E. Wierman, M.A. Shupnik and W.W. Chin. 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr.Rev.* 11(1):177-198.

Gina, B.G. and T. Nett. 1995. Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropins-releasing hormone in the ewe. *Biol.Reprod.* 53:166-172.

Gong, J.G., T.A. Bramley, C.G. Gutierrez, A.R. Peters and R. Webb. 1995. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *J.Reprod.Fertil.* 105:263-270.

Hamernik, D.L., C.M. Clay, A. Turzillo, E.A. Van Kirk, G.E. Moss. 1995. Estradiol increases amounts of messenger ribonucleic acid for gonadotropin-releasing hormone receptors in sheep. *Biol.Reprod.* 53:179-185.

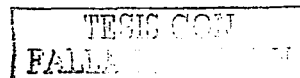
Hassing, J.M., G.B. Kletter, H. I'Anson, R.I. Wood, I.Z. Beitins, D.L. Foster, and V. Padmanabhan. 1993. Pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone does not alter the follicle-stimulating hormone (FSH). Isoforms distribution pattern of pituitary of circulating FSH in nutritionally growth-restricted ovariectomized lambs. *Endocrinology.* 132:1527-1536.

Helton, T.E., J.A. Magner. 1994. Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an in situ hybridization study. *Endocrinology.* 134:2347-2352.

Keel, B.A., B.D. Schanbacher and H.E. Grotjan Jr. 1987. Ovine Luteinizing Hormone. I. Effect of castration and steroid administration on the charge heterogeneity of pituitary luteinizing hormone. *Biol.Reprod.* 36:1102-1113.

Kojima, F.N., A.S. Cupp, T.T. Stumpf, D.D. Zalesky, M.S. Roberson, L.A. Werth, M.W. Wolfe et al. 1995. Effects of 17 β -estradiol on Distribution of Pituitary Isoform of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone During the Follicular Phase of the Bovine Estrous Cycle. *Biol.Reprod.* 52: 297-304.

- Krishnan, K.A., J.A. Proudman, and J.M. Bahr. 1994. Purification and partial characterization of isoforms of luteinizing hormone from chicken pituitary gland. *Comp.Biochem.Physiol.Biochem.Mol.Biol.* 108:253-265.
- Manzella, S.M., L.V. Hooper and J.U. Baenzinger. 1996. Oligosaccharides Containing β 1,4-Linked N-Acetylgalactosamine, a Paradigm for protein-specific glycosylation. *J.Biol.Biochem.* 271(21):12117-12120.
- Matteri, R.L., H. Papkoff, J.R. Swedlow and Y.S. Chang. 1986. Isolation and characterization of tree forms of luteinizing hormone from the pituitary gland of the horse. *Biol.Reprod.* 34:571-578.
- Mi, Y., S.D. Shapiro and J.U. Baenzinger. 2002. Regulation of lutropin circulatory half-life by the mannose/N-acetylgalactosamine-4-SO₄ receptor is critical for implantation *in vivo*. *J.Clin.Invest.* 109:269-276.
- Nett, T.M., A.M.Turzillo, M.Baratta and L.A.Rispoli. 2002. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domest.Anim.Endocrinol.* 23: 33-42.
- Nomura, K., K. Ohmura, Y. Nakamura, N. Horiba, Y. Shirakura, M. Ujihara, K. Ohki and K. Shizume. 1989. Porcine luteinizing hormone isoforms: Relationship between their molecular structures and renotropic versus gonadotropic activities. *Endocrinology.* 124:712-719.
- Norris, T.A., G.D.Weesner, J.M. Shelton, P.G. Harms and D.W. Forrest. 1989. Biological activity of LH during the peripartum period and the estrous cycle of the ewe. *Dom.Anim.Endocrinol.* 6(1):25-33.
- Padmanabhan, V, L.L. Lang, J. Sonstein, et al. 1988. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoforms distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 67:465-473.
- Padmanabhan, V., C.D. Mieher, M. Borondy, H. I'Anson, R.I. Wood, T.D. Landefeld, D.L. Foster and I.Z. Beitins. 1992. Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoform during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology.* 131:213-220.
- Perera, M.G., Falcón, A.A., Salas, V.A. 1996a. Estandarización de la técnicas de radiomarcaje con Iodo-Gen. XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Puebla (Puebla) México.



Perera, M.G., R.F.Ortiz, V.J.J.Gamboa, M.W. Reynoso, A.A. Falcón, V.A. Salas.1996b. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipófisis caprina (gLH). *Vet.Mex.* 27: 1-10.

Perera, M.G., Murcia, M.C., Rojas, S.M., Hernández, C.J y González, P.E. 2000. Caracterización fisicoquímica e inmunológica de isoformas de la LH en hipófisis frescas y liofilizadas. XVII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Panamá (República de Panamá): 273.

Robertson, D.M., L.M.Foulds, R.C. Fry, J.T.Cummins and I. Clarke. 1991. Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoforms fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology.* 129:1805-1813.

Ropletato, M.G., M.C.García-Rudaz, C. Castro-Fernández, A. Ulloa-Aguirre, M.E.Escobar, M. Barontini and J.D.Veldhuis. 1999. A Preponderance of Basic Luteinizing Hormone (LH). Isoforms Accompanies Inappropriate Hypersecretion of Both Basal and Pulsatile LH in Adolescents with Polycystic Ovarian Syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 84:4629-4636.

Stumpf, T.T., M.S. Roberson, M.W.Wolfe, D.D.Zalesky, A.S.Cupp, L.A.Werth, N. Kojima, K. Hejl, R.J. Kittok, H.E.Grotjan and J.E. Kinder. 1992a. A similar distribution of gonadotropin isohormones is maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. *Biol.Reprod.*46:442-450.

Stumpf, T.T., M.W. Wolfe, M.S.Roberson, G. Caddy, R.J. Kittok, B.D. Schanbacher, H.E. Grotjan and J.E. Kinder. 1992b. Bovine luteinizing hormone (LH) isoforms and amounts of messenger ribonucleic acid for alpha and LH beta-subunits in pituitaries of cows immunized against LH-releasing hormone. *Biol.Reprod.* 47: 776-781.

Ulloa-Aguirre, A, R. Espinoza, P. Damián-Matsumura, F. Larrea, A. Flores, I. Morales and R. Domínguez. 1988. Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric pattern throughout the estrous cycle. *Biol.Reprod.* 38:70-78.

Ulloa-Aguirre, A., A.Cravioto, P. Damian-Matsumura, M. Jimenez, E. Zambrano, V. Díaz-Sánchez. 1992. Biological characterization of the natural occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum.Reprod.* 7:23-30.

Ulloa-Aguirre, A., Midgley, A.R., Beitins, I.Z., and Padmanabhan, V. 1995. Follicle-Stimulating Isohormone: Characterization and Physiological Relevance. *Endocr.Rev.*16:765-787.

Wide, L and O. Bakos. 1993. More Basic Forms of Both Human Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Serum at Midcycle Compared with the Follicular or Luteal Phase. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*76:885-889.

West, CH. R., N.E. Carlson, J.S. Lee, A.L. McNeilly, T.P. Sharma, W. Ye and V. Padmanabhan. 2002. Acidic mix of FSH isoforms are better facilitators of ovarian follicular maturation and E₂ production than the less acidic. *Endocrinology*. 143:107-116.

Zaleky, D.D. and H.E. Grotjan. 1991. Comparasion of Intracellular and Secreted Isoforms of Bovine and Ovine Luteinizing Hormone. *Biol.Reprod.* 4:1016-1024.

Zalesky, D.D., T.M. Nett and H.E. Grotjan. 1992. Ovine Luteinizing Hormone: Isoforms in the Pituitary During the Follicular and Luteal Phases of the Estrous Cycle and During Anestrus. *J.Anim.Sci.* 70: 3851-3856.

Zalesky, D.D., B.D. Schanbacher and H.E. Grotjan. 1993. Effect of immunization against LHRH on isoforms of LH in the ovine pituitary. *J.Reprod.Fertil.* 99: 231-235.

Zambrano, E., A. Olivares, J.P. Méndez, L.Guerrero, L.Díaz-Cueto, J.D.Veldhuis, A. Ulloa-Aguirre. 1995. Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoforms distribution throughout the human menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*80:1647-1656.

Cuadro 2. Porcentaje de distribución de las isoformas circulantes de la LH en vaquillas Holstein por grupo de isoformas. Las muestras de suero colectadas en estro y diestro, se analizaron por medio del cromatoenfoco, eluido en un rango de pH de 10.5 a 3.5; Para la etapa de diestro, se analizaron únicamente las muestras colectadas a los 60 min. después de 250µg i.v. de GnRH, en tanto que las muestras colectadas en la etapa de estro, correspondieron a las del cenit del pico preovulatorio. Los resultados presentan el porcentaje promedio \pm desviación estándar de cada grupo de isoformas en las etapas del ciclo analizadas; entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Grupo	pH de elución	Estado fisiológico	
		Estro (n=7) %	Diestro (n=7) %
Básicas	≥ 7.5	57.8 ± 6.2 (10.9) ^b	78.4 ± 4.2 (5.4) ^a
Neutras	7.4-6.5	13.7 ± 2.6 (19.3) ^b	3.0 ± 0.7 (23.3) ^a
Ácidas	≤ 6.4	28.5 ± 2.8 (9.9) ^b	18.7 ± 3.4 (18.2) ^a

a, b literales distintas en un renglón, muestran diferencias ($p < 0.05$) entre etapas del ciclo estral.

Cuadro 3. Porcentaje de distribución de las isoformas circulantes de la LH por unidad de pH en vaquillas Holstein. Las muestras de suero del estro y diestro, se analizaron por medio del cromatoenfoque, eluido en un rango de pH de 10.5 a 3.5. Las muestras analizadas en la etapa de estro, correspondieron a las del cenit del pico preovulatorio; en tanto que las muestras colectadas a los 60 min. después de la aplicación de 250µg i.v. de GnRH correspondieron al diestro. Los resultados presentan el porcentaje promedio \pm desviación estándar de cada unidad de pH en las condiciones fisiológicas estudiadas; entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

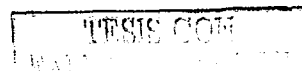
Unidad de pH	Estado fisiológico	
	Estro (n=7) %	Diestro (n=7) %
≥ 10	3.2 \pm 0.2 (6.3)	4.1 \pm 1.0 (24.4)
9.99-9	30.2 \pm 2.8 (9.3) ^a	38.4 \pm 4.1 (10.7) ^b
8.99-8	21.5 \pm 2.6 (12.1)	18.6 \pm 3.1 (16.7)
7.99-7	9.9 \pm 0.3 (3.0) ^a	17.4 \pm 6.7 (37.9) ^b
6.99-6	7.2 \pm 0.3 (4.2) ^a	3.0 \pm 1.3 (43.3) ^b
5.99-5	7.2 \pm 1.0 (13.9)	4.8 \pm 1.6 (33.3)
4.99-4	8.6 \pm 0.7 (8.1) ^a	5.5 \pm 1.1 (20.0) ^b
3.99-3.5	12.3 \pm 1.1 (8.9)	8.3 \pm 3.3 (39.8)

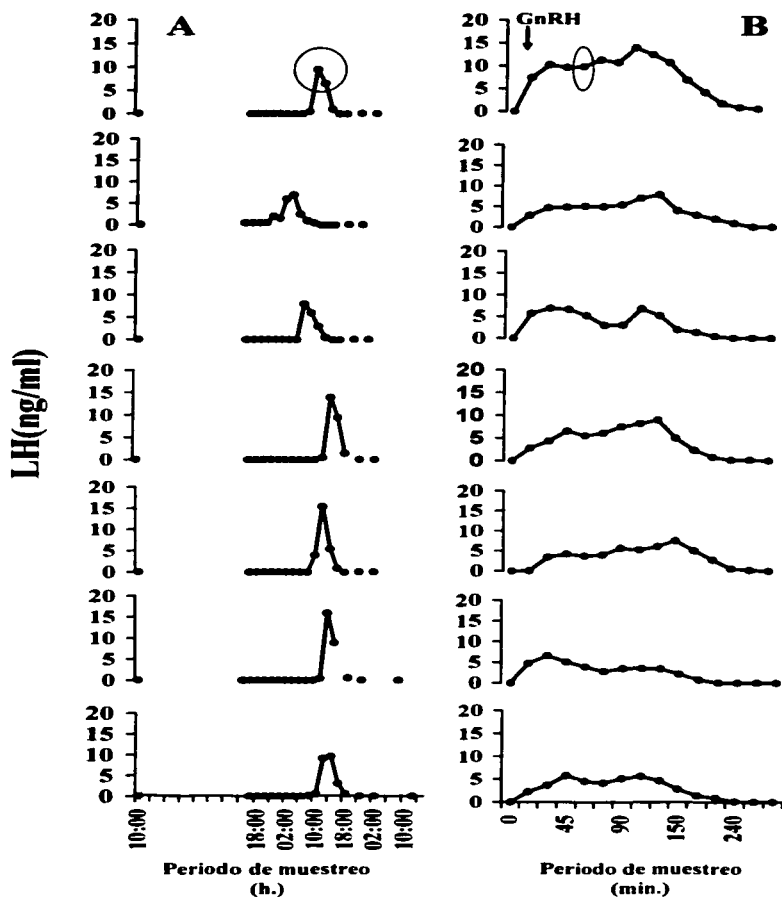
a, b literales distintas en un renglón, muestran diferencias ($p < 0.05$) entre etapas del ciclo estral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Resultados de la presencia de bandas de LH inmunoreactivas, determinadas por medio de la inmunotransferencia, en tres ensayos independientes de las fracciones agrupadas por unidad de pH, obtenidas después del análisis del suero por medio del cromatofoco.

Rango de pH	Anti-oLH-26			Anti-USDA-bFSH		
	Exp-1	Exp-2	Exp-3	Exp-1	Exp-2	Exp-3
9.99-9	+	+	+	-	-	-
8.99-8	+	+	+	-	-	-
7.99-7	+	+	+	-	-	-
6.99-6	+	+	+	-	-	-
5.99-5	+	+	+	-	-	-
4.99-4	+	+	+	-	-	-
3.99-3.5	+	+	+	-	-	-





TESIS CON
FALLA DE COPIA

Figura 1. Perfil de distribución de la LH en el suero bovino, durante la etapa de estro (A) y la etapa de diestro (B). Cada gráfico representa el perfil de la LH en un animal, la muestra utilizada para el análisis de la heterogeneidad de la LH por medio del cromatofoco, se señala con un círculo y correspondió al Cenit del pico preovulatorio en (A) y a los 60 min después de la administración de 250 ug/i.v. animal en (B). Las muestras obtenidas en cada animal, fueron colectadas cada 2 h en el estro por 24 h. y cada 15 min en el diestro, durante un periodo de 5 h.

FALTA DE
 TESIS CON
 100 SIS/1

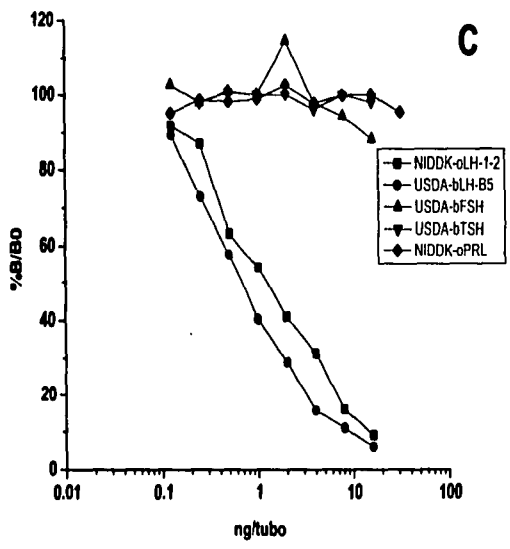
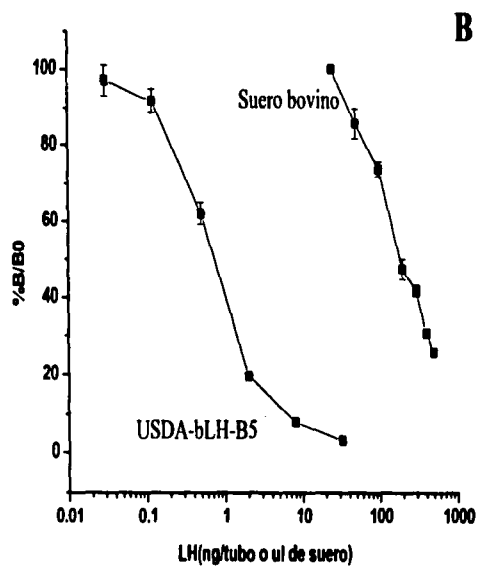
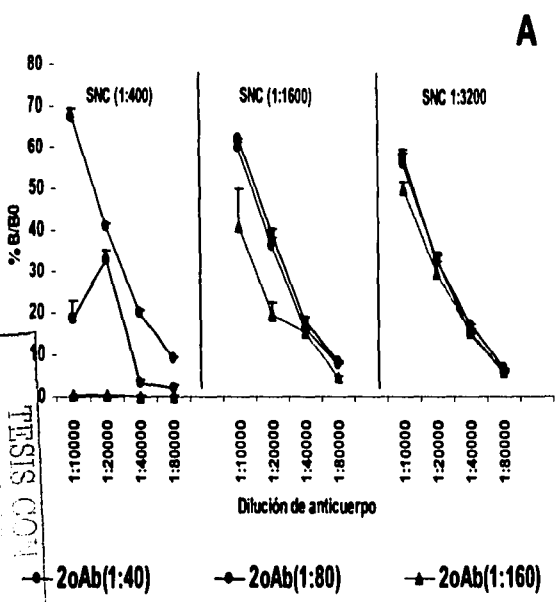


Figura 2. A) Titulación del anticuerpo anti-oLH-26. Las diferentes diluciones de anticuerpo se mezclaron con suero normal de conejo (SNC) 1:400, 1:1600 y 1:3200, y se incubaron durante 48 h en presencia del antígeno marcado (USDA-bLH-B5). El sistema de separación de la fracción unida de la libre correspondió a segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo generado en burro). B) La curva de referencia, se desarrollo con el estándar USDA-bLH-b5, a las dosis de 0.03 a 32 ng/tubo en un volumen de 100 μ l, 200 μ l de primer anticuerpo (anti-oLH-26) a una dilución de trabajo de 1:20,000, en presencia de suero normal de conejo 1:1600 y 48 h después, se colocaron 100 μ l de hormona marcada (USDA-bLH-B5) que correspondió a 14,000 cpm y después de 48 h de incubación, se separó la fracción unida (antígeno-anticuerpo) con 2° Ab diluido 1:80, previa incubación de 24 h. Cada punto corresponde al promedio (n=5) \pm D.S. La validación del sistema se desarrollo con suero bovino, en un volumen de 500 μ l hasta 25 μ l. Cada volumen de suero se analizó por quintuplicado y los tubos se incubaron en las mismas condiciones para la curva estándar. C) Presenta la especificidad del sistema.

56-5

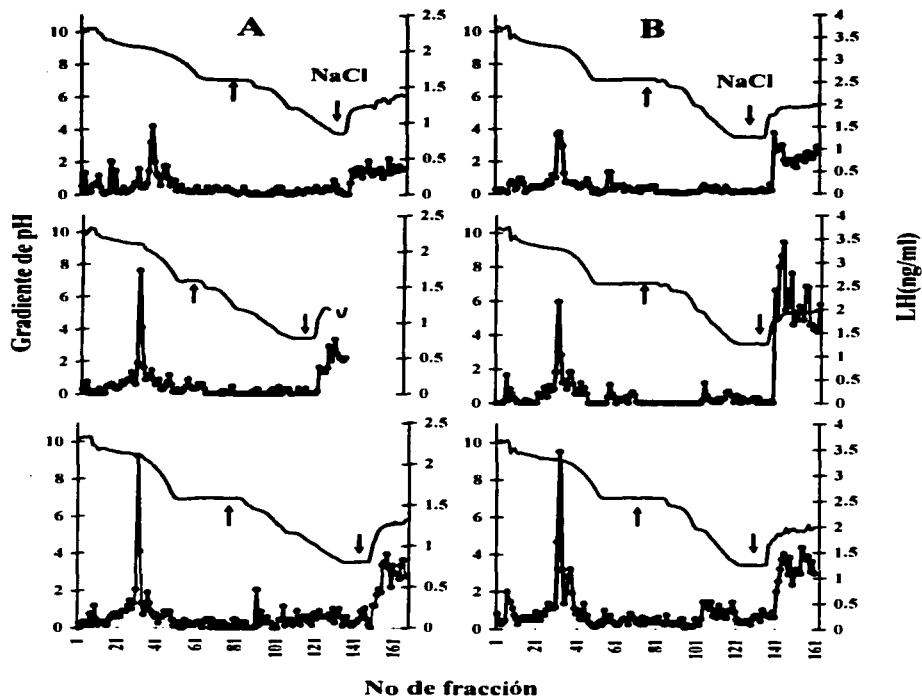


Figura 3. Patrón representativo de elución de la LH en el suero colectado en la etapa de estro (A) y diestro (B). Veinte mg de proteína se aplicaron al intercambiador iónico (PBE-118), equilibrado con trietilamina 0.025M, pH 11.0.

La columna se eluyó con un gradiente de pH de 10 a 3.5 y se colectaron fracciones de 2 ml. Las flechas señalan el cambio de amortiguador, durante la corrida cromatográfica y después la aplicación de NaCl 1M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

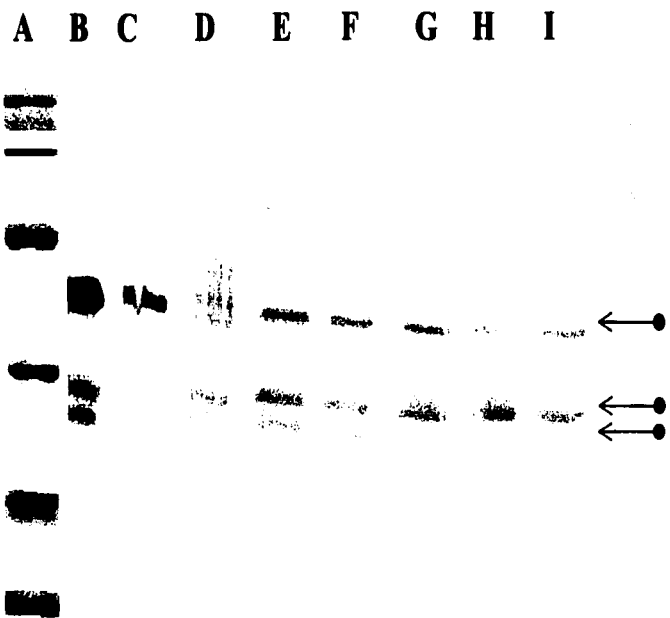


Figura 4. Inmunotransferencia de las isoformas de la LH sérica, obtenidas por medio del cromatofoco. El anticuerpo (anti-oLH-NIDDK-oLH-26) se utilizó a una dilución 1:500, con un periodo de incubación de 24 h. A) marcadores de peso molecular, 92.5; 62.5, 45.0, 31.0, 21.5 y 14.4 KaD; B) USDA-bLH-B5; C) 9.99-9; D) 8.99-8; E) 7.99-7; F) 6.99-6; G) 5.99-5; H) 4.99-4; I) 3.99-3.5. La flecha superior derecha señala la forma monomérica de la LH y las inferiores presentan la subunidad alfa y beta de cada proteína.

56-7

1997 10/10/97

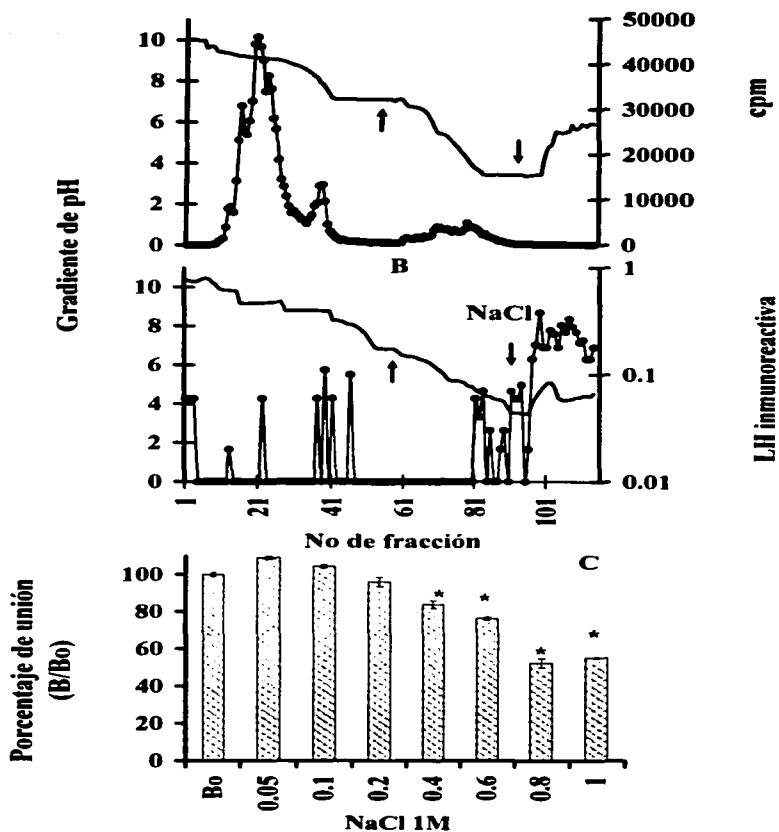


Figura 5. A) Patrón de elución de la USDA-bLH-B5, marcada con Na-125I. Las flechas indican el cambio de amortiguador, durante el gradiente de pH. **B)** Patrón de elución del suero bovino, con concentraciones menores de 1 ng/ml, durante la corrida cromatográfica en el intercambiador iónico PBE-118. **C)** Porcentaje de unión (B/Bo) bajo diferentes concentraciones molares de NaCl. Los asteriscos denotan diferencia ($p < 0.05$) con relación a la unión máxima (Bo).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 6

EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS INTRAHIPOFISARIAS DE LAS GONADOTROPINAS EN VAQUILLAS CEBÚ X SUIZO

TESIS CON
FALLA DE

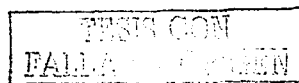
RESUMEN

El pleomorfismo que presentan las gonadotropinas en la hipófisis, es regulado por múltiples factores. Sin embargo, los estudios de la heterogeneidad de la LH y FSH intrahipofisaria en bovinos, se han limitado al efecto del estradiol y la GnRH. Luego entonces, en el presente estudio, analizamos el efecto de la progesterona sobre el patrón de distribución de las isoformas intrahipofisarias de las gonadotropinas, utilizando como modelo a vaquillas ovariectomizadas (OVX). Ocho vaquillas OVX fueron distribuidas en dos grupos (n=4), el grupo OVX recibió solución salina im y el grupo OVX-P₄, recibió i.m. P₄ durante 8d. Veinticuatro horas después de la última administración, los animales se sacrificaron y se colectaron las hipófisis. La heterogeneidad de la LH y FSH intrahipofisaria, se analizó por medio del cromatoenfoco, eluido con un gradiente de pH de 10.5 a 3.5. A cada fracción obtenida, se le determinó la concentración de LH y FSH por medio de un radioinmunoanálisis (RIA) específico, las fracciones colectadas, se agruparon de acuerdo al pH de elución, que correspondió a isoformas básicas (pH ≥ 7.5), neutras (pH 7.4-6.5) y ácidas (pH ≤ 6.4), como por rangos de pH. El peso promedio de las adenohipófisis en ambos grupos, no fue diferente, como la proporción de isoformas básicas, neutras y ácidas de ambas gonadotropinas; sin embargo, el porcentaje de isoformas neutras, en la LH, fue menor en el grupo OVX ($7.69 \pm 1.66\%$), en relación al grupo OVX-P₄ ($10.24 \pm 1.11\%$), fenómeno similar para la FSH ($9.6 \pm 0.3\%$ vs $14.2 \pm 2.5\%$); Inversamente, las isoformas más básicas y ácidas de la LH fueron ligeramente superiores en el grupo OVX ($13.25 \pm 1.15\%$), cuando se comparó con el grupo OVX-P₄ (11.18 ± 0.825), sin embargo, para la FSH no hubo cambio ($66.3 \pm 1.5\%$ vs $63.8 \pm 1.7\%$). Los resultados muestran que la progesterona no modifica significativamente el porcentaje de distribución de las isoformas intrahipofisarias de las gonadotropinas.

INTRODUCCIÓN

Las gonadotropinas (FSH, LH) son una familia de proteínas identificadas en la hipófisis, el suero y la orina (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Padmanabhan et al., 1998); Se ha documentado que este polimorfismo, se debe en parte a la estructura de los oligosacáridos que las conforman (Comabarnous, 1988; Baenzinger y Green, 1988; Manzella et al., 1996), participando en muchas de las funciones características de las moléculas, por ejemplo en el plegamiento, ensamblaje de subunidades y maduración conformacional, lo que repercute en la carga, en su actividad biológica *in vitro* e *in vivo* (Creus et al., 2001; Barrios-De Tomasi et al., 2002; Burgon et al., 1996), así como en su vida media en la circulación (Burgon et al., 1996; Castro-Fernández et al 2000; Mi et al., 2002).

La regulación endocrina del pleomorfismo en las gonadotropinas se ha caracterizado a través de una variedad de condiciones fisiológicas y farmacológicas, por ejemplo diversos estudios *in vivo* e *in vitro* en humanos (Wide y Bakos, 1993; Phillips et al., 1997; Castro-Fernández et al., 2000); y en rumiantes (Zalesky y Grotjan, 1991; Padmanabhan et al., 1992; Kojima et al., 1995; Rojas et al., 2001; Perera et al., 2002), indican que la abundancia relativa y la distribución de carga de las isoformas de la FSH y LH intrahipofisarias y circulantes, son reguladas por el medio ambiente endocrino y que los esteroides gonadales, en particular el estradiol (Keel et al., 1987; Kojima et al., 1995; Stumpf et al., 1992; Cupp et al., 1995; Christianson et al., 1998) y la GnRH (Hassing et al., 1993; Zalesky et al., 1993; Wide et al., 1996.), juegan un papel importante. Sin embargo, en la actualidad, la participación de la progesterona (P₄) en la heterogeneidad de las gonadotropinas intrahipofisarias no se ha documentado. Aunque se conoce que la administración crónica de P₄, en borregas ovariectomizadas (OVX) disminuye la frecuencia pero no la amplitud de los pulsos de la LH (Goodman y Karsch, 1980; Hamernik et al., 1987), a nivel de la transcripción P₄ disminuye la expresión del RNAm para el receptor de la GnRH *in vivo* e *in vitro* (Hamernik et al., 1995), así como en el número de receptores para estradiol (Koligian y Stomshak, 1977) y en las gonadotropinas participa reduciendo el tamaño del RNAm para las subunidades β LH y α (Gina y Nett, 1995).



Con este cuerpo de evidencias, es posible hipotetizar que la administración crónica de la progesterona a animales OVX, modificará la heterogeneidad de las gonadotropinas. Por lo tanto el objetivo de este estudio, se encamino a conocer el patrón distribución de las isoformas de las gonadotropinas intrahipofisarias bajo el efecto de la progesterona, utilizando como modelo a vaquillas Cebú X Suizo ovariectomizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ocho vaquillas de la raza Cebú x Suizo con una condición corporal de 2.5 (escala 1-5), fueron ovariectomizadas (OVX) por vía vaginal; 8 semanas después, se distribuyeron al azar en dos grupos. El grupo OVX (n=4), recibió 1 ml de solución salina fisiológica i.m. por un periodo de 8d, en tanto que el grupo OVX-P₄ (n=4), recibió diariamente 31.25 mg de progesterona en un volumen de 1ml de solución salina i.m., durante el mismo periodo. Veinticuatro horas después de la última inyección, se sacrificaron los animales y se colectaron las hipófisis, las cuales fueron identificadas y congeladas, para su análisis.

Homogenizado de adenohipófisis

Las hipófisis se disecaron de la neurohipófisis y la adenohipófisis se pesó y homogeneizó (Tissue-tearor, model 985-370, variable speed) con amortiguador TRIS 50 mM, 150 mM de NaCl, pH 7.4, que contenía 1 mM phenilsulfonilmetilfluoruro (PMSF), EDTA, 1mM y 200 U/ml de aprotinina (en una relación de 1.0 ml/100 mg de tejido húmedo). El extracto adenohipofisario, se centrifugó (16,000g, por 2 h a 4°C) y el sobrenadante fue dializado en membranas con un límite de exclusión de 12 a 14 kDa (espectrapor 1) a 4°C por 48 h, con agua desionizada, con cambios sucesivos cada 8 h; al termino, cada sobrenadante fue fraccionado en un volumen de 1.0 ml (equivalente a 2.85 ± 0.16 mg de proteína total [Baradford, 1976]) y liofilizado.

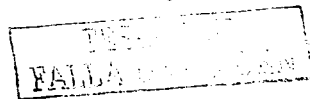
Cromatoenfoque

Las isoformas de la LH y FSH presentes en el sobrenadante de cada extracto hipofisario, fueron separadas de acuerdo a su carga como fue previamente descrito (Castro-Fernández et al., 2000). En breve: El sobrenadante dializado y liofilizado se resuspendió en 3 ml con

Pharmalyte (pH 8-10.5)-HCl (Pharmacia Biotech; 1:45, pH 7.0) y se aplicó a una columna (27 cm X 0.7d.i.) que contenía una resina de intercambio iónico (PBE-118, Pharmacia, Biotech), previamente equilibrada con 20 volúmenes de trietilamina-HCl, 0.025M (pH 11.0) y mantenida a 4°C. Las fracciones eluidas (2 ml), fueron colectadas con un flujo de 7 ml/h. El pH de cualquier fracción se midió, y cuando se llegó a pH 7.0 y se estabilizó durante más de diez fracciones, el amortiguador de elución fue cambiado por el polybuffer 74 (Pharmacia, Biotech), diluido 1:8 con agua desionizada (pH 3.5), con el fin de eluir las proteínas de pH 7.0 a 3.5. Las proteínas unidas después de la elución con el pH inferior (pH 3.5), fueron recuperadas con la adición de 1.0 M de NaCl a la columna cromatográfica. Aquellas fracciones que eluyeron con el amortiguador Pharmalyte, se neutralizaron con una solución TRIS-HCl, 1.1M, pH 7.4 (200µl), mientras que las fracciones eluidas con el polybuffer 74 y NaCl, se neutralizaron con imidazol 1.1M, pH 7.0 (200µl). Todas las corridas cromatográficas se realizaron con amortiguadores desgasificados. A cada una de las fracciones sujetas a la neutralización del pH, se les determinó la concentración de LH y FSH por triplicado, mediante los radioinmunoensayos (RIA) que se describen a continuación.

RIA de LH y FSH

El RIA de LH, fue realizado empleando como trazador al USDA-bLH-B6, marcado con Na[¹²⁵I] por medio de la técnica del IODO-GEN (Perera et al., 1996); la preparación de LH de referencia correspondió al NIDDK-oLH-1-4 (AFP-8614B) a las dosis de 0.1, 0.25, 0.5 1.0, 2.5, 5.0 y 10 ng/tubo y el anticuerpo (anti-oLH-26), se generó en este laboratorio a partir del estándar NIDDK-oLH-26, el que se utilizó a una dilución de trabajo 1:20,000 (previa caracterización y titulación). La sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng/tubo y el coeficiente de variación intra e interensayo se calculó con base a la dosis esperada del 50 % de la relación logyt-log (ED₅₀) que correspondió a 5 y 12% respectivamente. La especificidad del sistema se determinó con las siguientes hormonas: NIDDK-oLH-1-2 (100%), USDA-bLH-B5 (103%), NIDDK-oFSH-SRP2 (0.05%) y USDA-oTSH (0.02%); la NIDDK-bGH y NIDDK-oPRL no mostraron reacción cruzada. La separación de la fracción unida de la libre se realizó con Pansorbina (Calbiochem, suspensión celular de



proteína A de *Staphilococcus aureus*), en un volumen de 0.015µl/ tubo/ml, previa incubación a 4°C. El RIA de FSH, se desarrollo bajo las condiciones ya descritas (Gong et al., 1995). En breve: Se utilizó como trazador al NIDDK-oFSH-I-SIAFP-19; como referencia se empleó al NIDDK-oFSH-SIAFP-RP-2 (AFP-4117A), a las dosis de 0.01, 0.025, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ng/tubo respectivamente y el primer anticuerpo NIDDK-anti-oFSH-1 (AFPC5288113), se utilizó a una dilución final de 1:40,000. La sensibilidad de ensayo fue de 0.025 ng/tubo, con un coeficiente de variación intra e interensayo de 5 y 12% respectivamente. La separación de la fracción unida de la libre se realizó con segundo anticuerpo (1:80), previa incubación a 4°C por 24 h. El amortiguador en ambos inmunoensayos, correspondió a PB 0.05M, pH 7.2, NaCl 0.14M y albúmina sérica bovina (BSA) 1% (peso/volumen).

Análisis estadístico

La información del porcentaje de la LH y FSH eluida en cada fracción del cromatofoco, se agrupo en básicas (pH \geq 7.5), neutras (7.4-6.5) y ácidas (pH \leq 6.4) y en rangos de pH. Con el propósito de normalizar los datos, el porcentaje de la LH y FSH inmunoreactiva recuperada por grupo y por unidad de pH se transformo a arcoseno y se sometió a un análisis de varianza, considerando los efectos de grupo de pH y el tratamiento a que pertenecía la muestra (OVX o OVX-P₄). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS.

RESULTADOS

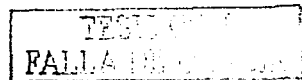
El peso promedio de las adenohipófisis (\pm ES) en ambos grupos no fue significativamente diferente, aunque el grupo de OVX-P₄ presentó un peso mayor correspondiente a 986.7 ± 124.63 mg de tejido, mientras que el grupo testigo o OVX pesó 802.5 ± 25 mg de tejido. El porcentaje promedio de recuperación para la LH y FSH durante las diferentes corridas cromatográficas correspondieron a $82.23 \pm 7.6\%$ (n=8) y $80.3 \pm 4.6\%$ (=7) respectivamente.

El patrón de elución obtenido a través del cromotoenfoco en ambos grupos, revelo trece formas moleculares de la LH y nueve isoformas de FSH, dentro del rango de pH (3.5 a 10.5) estudiado, con un rango aparente de PI's de 3.8 a 9.91, ambos grupos de proteínas eluyeron dentro del límite de resolución de este intercambiador. La LH, presentó un patrón de elución, el cual se identificó con una letra, comenzando con el componente más básico (isoforma A), hasta la proteína eluida con NaCl, designa isoforma S; para la FSH, el patrón se identificó con número romanos (I-X), comenzando con el componente más básico (I) y concluyendo con NaCl (X), en ambos casos, se asumió que cada letra o número, representaba una isoforma; el perfil representativo de elución del extracto hipofisario de ambos grupos, para la LH, se presenta en las Figuras 6 y 7; y la Figuras 8A y 8B ejemplifican para la FSH. En ambos grupos, las isoformas de la LH intrahipofisarias con mayor porcentaje de recuperación se presentó en el rango de pH básico (9.91-8.35) con un total de 6 isoformas, predominando la isoforma E, siendo esta mayor en el grupo OVX-P₄ (cuadro 5). Las isoformas de elución a pH neutro (7.4 a 6.5), no presentaron diferencias significativas entre porcentajes de ambos grupos, aunque se presentó un incremento porcentual el grupo OVX-P₄ (cuadro 6), generada particularmente por la isoforma H (cuadro 5). Las isoformas que eluyeron en el rango ácido (pH<6.5), en el grupo OVX (13.3 ± 1.15%) presentaron un porcentaje mayor que el grupo OVX-P₄ (11.1 ± 0.8%) (p>0.06), debido a las formas K y L.

El análisis de las fracciones para FSH, revelaron un alto porcentaje en las isoformas de elución a pH ácido (pH<6.5), semejante entre grupos, predominado en el grupo OVX la isoforma VII, que eluye entre el rango de pH de 5.89 a 4.03 (Cuadro 7). En contraste al porcentaje de las isoformas básicas, neutras y ácidas, donde no se presentaron diferencias significativas entre grupos, las proteínas que eluyeron con NaCl 1M, fueron diferentes (P<0.05), predominado en el grupo OVX en relación al grupo OVX-P₄ (Cuadro 6).

DISCUSIÓN

El pleomorfismo de las gonadotropinas tanto en la hipófisis, como en el suero, ha sido documentado en múltiples especies, cuya heterogeneidad es regulada por el medio



ambiente endocrino. Sin embargo la heterogeneidad de la LH y FSH intrahipofisarias en bovinos, se ha limitado únicamente al efecto de la GnRH y al estradiol, por lo que en la actualidad no se conoce la participación de la progesterona en este fenómeno, aunque existen evidencias que esta hormona esteroide, juega un papel importante en la secreción de las gonadotropinas, en el ciclo reproductivos de las hembras, tanto a nivel de la hipófisis como en el hipotálamo (Goodman y Karsch, 1980; Fink, 1988).

Los resultados de este estudio, mostraron un patrón cualitativo de distribución de las isoformas de las gonadotropinas intrahipofisarias, similar al patrón de elución para esta y otras especies (Zalesky y Grotjan, 1991; Zalesky et al., 1992; Stumpf et al., 1992; Ulloa-Aguirre et al., 1995; Kojima et al., 1995; Cupp et al., 1995), predominado en todos los casos las isoformas básicas para la LH y las isoformas ácidas para la FSH; Por otro lado, se observó un incremento en el porcentaje de las isoformas de LH y FSH de tipo básico, con resultados semejantes a lo informado en ovinos y bovinos ovariectomizados (Stumpf et al., 1992; Kojima et al., 1995) y ovinos castrados (Christianson et al., 1998; Keel et al., 1987).

Aunque en este estudio no se observaron diferencias significativas en el porcentaje relativo de isoformas de la LH y FSH entre el grupo OVX y el OVX-P₄, posiblemente debido al esquema de aplicación de la progesterona. A este respecto, Hamernik et al. (1987), demostraron que la administración crónica de la progesterona en borregos ovariectomizados disminuye la concentración sérica de la LH (no de la FSH), sin embargo, a nivel hipofisario, los resultados no mostraron un cambio significativo en la expresión de la mRNA para la GnRH, en el número de receptores a GnRH, en el contenido de la gonadotropinas intrahipofisarias y en la expresión del mRNA para las subunidades α y β LH y β FSH. En contraste, la administración aguda de P₄, en cultivos de células adenohipofisarias ovinas (Batra y Miller, 1985; Wu et al., 1991) modificó la expresión del mRNA para las subunidades α y β de LH y FSH en un tiempo de 24 h, así como la eliminación del tallo de poli A presente en el mRNA que codifica para ambas gonadotropinas, datos similares a los informado por Gina et al. (1995) *in vivo*. Es con estas

evidencias, que podemos sugerir que la falta de un efecto significativo de la P_4 en el patrón de isoformas intrahipofisarias de las gonadotropinas en vaquillas ovariectomizadas, se debió en parte, posiblemente al esquema de administración. Por otro lado, existen reportes que el efecto de los esteroides gonadales en la heterogeneidad de las gonadotropinas, depende de la especie; por ejemplo, el efecto del estradiol en roedores y monos (Goodman et al., 1981; Galle et al 1983; Chappel et al., 1984), presentaron un incremento en la proporción de isoformas menos ácidas en la adenohipófisis, en tanto que la administración crónica de esta hormona, presenta un cambio diametralmente opuesto en otras especies. Por ejemplo, en borregos gonadectomizados la proporción de isoformas menos ácidas de FSH se ven favorecidas, con un cambio revertido cuando se administró estradiol crónicamente (Keel et al., 1987). En vaquillas prepúberes OVX con un restablecimiento fisiológico en las concentraciones de E_2 , tiene poco efecto (Stumpf et al., 1992), en tanto que animales prepúberes castrados con dosis farmacológicas de este esteroide sexual, se incrementa la proporción de isoformas más ácidas y disminuyen las menos ácidas (Stumpf et al., 1992). En vacas OVX (Kojima et al., 1995), la administración de dosis fisiológicas de E_2 no parecen cambiar el patrón de distribución de las isoformas intrahipofisarias de la FSH. Luego entonces podemos establecer la posibilidad que el modelo de las vaquillas OVX no responda a la P_4 .

Por otro lado, es interesante señalar que en la adenohipófisis de animales OVX se ha documentado la presencia de una serie de glicoproteínas en diferentes etapas del proceso de síntesis, reguladas principalmente por la GnRH, ya que en este estudio no se utilizaron animales privados de GnRH, y como es conocido, este decapeptido participa en el proceso de síntesis y secreción de las gonadotropinas, luego entonces estas glicoproteínas sintetizadas, pueden ser reconocidas de manera indistinta por el anticuerpo, lo que podría enmascarar las diferencias sutiles inducidas por la progesterona en el patrón de distribución de las gonadotropinas; ya que se ha documentado que la progesterona, modifica la estabilidad del mRNA de las gonadotropinas en particular de β LH y subunidad α , lo que sugiere que P_4 participa en la síntesis de las gonadotropinas, fenómeno que no se observó en la heterogeneidad de las gonadotropinas.

Alternativamente podemos señalar que el tipo de tejido utilizado en la identificación del pleomorfismo de la LH y FSH, podría ser otro factor importante, a este respecto, recientemente en este laboratorio (Rojas et al., 2001; Perera et al., 2002), se ha identificado cambios significativos en el porcentaje de isoformas de la LH presentes en la circulación en diferentes etapas del ciclo estral en la especie bovina (estro vs diestro) y entre etapas en la especie caprina (estro vs anestro), fenómeno no observado en extractos hipofisarios en ovinos y bovinos (Zalesky et al., 1992; Stumpf et al., 1992; Kojima et al., 1995), luego entonces, esto nos permite sugerir que el tejido analizado en este estudio no permitió identificar las posibles diferencias inducidas por la progesterona.

Aunque no se observo un cambio significativo en el porcentaje de isoformas entre grupos, se pudo identificar un pequeño incremento en las isoformas de la LH que eluyeron en el rango más básico del cromatofoco en el grupo OVX, debido probablemente a la reducida acción de retroalimentación negativa inducida por los esteroides gonadales que afectan la síntesis y regulación de las gonadotropinas. En acorde con este razonamiento, existen evidencias de que P_4 participa a nivel de la trascrición, reduciendo el tamaño del RNAm para las subunidades β LH y α de las gonadotropinas (Gina y Nett, 1995) y que los niveles del mRNA para la subunidad β de la LH se incrementan significativamente después de la ovariectomía (Robertson et al., 1991), además, se ha documentado que la GnRH puede regular la glicosilación de la LH a nivel postraducciona (Vogel et al., 1986) y finalmente se ha demostrado que la incorporación de N-acetilgalactosamina dentro de los oligosacáridos de la LH es reducida significativamente por el tratamiento con estradiol (Damersh y Baezinger, 1993), Considerando estas observaciones, podemos sugerir que la exposición sostenida del gonadotropo a un medioambiente modificado de hormonas esteroides sexual, favorece la síntesis de isoformas más básicas como se observo en el grupo OVX.

Por lo tanto los resultados de este estudio, muestran que la progesterona no modifica significativamente el patrón de isoformas intrahipofisarias de las gonadotropinas, lo que

sugieren que el papel de la progesterona en el recambio intrahipofisario de las gonadotropinas, puede ser un mecanismo fino de regulación a nivel de síntesis y liberación de algunas isoformas de la LH y FSH. Finalmente, podemos señalar que aunque en este estudio no se identificaron diferencias entre tratamientos a nivel hipofisario, es necesario corroborar el patrón de elución de las isoformas de la LH y FSH a nivel circulatorio.

REFERENCIAS

Baenzinger JU and Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988;947:287-306.

Barrios-De-Tomasi J, Timosi C, Merchant H, Quintanar A, Avalos JM, Andersen CY, Ulloa-Aguirre A. Assessment of the in vitro and in vivo biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186:189-198.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

Burgon PG, Stanton PG and Robertson DM. *In vivo* Bioactivities and Clearance Patterns of Highly Purified Human Luteinizing Hormone Isoforms. *Endocrinology* 1996;137:4827-4836.

Castro-Fernández C, Olivares A, Soderlund D, López-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A and Méndez JP. A Preponderance of Circulating Basic Isoforms is Associated with Decreased Plasma Half-Life and Biological to Immunological Ratio of Gonadotropin-Releasing Hormone-Releasable Luteinizing Hormone in Obese Men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 4603-4610.

Chappel SC, Bethea CL and Spies HG. Existence of multiple forms of follicle stimulating hormone within the anterior pituitaries of cynomolgus monkeys. *Endocrinology* 1984;115:452-461.

Christianson SL, Zalesky DD, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone heterogeneity: Androgens increase the percentage of less basic isohormone. *Domest Anim Endocrinol* 1998;15:87-92.

Combarnous Y. Structure and Structure-Function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Dev* 1988;28:211-228.

Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Ulloa-Aguirre A and Campo S. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001;174: 41-49.

Cupp AS, Kojima FN, Roberson MS, Stumpf TT, Wolfe MW, Werth LA, Kittok RJ, Grotjan HE and Kinder JE. Increasing concentration of 17 β -estradiol has differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and amounts of mRNA for gonadotropin subunits during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 1995; 52: 288-296.

Damesh SM, Baenzinger JU. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides of lutropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11127-11131.

Fink G. Oestrogen and progesterone interactions in the control of gonadotropins and prolactin secretion. *J Steroid Biochem* 1988; 30:169-178.

Galle PC, Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. Effects of estradiol, phenobarbitone and lutenizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J. Endocrinol* 1983; 99:31-39.

Gina BG and Nett T. Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropins-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod* 1995;53:166-172.

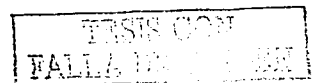
Gong JG, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR and Webb R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian fuction in heifers. *J.Reprod Fertil* 1995;105:263-270.

Goodman RL, Bittman EL, Foster DL, Karsch FJ. The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 1981;10:1414-1417.

Hamernik DL, Clay CM, Turzillo A, Van Kirk EA, Moss GE. Estradiol increases amounts of messenger ribonucleic acid for gonadotropin-releasing hormone receptors in sheep. *Biol Reprod* 1995;53:179-185.

Hassing JM, Kletter GB, I'Anson H, Wood RI, Beitins IZ, Foster DL, and Padmanabhan V. Pulsatile Administration of Gonadotropin-Releasing Hormone Does Not Alter the Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Isoforms Distribution Pattern of Pituitary of Circulating FSH in Nutritionally Growth-Restricted Ovariectomized Lambs. *Endocrinology* 1993;132:1527-1536.

Keel BA, Schanbacher BD and Grotjan HE. Jr. Ovine Luteinizing Hormone. I. Effect of castration and steroid administration on the charge heterogeneity of pituitary luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1987;36:1102-1113.



Kojima FN, Cupp AS, Stumpf TT, Zalesky DD, Roberson MS, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ, Grotjan HE and Kinder JE. Effects of 17 β -estradiol on Distribution of Pituitary Isoform of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone During the Follicular Phase of the Bovine Estrous Cycle. *Biol Reprod* 1995;52: 297-304.

Koligian KB, Stormshak F. Nuclear and cytoplasmic estrogen receptors in ovine endometrium during the estrous cycle. *Endocrinology* 1977;101: 524-533.

Manzella SM, Hooper LV and Baenzinger JU. Oligosaccharides Containing β 1.4-Linked N-Acetylgalactosamine, a Paradigm for protein-specific glycosylation. *J Biol Biochem* 1996;271(21):12117-12120.

Mi Y, Shapiro SD and Baenzinger JU. Regulation of lutropin circulatory half-life by the mannose/N-acetylgalactosamine-4-SO₄ receptor is critical for implantation in vivo. *J Clin Invest* 2002; 109:269-276.

Padmanabhan V, Miehler CD, Borondy M, Anson H, Wood RI, Landefeld TD, Foster DL and Beitins IZ. Circulating Bioactive Follicle-Stimulating Hormone and Less Acidic Follicle-Stimulating Hormone Isoform During Experimental Induction of Puberty in the Female Lamb. *Endocrinology* 1992; 131:213-220.

Padmanabhan V, Lee JS, Beitins IZ. Follicle-stimulating isohormones: Regulation and biological significance. In: Thacher WW, Inskeep EK, Niswender RD, Doborska C, eds. *Reproduction in domestic ruminants*. *J Reprod Fertil* 1998;54(suppl):87-99.

Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K and Wide L. Changes In the Isoforms of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone during Puberty in Normal Children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3103-3106.

Perera MG, Falcón AA, Salas VA. Estandarización de la técnicas de radiomarcaje con Iodo-Gen. *Memorias del XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*; 1996 septiembre 24-26; Puebla (Puebla) México.

Perera MG, Rojas SM, Murcia MC, Hernández CJ, González PE. Identification of Molecular Forms of Luteinizing Hormone in the Serum of Cows and Goats During the Preovulatory Peak. 27th World Veterinary Congress. Tunis, September 25-29, 2002.

Robertson DM, Foulds LM, Fry RC, Cummins JT, Clarke I. Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoforms fraction of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 1991;129:1805-1813.

Rojas MS, Perera MG, Murcia MC, Hernández CJ, Zarco QL, y González PE. Formas moleculares de la hormona luteinizante (LH) en el pico preovulatorio de cabras ciclando o en el inducido con GnRH durante el anestro. Memorias del XXXVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria: 2001 octubre 9-12; Tuxtla Gutiérrez (Chiapas) México. 2001:20.

Stumpf TT, Roberson MS, Wolfe MW, Zalesky DD, Cupp AS, Werth LA, Kojima N, Hejl K, Kittok RJ, Grotjan HE and Kinder JE. A similar distribution of gonadotropin isohormones is maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. Biol Reprod 1992;46:442-450.

Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ and Padmanabhan V. Follicle-Stimulating Isohormone: Characterization and Physiological Relevance. Endocr Rev 1995;16:765-787.

Vogel DL, Manger JA, Sherins RJ, Weintraub BD. Biosynthesis, glycosilation, and secretion of rat luteinizing hormone α subunit and β subunits:differential effects of orchietomy and GnRH. Endocrinology 1986;119:202-213.

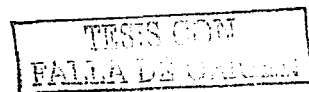
Wide L and Bakos O. More Basic Forms of Both Human Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Serum at Midcycle Compared with the Follicular or Luteal Phase. J Clin Endocrinol Metab 1993;76:885-889.

Wide L, Albertsson-Wikland K and Phillips DJ. More Basic Isoforms of Serum Gonadotropins During Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Therapy in Pubertal Children. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:216-221.

Zaleky DD and Grotjan HE. Comparison of Intracellular and Secreted Isoforms of Bovine and Ovine Luteinizing Hormone Biol Reprod. 1991;4:1016-1024.

Zalensky DD, Nett TM and Grotjan HE. Ovine Luteinizing Hormone: Isoforms in the Pituitary During the Follicular and Luteal Phases of the Estrous Cycle and During Anestrus. J Anim Sci 1992;70: 3851-3856.

Zalesky DD, Schanbacher BD and Grotjan HE. Effect of immunization against LHRH on isoforms of LH in the ovine pituitary. J Reprod Fertil 1993;99: 231-235.



Cuadro 5. Porcentaje de distribución de las isoformas intrahipofisarias de la LH en la especie bovina por rango de pH. La heterogeneidad se analizó por medio del cromatofoco, eluido a pH 10.5 a 3.5. Los resultados presentan el promedio \pm error estándar de cada tipo de isoforma y entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Isoforma	OVX (n=4)		OVX-P ₄ (n=4)	
	Rango de pH	LH \pm E.E. (C.V.)	Rango de pH	LH \pm E.E. (C.V.)
A	9.87-9.91	0.6 \pm 0.15 (52.7)	9.83-9.84	0.3 \pm 0.10 (80.7)
B	9.35-9.42	5.3 \pm 2.9 (>100)	9.36-9.37	3.1 \pm 0.85 (54.9)
C	9.20-9.22	11.8 \pm 1.7 (38.2)	9.20-9.22	11.3 \pm 3.70 (65.9)
D	9.12-9.14	23.4 \pm 2.2 (18.4)	9.13-9.15	24.1 \pm 1.18 (9.8)
E	8.87-8.98	30.7 \pm 6.9 (44.6)	8.94-8.99	32.5 \pm 2.28 (14.0)
F	8.35-8.49	5.3 \pm 1.4 (53.2)	8.38-8.52	6.8 \pm 1.30 (38.0)
G	7.04-7.66	3.2 \pm 0.5 (27.7)	7.48-7.59	3.2 \pm 0.5 (31.9)
H	7.01-7.10	4.1 \pm 1.2 (59.1)	7.02-7.07	7.1 \pm 1.4 (39.6)
I	6.83-6.71	1.6 \pm 0.2 (26.1)	6.73-6.83	1.3 \pm 0.2 (31.4)
J	5.90-6.23	5.9 \pm 0.5 (17.1)	5.75-6.05	6.0 \pm 0.9 (31.1)
K	4.48-4.87	4.4 \pm 0.6 (27.0)	4.26-4.51	3.2 \pm 0.4 (23.0)
L	3.47-3.82	1.4 \pm 0.4 (57.1)	3.39-3.51	0.7 \pm 0.2 (70.6)
S	NaCl	0.7 \pm 0.4 (>100)	NaCl	0.6 \pm 0.3 (79.6)

Cuadro 6. Porcentaje de distribución por grupo de pH de las isoformas intrahipofisarias de la LH y FSH en bovinos ovariectomizados (OVX) y ovariectomizados en presencia de progesterona (OVX-P₄). Los resultados presentan el promedio \pm error estándar de cada grupo de isoforma y entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Isoformas	pH	OVX (n=4)	OVX -P ₄ (n=4)	OVX (n=4)	OVX-P ₄ (n=4)
		LH	LH	FSH	FSH
Básicas	≥ 7.5	78.3 \pm 2.1 (5.3)	78.0 \pm 2.0 (5.1)	23.9 \pm 1.6 (11.2)	23.0 \pm 1.8 (15.9)
Neutras	7.4-6.5	7.7 \pm 1.7 (43.2)	10.3 \pm 1.1 (21.4)	9.6 \pm 0.3 (5.5)	14.2 \pm 2.5 (35.0)
Ácidas	≤ 6.5	13.3 \pm 1.2 (17.6)	11.1 \pm 0.83 (15.0)	66.3 \pm 1.5 (3.9)	63.8 \pm 1.7 (5.3)
NaCl		0.7 \pm 0.4 (>100)	0.6 \pm 0.3 (100)	11.2 \pm 0.2 ^a (3.7)	7.4 \pm 0.3 ^b (7.3)

Las literales denotan diferencia ($p < 0.05$) entre grupo de isoformas y entre tratamientos.

TESIS CON
FALLA DE ...

Cuadro 7. Porcentaje de distribución por rango de pH de las isoformas intrahipofisarias de la FSH en la especie bovina. El análisis se llevó a cabo. Los resultados presentan el promedio \pm error estándar de cada tipo de isoforma y entre paréntesis se presenta el coeficiente de variación (%).

Isoforma	OVX (n=4)		OVX-P ₄ (n=4)	
	Rango de pH	FSH \pm E.E. (C.V.)	Rango de pH	FSH \pm E.E. (C.V.)
I	9.48-9.10	5.1 \pm 0.21 (7.13)	9.62-9.07	4.8 \pm 0.54 (19.48)
II	9.09-9.0	6.9 \pm 0.91 (22.8)	9.02-8.77	6.2 \pm 0.87 (24.3)
III	8.95-8.71	9.3 \pm 0.8 (14.34)	8.74-7.65	9.6 \pm 1.52 (27.4)
IV	8.63-7.77	4.3 \pm 0.6 (22.96)	7.59-7.08	3.8 \pm 0.79 (36.0)
V	7.6-6.64	6.6 \pm 1.26 (33.1)	7.07-6.60	7.3 \pm 0.5 (12.6)
VI	6.64-6.12	9.3 \pm 1.9 (33.2)	6.51-5.46	11.1 \pm 1.8 (28.7)
VII	5.89-4.03	46.8 \pm 1.8 (6.66)	5.41-3.73	41.7 \pm 1.5 (6.27)
VIII	3.86-3.45	3.6 \pm 0.5 ^a (25.0)	3.60-3.35	1.2 \pm 0.3 ^b (44.7)
IX	NaCl	11.2 \pm 0.2 ^a (3.71)	NaCl	7.4 \pm 0.3 ^b (7.26)

Las literales denotan diferencia $p < 0.05$ entre tratamientos

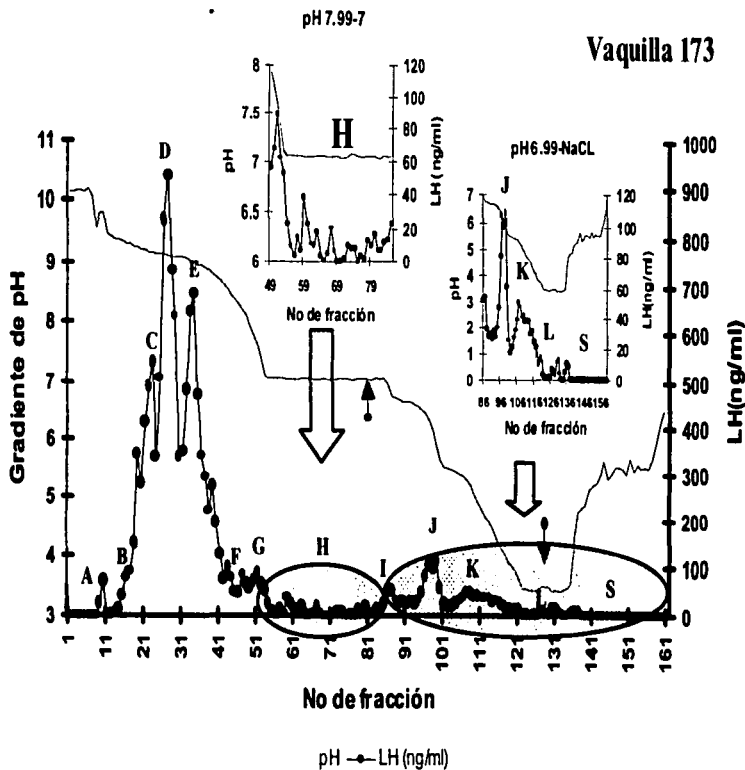


Figura 6. Perfil representativo del patrón de LH inmunoreactiva del extracto de adenohipófisis bovina del grupo control (OVX). Cuatro mg de proteína del extracto hipofisario, fueron analizados en un gradiente de pH de 10.5 a 3.5. La flecha inicial muestra la aplicación del polybuffer 74, pH 3.5 y la segunda flecha indica la aplicación de NaCl 1M. Los recuadros señalan el detalle del patrón de elución de la LH inmunoreactiva en los rangos de pH 7.99-7 y 6.99 a NaCl respectivamente. Las diferentes isoformas se codificaron con letras comenzando con las formas más básicas (A).

70-4

FALLA
 TRES
 1981

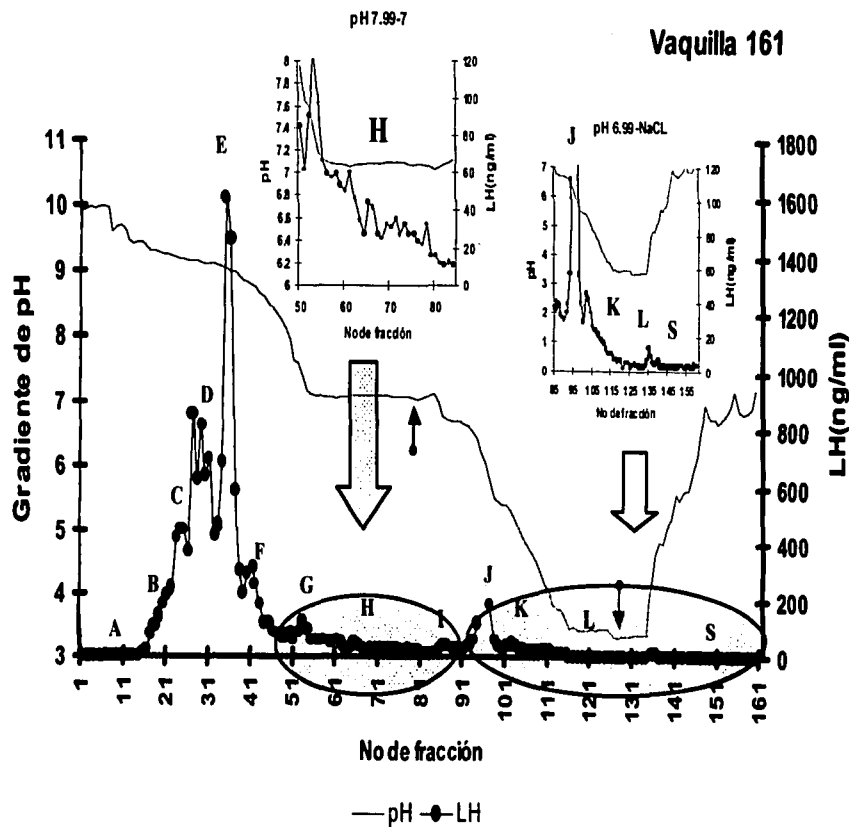


Figura 7. Perfil representativo del patrón de LH inmunoreactiva del extracto de adenohipófisis bovina, del grupo estimulado con progesterona (OVX-P₄). Cuatro mg de proteína del extracto fueron analizados en un gradiente de pH de 10.5 a 3.5. La flecha inicial muestra la aplicación del polybuffer 74, pH 3.5 y la segunda flecha muestra la aplicación de NaCl 1M. Los recuadros señalan el detalle del patrón de elución de la LH inmunoreactiva en los rangos de pH 7.99-7 y 6.99 a NaCl respectivamente. Las diferentes isoformas se codificaron con letras comenzando con las formas más básicas (A).

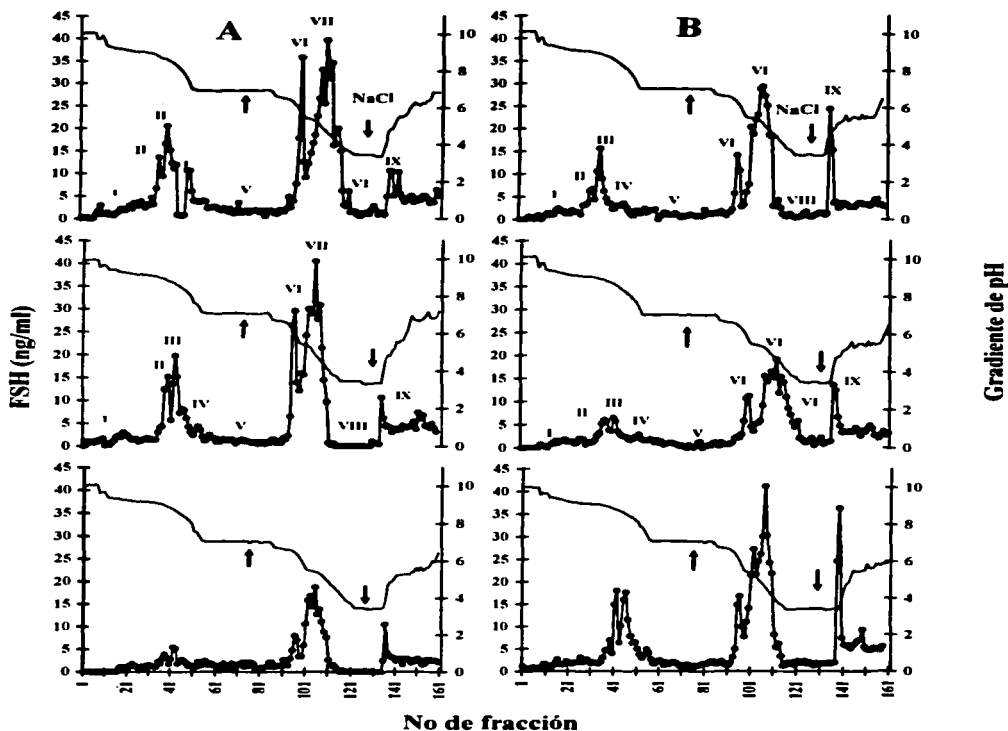


Figura 8. Perfil representativo del patrón de isoformas de la FSH presentes en el extracto de adenohipófisis bovina. **A)** Grupo estimulado con progesterona (P4). **B)** Grupo Control. Cuatro mg de proteína del extracto fueron analizados en cada cromatofoco, a través de un gradiente de pH de 10.0 a 3.5. La flecha indica el momento de la aplicación del polybuffer 74, pH 3.5 y NaCl 1M respectivamente. Las diferentes isoformas se identificaron con números romanos, comenzando con las formas más básicas (I).

TESIS COM
FALLA

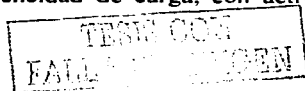
CAPITULO 7

PURIFICACIÓN DE CINCO ISOFORMAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE BOVINA (bLH). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, BIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA

TRINIS CON
INMUNOLÓGICA

RESUMEN

Este estudio describe la purificación de cinco isoformas de la LH a partir del extracto glicoproteínico de adenohipófisis bovinas. La segunda fracción eluida a pH 6.8, designada como CM-2ab y la fracción obtenida a pH 9.5 (CM-3ab) de la cromatografía de intercambio catiónico (CM-sepharosa), se repurificaron en una cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel) en condiciones idénticas, para obtener a la isoforma I, con un rendimiento de 1.6 mg/Kg de tejido y las isoformas II, III, IV y V con 1.8 mg/Kg; 1.5mg/Kg; 1.2 mg/Kg y 7.0 mg/Kg respectivamente. La diferencia de carga de cada isoforma, se determinó por su movilidad relativa (Rf.) mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas. La isoforma I, mostró un Rf. de 0.16 cm., mientras que las isoformas II, III y IV, presentaron un Rf. de 0.044 cm. y la isoforma V mostró un Rf. de 0.11cm. La determinación del peso molecular de las isoformas, se llevo a cabo por medio de una electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). En condiciones no reductoras, las isoformas I y V presentaron un peso molecular de 37.5 Kilodaltones (kDa), correspondiente a la forma nativa, mientras que las isoformas II, III y IV, presentaron un peso molecular de 38.5 kDa, pesos moleculares semejantes a los estándares USDA-bLH-b5 y NIDDK-oLH-26. El análisis por inmunotransferencia (Western-blot), utilizando el anticuerpo oLH (CSU-204), permitió identificar bandas inmunoreactivas de peso molecular de 59.0, 37.5 (mayoritaria) y 22.0 kDa, respectivamente, tanto en los estándares como en las distintas isoformas. La potencia biológica realizada mediante la depleción del ácido ascórbico en rata, fue de 1.04U/mg (isoforma I); 5.9U/mg (isoforma II), 0.16 U/mg (isoforma III), 0.86U/mg (isoforma IV) y 1.4U/mg(isoforma V), con intervalos de confianza del 95%. Su actividad inmunológica se determinó por medio de un radioinmunoensayo específico para la LH, a la dosis esperada del 50% (ED₅₀). Los resultados fueron de 1.74U/mg (isoforma I), 3.31U/mg (isoforma II), 2.85U/mg (isoforma III), 5.96U/mg (isoforma IV) y 2.31U/mg (isoforma V); en todos los casos sus curvas mostraron un paralelismo con el USDA-bLH-b5 y NIDDK-oLH-26. Las isoformas, no presentaron reacción cruzada en un radioinmunoensayo de FSH y TSH. Estos datos muestran la obtención de dos isoformas que eluyen a pH 6.8 (I y V) y tres isoformas a pH 9.5 (II, III y IV), con una heterogeneidad de carga, con actividad



inmunológica y biológica de LH. Los resultados de este estudio, permiten contar con una metodología sencilla, con rendimientos suficientes de cada una de las isoformas, para el desarrollo de su correspondiente sistema analítico, lo que permitirá conocer sus niveles circulantes en diferentes condiciones fisiológicas.

INTRODUCCION

La hormona luteinizante (LH) es una proteína heterodimérica, compuestas de dos subunidades (α y β) en unión no covalente. (Combarnous, 1988). La subunidad α es común en las gonadotropinas, mientras que la subunidad β les confiere especificidad biológica e inmunológica (Pierce y Parson, 1981). La LH, presenta una microheterogenidad de carga, que en los últimos años, se ha atribuido en parte a la variada estructura interna de sus oligosacáridos (Combarnous, 1988; Creus et al., 2001; Baenzinger y Green1988), lo que repercute en su punto isoeléctrico (Kojima et al., 1995), en su actividad biológica *in vitro* como *in vivo* (Creus et al., 2001). Múltiples isoformas de la LH, se han aislado de extractos de la adenohipófisis de diferentes especies, mediante diversos métodos, tales como el intercambio iónico (Stockell-Hartree, 1966; Carranza et al., 1994; Perera et al., 1996; Stanton et al., 1996; Burgon et al., 1996; Chlenov et al., 1993), la cromatografía de interacción hidrofóbica (Hiyama et al., 1990; Jack et al., 1987) y el cromatoenfoco (Grotjan et al., 1991; Kojima et al., 1995). No obstante, la cantidad de cada una de las isoformas, no ha permitido el desarrollo de un sistema de Radioinmunoanálisis (RIA) y/o Enzimunoanálisis (ELISA) para cada una de ellas, debido a su bajo rendimiento.

El contar con un sistema de cuantificación específico, permitirá conocer con precisión, la secreción de las diferentes isoformas en distintos estadios fisiológicos, como en las diferentes etapas del ciclo estral, anestro posparto o en condiciones de manipulación artificial de la reproducción. Luego entonces, es importante destacar, la necesidad del desarrollo de sistemas analíticos, precisos y específicos para cada una de las isoforma de las gonadotropinas (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Padmanabhan et al., 1999; Ulloa-Aguirre et al., 2001; Rose et al., 2002), ya que muchas de las evidencias, han presentado diferentes valores de actividad inmunológica para una misma hormona, cuyos resultados dependen

fundamentalmente del tipo de sistema de análisis (homólogo o heterólogo) y tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) utilizado, luego entonces, este tema de discusión apoya fuertemente la necesidad de obtener y purificar suficientes cantidades de cada una de las isoformas, lo que permitirá el desarrollo de sistemas analíticos, confiables, homólogos y específicos, para conocer con precisión, el patrón de secreción de estas isoformas en diferentes condiciones fisiológicas.

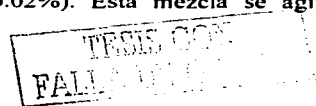
Por lo tanto, el objetivo del presente estudio, correspondió a la obtención y purificación de isoformas de la LH a partir de extractos glicoproteínicos de adenohipófisis bovinos, con rendimientos adecuados, para ser empleadas en el desarrollo de un sistema analítico, para la cuantificación de cada isoforma en diferentes estadios fisiológicos en esta especie. Así como determinar sus características fisicoquímicas, su actividad biológica (*in vivo*) e inmunológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron 1000 glándulas bovinas en el Rastro Estatal de la Ciudad de la Habana, Cuba, durante un periodo de 6 meses, las que se obtuvieron después de 30 a 45 min. del sacrificio y se conservaron en acetona hasta su procesamiento. Las glándulas en estas condiciones se transportaron a la Ciudad de México. Todos los pasos de extracción y purificación se realizaron a 4°C, con reactivos de grado analítico.

Extracción de la fracción glicoproteínica (GLP)

Las glándulas se disecaron del tejido que las rodea y se separaron los lóbulos posteriores, los lóbulos anteriores se homogeneizaron en agua acidificada (pH 5.1) que contenía un inhibidor de proteasas (fenilsulfonilmetilfluoruro, PMSF) al 0.02%; el homogeneizado se agitó mecánicamente durante 16 horas; Las proteínas del sobrenadante, obtenido por centrifugación (3000 x g/ 30 min./4°C) se precipitaron con etanol y se dializaron exhaustivamente con agua y se liofilizaron para estudios posteriores. Por cada gramo de precipitado obtenido, se añadieron 6 volúmenes de acetato de amonio al 10%, pH 5.1 y 4 volúmenes de etanol al 96% que contenía el PMSF (0.02%). Esta mezcla se agito



mecánicamente durante 48 horas y se centrifugo a 6000 x g durante 30 min. El precipitado sé resuspendió nuevamente y se repitió el proceso; el último residuo se conservó en congelación para estudios posteriores. Las proteínas de cada sobrenadante fueron previamente ajustadas a pH 5.1 y precipitadas con etanol frío, agregado gota a gota y con agitación constante. Las mezclas se mantuvieron en reposo durante 48 horas, al cabo de las cuales sé extrajo el sobrenadante y el precipitado se centrifugó en las condiciones antes señaladas. Los precipitados correspondieron a la fracción glicoproteínica y sé resuspendieron en agua y se dializaron* durante 24 horas, con 3 cambios de agua; finalmente se liofilizaron**.

Cromatografía de Intercambio Catiónico (CM-Sepharosa)†

La fracción glicoproteínica (GLP), se purificó de acuerdo al método descrito en ruminantes (Carranza et al., 1994; Perera et al., 1996). En breve, el extracto glicoproteínico (61.4 mg de proteína) se disolvió en 27 ml de acetato de amonio 0.005 M, pH 5.1 y el material insoluble se descarto por centrifugación a 6000 x g durante 30 min. y el sobrenadante se aplicó a la columna (1.5 x 27 cms.) de intercambio catiónico, previamente equilibrada con este amortiguador. La columna sé eluyó con flujo de 23 ml/h, y se colectaron fracciones de 3 ml y el registro de proteína se realizó por espectrofotometría a 280 nm. La columna se eluyó, aplicando un gradiente escalonado de amortiguadores, que correspondió a, acetato de amonio 0.005M, pH 5.1, acetato de amonio 0.1M, pH 6.8 y acetato de amonio 1M más glicina 0.1M pH 9.5.

Cromatografía de Intercambio Aniónico (DEAE-Sephacel)‡

Las fracciones de proteínas obtenidas con el segundo (CM-2ab, 7.6mg de proteína) y tercer amortiguador (CM-3ab, 27.7 mg de proteína) de la corrida del EGP en la CM-sepharosa, se resuspendieron en amortiguador de glicina 0.1M, pH 9.5 y se aplicaron de manera

* Spectrapor, membrane tubing # 4; MCOW 12-14000

** Labconco freeze Dyrer 5

† CM Sepharose CL-6B. Pharmacia Biotech

‡ DEAE Sephacel, Pharmacia Biotech

independiente a la columna (1.2 X 34 cm; 1.5 X 24 cm) de DEAE-Sephacel, equilibrada previamente con el mismo amortiguador. La elución de las columnas se llevó a cabo con un flujo de 18 y 23 ml/hora respectivamente y se aplicó un gradiente de pH con los siguientes amortiguadores, glicina 0.1M, pH 9.5, acetato de amonio 0.1M, pH 6.8 y acetato de amonio 1.0M, pH 5.1, se colectaron fracciones de 3 ml y la detección de proteína se realizó a 280 nm.

Caracterización fisicoquímica

Determinación de proteínas totales

Se realizó de acuerdo al método descrito por Bradford, (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Electroforesis en condiciones nativas (TRIS-PAGE)

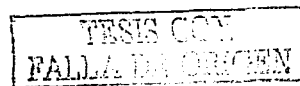
Cada fracción obtenida durante la extracción y purificación, se le determino la movilidad relativa (Rf.) o carga eléctrica por medio de una electroforesis en tubo, en condiciones nativas, utilizando poliacrilamida al 7.0%, pH 8.3 (Nicoll y Linch, 1971). En breve, se colocaron 100 µg de proteína/tubo y se aplicó un voltaje constante de 1.5 mA/tubo durante 3 hrs. Al termino de la corrida, los geles se tiñeron con amido-Black 10B (Bio-Rad) al 0.5% disuelto en ácido acético al 5%. La decoloración se realizó con ácido acético al 5%.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

El peso molecular para cada una de las fracciones obtenidas en DEAE-Sephacel, se determinó por medio de una electroforesis en placa (Laemmli, 1970), utilizando geles de poliacrilamida al 12.5%, pH 8.6, en presencia de β-mercaptoetanol (condiciones reductoras) o ausencia (condiciones no reductoras). Los geles se tiñeron con plata[†] y se utilizaron como referencia, estándares de bajo peso molecular[‡].

[†] Silver Stain Plus Kit, Bio-Rad

[‡] SDS-PAGE Molecular Weight standards, Low Range



Caracterización Inmunológica

Inmunotransferencia

Con el propósito de identificar únicamente las bandas de proteínas correspondientes a LH en las fracciones obtenidas en el intercambiador aniónico (DEAE-Sephacel), se desarrolló el sistema de inmunotransferencia, para ello, las proteínas purificadas, se corrieron en una electroforesis de SDS-PAGE a una concentración de proteína de 100 ng por carril, una vez realizada la electroforesis, las bandas de proteína, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45µm trans, blot, Bio-Rad) durante 90 minutos a 150 volts (Towbin et al., 1979; Perera et al., 1996a). Una vez transferidas las proteínas, se incubaron con el primer anticuerpo (anti-oLH, CSU-204, diluido 1:500) durante 24 h, posteriormente, se incubaron durante dos horas con el segundo anticuerpo (1:3000) de cabra dirigida contra IgG de conejo* acoplado a fosfatasa alcalina. El revelado de las bandas inmunoreactivas** se realizó con 1 ml de agente color A (nitroblue tetrazolium in aqueous dimethylformamide [DMF]) 1 ml de agente de color B (5-bromo-4-choro-3-indolyphosphate in DMF), disuelto en 100 ml de amortiguador TRIS (0.1M).

Radioinmunoanálisis (RIA) para la hormona luteinizante (LH)

La concentración de la LH presente en las fracciones finales de la purificación, se realizó por medio de un RIA, en fase líquida, con 20 horas de incubación a 4°C. Para ello, se utilizó como trazador a la hormona NIDDK-oLH-1-2, AFP-7071B que sé marco con Na¹²⁵I, por el método del IODO-GEN (Perera et al., 1996b), en tanto que la NIDDK-oLH-26 se utilizó como referencia o estándar, a las dosis de 0.325 a 45.0 ng/tubo. El primer anticuerpo (NIDDK-anti-oLH-1, AFP-192279), se utilizó a una dilución final de 1:500.000 y el complejo antígeno-anticuerpo se obtuvo después de la aplicación de 1 ml de una suspensión celular de *Staphylococcus-aureus*, acoplada a la proteína A[†] (1.5 µg/tubo). La determinación de la concentración de la LH presente en cada muestra, se analizó por

* Alkaline Phosphatase-conjugate AffiniPure Goat anti Rabbit IgG. Jackson immunoResearch.

** Alkaline Phosphatase conjugated substrate Kit (Bio-Rad).



triplicado, colocando concentraciones de proteína semejantes a las dosis del estándar. La actividad inmunológica se calculó en función de la dosis esperada del 50 % (ED_{50}) de la regresión lineal Logit-log de la curva dosis-respuesta para cualquier fracción estudiada (Materi et al., 1986). El paralelismo se determinó mediante la comparación de cada pendiente y su coeficiente de correlación del estándar como de las proteínas de este estudio.

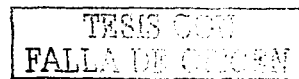
Radioinmunoanálisis para la hormona estimulante del folículo (FSH)

La concentración de FSH en cada fracción final, se determinó por medio de un RIA en fase líquida, con un periodo de incubación de 48 h a temperatura ambiente, utilizando como sistema de separación al segundo anticuerpo. La hormona USDA-bFSH-1-2, AFP-5318C se utilizó como trazador, así como referencia a las dosis de 0.2 a 12.8 ng/tubo; El primer anticuerpo (anti β -bFSH-USDA) se utilizó a una dilución final de 1:9600 en presencia de suero normal de conejo 1:1600. El complejo antígeno-anticuerpo se precipitó con exceso de segundo anticuerpo (1:40) de ovino dirigido contra IgG de conejo. Las fracciones se analizaron por triplicado desde 0.4 a 204 ng de proteína/tubo. La concentración de la hormona, se calculó a la dosis esperada del 50% (ED_{50}).

Radioinmunoanálisis para la hormona estimulante del tiroides (TSH)

La concentración de TSH, se cuantificó con un RIA bovino en fase líquida con 20 h de incubación a temperatura ambiente. La hormona USDA-bTSH-1-1 se utilizó como trazador y estándar a las dosis de 0.1 a 12.8 ng/tubo. El primer anticuerpo (anti-bTSH, AFP-284246) se utilizó a una dilución final de 1:500,000 y el complejo antígeno-anticuerpo y la concentración de esta hormona en las fracciones analizadas, se determinó de manera idéntica a lo señalado en el RIA de LH.

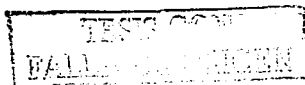
* Pansorbin, Cells. Calbiochem



Caracterización biológica

Bioensayo *in vivo*

La potencia biológica se determinó por medio del bioensayo in vivo de la depleción del ácido ascórbico (Parlow, 1961) en tres bioensayos independientes. Cada bioensayo se desarrolló bajo las mismas condiciones previamente descritas (Perera et al., 1996), y la cuantificación del ácido ascórbico se determinó con la técnica densitométrica a 245 nm. En breve: Para cada bioensayo se utilizaron 50 ratas de la cepa Wistar de 23 días de edad, con un peso promedio de 40-50 g. La pseudopreñez en los animales, se indujo con la aplicación de 50UI de PMSG/animal en 0.5 ml de solución salina por vía subcutánea, 60 horas después se administró por la misma vía 25 UI de HCG a cada animal. Ocho días después, el primer bioensayo se desarrolló, para ello, los animales se distribuyeron al azar en diez grupos, el grupo testigo (n=5), el estándar (NIDDK-oLH-26) se administró a las dosis de 0.75 (n=5), 3 (n=5) y 12 μ g de proteína (n=5) respectivamente, en tanto que para LH-I y LH-II, se utilizaron el mismo número de animales (n=15) distribuidos en tres grupos (n=5), y se administró la hormona en las mismas dosis que el estándar. El bioensayo dos y tres, se realizaron de manera semejante al bioensayo uno, utilizando las mismas dosis del estándar y se probaron la LH-III y LH IV (bioensayo dos), V y I (bioensayo tres). A los animales se les administró i.p. 0.5 ml de solución salina (grupo testigo) o solución de proteína (estándar y/o problema). Cuatro horas después de la aplicación de las hormonas, los animales se sacrificaron con dióxido de carbono y se disecó el ovario izquierdo de cada animal, se pesó y posteriormente se homogeneizó en 10 ml de ácido metafosfórico al 2.5%. El homogeneizado se filtro (Whatman 40-42, 11.0 cm.) e inmediatamente se leyó a 245 nm. Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva de ácido ascórbico (1 a 256 μ g/ml) disuelto en ácido metafosfórico a la misma concentración. Los resultados se analizaron por medio de un arreglo factorial 2x2 donde los factores fueron: estándar y tipo de isoforma (Alatorre, 1976; Finney, 1986). En cada bioensayo se determinaron los parámetros λ y g, correspondientes al índice de precisión (<1) y el paralelismo (<1) respectivamente.



ESTADO LIBRE ASOCIADO
DE PUERTO RICO
DE LA BIENESTAR

RESULTADOS

El patrón de elución de la fracción glicoproteínica en CM-sepharosa se presenta en la Figura 9(a), se identificaron por espectrometría tres picos de proteína con la aplicación del gradiente escalonado de amortiguadores; la fracción de proteína no retenida en la columna (designada CM-1ab), presentó un porcentaje de recuperación total del 4.6%, en tanto que la fracción que eluyó con acetato de amonio 0.1M, pH 6.8 (designada CM-2ab) presentó un porcentaje de recuperación del 14.2% y la fracción obtenida con acetato de amonio 1M mas glicina 0.1M, pH 9.5 (designada CM-3ab), se recuperó el 45.2%. La Figura 9(b), muestra el patrón cromatográfico de la fracción CM-2ab repurificada en intercambio aniónico (DEAE-sephacel), donde se obtuvo una pequeña fracción de proteínas que eluyeron con el segundo amortiguador (acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8) que correspondió a la isoforma I, con un porcentaje de recuperación del 16.1%, mientras que, con acetato de amonio 1M, pH 5.1 se obtuvo una fracción de proteína, con un rendimiento del 8.4%, que presentó una movilidad relativa (Rf) de 0.48 cm, con un peso molecular de 47.6 Kilodaltones (kDa), con una actividad biológica de FSH de 421 U/mg e inmunológica de 1.218 U/mg, por lo que se descarto del estudio. En cuanto a la fracción CM-3ab repurificada en DEAE-sephacel, se presenta en la Figura 9(c), con el primer amortiguador (glicina 0.1M, pH 9.5) eluyeron tres fracciones de proteínas, que correspondieron a la isoforma II, III y IV, cuyo rendimiento correspondió al 6.4%, 5.6% y 4.3% respectivamente; con el segundo amortiguador (acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8) se eluyó el pico correspondiente a la isoforma V, con un rendimiento del 25.3%, con el tercer amortiguador (acetato de amonio 1 M, pH 5.1) eluyó un quinto pico de proteína con características fisicoquímicas, biológicas e inmunológicas de FSH, por lo que no se considero en este estudio. Los rendimientos se resumen en el cuadro 8.

Los patrones electroforéticos en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de cada fracción obtenida durante la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa) se presentan en la Figura 10. La fracción CM-1ab, presentó dos bandas con una movilidad relativa de 0.39 cm. y 0.49 cm., en tanto que la fracción CM-2ab presentó un Rf. de 0.12 cm. y 0.38 cm., finalmente la fracción CM-3ab presentó una banda pegada a la línea de aplicación con



un Rf de 0.049 cm. La Figura 11, presenta los patrones en TRIS-PAGE de las diferentes fracciones obtenidas en DEAE-Sephacel, la isoforma I, presentó un Rf de 0.16 cm., en tanto que la isoforma II, III y IV presentaron un Rf. de 0.044 cm., y la isoforma V mostró un Rf. de 0.11 cm., semejante al estándar USDA-bLH-5.

El patrón electroforético en SDS-PAGE, de las fracciones obtenidas en DEAE-Sephacel, se presenta en la Figura 12. El patrón en ausencia de β -mercaptoetanol (condiciones no reductoras) se ejemplifica en el recuadro (A). En las isoformas I y V se identificó una banda de alto peso molecular que correspondió a 59.02 kDa, una banda predominante de peso molecular de 37.5 kDa y dos bandas con un peso molecular de 23.44 kDa y 20.82 kDa (bandas poco presentes), patrón semejante al estándar de referencia USDA-bLH-B5; Aunque las isoformas II, III y IV presentaron la misma banda de alto peso molecular (59.02 kDa), la banda más importante correspondió a un peso molecular ligeramete superior de 38.5 kDa, y tres bandas de 24.6 kDa, 20.8 kDa y 17.2 kDa respectivamente. El recuadro (B), muestra el patrón electroforético en presencia de β -mercaptoetanol (condiciones reductoras) de las mismas fracciones. Bajo estas condiciones, las bandas de alto peso molecular desaparecieron en su totalidad y se conservó la banda mayoritaria de 37.6 kDa y se intensificaron las bandas con un peso molecular de 20.9 kDa y 19.1 kDa, tanto para el estándar como para las diferentes isoformas de la LH.

El análisis por inmunotransferencia, utilizando el anticuerpo (anti-oLH-CSU-204), identificó bandas inmunoreactivas de peso molecular de manera idéntica a los estándares de referencia (Figura 13), predominando la banda de peso molecular de 37.6 y 38.5kDa, así como la banda de 23.4 kDa, sin embargo se inmunotifieron las bandas de alto peso molecular.

La actividad inmunológica cuantificada por el radioinmunoensayo a la dosis esperada del 50% (ED_{50}) correspondió a: 1.74U/mg (170%) para la isoforma I, de 3.3U/mg (330%) en la isoforma II, de 2.9U/mg (290%) para la isoforma III, de 5.96 U/mg (596%) en la isoforma IV y de 2.3U/mg (230%) para la isoforma V. En todas las isoformas se presentó un alto

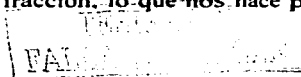
paralelismo con los estándares de referencia (NIDKK-oLH-26, 100% y USDA-bLH-b5, 230%). La pendiente obtenida para cada hormona correspondió a -2.04 (NIDDK-oLH-26), -1.89 (USDA-bLH-b5), -2.01 (LH-I), -1.97 (LH-II), -2.06 (LH-III), -2.23 (LH-IV), y -2.12 (LH-V), figura 14, cuyos resultados se resumen en el cuadro 9.

Los resultado con el sistema de FSH para cada una de las proteínas con características de LH, no mostraron una reacción cruzada con este sistema, como se presentó con el estándar USDA-bLH-B5. En tanto que los resultados con el sistema de TSH bovino, mostraron una reacción cruzada del 10 al 30%, sin embargo no existió paralelismo con las muestras. El cuadro 10 resume los resultados.

La potencia biológica determinada en un bioensayo 2x2 balanceado, correspondió para la isoforma I a 1.04 U/mg con una λ de 0.88 y una g de 0.46; para la isoforma II de 5.92 U/mg ($\lambda=0.54$ y $g=0.71$); la LH-III, presentó una actividad de 0.16U/mg sin límites de confianza, en tanto que la LH IV fue de 0.865 U/mg ($\lambda =0.29$ y una $g=0.27$) y finalmente la isoforma V fue de 1.4U7mg ($\lambda= 0.61$ y $g = de 0.23$).

DISCUSIÓN

Se aislaron y purificaron del extracto glicoproteínico de adenohipófisis bovinas, cinco isoformas de la LH. La isoforma I se obtuvo a partir de la fracción CM-2ab, mientras que las isoformas II, III, IV y V se obtuvieron de la fracción CM-3ab, ambas fracciones obtenidas durante la purificación del extracto glicoproteínico en CM-sepharosa y repurificadas en las mismas condiciones en un intercambiador aniónico (DEAE-Sephacel). El patrón cromatográfico del extracto glicoproteínico de adenohipófisis bovina en CM-Sepharosa, fue similar a lo reportado para extractos glicoproteínicos bovinos (Carranza et al., 1994) y caprinos (Perera et al., 1996), en las mismas condiciones. Aunque, la fracción obtenida a partir de acetato de amonio 0.005M, pH 5.1, designada como CM-1ab, se descarto del estudio, debido al alto rendimiento y actividad de FSH (Stockell-Hartree, 1966; Carranza et al., 1994); Perera y col (1996), informaron de la obtención de una forma molecular de la LH en la especie caprina a partir de esta fracción, lo que nos hace pensar



que probablemente en la especie bovina podamos obtener otra isoforma de LH a partir de esta fracción. Aunque el rendimiento (mg de proteína/kg de tejido) obtenido para cada una de las fracciones consideradas como LH, fueron inferiores a lo reportado en otras especies (Stockeel-Hartree, 1966; Matteri et al 1986; Muralidhar et al., 1992; Perera et al., 1996), en ninguno de estos estudios reportan la obtención de cuatro proteínas con características fisicoquímicas, biológicas e inmunológicas de LH a partir de la fracción CM-3ab, considerada como una fuente importante de TSH (Carranza et al., 1994).

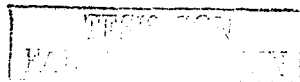
EL patrón electroforético en TRIS-PAGE de las diferentes isoformas de la LH, confirmó la heterogeneidad de carga de esta proteína ya que la LH-I y la LH-V mostraron un comportamiento menos catiónico, patrón semejante para isoformas de LH equina (25,30); humana (Stockell-Hartree, 1966; Bates et al., 1968); bovina (Carranza et al., 1994; Muralidhar et al., 1992); rata (Ward et al., 1971) y caprina (Perera et al., 1996). A diferencia, la LH-II, LH-III y LH-IV que eluyeron a pH 9.5, que presentaron patrón electroforético del tipo catiónico, semejante a los estándares USDA-bLH-5, AFP5500 y NIDDK-oLH-26, AFP5551B, así como una variante de LH caprina (Perera et al., 1996), LH equina (Matteri et al., 1986) y humana (Stockell-Hartree y Renwick, 1992). La diferencia entre los diferentes patrones electroforéticos en TRIS-PAGE (heterogeneidad de carga), para la LH que eluyeron a pH 6.8 y aquellas que eluyeron a pH 9.5, se ha sugerido que se debe a la composición de las unidades de carbohidratos presentes en la molécula, así como la cantidad de sulfato terminal en estos carbohidratos. (Combarrous, 1988; Baenzinger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre et al., 2001; Dias, 2001).

Con el fin de determinar el peso molecular de las isoformas de LH, se recurrió al análisis electroforético en el sistema SDS-PAGE, en comparación con el estándar USDA-bLH-B5 en condiciones no reductoras. en todos los casos, se presentó una banda importante con peso molecular relativo de 37.5 a 38.5 kDa, cercano a lo señalado para la especie ovina, bovina, porcina y caprina (Perera et al., 1996), sugiriendo que esta banda presente en las diferentes fracciones purificadas de este estudio, corresponden a la forma nativa de esta proteína. Por otro lado se identificaron proteínas de alto peso molecular, principalmente en

la LH-I y LH-V, sin embargo cuando se analizaron las muestras en condiciones reductoras (en presencia de β -mercaptoetanol), estas proteínas de alto peso molecular desaparecieron, lo que sugiere que estas proteínas son agregados de peso molecular de la LH, ya que se conserva ligeramente la banda de 37.5kDa y se enriquecen las bandas de peso molecular relativo de 23.4 y 20.8kDa, resultados semejantes a lo informado para esta hormona (Carranza et al., 1994; Perera et al 1996; Stanton et al 1996; Matteri et al., 1986) en donde se sugiere que las formas de alto peso molecular corresponden a agregados de la forma nativa y ésta a su vez esta compuesta de dos subunidades, que correspondieron a las bandas de menor peso molecular.

El análisis por medio de la inmunotransferencia para cada una de las fracciones purificadas de la LH, identificaron proteínas de alto peso molecular, una banda importante con peso molecular relativo de 37.5kDa, así como una proteína con un peso molecular de 23.4kDa. Estos datos confirman una vez más que las diferentes fracciones purificadas en este estudio corresponden a la LH. Con el fin de analizar la especificidad de anticuerpo utilizado en este sistema, simultáneamente se incluyó a la USDA-bTSH, el cual mostró la presencia de las bandas de 37.5kDa y 23.4kDa en muy poca intensidad, confirmando que el estándar presenta contaminación con LH y también sugiere que la banda de peso molecular pequeño corresponde a la subunidad alfa, común entre las glicoproteínas.

El sistema de radioinmunoensayo, permitió observar un paralelismo en las diferentes isoformas de la LH, lo que se pudo confirmar en los valores de las pendientes, en comparación con los estándares de oLH y bLH, lo que confirma la presencia de LH. La cuantificación de la actividad inmunológica, mostró una mayor actividad de la LH, en aquellas proteínas que eluyeron a pH 9.5 (LH-II, III y IV) en comparación con la de elución a pH 6.8. La diferencia de respuesta se puede explicar en función del tipo de anticuerpo utilizado en este estudio, el cual se generó con una LH obtenida a pH 9.5, (datos señalados por USDA y NIDDK).



El grado de contaminación de las isoformas de la LH, en relación con proteínas estructuralmente semejantes (FSH y TSH), no se observó en cada uno de los sistemas utilizados, en particular con FSH, lo que demuestra que estas isoformas no tienen contaminación con FSH. En contraste, con el sistema de TSH, se presentó una reacción cruzada de 0.36U/mg para la LH-I y de 0.23U/mg para la LH-IV, mientras que las isoformas II, III y V el porcentaje fue mínimo o no detectable; el comportamiento de sus curvas dosis-respuesta, no fueron paralelas, lo que se reflejó en su pendiente, y establece que no hay identidad; sin embargo, podemos señalar que el anticuerpo utilizado en el sistema de TSH puede reconocer sitios antigénicos comunes con la LH, ya que ambas proteínas son estructuralmente muy semejantes. Por lo tanto, podemos señalar que las diferentes proteínas purificadas en este estudio son LH con nula actividad inmunológica de FSH y TSH.

Recientemente, Ulloa-Aguirre y col (Ulloa-Aguirre et al., 2001), enfatiza la importancia de la relación de la actividad biológica e inmunológica (B/I) como un índice (B/I) de la biopotencia de isoformas individuales, el cual varía con la acidez de la proteína; por ejemplo, Castro-Fernández et al. (2000), señalan que la relación, disminuye con el incremento de la acidez, datos que se confirman con los resultados obtenidos para la LH-II (elución a pH 9.5), cuando se comparó con las isoformas que eluyeron a pH 6.8 (LH-I, V); sin embargo las variantes LH-III y LH-IV, mostraron una relación muy inferior a pesar de haber eluido a pH 9.5, quizá esta discrepancia en actividad biológica se deba a que el modelo biológico (depleción del ácido ascórbico) utilizado para su determinación no es suficientemente sensible o específico para ellas, ya que en todos los casos el anticuerpo reconoció de manera indistinta a cada isoforma.

Por lo tanto, los resultados fisicoquímicos, biológicas e inmunológicos de este estudio, confirman la purificación de cinco isoformas de la LH a partir del extracto glicoproteínico bovino, a través de un procedimiento de extracción y purificación sencillo, con adecuado rendimiento para cada isoforma, relativamente puras, que permitirán el desarrollo de su correspondiente sistema analítico.

REFERENCIAS

Alatorre FS. Programa Manual para Bioensayos. *Unidad de Investigaciones Biomédicas*, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social. México D.F. 1976 (Manual)

Baenzinger JU and Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-like oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988; 947:287-306.

Bates RW, Garrison MM, Cooper JA and Condliffe PG. Further studies on the purification of human thyrotropin. *Endocrinology* 1968; 83:721-730.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

Braselton Jr. WE and Mcshan WH. Purification and propiedties of follicle stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. *Arch Biochem Biophys* 1970; 139:45-58.
Burgon PG, Stanton PG and Robertson DM. *In vivo* bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 1996; 137:4827-4836.

Carranza SME, Amezcua MEV, Neri BR y Salas VA. Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Tec Pec Mex* 1994;32: 5-17.

Castro-Fernández C, Olivares A, Soderlung D, López-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A and Méndez JP. A Preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4603-4610.

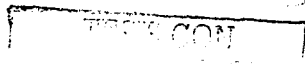
Chlenov MA, Kandyba EI, Nagornaya LV, Orlova IL and Volgin YV. High-performance liquid chromatography of human glycoprotein hormones. *J Chromatogr* 1993; 631:261-267.

Combarnous Y. Structure and Structure-Function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Dev* 1988; 28:211-228.

Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Ulloa-Aguirre A and Campo S. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001;174: 41-49.

Dias JA. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Hum Reprod* 2001; 16: 825-830.

Finney DJ. Statistical methods in biological assay. Edn London Griffin 1986.



Grotjan HE, Schanbacher BD, Keel BD. Ovine luteinizing hormone. V. Significance of flow-through peaks observed during chromatofocusing as revealed by various methods of sample preparation and application. *J Chromatogr* 1991; 549:141-152.

Hiyama J, Surus A and Renwick AGC. Purification of human pituitary LH and thyrotrophin by hydrophobic chromatography. *J Endocrinol* 1990; 125: 493-500.

Jack GW, Blazek R, James K, Boyd JE & Micklem LR. The automated production by immunoaffinity chromatography of the human pituitary glycoprotein hormones thyrotropin, follitropin and lutropin. *J Chem Technol Biotechnol* 1987; 39: 45-58.

Kojima FN, Cupp AS, Stumpf TT, Zalesky DD, Robertson MS, Werth LA. Effects of 17 β -estradiol on distribution of pituitary isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 1995; 52:297-304.

Laemmli LVK. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 224: 680-685.

Matteri RL, Papkoff DA, Swedlow JR and Chang Y-S. Isolation and characterization of three forms of luteinizing hormone from the pituitary gland of the horse. *Biol Reprod* 1986; 34: 571-578.

Muralidhar K, Rajendrakumar T and Sharma HP. Heterogeneity in buffalo lutropin. *Indian J Biochem Biophys* 1992; 29:168-172.

Nicoll SC and Linch P. Evolutionary biology of prolactin and somatotropin. II Electrophoretic comparison of tetrapod somatotropin. *Gen Comp Endocrinol* 1971; 17:490-507.

Padmanabhan V, Lee JS and Beitins IZ. Follicle-stimulating isohormones: regulation and biological significance. *J. Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 87-89.

Parlow AF. Bioassay of pituitary luteinizing hormone by depletion of ovarian ascorbic acid. In: *Human pituitary gonadotropins*. Edited by: Albert, M.A. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1961:300-312.

Perera MG, Ortiz RF, Gamboa VJJ, Reynoso MW, Falcón AA y Salas VA. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipófisis caprina (gLH). *Vet Mex* 1996; 27: 1-10.

Perera MG, Falcón AA, Salas VA. Estandarización de la técnicas de radiomarcaje con Iodo-Gen. Memorias del XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas; 1996 septiembre 24-26; Puebla (Puebla) México.

Pierce JG and Parson TF. Glycoprotein hormones: Structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:465-495.

Rose PM, Das Gaines RE and Balen HA. Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev* 2000;21:5-22.

Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW and Robertson DM. Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125:133-141.

Stockell Hartree A. Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. *J Biol Chem* 1966; 100:754-761.

Stockell-Hartree A and Renwick GC. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 1992; 287:665-679.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C and Méndez JP. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Hum Reprod* 2001;16: 599-604.

Ulloa-Aguirre A, Midgley R Jr., Beitins IZ, and Padmanabham V. Follicle-stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 1995; 16:765-787.

Ward, DN, Reichert Jr. JE, Fitak, BA, Nahm HS, Sweeney CM, and Neill JD. Isolation and properties of subunits of rat pituitary luteinizing hormone. *Biochemistry* 1971; 10:1796-180.

TESIS COM
FALLA DE G

Cuadro 8. Rendimiento de los productos obtenidos durante la extracción y purificación de las isoformas de LH. Los resultados son expresados por Kg de tejido.

Producto	Rendimiento (mg)	Proteína (µg/mg)	Proteína total (mg)	Recuperación (%)
EGP¹	660	93	61.4	100
CM-1ab²	99.5	28.5	2.9	4.6
CM-2ab²	33.7	258.7	8.7	14.2
CM-3ab²	138.6	200	27.2	45.2
CM-2ab²	29.2	258.7	7.6	100
LH-I³	7.2	170.3	1.2	16.1
FSH³	4.7	136.0	0.6	8.4
CM-3ab²	138.6	200	27.2	100
LH-II³	15.2	117.0	1.8	6.4
LH-III³	15.9	97.0	1.5	5.6
LH-IV³	15.0	80.0	1.2	4.3
LH-V³	40.7	172.0	7.0	25.3

¹Extracto glicoproteínico

²Productos obtenidos en la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa)

³Productos obtenidos en la cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel)



Cuadro 9. Actividad biológica e inmunológica y su relación B/I de las isoformas LH bovina.

Hormona	pH de elución	Actividad Biológica ¹ (U/mg)		Actividad inmunológica ² (U/mg)		Relación B/I	
		λ	g		Pendiente		
NIDDK-oLH-26	-----	2.3	-----	-----	1.0	- 2.04	2.3
USDA-bLH-5	-----	2.1	----	-----	2.3	- 1.89	0.91
LH-I	6.8	1.04	0.88	0.46	1.7	- 2.01	1.44
LH-II	9.5	5.93	0.53	0.71	3.3	- 1.97	1.78
LH-III	9.5	0.15	1.02	3.20	2.9	- 2.06	0.07
LH-IV	9.5	0.87	0.29	0.27	6.0	- 2.23	0.15
LH-V	6.8	1.40	0.61	0.23	2.3	- 2.12	0.61

¹ Bioensayo *in vivo* consistente en la depleción del ácido ascórbico en ratas prepúberes, pseudopreñadas (n=5), el estándar de referencia NIDDK-oLH-26, con una actividad biológica de 2.3 U/mg. El análisis estadístico de la actividad biológica, consistió de un análisis de varianza 2x2, con límites de confianza al 95% para el bioensayo.

² Radioinmunoensayo de LH ovina, el NIDDK-oLH-1-2 se marco con Na¹²⁵I con la técnica de IODO-GEN y el NIDDK-oLH-26 se utilizó como estándar. El cálculo de la actividad inmunológica se realizó basándose en la cantidad requerida de la hormona en el desplazamiento al 50% de la relación B/BO y la actividad inmunológica del estándar (NIDDK-oLH-26), correspondió a 1.0 U/mg. El paralelismo se determinó por medio de sus pendientes con una P>0.05.

TRISIA GONZ
FALLA DE CALIBRAN

Cuadro 10. Inmunoreactividad cruzada de las isoformas de LH purificadas, obtenida en el sistema de radioinmunoensayo para la FSH y la TSH.

RIA-TSH ¹			RIA-FSH ²		
Hormona	ED ₅₀ ³	Actividad (U/mg)	Hormona	ED ₅₀ ³	Actividad (U/mg)
USDA-bTSH-I-1	0.76	1.00	USDA-bFSH-I	1.95	1.00
USDA-bLH-5	62.0	0.012	USDA-bLH-5	N.D.	N.D.
LH-I	2.10	0.36	LH-I	52.8	0.04
LH-II	5.6	0.14	LH-II	N.D.	N.D.
LH-III	10.0	0.076	LH-III	N.D.	N.D.
LH-IV	3.3	0.23	LH-IV	N.D.	N.D.
LH-V	N.D.	N.D.	LH-V	N.D.	N.D.
NIDDK-oLH-26	N.D.	N.D.	NIDDK-oLH-26	N.D.	N.D.

¹ Radioinmunoensayo homologo bovino, en fase líquida, 20 horas de incubación a temperatura ambiente. Estándar USDA-bTSH-I-1 (0.1-12.8 ng/tubo), anti-bTSH, AFP-284246, dilución final de 1:500,000.

² Radioinmunoensayo homologo bovino, en fase líquida, 48 de incubación a temperatura ambiente. Estándar USDA-bFSH-I-2, AFP-5318C (0.2-12.8 ng/tubo), anti-bFSH-USDA, dilución final 1:40,000.

³ La potencia inmunológica se calculo en función de la dosis esperada del 50 % (ED₅₀) de la regresión lineal Logit-log de la curva dosis respuesta para cualquier hormona estudiada. N.D.= No detectables por el sistema.

TESIS
FALLA

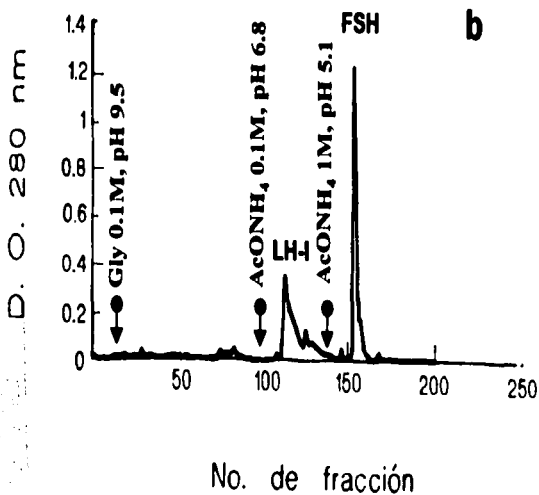
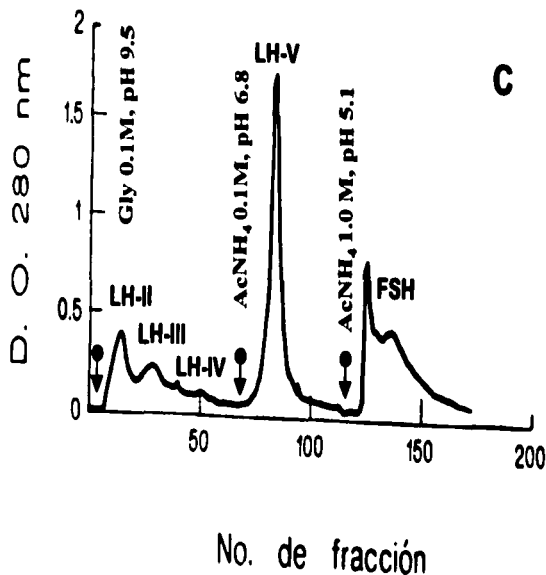
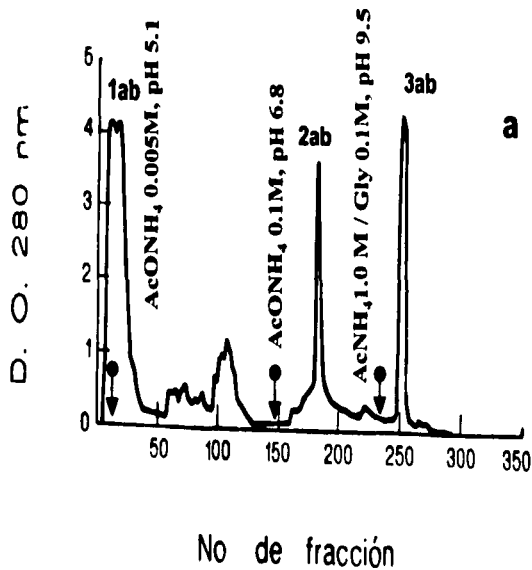


Figura 9. a) Cromatografía de intercambio catiónico (CM-sepharosa) de la fracción glicoproteínica (GLP: 61.86 mg de proteína). La columna (1.5x 27cm) se equilibró con acetato de amonio 0.005 M, pH 5.1, con un flujo de 23 ml/h, se colectaron fracciones de 3 ml. La fracción no retenida en la columna (CM-1ab) eluyó con este amortiguador, mientras que las fracciones CM-2ab y CM-3ab se obtuvieron con acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8 y acetato de amonio 1 M más glicina 0.1 M, pH 9.5 respectivamente. b) Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel) de la fracción CM-2ab (7.6 mg de proteína), la columna (1.5x 25 cm) se equilibró con glicina 0.1 M pH 9.5, con un flujo de 18 ml/h, y se colectaron fracciones de 3 ml. La fracción 2ab (LH-I) eluyó con acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8 y la 3ab, eluyó con acetato de amonio 1 M, pH 5.1. c) Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-sephacel) de la fracción CM-3ab (27.72 mg de proteína), la columna (1.5x 24.5 cm), se equilibró con glicina 0.1 M pH 9.5, con un flujo 22.9 ml/h y se colectaron fracciones de 3 ml. Las fracciones 1ab (LH-II), 1cd (LH-III) y 1ef (LH-IV) eluyeron con el mismo amortiguador, la fracción 2ab (LH-V) eluyó con acetato de amonio 0.1 M pH 6.8 y las fracciones 3ab y 3cd eluyeron con acetato de amonio 1 M, pH 5.1.



Figura 10. Electroforesis discontinua en geles de tubo de poliacrilamida al 7.0%, en condiciones nativas (TRIS-PAGE) pH 8.3. Se aplicaron de 100 μ g de proteina por gel, con un voltaje constante de 3mV. Fracciones colectadas durante la purificación del extracto glicoproteínico en la cromatografía de intercambió catiónico (CM-sepharosa). Extracto glicoproteínico o GLP; Fracción de proteínas colectadas a pH 5.1 (CM-1ab); segundo pico de proteínas eluidas a pH 6.8 (CM-2ab) y tercer pico de proteínas obtenidas a pH 9.5 (CM-3ab).

88-5
 TESTE
 PALLA
 1988

9-88

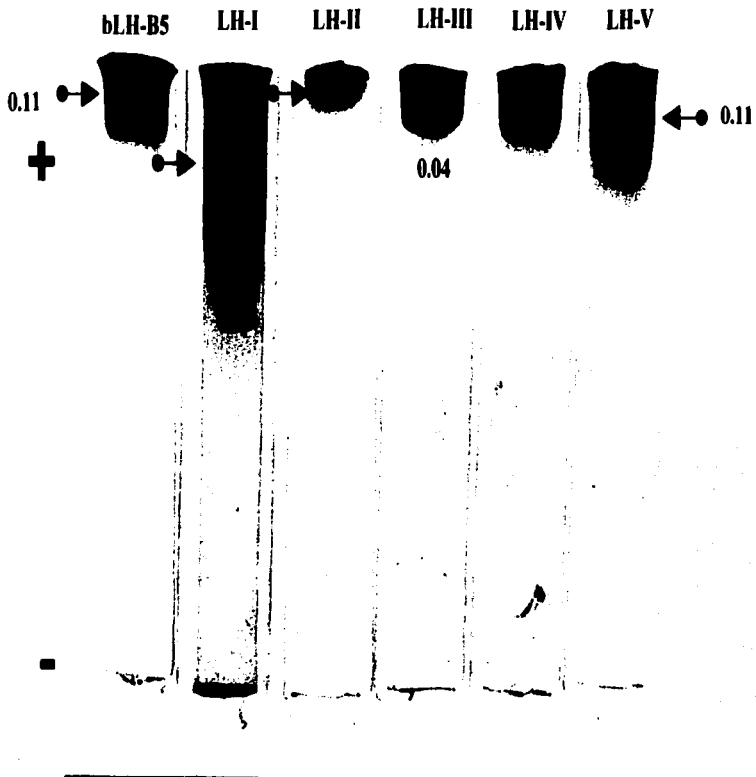


Figura 11. Electroforesis discontinua en geles de tubo de poliacrilamida al 7.0 %, en condiciones nativas (TRIS-PAGE), pH 8.3. Se aplicaron de 100 μ g de proteina por gel, con un voltaje constante de 3mV. USDA-bLH-b5 (Rf=0.11 cms); LH-I (Rf=0.16 cms); LH-II,III, IV (Rf=0.04) y LH-V (Rf=0.11).

10575

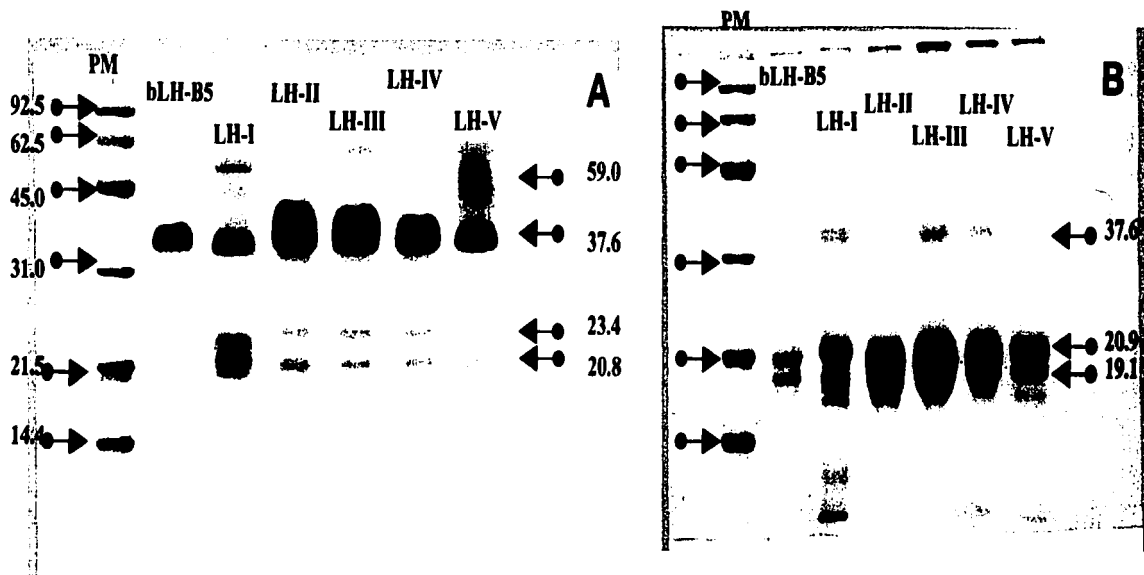


Figura 12. Electroforesis discontinua en condiciones desnaturizantes en SDS-PAGE, al 12.5%, pH 8.6. El panel "A" corresponde a las condiciones no reductoras (ausencia de β -mercaptoetanol) y el panel "B" corresponde a las condiciones reductoras (presencia de β -mercaptoetanol). marcadores de peso molecular; USDA-bLH-b5; LH-I; LH-II; LH-III; LH-IV y LH-V. La concentración de proteína en cada carril correspondió a 1 μ g. La tinción se realizó con nitrato de plata (BIO-Rad). Las flechas a la izquierda indican a los marcadores de peso molecular. Las flechas de la derecha señalan, agregados de la forma nativa (59.02kDa); la forma nativa de la LH(37.6kDa). 23.4 kDa y 20.8 kDa, corresponden a la subunidad alfa y beta respectivamente.

88-7

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
FALTA DE...

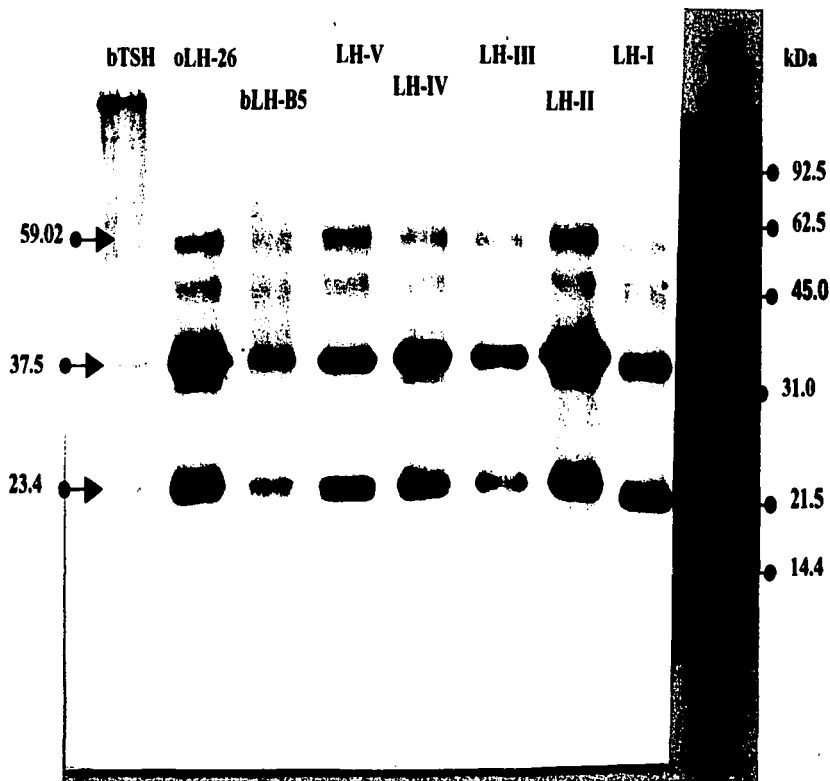
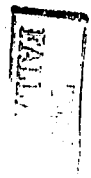


Figura 13. Inmunotransferencia de las diferentes isoformas de la LH purificadas en este estudio. El anticuerpo (anti-oLH-CSU-204) se utilizó a una dilución 1:500, con un periodo de incubación de 24 h. USDA-bTSH; NIDDK-oLH-26; USDA-bLH-b5; LH-V; LH-IV; LH-III; LH-II; LH-I. Marcadores de peso molecular (92.5; 62.5, 45.0, 31.0, 21.5 y 14.4 kDa). La banda de 37.5 kDa, corresponde a la forma nativa de la LH y la banda de 23.4 kDa, muestra la subunidad alfa.

8-88



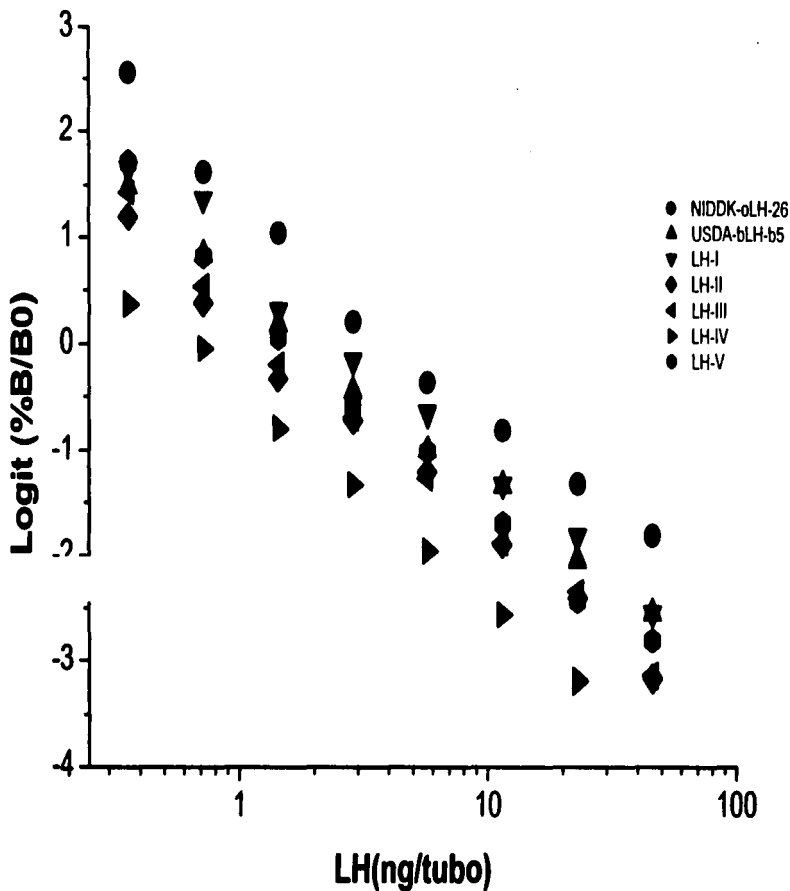


Figura 14. Curva dosis-respuesta de las diferentes isoformas de la LH en el sistema de radioinmunoensayo de la LH. El sistema se incubo por 20h durante 4C, el estándar de referencia correspondio al NIDDK-oLH-26 a las dosis de 0.3 a 45 ng/tubo. El primer anticuerpo se utilizó a una dilución final de 1:500,000 y el complejo antígeno-anticuerpo se precipitó con una solución de pansorbina. las curvas presentan el promedio+ la desviación estándar.

INSTITUTO VETERINARIO
 ZOOLOGICO
 PALMIRA

Capítulo 8

Discusión e implicaciones fisiológicas

Es conocido que las gonadotropinas, están consitiuidas por una familia de proteínas o isoformas, presentes en la hipófisis, suero y orina (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Ulloa-Aguirre et al., 2001; Zambrano et al., 1995; Ropelato et al., 1999; Castro-Fernández et al., 2000; Padmanabhan et al., 1999). Este polimorfismo que presentan las gonadotropinas, se debe en parte, a la variada estructura de los oligosacáridos que las conforman y cuyo proceso de glicosilación, está regulado por múltiples factores, entre los que destacan la GnRH, los péptidos y esteroides gonadales, en particular el estradiol (E_2); los que repercuten en sus propiedades fisicoquímicas (punto isoeléctrico, peso molecular) y biológicas *in vitro* e *in vivo* (afinidad por su receptor y la vida media en circulación [Ropelato et al., 1999; Creus et al., 2001]). Muchas de estas evidencias, se han obtenido a partir de muestras de origen humano y en roedores (ver revisiones de Ulloa-Aguirre et al., 1995, Padmanabhan et al., 1999); En contraste, la información para rumiantes es escasa, la cual se ha limitado a estudios de origen hipofisario (ver revisión de Cooke et al., 1996), y raramente se encontró información en circulación para la LH (Rojas et al., 2001), y FSH (Ward et al., 1996; Hassing et al., 1993; Padmanabhan et al., 1992).

Con base en estos antecedentes, los objetivos de este trabajo se enfocaron a: 1) Conocer la heterogeneidad de la LH sérica en diferentes condiciones fisiológicas, caracterizados principalmente por un patrón de secreción diferente de la LH, correspondientes al momento del pico preovulatorio (estro) y a la etapa de diestro; 2) Conocer e identificar el patrón de distribución de isoformas de la LH y FSH intrahipofisaria de la especie bovina en presencia de progesterona y 3) Obtención de isoformas de la LH bovina en cantidades suficientes para la realización de sistemas analíticos que nos permitirán conocer el patrón de secreción de cada isoforma en diferentes condiciones fisiológicas.

Para la realización de estos estudios, fue necesario el desarrollo de una serie de metodologías, por ejemplo, la electroforesis en condiciones nativas (TRIS-PAGE) necesaria para la determinación de la carga eléctrica de las proteínas; la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), para determinar el peso molecular relativo de cada isoforma; la inmunotransferencia (Westen-blot), que nos permitió corroborar la identificación de las isoformas obtenidas durante las diferentes corridas cromatográficas; el cromatoenfoque, como una herramienta para identificar el polimorfismo de las gonadotropinas presentes en el suero como en la hipófisis; finalmente se desarrollaron los sistemas de cuantificación inmunológica correspondientes al radioinmunoensayo (RIA) con un tiempo de incubación corto de 20 h, para el análisis de las muestras obtenidas a partir de extractos hipofisarios y un radioinmunoensayo largo, con un periodo de incubación de 120 h, para el análisis de muestras sanguíneas.

Los resultados del primer estudio, presentaron un patrón cuantitativo de isoformas de la LH en el suero, distinto al observado en extractos crudos y parcialmente purificados de adenohipófisis bovinas (Perera et al., 2001). En el estro, las isoformas de la LH de tipo ácido se incrementaron con relación a las observadas en la etapa de diestro, donde hubo mayor presencia de isoformas de tipo básico, lo que permite inferir que el ambiente endocrino, particularmente la relación progesterona/estradiol, modifica el patrón de distribución de isoformas de la LH presentes en la circulación, que regulan la actividad ovárica en bovinos; las isoformas básicas que predominan en la etapa de diestro, que son más rápidamente removidas de la circulación, participan básicamente en el mantenimiento de la función del cuerpo lúteo, en tanto que en el estro, las isoformas de tipo ácido, con depuración más lenta de la circulación, están involucradas en el complejo fenómeno de la ovulación. Aunque en este estudio no se analizaron las isoformas de la FSH, West et al. (2002), mostraron que las isoformas más ácidas de la FSH, son más eficaces para promover el desarrollo, maduración y función estrogénica del folículo preovulatorio. Luego entonces, podemos sugerir que el patrón diferencial de secreción de las isoformas de la LH en las diferentes etapas del ciclo estral, es acorde con el diferente papel que juega esta hormona para regular la función ovárica en esta especie en diferentes etapas del ciclo estral.

Finalmente la poca variabilidad entre individuos en la proporción de las isoformas de la LH, es indicativa de que la microheterogeneidad de la hormona en diferentes condiciones fisiológicas, es una característica genética relativamente fija, al menos en la raza Holstein.

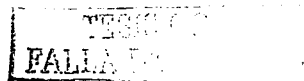
Se ha reportado que el porcentaje de isoformas ácidas ($\text{pH} \leq 6.5$) en extractos hipofisarios de rumiantes varía del 7.48 % al 16.85%, sin embargo en este estudio, se observó un incremento de este tipo de isoformas en el suero ($18.7 \pm 3.4\%$, diestro; 28.5 ± 2.8 , estro). Para corroborar que la LH obtenida en las escalas menores de pH del cromatoenfoco era realmente LH, y no se trataba de FSH, que generalmente eluye a esos valores de pH, se verificó la especificidad del sistema de cuantificación (RIA), con resultados que confirmaron que el sistema utilizado es altamente específico para la LH. Adicionalmente, se analizaron las isoformas eluidas a diferentes grados de acidez por inmunotransferencia (anti-oLH-26), observando en todos los casos una banda inmunoreactiva de peso molecular de 36.5 kDa, semejante al USDA-bLH-b5, en contraste, cuando las isoformas se incubaron con anti- β FSH, ninguna mostró unión específica positiva, ni en el sistema de radioinmunoensayo para FSH las identificó. Con base en estos resultados, podemos concluir que la presencia de isoformas de elución a pH ácido en el cromatoenfoco corresponde a proteínas ácidas de la LH.

Finalmente en este estudio, se observó un alto porcentaje de proteínas que eluyeron después de la aplicación de NaCl 1M, de manera semejante a lo informado en suero humano (Catro-Fernández et al., 2000), caprino (Rojas et al., 2000) y que mostraron la inmunoreactividad propia de las gonadotropinas en estudio. Los resultados aquí presentados demuestran que la presencia de proteínas aparentemente con inmunoreactividad de LH, obtenidas luego de la aplicación a la columna cromatográfica de la alta fuerza iónica, corresponden a una alteración en el comportamiento de la interacción antígeno-anticuerpo, artefacto de la técnica, y no se trata realmente de LH, por lo que en este estudio, las fracciones colectadas después de la elución debida al NaCl, no se tomaron en cuenta para el análisis de resultados.

El pleomorfismo de las gonadotropinas en la hipófisis, ha sido documentado en múltiples especies, cuya heterogeneidad es regulada por el medio ambiente endocrino. Sin embargo la identificación de la heterogeneidad de la LH y FSH intrahipofisarias en bovinos, se ha limitado únicamente al efecto de la GnRH y al estradiol, por lo que en la actualidad no se conoce la participación de la progesterona en este fenómeno, aunque existen evidencias que la progesterona juega un papel importante en la secreción de las gonadotropinas, en el ciclo reproductivos de las hembras, tanto a nivel de la hipófisis como en el hipotálamo (Goodman and Karsch, 1980 Fink, 1988). En este estudio, se identificó el patrón de distribución de las isoformas de la LH y FSH en la adenohipófisis de vaquillas, en presencia de progesterona. El patrón cualitativo y cuantitativo de distribución de las isoformas en ambos grupos fue similar y el análisis, no mostró diferencia significativa entre el grupo que recibió progesterona y el grupo control; sin embargo el porcentaje de isoformas que eluyeron después de la aplicación de la alta fuerza iónica, fue significativamente superior en el grupo control. Estas evidencias nos indican que a nivel hipofisario el patrón de las isoformas de la LH y FSH no son modificadas por la presencia de P_4 . Sin embargo es importante el análisis en cuanto dosis, tiempo de aplicación de la hormona, ya que hay evidencias que el tratamiento es un factor importante en la heterogeneidad de la hormona.

Finalmente, en el tercer estudio, se purificaron a partir del extracto glicoproteínico de adenohipófisis bovinas, cinco isoformas de la LH, con características fisicoquímicas, biológicas e inmunológicas, particulares para cada una de ellas, también se obtuvieron rendimientos adecuados para cada proteína, lo que permitirá el desarrollo de sistemas analíticos específicos y sensibles.

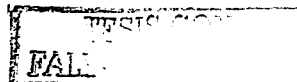
Aunque se han establecido una serie de metodologías (cromatoenfoco, el isoelectroenfoco y la electroforesis en suspensión de agarosa) para el aislamiento y purificación de la LH, a partir de extractos crudos o parcialmente purificados de adenohipófisis en múltiples especies, con las cuales han identificado un número mayor de isoformas de la LH a lo informado en este estudio, sin embargo, el rendimiento en estos



estudios son bajos, lo que no ha permitido el desarrollo de sistemas analíticos homólogos y específicos como el radioinmunoanálisis (RIA) o el inmunoanálisis (ELISA) para cada isoforma. Aunado a lo anterior, recientemente, Ulloa-Aguirre et al. (2001) enfatizan la necesidad del desarrollo de sistemas analíticos, precisos, específicos para cada isoforma, ya que muchas de las evidencias inmunológicas para cada isoforma, han presentado diferentes valores de esta actividad para una misma hormona, cuyos resultados dependen fundamentalmente del sistema de análisis, tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal), entonces este punto de vista, refuerza la importancia de la obtención de isoformas altamente puras, con suficiente cantidad, con el fin de desarrollar los diferentes sistemas de cuantificación analítica para cada isoformas y conocer el patrón de secreción de las isoformas de la LH en diferentes condiciones fisiológicas.

Con base en estos resultados, podemos concluir:

- 1) El patrón de isoformas de la LH presentes en la circulación es propiedad de la muestra analizada ya que presentó un patrón cuantitativo diferente al observado en extractos hipofisarios, en particular en el suero de animales en estro.
- 2) El análisis de suero nos permite identificar adecuadamente el cambio sutil que se presenta en el patrón de isoformas de la LH en relación a los extractos hipofisarios, a pesar de las bajas concentraciones presentes en el suero en las etapas analizadas.
- 3) Nuevamente se demuestra, que el análisis de la adenohipófisis, no es un tejido adecuado para conocer el posible cambio de isoformas en diferentes condiciones fisiológicas.
- 4) Se obtuvieron 5 isoformas de la LH de origen hipofisarios con suficiente rendimiento, lo que nos permitirá el desarrollo de diferentes sistemas analíticos específicos para cada isoforma.



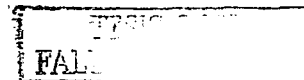
Aunque en este estudio se lograron cubrir todos los objetivos planteados en un inicio, es importante señalar la necesidad del desarrollo de una serie de metodologías, como los bioensayos *in vitro* que nos permitan conocer la actividad biológica de cada una de las isoformas identificadas en este estudio, para poder establecer la relación estructura-función de cada una de ellas en diferentes condiciones fisiológicas. Por otro lado, una de las limitantes de este estudio, se caracterizó por la falta de animales, para conocer la relación de isoformas de la LH presentes en la adenohipófisis y cotejar con las isoformas presentes en la circulación.

Además es necesario una mayor investigación en este campo, en particular con el patrón de distribución de isoformas de las gonadotropinas en diferentes razas de bovinos, en particular en aquellas en donde la selección genética no se ha llevado tan marcada como la raza Holstein, y conocer si esta es una característica de heredabilidad entre razas.

IMPRESO CON
MÁQUINA DE ORIGEN

REFERENCIAS

- Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, et al. Glycoforms composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:631-639.
- Baenzinger UC and Green DE. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988; 947:287-306
- Baenzinger UJ, Kumar S, Brodbeck RM, Smith PL and Beranek MC. Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:334-338
- Baird, DT. Luteotrophic control of the corpus luteum. *Anim Reprod Sci* 1992; 28:95-110.
- Banhart KM and Mellon PL. The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone α -subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol.* 1996; 8:878-885.
- Baratta M, Turzillo AM, Arreguin-Arevalo A, Clay CM, Nett TM. Regulation of genes encoding steroidogenic factor-1 (SF-1) and gonadotropin subunits in the ovine pituitary gland. *Domest Anim Endocrinol* 2003 (en prensa).
- Bates RW, Garrison MM, Cooper JA. & Condliffe PG. Further studies on the purification of human thyrotropin. *Endocrinology* 1968; 83:721-730.
- Bach IB, Rhodes SJ, Pearse H, Heinzl T, Gloss B, Scully KM, Sawchenko PE and Rosenfeld MG. P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergises with Pit-1. *Proc Nat Sci USA* 1995;92:2720-2724.
- Barrios-De-Tomasi J, Timosi C, Merchant H, Quintanar A, Avalos JM, Andersen CY, Ulloa-Aguirre A. Assessment of the *in vitro* and *in vivo* biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186:189-198.
- Bauer-Dantoin AC, Weiss J and Jameson L. Roles of estrogen, progesterone and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary gnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology* 1995;136:1014-1019.
- Beato M. Gene regulation by steroid hormone. *Cell* 1989; 56: 335-338



Begeot M, Hemming FJ, Dubois OM, Combarnous Y, Dubois MP and Aubert ML. Induction of pituitary lactotrope differentiation by luteinizing hormone α -subunit. *Science* 1984; 26: 566-568.

Blithe DL, Richards RG & Skarulis MC. Free alpha molecules from pregnancy stimulate secretion of prolactin from human decidual cells: a novel function for free alpha in pregnancy. *Endocrinology* 1991; 129: 2257-2259.

Blum WFP and Gupta D. Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: Studies on serum FSH, hormone released *in-vitro* and metabolic clearance rates of its various forms. *J Endocrinol* 1985; 105:29-37

Bousfield GR, Perry WM and Ward DN. Gonadotropins: Chemistry and biosynthesis. 1994. In *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J.D. Neill Eds), pp. 1749-1792. Raven Press, New York.

Bousfield GR. LH (Luteinizing Hormone). *Encyclopedia of Reproduction*. 1998 vol 2. 1034-1054.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 56:304-308.

Brown P and McNeilly AS. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. *Rev Reprod* 1999; 4:117-124.

Brown P, Cowen G, McNeilly JR, McNeilly AS. A possible role for Hesx1/RPX homeobox gene in regulating luteinising hormone β -subunit gene expression. 81st Annual Meeting American Endocrine Society. 1999. Abst 043389.

Brown P, McNeilly JR, Wallace RM, McNeilly AS and Clark AJ. Characterization of the ovine LH β -subunit gene: the promoter directs gonadotrope-specific expression in transgenic mice. *Mol Cell Endo* 1993;93:157-165.

Burgon PG, Stanton PG and Robertson DM. *In vivo* Bioactivities and Clearance Patterns of Highly Purified Human Luteinizing Hormone Isoforms. *Endocrinology* 1996;137:4827-4836.

Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Polosa P and D'Agata R. activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. *J Endocrinol* 1998;156:269-274.

Campbell BK, Scaramuzzi RJ and Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fert Suppl* 1995; 49:335-350.

FILES COPY
ALLA DE ORGEN

Caraty A, Fabre-Nys C, Delaleu B et al. Evidence that the medio-basal hypothalamus in the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 1998;139:1752-1760.

Caraty A, Skinner DC. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 1999;140: 165-170.

Carranza SME, Amezcua MEV, Neri BR y Salas VA. Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Tec Pec Mex* 1994; 32: 5-17.

Castro-Fernández C, Olivares A, Soderlung D, López-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A and Méndez JP. A Preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4603-4610

Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A, Bouchard P. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids* 2000 ;65 :613-620.

Chabot V, Magallon T, Taragnat C and Combarnous Y. Two free isoforms of ovine glycoprotein hormone α -subunit strongly differ in their ability to stimulate prolactin release from fetal pituitaries. *J Endocrinol* 2000; 164: 287-297

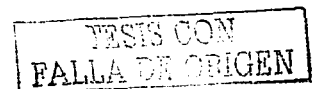
Chappel SC, Courtifaris C, Jacobs SJ. Studies on the microheterogeneity of follicle-stimulating hormone present whit the anterior pituitary gland of ovariectomized hamster. *Endocrinology* 1982; 110: 847-854

Chappel SC, Bethea CL and Spies HG. Existence of multiple forms of follicle stimulating hormone within the anterior pituitaries of cynomolgus monkeys. *Endocrinology* 1984; 115:452-461.

Chemineau P, Martin GB, Saumande J and Normant E. Seasonal and hormonal control of pulsatile LH secretion in the dairy goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fert* 1988; 83:91-98.

Childs GV, Ellison DG & Garner LL. An immunocytochemist's view of gonadotropin storage in the adult male rat: cytochemical and morphological heterogeneity in serially sectioned gonadotropes. *Am J Anatomy* 1980; 158:397-409.

Childs GV. Functional ultrastructure of gonadotropes. A review. *Curr Top Neuroendocrinol* 1986; 7:49-79



Childs GV, Unabia G, Tibolt R and Lloyd HM. Cytological factors that Support Nonparallel Secretion of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating hormone during the Estrous Cycle. *Endocrinology* 1987; 121:1801-1813

Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vitamins and Hormone* 1994; 50 215-286.

Childs GV. Gonadotropes. *Encyclopedia of Reproduction* 1998; Vol. 2: 498-506.

Childs GV, Unabia G, Miller BT and Collins TJ. Differential expression of gonadotropin and prolactin antigen by GnRH target cells from male and female rats. *J Endocrinol* 1999; 162:177-187.

Christianson SL, Zalesky DD, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone heterogeneity : Androgens increase the percentage of less basic isohormone. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15:87-92.

Clay CM, Keri RA, Finicle AB, Hechert LL, Hamernik DL, Marschke KM, Wilson EM, French FS and Nilson JH. Transcriptional repression of the glycoprotein hormone α -subunit gene by androgen may involved direct binding of androgen receptor to the proximal promoter. *J Biol Chem* 1993; 268:13556-13564.

Cole LA, Metsch LA, Grotjan HE Jr. Significant steroidogenic activity of luteinizing hormone is maintained after enzymatic removal of oligosaccharides. *Mol Endocrinol* 1987; 9:621-627

Combarnous Y. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Dev* 1988; 28:211-228.

Combarnous Y. Molecular Basis of the Specificity of Binding of Glycoprotein hormones to Their Receptors. *Endocr Rev* 1992; 13 (4): 670-691.

Combarnous Y. Gonadotropins: Structure Synthesis-Functions. In: *Reproduction in mamals and man*. 1993. Edited by Thibault, Ch., Levasseur, M.C. and Hunter, R.H.F. Ellipses. Paris France. 61-78.

Cooke DJ, Crowe MA, Roche JF and Headon DR. Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 1996; 41:77-99.

Couris R. Gonadotropin biosynthesis. *Encyclopedia of reproduction* 1998; Vol 2 507-520.

Crawford JL, Currie JW and McNeilly AS. Replenishment of LH stores of gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH after the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. *J Endocrinol* 2000; 167:453-463.

Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Ulloa-Aguirre A and Campo S. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of *in-vitro* bioactivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001;174: 41-49.

Cupp AS, Kojima MS, Roberson TT et al. Increasing concentration of 17 β -estradiol has differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and amounts of mRNA for gonadotropin subunits during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 1995; 52: 288-296

Dias JA. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Human Reprod* 2001; 16: 825-830

Dufau ML. The luteinizing hormone receptor. *Ann Rev Physiol* 1998; 60:461-496.

Drickamer K. Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* 1991; 67: 1029-1032.

Edmonson JA, Lean JJ, Weaver DL, Farver T and Webster GA. Body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 1989; 72:68-78.

Falset PC and Shupnik MA. Gonadal steroid feedback regulation of the rat luteinizing hormone β gene expression in transgenic mice. *Biol Reprod* 1994;50:149.

Fiddes JC and Goodman HM. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *Recent Prog Horm Res* 1981; 40:43-78.

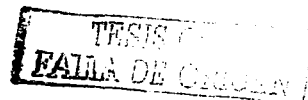
Fiete D, Srivatava V, Hindsgaul O and Baenzinger JU. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc β 1,4GlcNAc β 1,2Man α . That mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 1991; 67:1103-1110.

Finney DJ. *Statistical methods in biological assay*. 1986; Edn London Griffin.

Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994; 50:225-232.

Fowkes RC and Burrin JM. Steroidogenic factor -1: a key regulator of gonadotroph gene expression. *J endocrinol* 2003;177:345-350.

García-Crespo V and Boime I. Novel recombinant Gonadotropins. *Trend Endocrinol Metabol* 2000; 12:72-



Garnier J, Pernollet JC, Tertrin-Clary C, Salesse R, Casteing M, Barnavon M, De La Llosa P, Jutisz M. Conformational studies of ovine lutropin (luteinizing hormone) and its native and chemically modified subunits by circular dichroism and ultraviolet absorption spectroscopy. *Eur J Biochem* 1975 ; 53: 243-254.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA and Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrinol Rev* 1990; 11:177-199.

Gina BG and Nett T. Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropins-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod* 1995;53:166-172.

Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 1998;392:509-512.

Green ED, Van Halbeek H, Boime I, and Baenzinger JU. Structural elucidation of disulfated oligosaccharides from bovine lutropin. *J Biol Chem* 1985; 263:25-35.

Green ED, Boime I, and Baenzinger JU. Biosynthesis of sulphated asparagine-like oligosaccharides on bovine lutropin. *J Biol Chem* 1986; 261:16309-16316.

Gregg DW, Allen MC, Nett TM. Estradiol-induced increase in number of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured ovine pituitary cells. *Biol Reprod* 1990;43:1032-1036.

Halvorson LM y Chin WW. Hormonas gonadotróficas: Biosíntesis, secreción, receptores y acción. Capítulo 3. 86-117. 4ª Ed. 2001. Editorial Médica Panamericana. Editores: Yen SSC, Jaffe RB and Barbieri RL.

Halvorson LM, Ito M, Jameson JL, and Chin WW. Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate luteinizing hormone β -subunit gene expression. *J Biol Chem* 1998;273:14712-14720.

Hamernik DL. Molecular biology of gonadotropins. *J Reprod Fertil Suppl* 1995; 49:257-269.

Hassing JM, Kletter GB, I'anson H, Wood RI, Beitins IZ, Foster DL, and Padmanabhan V.. Pulsatile Administration of Gonadotropin-Stimulating Hormone (FSH) Isoform Distribution Pattern of Pituitary of Circulating FSH in Nutritionally Growth-Restricted Ovariectomized Lambs. *Endocrinology* 1993; 132:1527-1536.

Hillier SG. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endo* 2001;179:39-46.

Hirschberg CD, and Snider MD. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Annu Reprod Biochem* 1987; 56:63-87.

Hiyama J, Surus A and Renwick AGC. Purification of human pituitary LH and thyrotrophin by hydrophobic chromatography. *J Endocrinol* 1990; 125: 493-500.

Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endo Rev* 1998; 19:302-320.

Hermesz E, Mackem S and Mahon KA. Rpx: a novel anterior restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 1996;122:41-52.

Henricks DM. Biochemistry and physiology of the gonadal hormones. In *Reproduction in Domestic Animals*. 4th Ed. Ed. Cupps, P.T. Academic Press. San Diego California, USA:81-118. 1991

Hopko JL, Good TE, Knight PG and Ireland JJ. Alterations in amounts of different forms on inhibin during follicular atresia. *Biol Reprod* 1994;50:1265-1276.

Horn F, Windle JJ, Barnhart KM and Mello OL. Tissue-specific gene expression in the pituitary: the glycoprotein hormone α -subunit gene is regulated by gonadotrope specific protein. *Mol Cell Biol* 1992;12:2143-2153.

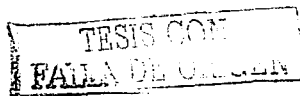
Jack GW, Blazek R, James K, Boyd JE & Micklem LR. The automated production by immunoaffinity chromatography of the human pituitary glycoprotein hormones thyrotropin, follitropin and lutropin. *J Chemical Tec Biotech* 1987; 39: 45-58.

Jackson SM, Gutierrez-Hatmann A and Hoeffler JP. Upstream stimulatory factor, a basic-Helix-loop-helix-zipper protein, regulates the activity of the α -glycoprotein hormone subunit gene in pituitary cells. *Mol Endo* 1995;9:278-291.

Jameson JL and Hollenberg AN. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endo Rev* 1993; 14:203-221.



- Ji I, Ji TH. Asp383 in the second transmembrane domain of the lutropin receptor is important for high affinity hormone binding and cAMP production. *J Biol Chem* 1991;266:14953-14957.
- Ji I, koo YB, Ji TH. Characterization of the rat LH/CG receptor gene: dominant suppressors, proximal regulators and transcription start sites. *Endocrinol J* 1994;2:279-87.
- Karla SP. Mandatory neurospptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endo Rev* 1993;14:507-537.
- Karsch FJ, Moenter SM and Caraty A. The neuroendocrine signal for ovulation. *Anim Reprod Sci* 1992; 28:329-341.
- Kay TWH, Jameson JJ. Identification of a gonadotropin-releasing hormone-reponsive region in the glycoprotein hormone α -subunit promoter. *Mol Endo* 1992;6:1767-1773.
- Keel BA, Schanbacher BD, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone. I Effects of castration and steroid administration on the charge heterogeneity of pituitary luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1987; 36:1102-1113.
- Keel BA and Schanbacher BD. Change heterogeneity of ovine follicle-stimulating hormone in rams and steroid-treated wethers. *Biol Reprod* 1987; 37: 786-796.
- Kennedy GC, Anderson B and Nilson JH. The human α subunit glycoprotein hormone gene utilizes a unique CCAAT binding factor. *J Biol Chem* 1990; 265:6279-6285.
- Keri RA, Wolfe MW, Kendal SK, Saunders TL, camper SA, Nett TM and Nilson JH. Gonadotrope-specific expression and hormonal regulation of the bovine LH β subunit gene promoter in transgenic mice. 76th Annual meeting of the Endocrine Society, Anaheim, CA, 1994:p503.
- Knight PG, Feist SA, Tannetta DS, Bleach ECL, Fowler PA, O'Brien M and Groome NP. Measurement of inhibin-A($\alpha\beta$ dimer) during the oestrous cycle, after manipulation of ovarian activity and during pregnancy in ewes. *J Reprod Fertil* 1998;113:159-166.
- Kojima FN, Stumpf TT, Cupp AS, Werth LA, Roberson MS, Wolfe MW, Kittok RJ, Kinder JE. Exogenous progestin as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17 β -estradiol in circulation of cows. *Biol Reprod* 1992; 47:1009-1017.



Kojima FN, Cupp AS, Stumpf TT, Zalesky DD, Robertson MS, Werth LA, Wolfe MW, Kiukok RJ, Grotjan HE and Kinder JE. Effect of 17β -estradiol on distribution of pituitary isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. Biol Reprod 1995; 52:297-304.

Kojima FN, Chenault JR, Wehrman ME, Bergfeld EG, Cupp AS, Werth LA, Mariscal V, Sánchez T, Kittok RJ and Kinder JE. Melengestrol acetate at greater doses than typically used for estrous synchrony in bovine females does not mimic endogenous progesterone regulation of secretion of luteinising hormone and 17β -estradiol. Biol Reprod 1995; 52:455-463.

Koligian KB, Stormshak F. Nuclear and cytoplasmic estrogen receptors in ovine endometrium during the estrous cycle. Endocrinology 1977;101: 524-533.

Kronman C, Chitlaru T, Elhanany E, Velan B and Shafferman A. Hierarchy of post-translational modifications involved in the circulatory longevity of glycoproteins. J Biol Chem 2000; 275 (38) 29488-29502.

Krishnan KA, Proudman JA, and Bahr JM. Purification and partial characterization of isoforms of luteinizing hormone from chicken pituitary gland. Comp Biochem Physiol Biochem Molec Biol 1994; 108:253-265.

Kumar RS, Trant JM. Piscine glycoprotein hormone (gonadotropin and thyrotropin) receptors: a review of recent developments. Com Biochim Physiol Part B 2001;129:347-355.

Laemmli LVK. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 1970;224: 680-685.

Liu TC, Jackson GL, Gorski J. Effects of synthetic gonadotropin-releasing hormone on incorporation of radioactive glucosamine and amino acids into luteinizing hormone and total protein by rat pituitaries *in vitro*. Endocrinology 1976;98: 151.

Mahesh VB, Brann DW. Regulation of the preovulatory gonadotropins surge by endogenous steroids. Steroid 1998, 63:616-629.

Mathews CK and van Holde KE. Bioquímica. 2ªEd, McGraw-Hill, Interamericana, 2000, parte IV, capitulo 23, 905-952.

Matteri RL, Papkoff DA, Swedlow JR and Chang Y-S. Isolation and characterization of three forms of luteinizing hormone from the pituitary gland of the horse. Biol Reprod 1986; 34: 571-578.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA

McNeilly AS. The generation of preovulatory LH surge. *Endocrine 2000 Abstracts* 3 S7.

Meunier H, Rivier C, Evans RM and Vale W. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta a and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Nat Acad Sci USA* 1988;85:247-251.

Mi Y, Shapiro SD and Baenzinger JU. Regulation of lutropin circulatory half-life by the mannose/N-acetylgalactosamine-4-SO₄ receptor is critical for implantation *in vivo*. *J Clin Invest* 2002; 109:269-267.

Moenter SM, Caraty A, Lacatelli A, Karsch FJ. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* 1991; 129:1175-1182.

Moore LG, Chie W Ng, Hudson NL and McNatty KP. Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive states. *J Endocrinol* 2000; 165:185-192.

Muralidhar K, Rajendrakumar T and Sharma HP. Heterogeneity in buffalo lutropin. *Indian J Biochem Biophys* 1992; 29:168-172.

Nett TM. Regulation of genes controlling gonadotropin secretion. *J Anim Sci* 1990; 68(suppl 2) 3-17.

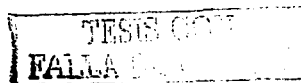
Nett TM, Turzillo AM, Baratta M and Rispoldi LA. Pituitary effects of steroid hormone on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domestic Anim Endo* 2002;23:33-42.

Nicoll SC, and Linch P. Evolutionary biology of prolactin and somatotropin. II Electrophoretic compararison of tetrapod somatotropin. *Gen Comp Endocrinol* 1971; 17:490-507.

Niswender GD, Jennifer LJ, Patrick JS, Keith R and Eric W Mc. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Phisiol Rev* 2000; 80: 1-29.

Nomura K, Ohmura K, Nakamura Y, Horiba N, Shirakura Y, Ujiharam, Ohki K and Shizume K. Porcine luteinizing hormone isoforms: Relationship between their molecular structures and renotropic versus gonadotropic activities. *Endocrinology* 1989;124:712-719.

Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP and Beitins IZ. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal disgenesis. *J Clin Endocr Metab* 1988; 67:465-473.



Padmanabhan V, Reno KM, Borondy M, Landefeld TD, Ebling JP, Foster DL, and Beitins IZ. Effect of Nutritional Repletion on Pituitary and Serum Follicle-Stimulating Hormone Isoform Distribution in Growth-Retarded Lambs. *Biol Reprod* 1992; 46: 964-971.

Padmanabhan V, Mieher CD, Borondy M, l'Anson H, Wood RI, Landerfeld TD, Foster DL and Beitins IZ. Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 1992; 131: 213-220

Padmanabhan V, Lee JS, Beitins IZ. Follicle-stimulating isohormones: Regulation and biological significance. In: Thacher WW, Inskeep EK, Niswender RD, Doborska C, eds. *Reproduction in domestic ruminants. J Repod Fertil* 1998;54(suppl):87-99.

Parlow AF (1961) Bioassay of pituitary luteinizing hormone by depletion of ovarian ascorbic acid. In: *Human pituitary gonadotropins*. Edited by: Albert, M.A., 300-312. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.

Perera MG, Murcia C, Rojas MS, Hernández CJ y González PE. Caracterización fisicoquímica e inmunológica de isoformas de la LH en hipófisis bovinas frescas y liofilizadas. XVII PANVET 2000; Res 198

Perera MG, Ortiz RF, Gamboa VJJ, Reynoso MW, Falcón AA y Salas VA. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipófisis caprina (gLH). *Vet Mex* 1996; 27: 1-10.

Perera MG, Falcón AA, Salas VA. Estandarización de la técnicas de radiomarcaje con Iodo-Gen. *Memorias del XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas* 1996. Puebla -México.

Pierce JG and Parsons TF. Glycoprotein hormones structure and function. *Ann Rev Biochem* 1981; 50:465-495.

Pittman RH, Clay CM, Farmerie TA, Nilson JH. Functional analysis of teh placenta-specific enhancer of the human glycoprotein hormone α subunit gene. *J Biol Chem* 1994;269:19360-19368.

Philips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K et al. Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J Clin Endocr Metab* 1997; 82:3103-3106.

Price CA, Salah N and Groome NP. Plasma concentration of dimeric inhibin and oestradiol in heifers undergoing superovulation with eCG or FSH. *J Reprod Fertil Suppl.* 1995;49:507-510.

Rao CV. Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility* 2001; 76(6):1097-1100.

Ramos ML, Murcia MC, Rojas MS, Salas VA y Perera MG. Determinación de la hormona luteinizante con radioinmunoanálisis (RIA) homólogo en cabras estimuladas con diferentes dosis de hormona liberadora de las gonadotropinas. *Vet Mex* 1995; 26:203-208.

Robertson DM, Foulds LM, Fry RC, Cummins JT and Clarke I. Circulating Half-Lives of follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Pituitary Extracts and Isoform Fractions of Ovariectomized and Intact Ewes. *Endocrinology* 1991; 129:1805-1813.

Roberson MS, Schoderbek WE, Tremml G and Maurer RA. Activation of the glycoprotein hormone α -subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol Cell Biol* 1994;14:2985-2993.

Rojas MS, Perera MG, Murcia MC, Hernández CJ, Zarco QL y González PE Formas moleculares de la hormona luteinizante (LH) en el pico preovulatorio de cabras ciclando o en el inducido con GnRH durante el anestro XXXVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 2001 Chiapas-México.

Ropelato MG, García-Rudaz MC, Castro Fernández C, Ulloa-Aguirre A, Escobar ME, Barontini M and Veldhuis JD. A Preponderance of basic luteinizing hormone (LH) Isoforms accompanies inappropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4629-4636.

Roux N, Milgrom E. Inherited disorders of GnRH and gonadotropins receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:83-87.

Sairam MR. Gonadotropins, Overview. *Enciclopedia of Reproduction* 1998 Vol. 2:562-565.

Schoderbeck WE, Kim KE, Ridgway EC, Mellon PL and Maurer RA. Analysis of DNA sequences required for pituitary-specific expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene. *Mol Endo* 1992;6:893-903.

Schoderbeck WE, Roberson MS and Maurer RA. Two different DNA elements mediate gonadotropin releasing hormone effects on expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene. *J Biol Chem* 1993;268:3903-3910.

Schwall RH. Inhibin. *Encyclopedia of Reprod* Vol 2 1999:832-839.

Smith MF, McIntush EV and Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994; 72:1857-1872.

Smith MJ, Jennes L and Wise PM. Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinology* 2000;141:4317-4320.

Smith MJ and Jennes L. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 2001;122:1-10

Shupnik WA, Weinmann CM, Notides AC, Chin WW. An upstream region of the rat luteinizing hormone β gene binds estrogen receptor and confers estrogen responsiveness. *J Biol Chem* 1989;264:80-86.

Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW and Robertson DM. Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125:133-141.

Stockell Hartree A. Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. *J Biochem* 1966; 100:754-761.

Stockell-Hartree and Renwick GC. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem. J* 1992; 287:665-679.

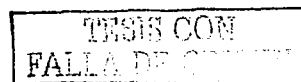
Stumpf TT, Roberson MS, Wolfe MW, Zalesky DD, Cupp AS, Werth LA, Kojima N, Hejl KL, Kittok RJ, Grotjan HE and Kinder JE. A similar distribution of gonadotropin isohormones is maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. *Biol Reprod* 1992; 46:442-450.

Steger DJ, Hecht JH and Mellon PL. GATA-binding proteins regulate the human gonadotrophin α -subunit gene in the placenta and the pituitary gland. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5592-5602.

Taragnat C, Bernier A and Fontaine J. Gonadotrophin storage patterns in the ewe during the oestrous cycle or after long-term treatment with a GnRH agonist. *J Endocrinol* 1998; 156:149-157.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.

Tremblay JJ, Lanctot and Drouin. The pan-pituitary activator of transcription, PTx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is upstream regulator of the LIM-homeodomain gene *lim3/lhx3*. *Mol Endocrinol* 1998;12:428-441.



Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Dufau ML. Intronic nature of the rat luteinizing hormone receptor gene defines a soluble receptor subspecies with hormone binding activity. *J Biol Chem* 1990;265:19385-19388.

Turzillo AM and Nett TM. Regulation of GnRH receptor gene expression in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 1999;54:75-86.

Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P et al. Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum Reprod* 1988; 3: 491-501

Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E, Damián-Matsumura P. Effects of gonadotrophin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cells in culture. *J Endocrinol* 1992; 134:97-106

Ulloa-Aguirre A, Midgley R Jr, Beitins IZ, and Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 1995; 16: 765-787.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumara P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999; 11:205-215.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C and Méndez JP. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Human Reprod* 2001; 16: 599-604.

Vogel DL, Magner JA, Sherins RJ, Weintraub BD. Biosynthesis, glycosylation and secretion of rat luteinizing hormone α and β -subunits: differential effects of orchietomy and gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1986;119:202.

Ward DN, Reichert Jr JE, Fitak BA, Nahm HS, Sweeney CM, and Neill JD. Isolation and properties of subunits of rat pituitary luteinizing hormone. *Biochemistry* 1971; 10:1796-1802.

Wide L. Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. II. Relationship to sex and age. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985;109:190-197.

Wide L, Albertsson-Wikland K. Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:271-276.

Wide L, Naessen T, Eriksson K, Rune C. Time-related effects of a progestogen on isoforms of serum gonadotrophins in 17 beta-oestradiol treated post-menopausal women. *Clinical Endocrinol* 1996; 44:651-658.

Williams GL, Gazal OS, Guzman Vega GA and Stanko RL. Mechanisms regulating suckling-mediated annovulation in the cow. *Anim Reprod Sci* 1996; 42:289-298.

Woodworth A and Baenzinger JU. The Man/GalNAc-4SO₄-receptor has multiple specificities and function. 2000. This paper is available on line at <http://www.jbc.org>.

Xie YB, Wang H, Segaloff DL. Extracellular domain of lutropin/choriogonadotropin receptor expressed in transfected cells binds choriogonadotropin with high affinity. *J Biol Chem* 1990;265:21411-21414.

Yiling Mi, Shapiro SD and Baenzinger JU. Regulation of lutropin circulatory half-life by the mannose/N-acetylgalactosamine-4SO₄ receptor is critical for implantation *in vivo*. *J Clin Invest* 2002;109:269-276.

Ying SY. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endo Rev* 1988;9:267-293.

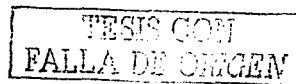
Zalesky DD and Grotjan HE. Comparison of Intracellular and Secreted Isoforms of Bovine and Ovine Luteinizing Hormone. *Biol Reprod* 1991; 44:1016-1024.

Zalesky DD, Nett TM and Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone: isoforms in the pituitary during the follicular and luteal phases of the estrous cycle and during anestrus. *J Anim Sci* 1992; 70:3851-3856.

Zalesky DD, Schanbacher BD and Grotjan HE. Effect of immunization against LHRH on isoforms of LH in the ovine pituitary. *J Reprod Fert* 1993;99:231-235.

Zambrano E, Olivares A, Mendez JP. et al. Dynamic of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1647-1656.

Zarco QL y Hernández CJ. Momento de ovulación y efecto del intervalo entre el inicio del estro y la inseminación artificial sobre el porcentaje de concepción de vaquillas Holstein. *Vet Mex* 1996; 27:279-284.



Apéndice I

Desarrollo del Radioinmunoensayo (RIA) para la cuantificación de la hormona luteinizante (LH) en extractos hipofisarios y glicoproteínicos bovinos.

Objetivo: Con el propósito de contar con un sistema analítico para cuantificar la concentración de la LH en extractos crudos y extractos glicoproteínicos de adenohipófisis bovinas, se desarrolló un sistema de radioinmunoensayo en fase líquida con tiempo de incubación de 20 horas a 4°C. Para ello se procedió al desarrollo de la siguiente metodología:

Marcaje de la Hormona

El marcaje de las hormonas NIDDK-oLH-I-2 y USDA-bLH-B6, se realizó a temperatura ambiente, utilizando Na[¹²⁵I] (Amersham, actividad específica de 15.7 mCi/μg de yodo al momento de su producción, con un grado de pureza del 99.2%) mediante la modificación del método de IODO-GEN (Perera et al., 1996). En breve: cinco μg de hormona grado yodación se disolvieron en 25 μl de amortiguador de fosfatos (PB) 0.05M, pH 7.4, este volumen se depositó en un vial que contenía 1.5 μg de agente oxidante (1,3,4,6-tetracloro-3α-6α-diphenilglucoril, IODO-GEN) y la reacción se inició cuando se añadieron cantidades conocidas de Na[¹²⁵I] que en el día del marcaje contuvieran una actividad cercana a 0.5 mCi. Una vez añadido el Na[¹²⁵I] se realizó una agitación suave durante 8 minutos y la reacción se detuvo con 200 μl de una solución de metabisulfito de sodio (30μg/ml) y 200 μl de una solución de yoduro de potasio (100 μg/ml) ambos disueltos en PB 0.05M, pH 7.4. La mezcla de reacción se separó en una columna (1 x 27 cm.) de filtración en gel (Sephadex G50-150) previamente equilibrada con PB 0.05M, pH 7.4 con un flujo de 30 ml/hora y saturada con 60 mg de albúmina sérica bovina. Se colectaron 30 fracciones de 1 ml en tubos a los que previamente se le colocó 1 ml de una solución de albúmina sérica bovina al 1%.



Con el fin de conocer el patrón de elución de la hormona marcada con ^{125}I , se tomaron 10 μl de cada fracción y se contaron durante 10 segundos en un espectrómetro de radiaciones gamma, para obtener el cromatograma.

Para validar la hormona se determinaron dos parámetros: a) Actividad específica y b) Porcentaje de isótopo radiactivo incorporado a la proteína.

La actividad específica, se definió como la radiactividad unida al ligando por unidad de masa, expresada en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de proteína, el cual se calculo a través de la siguiente ecuación:

$$(A)B=C$$

donde:

A= Suma del pico de hormona marcada
B= Tiempo de conteo por volumen colectado
C= radiactividad total incorporada a la hormona, expresada en cuentas por minuto (cpm).

$$CX100/D=E$$

donde

D= porcentaje de la eficiencia del contador
E= radiactividad total expresada en desintegraciones por minuto (dpm)

$$E/F=G$$

donde

F= radiactividad expresada en mCi
G= radiactividad total incorporada a la hormona, expresada en mCi

$$G/H=I$$

donde

H= masa de hormona expresada en μg
I= Actividad específica en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

La eficiencia de incorporación del isótopo (^{125}I) se realizó por medio de la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético al 30% (TCA). En breve, se tomaron 10 μl de cada fracción a las cuales se les añadió 500 μl de una solución de albúmina sérica bovina al 1%

en PB-0.05M y 500µl de TCA al 30%. La mezcla se agito vigorosamente y se centrifugó a 1500 x g a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se decanto y la radioactividad presente en el precipitado se contó en un espectrómetro de radiaciones gamma durante 10 segundos. La eficiencia de marcaje se analizó por medio de la siguiente ecuación:

$$\Sigma Na^{125}I-H / \Sigma Na^{125}I_t \times 100$$

donde:

$\Sigma Na^{125}I-H$, corresponde a la cantidad de yodo incorporado a la proteína.
 $\Sigma Na^{125}I_t$ = cantidad de yodo total utilizado

Titulación de primer antisuero

Una vez analizadas la actividad específica y eficiencia de incorporación de yodo en cada una de las hormonas marcadas, se procedió a conocer el título adecuado de antisuero para el desarrollo del sistema, para lo cual fue necesario determinar el porcentaje de unión (B0) entre el trazador y el anticuerpo. Para ello se utilizaron dos anticuerpos, el anti-USDA-bLH-B6 y anti-NIDDK-oLH-26, en diluciones seriadas, desde 1:3000, hasta 1:92000.

Los tubos de reacción se prepararon en un volumen final de 1 ml, de los cuales 25 µl correspondieron a la hormona marcada, 100µl de la dilución correspondiente de antisuero y 875µl de amortiguador del RIA (fosfato salino PBS, 0.05M, pH 7.4 en presencia de albúmina sérica bovina, BSA al 1%). La reacción se incubó durante 24 horas a 4°C, al terminó de este periodo se colocó 1 ml de una solución de pansorbina con una concentración de 1.5 µg/tubo (suspensión celular de *Staphylococcus aureus*, acoplada a la proteína A), con una incubación de 30 min a 4°C, la fracción unida de la fracción libre se separó por medio de una centrifugación a 1500 x g/4°C durante 30 minutos. La fracción unida se contó durante un minuto en un espectrómetro de radiaciones gamma. El cuadro I resume dicho procedimiento.

Desarrollo de la curva estándar

Una vez conocida la dilución de antisuero que correspondió a la unión del trazador y el anticuerpo cercano al 50%, se procedió al desarrollo de la curva estándar en un sistema homólogo como heterólogo.

Para el desarrollo de la curva estándar en cada sistema, se utilizó el estándar a las dosis de 0.1 hasta 32 ng/tubo. El sistema consistió en colocar en los tubos de reacción, un volumen final de 1 ml, distribuido en 100 μ l de la dosis correspondiente de estándar, 100 μ l de la dilución de primer anticuerpo, 25 μ l de hormona marcada o trazador y 775 μ l de amortiguador del RIA, la reacción se incubó durante 24 horas a 4° C. El cuadro II, resume en protocolo de desarrollo de la curva estándar. El análisis de las curvas correspondió al cálculo de la dosis esperada (ED) al 20, 50 y 80% de la regresión lineal logit-log de la curva dosis respuesta, para cualquier hormona en estudio y el paralelismo se determinó mediante la comparación de cada pendiente y su coeficiente de correlación de cada curva.

Especificidad

La especificidad del sistema se determinó utilizando hormonas que estructuralmente presentan una alta homología, como fue el caso de USDA-bFSH-I, USDA-bTSH-I y se comparó con la NIDDK-oPRL-I que no presenta ninguna relación estructural con la hormona luteinizante.

TESIS CON
BARRA DE ORIGEN

Cuadro I. Protocolo de titulación para el primer antisuero

Tubo núm.	Contenido	Amortiguador del RIA (μ l)	1er Ab ¹ (μ l)	¹²⁵ I-LH ² (μ l) incube 24 h	Pansorbina ³⁻⁴ (μ l) incube 30 min.
1-3	Total	----	----	25	----
4-6	UNE Dilución de Ab	975	----	25	1000
7-9	1:3000	875	100	25	1000
10-12	1:6000	875	100	25	1000
13-15	1:12000	875	100	25	1000
16-18	1:24000	875	100	25	1000
19-21	1:48000	875	100	25	1000
22-25	1:96000	875	100	25	1000

¹ Primer anticuerpo diluido en PBS (0.05M)-EDTA (0.02M), pH 7.2, en presencia de su correspondiente dilución de suero normal de conejo

² Aproximadamente 27000 cpm

³ Pansorbina 1.5 μ g/tubo

⁴ Centrifugación a 1500xg/30 min. a 4°C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro II. Protocolo de trabajo para el radioinmunoanálisis de la LH

Tubo número	Contenido	Amortiguador (μ l)	Patrón ó muestra (μ l)	1er Ab ¹ (μ l)	¹²⁵ LH ² (μ l) incube 24h	PBS-Pansorbina ³⁻⁴ (μ l) Incube 30 min.
1-3	Total	----	----	----	25	----
4-6	UNE	975	----	----	25	1000
7-9	Cero	875	----	100	25	1000
	Patrón (ng/tubo)					
10-12	1	775	100	100	25	1000
13-15	2	775	100	100	25	1000
16-18	4	775	100	100	25	1000
19-21	8	775	100	100	25	1000
22-24	16	775	100	100	25	1000
25-27	32	775	100	100	25	1000
28-30	64	775	100	100	25	1000
31-33	128	775	100	100	25	1000
34-36	320	775	100	100	25	1000

¹ diluido 1:20,000, en presencia de suero normal de conejo 1:1600

² aproximadamente 20,000 cpm

³ sistema de separación 1.5 μ g/tubo

⁴ centrifugación a 1500 x g/ 30 min. a 4°C

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

Apéndice II

Desarrollo del cromatoenfoque como un sistema de identificación de las isoformas intrahipofisarias y circulantes en la especie bovina.

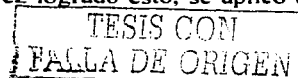
Objetivo: Con el propósito de identificar la heterogeneidad de las gonadotropinas presentes en el suero y en extractos glicoproteínicos, se desarrollo una metodología sencilla, con alta resolución, reproducibilidad y capacidad de recuperación de la muestra analizada. Para ello se desarrollo el cromatoenfoque, herramienta analítica que cumple con estos criterios. Para ello se analizaron tanto extractos crudos, como parcialmente purificado de adenohipófisis bovinas, así como el suero de la especie bovina.

Material y Métodos

a) Obtención del extracto crudo y extracto glicoproteínico de adenohipófisis bovina. Se homogeneizaron 10 glándulas hipofisarias bovinas frescas en amortiguador TRIS (50 mM), NaCl (150 mM), pH 7.4, que contenía fenilsulfonilmetilfluoruro (PMSF) 1mM y EDTA 5mM. El homogeneizado se realizó en una proporción de 1 ml de amortiguador por cada 100 mg de tejido fresco. Una vez homogeneizadas las glándulas se centrifugaron a 18000 x g durante 90 minutos a 4°C y el sobrenadante, se fracciono en dos partes. La primera se conservó en fracciones de 500 µl y se le denominó extracto crudo y la segunda parte se procedió a obtener el extracto glicoproteínico (extracto parcialmente purificado) por medio de precipitaciones etanólicas.

b) Cromatoenfoque.

Gradiente de pH a diferentes temperaturas: Para el desarrollo del sistema de cromatoenfoque, inicialmente identificamos el patrón de elución del gradiente de pH a temperatura ambiente como a 4°C. Para ello, se colocaron en dos columnas con un diámetro interno de 0.7cm y de 26 cm. de longitud, el intercambiador PBE-118, el cual una vez empacado, fue equilibrado con trietilamina 0.025M, pH 11.0 durante 72h, con un flujo de 5 ml/h, tanto a temperatura ambiente como a 4°C. Una vez logrado esto, se aplicó el



amortiguador Pharmalyte 8-10.5 HCl, 1:45, pH 7.0 (Pharmacia) y se colectaron 70 fracciones de 2 ml c/u, hasta obtener el pH 7.0, posteriormente se aplicó el amortiguador polybuffer 74 (1:8) de Pharmacia, pH 3.5 y se continuó la corrida (70 fracciones, 2 ml c/u) hasta que presentaron un pH de 3.5 o menor, finalmente se aplicó una solución de cloruro de sodio 1M y se colectaron 20 fracciones, hasta observar el incremento gradual de pH.

Cromatoenfoque del extracto crudo y extracto glicoproteínico de adenohipófisis bovino:

Una vez conocido el gradiente de pH de cada columna, como la temperatura adecuada de corrida, se aplicaron 10 mg de extracto crudo, como de extracto parcialmente purificado (EGP) de adenohipófisis bovina, para ello, los extractos se resuspendieron en 3ml de amortiguador de corrida (Pharmalyte 8-10.5 HCl, 1:45, pH 7.0) y se agitaron por 2h a 4°C, al término se centrifugaron a 15000 x g /30 min. y los sobrenadantes, se aplicaron a cada columna. Las columnas en las condiciones previamente descritas, se eluyeron con los amortiguadores Pharmalyte 8-10.5 HCl, 1:45, pH 7.0 (80 fracciones de 2ml c/u) y polybuffer 74 (1:8), pH 3.5 (80 fracciones c/u), finalmente se aplicó la solución de cloruro de sodio (1M) y se colectaron 20 fracciones de 2 ml c/u, con el propósito de observar todas aquellas proteínas que no fueron eluidas con ningún gradiente de pH. Durante el transcurso de cada corrida cromatográfica se determinó el pH a cada fracción así como su densidad óptica a 280 nm. Las fracciones que eluyeron entre el rango de pH 10.6-7.0 se neutralizaron con 200 µl de TRIS-HCL 1.1M y las fracciones obtenidas entre el rango de pH 6.9-3.5 y las obtenidas con cloruro de sodio se neutralizaron con imidazol 1.1M.

Suero bovino: Para conocer el patrón de elución de las isoformas de LH presentes en la circulación, se analizaron muestras de suero bovino de 3 animales en etapa de estro (50ml); Cada muestra, fue sometida a una diálisis (4-Spectra/Por, membrana MWCO: 12-14000) durante 24h, con tres cambios de agua desionizada cada 8h y posteriormente se liofilizaron. De cada uno de los sueros dializados y liofilizados, se pesaron 100 mg y se resuspendieron en 3 ml de amortiguador de corrida durante 24h a 4°C con agitación constante. Posteriormente se centrifugaron a 15000 xg durante 30 min a la misma temperatura con el propósito de clarificar los productos y los sobrenadantes (2.5 ml) se aplicaron a cada

columna de PBE-118 previamente equilibradas con trietilamina 0.025M pH 11.0, la determinación de pH, así como de su densidad óptica a 280 nm de cada fracción se realizó como se señaló anteriormente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN