

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE
LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACION DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESION
DE P450AROMATASA Y RECEPTOR PARA HORMONA
LUTEINIZANTE EN FOLICULOS DE BOVINO CICLANDO O
EN ANESTRO NUTRICIONAL.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIECIAS

PRESENTA

LUZ MARIA GRANADOS VILLARREAL

TUTOR:

DR. CARLOS G. GUTIERREZ

COMITE TUTORAL:

DR. ROGELIO ALONSO

DRA. MARTA ROMANO

MEXICO D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DECLARACION

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis este disponible para cualquier tipo de intercambio bibliotecario.

MVZ Luz Maria Granados Villarreal

Autorizo a la Direccion General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Luz Ma Granados
Villarreal

FECHA: 21 Junio 2004

FIRMA: 

DEDICATORIAS

A mi familia por su confianza y amor hacia mí.

A Ramiro Díaz

A Rosalía Díaz, Ana Arredondo, Beatriz Pozos, Daniela Arias, Ángel Nava, Silvia Reyes,
Refugio Cortez, Felicitas Vázquez, Carmen Camacho, Nuria Isabel y Laura Martínez por su
cariño hacia mí.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca-crédito fundamental para continuar mis estudios.

Cordialmente al Dr. Carlos Gutiérrez.

Al Dr. Rogelio Alonso por su paciencia y apoyo en la realización de esta investigación.

Al H. Jurado: Dra. María Teresa Sánchez-Torres, Dr Carlos Gutiérrez, Dr. Rogelio Aonso; Dr. Joel Hernández y Dr Nazario Pescador por sus acertados comentarios hacia este trabajo.

Al Dr. Mario Pérez del Depto de Histología por su apoyo en esta investigación.

A la Biol. Amanda Gayoso por su apoyo técnico.

A mis padres por nunca perder la fe en mí.

A Ramiro, por su gran cariño, apoyo, confianza y fe en mí.

Mi gratitud a Silvia Reyes por su gran apoyo durante la realización de este trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular, en especial a Refugio Cortés, Felicitas Vázquez y Carmen Camacho por su confianza en mi y su colaboración en esta investigación. A Mario, Addi , Dalila, Alejandro y Noé.

A los integrantes del Depto de Reproducción, en especial a Aranzazu Lassala, Ana Delia Rodríguez, Clara Murcia, Esperanza Ballesteros, Laura Edith Martínez, Lucía Rangel, Susana Rojas, Verónica Garza, Javier Hernández.

A Silvia Martínez, Xochitl Vega y a todos los que conforman el Laboratorio de Tuberculosis dirigido por el Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello.

RESUMEN

La reproducción en ganado vacuno es afectada primariamente por la calidad y disponibilidad del alimento. Durante los períodos de desnutrición se presenta una disminución de la función reproductiva reflejado en menor desarrollo folicular hasta el punto en que la ovulación cesa (anestro). El objetivo de este estudio es caracterizar la expresión de P450 aromatasa (P450arom) y receptor para LH (LHR) en folículos de bovino con condición corporal regular y ciclando o en condición corporal baja y anestro. Los ovarios de los bovinos fueron colectados y procesados para estudio histológico *in situ*, utilizando sondas de ARN. No se obtuvo hibridización probablemente debido a la degradación de ácidos nucleicos de la muestra sufrida durante el almacenamiento. Luego entonces, se optó por utilizar ovarios recolectados y trabajar con northern blot. La calidad del ARN obtenido fue buena y no había signos de degradación. Sin embargo no hubo hibridización. Utilizando Dot Blot se evita la transferencia de ARN y la posible pérdida de éste durante este paso. Con ésta técnica tampoco se logró la detección de ARN específico. Finalmente se sospechó que la falta de hibridización podía ser debida a la secuencia de la sonda utilizada. La secuenciación de las sondas para P450arom y LHR demostró baja similitud (9% y 14%) entre la secuencia reportada para ARNm y la sonda utilizada; lo que explica la falla en la hibridización en este trabajo. Se sugiere la utilización de RT-PCR cuantitativo para la detección y cuantificación de la expresión de los genes de P450arom y LHR.

Palabras clave: Bovino, anestro nutricional, P450 aromatasa, receptor para LH, hibridización *in situ*, northern blot, dot blot.

ABSTRACT

Bovine reproduction is affected primarily by the quality and availability of food. During periods of undernutrition, follicular growth rate decreases until ovulation ceases and the animal becomes anoestrous. The objective of the present study was to characterize messenger RNA (RNAm) expression for P450 aromatase (P450arom) and LH receptor (LHr) in ovarian follicles from cattle with either moderate body condition score and cycling or with low body condition score and in anoestrous. Cattle ovaries were surgically removed and subsequently processed for histological examination by *in situ* hybridization using riboprobes. No hybridization was obtained, perhaps due to the degradation of RNA during storage of the samples. Hence, to avoid RNA degradation, ovaries collected at the slaughter house were examined by northern blot. Quality of extracted RNA was good with no signs of degradation. Nonetheless, hybridization was not obtained. Consequently, dot blot analysis was used to overcome the need for RNA transfer and the risk of its loss whilst transfer. However, hybridization was not achieved. It was then thought that the failure to obtain hybridization was due to lack of correspondence between the riboprobes and the RNAm. The riboprobes were sequenced, and a very low correspondence was found between them and the sequence for mature RNAm for p450arom (9%) and LHr (14%), thus explaining the failure to obtain a positive hybridization. The use of quantitative RT-PCR for the detection and quantification of RNAm expression for RNAm for p450arom and LHr is suggested.

Key words: Bovine, nutritional anoestrous, P450aromatase, receptor for LH, *in situ* hibridization, northern blot, dot blot.

CONTENIDO

RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
INDICE DE CUADROS.....	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
1.1 SISTEMAS ESTEROIDOGÉNICOS P450 EN LA REPRODUCCIÓN DEL BOVINO CICLANDO.....	6
1.2 Transporte de colesterol hacia la mitocondria.....	7
1.3 Papel de la proteína reguladora esteroideogénica aguda (StAR).	9
1.4 P450 que corta la cadena lateral (P450scc).....	11
1.5 Vía $\Delta 4$ y $\Delta 5$ de esteroideogénesis.....	12
1.5.1 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y complejo P450C17.....	13
1.5.2 Complejo P450 aromatasa.....	16
1.6 Regulación genética de los citocromos P450.....	18
1.6.1 Gen CYP19.....	19
1.5.2 Expresión de aromatasa.....	20
1.2. REGULACIÓN ENDOCRINA DE FOLICULOGÉNESIS.....	22
1.2.1 Gonadotropinas.....	23

1.2.2 Receptor para Hormona Luteinizante.....	26
1.2.3 Papel del receptor para LH en la foliculogénesis.....	27
1.3. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA REPRODUCCIÓN EN GANADO BOVINO.....	30
1.3.1 ¿Cómo es que la reproducción puede modularse por el balance energético?..	31
1.3.2 Efecto de la desnutrición en folículos de bovino.....	38
CAPITULO II. OBJETIVO E HIPÓTESIS.....	41
CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS.....	42
3.1. EXPRESIÓN DE P450AROMATASA Y LHR EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE BOVINO POR HIBRIDACIÓN IN SITU.....	43
3.1.2 Animales y tratamientos.....	43
3.3. Templado.....	44
3.4 Transformación del plásmido.....	45
3.5 Extracción de ADN de plásmido (Minipreparaciones).....	45
3.6 Restricción del ADNc.....	46
3.7 Transcripción <i>in vitro</i>	47
3.8 Hibridación	48
3.2. EXPRESIÓN DE P450AROMATASA Y LHR EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE BOVINO POR NORTHERN BLOT.....	50
3.2.1 Animales.....	50

3.2.1. Aislamiento de ARN.....	50
3.2.3 Electroforesis con gel desnaturalizante.....	51
3.2.4 Transferencia de ARN en Northern Blot.....	51
3.2.3 Marcaje de ADNc con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimersasa PCR.....	51
3.2.4 Pre- hibridización e Hibridización.	52
3.3. EXPRESIÓN DE P450AROMATASA Y LHR EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE BOVINO POR DOT BLOT.....	53
3.3.1 Aislamiento de ARN.....	53
3.3.2 Preparación de las muestras de ARN.....	53
3.3.3 Dot Blot.....	53
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	55
4.1 HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	56
4.1.1 Dinámica folicular.....	56
4.1.2 Restricción de ADNc de P450aromatasa y LHR en pBlueScript con Eco RV en orientación antisentido y XBA1 en orientación en sentido.....	56
4.2 NORTHERN BLOT.....	61
4.2.1 Extracción de ARN a partir de muestras de ovario de vacas ciclando o en anestro nutricional.	61
4.2.2. Amplificación de ADNc producto de la alineación por PCR.....	63

4.3. SECUENCIACIÓN DE ADN DE P450AROMATASA Y LHR.....	64
4.3.1 P450aromatasa.....	65
4.3.2 Receptor para LH.....	65
CAPITULO V. DISCUSIÓN.....	67
CAPITULO VI. CONCLUSION.....	73
CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS.....	97
ANEXO I. ARN.....	98
1.1 Cuantificación espectrofotométrica de ARN total.....	98
ANEXO II. MARCAJE DE ADNc CON PCR.....	99
3.1 Marcaje de ADNc con PCR.....	99
ANEXO III.	
3.1 Secuencia de pares de bases del ADNc de P450aromatasa comparadas con la secuencia reportada por Vanselow y Furbass (1995).....	100
3.2 Secuencia de pares de bases de receptor para LH comparada con la secuencia reportada por Lussier et al., (1995).....	101
ANEXO IV. ABREVIATURAS.....	102

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuantificación de ARN extraído de folículos de ovario de vacas sin ciclar (grupo 1) y de vacas ciclando (Grupo 2).....	60
Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores diseñados para la detección de P450aromatasa y LHR en folículos de ovario de vacas sin ciclar y vacas ciclando.....	65
Cuadro 3. Condiciones para marcar ADNc por PCR.....	94

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles sitios de acción de leptina en el sistema reproductivo neuroendócrino.....	i
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) del producto de digestión de P450 aromatasa con Eco RV en el primer carril en orientación antisentido y en el segundo carril P450aromatasa intacto. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular λ DNA-BstEIIDigest.	56
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) de productos de digestión de receptor para LH con Eco RV en orientación antisentido, el cual se muestra en el tercer carril, en el segundo carril LHR intacto y en el primer carril λ DNA-BstEIIDigest.....	57
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) de productos de digestión de P450 aromatasa con Xba I en orientación en sentido, el cual se observa en el tercer carril, en el segundo carril P450aromatasa intacto y en el primer carril λ DNABstEIIDigest.....	58
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) de productos de digestión de receptor para LH con <i>Xba 1</i> en orientación en sentido.....	59
Figura 6. Electroforesis de ARN extraído de ovarios de vacas sin ciclar (grupo 1) y animales ciclando (Grupo 2).....	61
Figura 7. Electroforesis de los productos de la amplificación por PCR de ADNc para P450aromatasa y LHR en pBlueScript.....	62

INTRODUCCION

Me enseñaron que la manera del progreso es ni rápida ni fácil
Marie Curie

Las décadas anteriores se han marcado por extraordinarios avances en el entendimiento de la biología reproductiva en animales de producción. El progreso en ésta área ha estado motivado por el deseo de resolver los grandes misterios que restringen el éxito en la aplicación de nuevas tecnologías empleadas para mejorar las características de producción.

Sin embargo, a pesar del rápido progreso en el ámbito comercial la aplicación de estas técnicas permanece limitada. En México, la reproducción en ganado vacuno es afectada principalmente por la baja calidad y poca disponibilidad del alimento (García, 1996; González, 1996; Mendoza y Ricalde, 1996). Numerosos estudios han mostrado la influencia de la dieta sobre la función ovárica. En ganado de carne existe una relación negativa entre la pérdida de peso y el diámetro de los folículos preovulatorios (Rhodes *et al*, 1995a; Mackey *et al*, 1999; Bergfeld *et al*, 1994; Bossis *et al*, 1999) así como en el número de folículos (Rhind y Schanbacher, 1991, Gutiérrez *et al*, 1997) y en el potencial esteroideogénico de las células de granulosa en folículos pequeños (Armstrong *et al*, 2002).

En una vaca ciclando, la adquisición de la capacidad de producir estrógenos por los folículos en estados preantrales se da cuando poseen todos los componentes del modelo "dos células, dos gonadotropinas" (Drummond y Findlay, 1999). Las células de granulosa (CG) contienen receptores para Hormona Folículo Estimulante (Follicle Stimulant Hormone: FSH), y las células de la teca (CT) contienen receptores para Hormona Leutinizante (Leutinizing Hormone: LH); y están influenciados por la producción de estradiol-17 β (Fortune y Quirk, 1988) en sinergia con FSH. Al tiempo esperado de la desviación folicular, el número de receptores de FSH en CG se mantiene en niveles basales

en el folículo dominante (FD) mientras el número de receptores para LH se incrementa (Ginther *et al.* 1996). Este fenómeno es crucial para que este folículo adquiera el potencial de ser dominante (Xu *et al.* 1995a). Entre el surgimiento de gonadotropinas y la ovulación, se da un incremento en la capacidad esteroidogénica de las CT y CG.

En el bovino, existe una relación muy estrecha entre el eje reproductivo y la ingestión de nutrientes. Diversos factores contribuyen a que la actividad del pulso generador de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (gonadotropin-releasing hormone: GnRH) sea modulada por el balance energético. Se ha establecido que la función ovárica en vacas depende de dieta y balance energético (Lucy *et al.* 1991, Bossis *et al.* 1999).

En respuesta al balance energético negativo, hormonas como Hormona de crecimiento (Growth hormone, GH) y factores de crecimiento semejantes a la insulina (insuline like growth factor, IGF}, insulina (Adams *et al.* 1996; McGuire *et al.* 1992) y leptina (Smith *et al.* 2002) responden a la disminución de nutrientes en la dieta. En esta condición, las concentraciones de GH y ácidos grasos no esterificados (non-esterified fatty acids: NEFA) incrementan, mientras que glucosa, IGF's, insulina y leptina disminuyen. Se piensa que la leptina es una señal metabólica para el sistema reproductivo neuroendocrino y en condiciones de reservas energéticas mínimas, los bajos niveles de leptina actúan como una barrera metabólica que puede inhibir la actividad del eje reproductivo neuroendocrino (Cunningham *et al.* 1999).

El efecto de grandes períodos de desnutrición se observa en la disminución de la liberación de la GnRH desde el hipotálamo (Richards *et al.* 1989; Imakawa *et al.* 1987). Como la secreción de LH y FSH es regulada diferencialmente por la frecuencia de GnRH (Vizcarra *et al.* 1999), una disminución de GnRH resulta en la supresión de la secreción

pulsátil de LH (Rhodes *et al.* 1995a y b; Rhodes *et al.* 1996) y consecuentemente, en la baja producción de andrógenos (A4) en las CT.

Lo anterior conlleva a una disminución en el sustrato para la enzima P450 aromatasa; responsable de la conversión de A4 a E2. Con la baja acción de esta enzima, se provoca una disminución en la síntesis de estradiol -17 β , falla de la inducción de receptores de receptores para LH (Luteinizing Hormone receptor, LHR) en CG y ausencia de la ovulación. Estos efectos no son evidentes inmediatamente y la restricción en la dieta de varios meses puede disminuir el tamaño máximo del folículo dominante (FD) en vaquillas cíclicas (Bossis *et al.* 1999; León *et al.*, 2003) y en el número de folículos reclutados mayores de 6 mm (Gutiérrez *et al.* 1997). La presentación de la pubertad se retrasa en un promedio de 63 días la presentación de la pubertad en vaquillas (Bergfeld *et al.* 1994).

Se ha reconocido ampliamente la importancia de la nutrición en el desarrollo reproductivo. El conocimiento acerca de la expresión de ARNm de receptor para LH y P450 aromatasa durante el anestro nutricional es limitado. Pero ¿Cuáles son los cambios a través de los cuales la nutrición tiene influencia en la expresión de P450arom y LHR?

La respuesta dependerá del entendimiento de las relaciones entre nutrición y reproducción para determinar los mecanismos que regulan estos procesos.

CAPITULO I

REVISION DE LITERATURA

Uno puede inferir la posibilidad de la existencia de un océano Atlántico o de un Niágara con una gota de agua, sin necesidad de ver u oír hablar de ello.

ACD

1.1 SISTEMAS ESTEROIDOGÉNICOS P450 EN LA REPRODUCCIÓN DEL BOVINO CICLANDO.

Los citocromos P450s constituyen una superfamilia que tiene una región homóloga que comprende la región de unión heme. En la mitad de esta región, hay un residuo de cisteína, el cual es conservado en todas las especies de citocromos P450 (Simpson *et al.*, 1993). Estos juegan un papel en la activación del metabolismo oxidativo de componentes endógenos como esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas (Schenkman, 1992) y la oxidación de colesterol a ácidos biliares (Akiyama y González, 2002). Algunos P450 tienen papeles importantes en procesos fisiológicos, como la esteroidogénesis en folículos (Manikkam *et al.*, 2001). A pesar de que los citocromos P450 notan algún grado de similitud en al menos 40%, cada P450 representa una familia distinta, con un miembro generalmente. Sin embargo, los componentes de flavoproteína reductasas de los sistemas P450 mitocondriales y microsomales no muestran una secuencia de similitud entre las diferentes familias de oxidoreductasas (Hanukoglu, 1992).

Todas las formas de P450 en los mamíferos pueden agruparse en dos categorías: las formas biosintéticas y las multipropuestas. La mayoría de los estudios se concentran en las formas biosintéticas del citocromo P450, involucradas en la biosíntesis de esteroides. Las formas multipropuestas, pueden o no metabolizar esteroides, una amplia variedad de químicos, drogas y otros substratos endógenos como ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos y prostaglandinas (Schenkman, 1992). Estas formas son un grupo bastante extenso y pueden estar constitutivamente expresados en uno u otro tejido, o pueden requerir de algún inductor para la expresión *in vivo*.

Las principales enzimas esteroidogénicas involucradas en la biosíntesis de hormonas

esteroides a partir del colesterol, son seis formas de citocromos P450 biosintéticas y dos hidroxisteroides deshidrogenasas. Omura y Morohashi (1995) muestran que los P450 se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico (RE) y en la mitocondria. Tres de los seis P450s, uno que corta la cadena lateral (P450_{scc}), P450_{11β} y P450 aldosterona (P450_{aldo}) son localizados en la membrana interna de la mitocondria, mientras los otros tres P450_{c21}, P450_{17α} y P450aromatasa (P450_{arom}) están en la membrana del retículo endoplásmico. Las dos deshidrogenasas, 3β-HSD y 17β-HSD están asociadas con la membrana del retículo endoplásmico (Guthrie *et al.*, 1994). En los diferentes órganos, las principales diferencias están en la expresión de los miembros de las familias de P450. Por ejemplo, la expresión del citocromo P450 21-hidroxilasa (P450_{c21}) Y 11β-hidroxilasa (P450_{c11}) y P450_{aldo} están restringidas al complejo adrenal (White *et al.*, 1992). Mientras que el P450_{scc}, P450_{c17} y P450_{arom} están restringidas a las gónadas (Bao y Garverick, 1998b).

En resumen, la expresión de las 6 formas biosintéticas de P450s y 2 Hidroxisteroides deshidrogenasa (HSD) se restringen a diferentes órganos en los que se llevan a cabo diferentes funciones que se revisarán más adelante.

1.2 Transporte de colesterol hacia la mitocondria.

En los mamíferos existen tres órganos endocrinos que se especializan en la producción de hormonas esteroides: la glándula adrenal, el ovario y el testículo. Los ovarios son el principal sitio de producción de esteroides en la hembra y conforme los folículos crecen y maduran su respuesta a esteroides incrementa, debido a que los folículos dominantes poseen una gran capacidad de producir esteroides (Amsterdam *et al.*, 1992). En respuesta

al estímulo hormonal, en los tejidos esteroideogénicos se produce la biosíntesis de todos los esteroides adrenales y de la gónada. Como se ha demostrado, la biosíntesis de hormonas esteroides comienza con el transporte del colesterol. El colesterol puede sintetizarse a partir de acetato o bien puede obtenerse de los almacenamientos corporales, aunque normalmente deriva de lipoproteínas del plasma, las cuales, en la mayoría de las especies actúan como donadoras de colesterol. Las proteínas de baja y de alta densidad (low density lipoproteins: LDL, high density lipoproteins: HDL) son el origen más común de colesterol para la producción de hormonas esteroides por el cuerpo lúteo (Bao *et al.*, 1997), bajo condiciones normales, la mayoría del colesterol usado para la esteroideogénesis se obtiene desde el flujo sanguíneo en la forma de LDL y HDL (Pate y Condon, 1982).

El gen de Niemann-Pick C-1 (Niemann pick gen NPC-1) codifica para una glicoproteína de la membrana intracelular que procesa colesterol importado por las proteínas de baja densidad. Su ausencia se caracteriza por una acumulación patológica de colesterol en endosomas y lisosomas. NPC-1 está involucrado en la esteroideogénesis de la glándula adrenal, el ovario, testículo y placenta (Gevry y Murphy, 2002).

Los ésteres de colesterol pueden almacenarse en conglomerados lipídicos o en colesterol libre enzimáticamente de-esterificado. La interconversión entre colesterol libre y esterificado, está bajo el control de dos enzimas, *Colesterol Éster Hidrolasa* y *Colesterol Éster Sintetasa*. Estas son activadas por hormonas tróficas para garantizar suplementos adecuados del colesterol libre para la síntesis de esteroides dentro de los tejidos blanco. El colesterol sirve como el substrato inicial para todas las hormonas esteroides sintetizadas en el cuerpo; independientemente del tejido esteroideogénico.

El índice de formación de esteroides depende del índice de transporte de colesterol desde los almacenamientos intracelulares a la membrana mitocondrial interna.

1.3 Papel de la proteína reguladora esteroideogénica aguda (StAR).

El transporte de colesterol al interior de la mitocondria es el paso que se considera como el verdadero paso enzimático limitante en esteroideogénesis. El proceso de transporte de colesterol a la membrana mitocondrial externa, así como la translocación a la membrana mitocondrial interna; había permanecido como un misterio. Primeramente se demostró que se requiere síntesis de proteína *de novo* para la estimulación aguda de la producción de esteroides; en respuesta a la acción hormonal. En las investigaciones iniciales se suponía la presencia de otros factores. Mittre *et al.* (1996), lograron comprobar en células lúteas de bovinos, la implicación de tres proteínas mitocondriales (A, B y C). Debido a la localización de la proteína "A" en la mitocondria, el sitio del índice limitante en esteroideogénesis y a su elevada correlación con la producción de progesterona, favorecieron su implicación en la regulación aguda de la esteroideogénesis. No obstante, se sabía que la síntesis de esta proteína dependía de la proteína cinasa dependiente de Adenosin Monofosfato cíclico (cyclic adenosin monophosphate: AMPc) y por calcio (Ca^{2+}). Posteriormente, Clark y Stocco (1995) identificaron al fin una proteína nombrada proteína reguladora esteroideogénica aguda (steroidogenic acute regulated: StAR), la cual regula el paso limitante en la esteroideogénesis. StAR se encontraba en el CL del bovino, hecho descubierto por primera vez por Pescador *et al.*, (1996). Posteriormente también se mostró la presencia de StAR en tejido placentario (Pescador *et al.*, 1996; Mamluk *et al.*, 1999).

Stocco y Clark (1997), mostraron que si el microambiente que rodea a la mitocondria está en un rango de pH de 3.5-4, StAR provoca un cambio conformacional en la misma; incrementando la flexibilidad de la región de unión, entre la terminal amino y la terminal biológicamente activa de carboxilo. Se sabe que las membranas interna y externa de la mitocondria se ensamblan en los sitios de contacto y se sostienen a base de puentes de complejos de proteínas entre las dos membranas. Las funciones de StAR como la transferencia de proteínas no requiere un receptor proteínico o co-factor, lo que sugiere que StAR actúa directamente sobre lípidos de la membrana mitocondrial externa para promover la translocación de colesterol (Kallen *et al.*, 1998).

Stocco (2000) refiere la posibilidad de que este mecanismo sea para exponer el canal de colesterol o para prolongar el intervalo en el cual StAR puede residir sobre la membrana externa; sin embargo, su mecanismo de acción permanece desconocido. El colesterol que reside en la membrana mitocondrial externa, en conglomerados lipídicos o en membranas plasmáticas de células esteroidogénicas, puede ser transmitido a la membrana mitocondrial interna por medio de StAR en respuesta a la estimulación hormonal (Lin *et al.*, 1995; Stocco, 1997).

Posteriormente, se demostró que el elemento clave en la regulación del transporte de colesterol es el receptor de benzodiazepina periférico (periferal benzodiazepine receptor: PBR) (Papadopoulos *et al.*, 1997). Tanto StAR como PBR están involucrados en el transporte desde la membrana externa a la membrana mitocondrial interna. StAR puede unirse al colesterol en el citosol y transportarlo a la membrana mitocondrial, mientras que PBR transporta el colesterol desde la membrana externa a la membrana mitocondrial interna. La estimulación trófica de células esteroidogénicas induce AMPc y la liberación de

ácido araquidónico (AA). Posteriormente, AMPc traduce su señal a través de la activación de proteína cinasa A (protein kinase A: PKA) (Wang y Stocco, 1999). La fosforilación de StAR por PKA estimula el transporte de colesterol, mientras que la fosforilación por proteína cinasa C (protein kinase C: PKC) puede inhibir este proceso. El ligando natural para PBR, endozepina, también está implicada en el transporte a la membrana mitocondrial interna y la cual tiene un papel en los efectos de estimulación de PkA sobre la esteroidogénesis (Kallen *et al.*, 1998, Niswender, 2002).

Una vez que el colesterol se encuentra en la mitocondria, se lleva a cabo el corte de la cadena lateral del colesterol; convirtiéndose a pregnenolona el primer metabolito en la vía de la biosíntesis de hormonas esteroides, por medio de una reacción enzimática referida como un corte a la cadena lateral.

1.4 P450 que corta la cadena lateral (P450scc).

La reacción inicial de la biosíntesis de hormonas esteroides comienza con la separación de la cadena lateral del colesterol; por el complejo P450scc. La estimulación aguda para la producción de esteroides por hormonas de la pituitaria es dependiente de la disponibilidad de colesterol para la reacción de corte de la cadena lateral (Omura y Morohashi, 1995).

La enzima P450scc, adrenodoxin (ADX) y adrenodoxin reductasa, están localizadas en la membrana mitocondrial interna (crestas mitocondriales) (Stocco y Clark, 1997) y son responsables de la conversión de colesterol a pregnenolona, el primer paso en la biosíntesis de todas las hormonas esteroides. Este complejo multienzimático comprende tres componentes que sirven para transportar un electrón entre los otros dos componentes: el citocromo P450scc, que tiene una terminal oxigenasa, Dinucleótido-

Adenina-Flavina (flavine-adenine-dinucleotide: FAD) y una proteína heme que contiene sulfuro, luteodoxina o adrenoxina (en células lúteas y adrenales respectivamente). Todas las poblaciones mitocondriales de una célula esteroideogénica adquieren altos niveles de enzimas esteroideogénicas durante la luteinización. Las tres enzimas del complejo P450_{scc}, son empaquetadas sobre la superficie de las crestas mitocondriales en oposición a la matriz mitocondrial (Amsterdam *et al.*, 1992). La reacción utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: NADPH), generado dentro de la mitocondria por la oxidación de intermediarios en el ciclo de Krebs ó ácidos grasos. Para poder realizar la acción de corte de cadena lateral, se requiere de tres moléculas de NADPH y dos de oxígeno por mol de colesterol (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

1.5 Vía $\Delta 5$ y $\Delta 4$ de esteroideogénesis

De acuerdo con los conocimientos actuales, la producción de esteroides es regulada principalmente por la especificidad al tejido de las enzimas expresadas en el ámbito celular. Diferentes hormonas esteroides tienen diversos efectos fisiológicos, pero su naturaleza depende de las enzimas presentes en el tejido esteroideogénico en cuestión (Stocco, 2000). Las hormonas esteroides son sintetizadas en la glándula adrenal (White *et al.*, 1992), en el cerebro (Schenkman, 1992) en la gónada (Voss y Fortune, 1993a), en la placenta (Hinshelwood *et al.*, 1997) y en el tejido adiposo (TA; Simpson, 2000). En el caso de la gónada femenina, son producidas por un folículo antral actuando de manera autócrina y parácrina, con el fin de completar el proceso de maduración por el ovocito y generar la señal de ovulación (Carriere *et al.*, 1996).

Los primeros estudios sobre la síntesis de esteroides en las gónadas han reconocido la existencia de rutas metabólicas alternativas de pregnenolona utilizada para la síntesis de andrógenos. Con esta base se conoce que 17α -hidroxipregnenolona (17OH-P5) y dehidroepiandrosterona (DHEA:5androsteno-3,17-diona) siguen la vía $\Delta 5$ y 17α -hidroxiprogesterona (17OH-P4) y androstenediona (A4:androsteno,3,17-diona) siguen la vía $\Delta 4$ (Dorfman, 1965, citado por Conley y Bird, 1997). Estas dos rutas se conocen como las vías $\Delta 4$ y $\Delta 5$ de esteroidogénesis. Como lo mencionan Conley y Bird (1997), las dos vías operan con mecanismos aparentemente redundantes. Sin embargo, en algunas especies como los bovinos, ovinos, humanos y primates, existe un bloqueo funcional en la habilidad de P450c17 para sintetizar Andrógeno (A4) por la vía $\Delta 4$. En general, la síntesis de andrógenos en estas especies es a través de la vía $\Delta 5$, pero en otras especies como los cerdos, ratas y ratones, dependen de los niveles de P450c17 y 3β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD).

Las características de estas enzimas, incluyendo la especificidad del substrato así como los niveles relativos de una u otra, determinan el flujo de esteroides a través de cada vía.

1.5.1 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y complejo P450C17.

La habilidad de muchas enzimas para metabolizar esteroides depende de su destreza para interactuar con diferentes substratos para actuar en muchos substratos. Las enzimas P450c17 y 3β -HSD poseen esta característica. La enzima P450c17 puede actuar sobre pregnenolona y progesterona mientras que la enzima 3β -HSD puede actuar sobre pregnenolona, 17OH-P5 y DHEA. La enzima P450c17 puede llevar a cabo las reacciones hidroxilasa y liasa, en las vías conocidas como $\Delta 4$ y $\Delta 5$.

La expresión de la enzima 3 β -HSD se detectó primeramente en células de la teca interna de folículos preantrales, mientras que de igual modo se expresa en las células de la granulosa de folículos mayores o iguales de 8 mm (Bao *et al.*, 1998b).

La enzima P450c17 es uno de los dos principales componentes de la síntesis de andrógeno y estrógeno. Coincidiendo con el principal sitio de la producción de andrógenos, su sitio de expresión son las CT interna en respuesta a la LH (Hinshelwood *et al.*, 1998). En los ovarios, existen dos tipos de 17 HSDs, tipo 1 y de tipo 7. Las enzimas del tipo 1 se expresan en las CG y son capaces de catalizar andrógenos. Las enzimas del tipo 7 se expresan en células luteinizadas. La expresión de 17-HSD-1 se induce por la FSH actuando vía dependiente de PKA. Parte de la expresión se modula por la inhibición de PKC, estrógenos, andrógenos y factores de crecimiento; así como agentes leutinizantes, los cuales pueden causar una disminución en la expresión de 17-HSD1 (Peltoketo *et al.*, 1999).

La enzima 20 β -HSD, se produce en el citosol de folículos, células intersticiales y en el cuerpo lúteo (CL) del bovino, utilizando NADPH como donador de hidrógeno. Tiene un papel significativo en la determinación de la cantidad de substrato C-21 disponible para la conversión a andrógenos en células foliculares (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

La conversión de pregnenolona en andrógenos es clave en la síntesis de E2 en las gónadas. La pregnenolona es el precursor en la síntesis de progesterona (P4), los andrógenos y los estrógenos, y es utilizada por P450c17 ó 3 β - HSD en reacciones de competencia. Si primero es utilizada por P450c17, (vía Δ 5) en células de la teca, la pregnenolona es oxidada a 17OH-P5 (actividad 17 α -hidroxilasa), (Xu, *et al.*, 1995b). Posteriormente, dehidro epiano androstenediona (DHEA) de la vía Δ 5 sufre división de la

cadena lateral (actividad 17,20 liasa). A través de 3 β -HSD, se transforma a androstenediona (A4) y nuevamente por la actividad 17 β -HSD, el A4 se transforma a testosterona (T4) y posteriormente a estradiol a través del complejo P450 aromatasa (P450arom) en CG (Soumano *et al.*, 1996).

Sin embargo, si la pregnenolona se usa primero por 3 β -HSD, la unión Δ 5 es isomerizada y se introduce una cetona a C3 para formar el producto Δ 4 progesterona (4-pregnen-3,20-diona). La síntesis de progesterona (P4) es una vía compleja. La diferenciación en células capaces de producir P4 se completa por el incremento en la expresión de enzimas necesarias para llevar a cabo la conversión del colesterol a P4 (P450scc y 3 β -HSD). Si se produce P4, disminuye la expresión de las enzimas capaces de convertir P4 a estrógenos, P450-17 α hidroxilasa y P450arom (Niuswender *et al.*, 2000). También la progesterona es un substrato para P450c17 y se metaboliza en una vía similar para 17OH-P4. Posteriormente, por la actividad liasa- Δ 4 se produce secuencialmente A4 a partir del C19, identificada como la vía de síntesis Δ 4 de andrógenos (Conley y Bird, 1997). En las CG de folículos en desarrollo, P450aromatasa cataliza la aromatización de los andrógenos a estrógenos (Akhtar *et al.*, 1993) y el 17 β -HSD del tipo 1 convierte estrona (E1) a E2 altamente activo (Conley y Bird, 1997).

En resumen, el flujo de esteroides a través de cualquiera de estas vías, depende de la competencia entre la P450c17 y la 3 β -HSD por pregnenolona y de los niveles de cada enzima con respecto a la otra. Su distribución en el tejido es un componente importante en la esteroidogénesis que permite el mantenimiento del balance entre la síntesis de andrógenos y estrógenos en las gónadas.

1.5.2. Complejo P450 aromatasa.

Los estrógenos son importantes en el desarrollo funcional de las gónadas tanto en la hembra como en el macho, además que regulan las características de comportamiento vitales para la reproducción en las especies. En el humano, existen sitios extra gonadales que dependen principalmente del precursor C19 para la biosíntesis de estrógenos después de la menopausia (Simpson *et al.*, 1999). En los animales domésticos, la enzima citocromo P450 aromatasa (P450arom) es la encargada de convertir andrógenos a estrógenos, cuya actividad se restringe a las gónadas (CG de folículos en desarrollo, Simpson *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 1993) y al cerebro (Simpson, 2000).

Este complejo enzimático es localizado en el retículo endoplásmico (RE) de las CG que consta de dos componentes. El primero es el producto del gen CYP19; P450 aromatasa. Esta hemoproteína consiste de una cadena de polipéptidos, dirigida a catalizar una serie de reacciones que culminan en la formación de un anillo "A" fenólico. El segundo componente es una flavoproteína, citocromo P450 NADPH reductasa (Hinshelwood *et al.*, 1997). Este es responsable de la transferencia de equivalentes reductores desde NADPH a cualquier citocromo microsomal de especies P450.

La reacción de conversión de A4 a E2 a través de P450 aromatasa, utiliza 3 moles de oxígeno y 3 moles de NADPH por cada mol de esteroide C19 metabolizado (Akhtar *et al.*, 1997). La aromatasa tiene la propiedad de catalizar tres reacciones químicas para convertir andrógenos a estrógenos. En los mamíferos, la aromatasa es una de las dos enzimas que promueven la construcción de un núcleo aromático (las aminolaevulinato deshidratasa están involucradas en la biosíntesis de un anillo pirrólico). Es un P450 que tiene la función de oxidación que cataliza múltiples pasos de la reacción. Estos van

dirigidos hacia la remoción del grupo metilo en el C-10 como ácido fórmico, seguido por la reestructuración del anillo "A" a la estructura aromática (Gore-Langton y Armstrong, 1994). Algunos P450, principalmente aromatasa, no sólo catalizan la reacción hidroxilasa, sino también la oxidación de un alcohol en un compuesto carbonilo así como los procesos de división de uniones C-C-. Todas estas reacciones ocurren en el mismo sitio activo. Tiene efectos en la conversión por deacilación oxidativa del grupo metil C19 angular y aromatización del anillo A. La aromatización de los anillos "A" toma lugar con la pérdida de los hidrógenos 2- β , resultando en la reestructuración para formar el anillo fenólico "A", el cual es característico de estrógenos. La aromatasa es una de las primeras enzimas que convierten un grupo hidroxilo en un grupo carbonilo, no a través de las reacciones convencionales de deshidrogenación, sino por otro proceso usando NADPH y O₂ (Akhtar *et al.*, 1997). La deacilación requiere tres equivalentes de oxígeno y NADPH. Las primeras dos hidroxilaciones producen los derivados de andrógeno 19-hidroxi y 19-oxo (Brodie *et al.*, 1999). El sitio de la tercera hidroxilación aún no ha sido determinado, pero se ha propuesto una 2 β - hidroxilación para producir 2 β -hidroxi-19-oxoandrostenediona a partir de androstenediona (Peet *et al.*, 1993). Es posible que la conversión de andrógenos a estradiol se deba al reemplazo de varios grupos metilo por átomos de hidrógeno. Esta reacción puede facilitarse por el aislamiento de un grupo de electrones adyacentes a la unión -CH₃. Tal proceso puede mejorarse si se oxida el grupo metilo en forma progresiva, culminando en la liberación de un fragmento C1 en forma de CO₂ en estados de elevada oxidación. La tendencia a dividirse incrementa con la liberación del fragmento, así como con el aumento del estado de oxidación (siguiendo una reacción redox en C-3).

La actividad total resulta en la aromatización de un anillo "A" de andrógenos para formar

el anillo "A" fenólico, característico de estrógenos, con la pérdida de C19 del grupo metilo.

1.6 Regulación genética de los citocromos P450.

Recientemente, se ha enfocado la atención sobre las vías biosintéticas de las hormonas esteroides a partir del colesterol en los tejidos animales, así como las estructuras exón - intrón de los genes de los 5 citocromos P450s. Omura y Morohashi (1995), presentaron datos correspondientes a los genes de los 3 citocromos mitocondriales: el gen de P450_{scc} (CYP11A), el gen de P450_{11β} (CYP11B1) y el gen P450_{aldo} (CYP11B2) que tienen el mismo número de intrones insertados en las posiciones correspondientes en las secuencias codificantes.

Por otra parte, las estructuras exón - intrón de los tres genes microsomales (el gen de P450_{c21} (CYP21B), el gen de P450_{17α} (CYP17) y el gen de P450_{arom} (CYP19) aparentemente son diferentes en el número de intrones. Además, la expresión de estos genes P450 es específica para cada tejido, así como para cada tipo celular.

El análisis de las regiones promotoras de los genes P450 esteroideogénicos revelaron varios elementos cis- internos, incluyendo secuencias de respuesta AMP cíclico (AMPC) y factores de transcripción. Los estudios acerca de la regulación genética de los citocromos P450, identifican un factor de transcripción conocido como Factor esteroideogénico -1 (steroidogenic factor: SF-1), también llamado proteína adrenal ligadora-4 (Ad4BP), esencial para la expresión específica al tejido de los P450s (Omura y Morohashi, 1995). Este factor interactúa con elementos promotores para regular la expresión coordinada de hidroxilasas dentro de las células esteroideogénicas. Adicionalmente, las secuencias de unión a SF-1 se encuentran en todos los genes P450 esteroideogénicos del embrión

(Morohashi *et al.*, 1992). En el ratón, SF-1 es esencial para los órganos esteroideogénicos, así como en la regulación de la función reproductiva en los tres niveles del eje hipotálamo – pituitaria - gónada (Luo, *et al.*, 1999). Los factores de transcripción son esenciales para la expresión específica al tejido de los P450s esteroideogénicos; tanto en los embriones de animales como en la diferenciación sexual de las gónadas en el feto de la oveja (12 días después de la formación gonadal y durante la temprana de los folículos). Las células mesenquimales y mesangiales de los mesonefros en esta especie expresan mRNA y/o proteínas para StAR, 3 β -HSD, P450scc y P450arom (McNatty *et al.*, 2000).

Diversos factores de transcripción son esenciales para la expresión de los P450 esteroideogénicos en diversas células, además se han encontrado diferencias entre especies.

1.6.1 Gen CYP19.

La biosíntesis de estrógeno es catalizada por un complejo enzimático conocido como aromatasa, el producto del gen CYP19, y acoplada a ésta, una flavoproteína ubiquitina, citocromo NADPH P450 reductasa (Conley y Hinshelwood, 2001). Esta enzima se localiza en el retículo endoplásmico (RE) de las CG en las que se expresa (Omura y Morohashi, 1995). La biosíntesis de estrógenos a partir de andrógenos es catalizada por el complejo aromatasa. Este es el producto de un único gen llamado CYP19, perteneciente a una superfamilia de citocromos P450 que contiene más de 600 miembros pertenecientes a 100 familias de las cuales P450 aromatasa es el único miembro de la familia 19 (Simpson *et al.*, 1994). El gen CYP19 de P450arom es el único miembro considerado como una de las líneas más antiguas de la superfamilia. P450arom parece tener más de un billón de años

atrás, lo cual coincide con la separación de las formas de vida procarionte y eucarionte (Akhtar *et al.*, 1997).

En el bovino, este gen se ha ubicado en la banda q2.6 del cromosoma 10 (Goldammer *et al.*, 1994, citado por Fürbass *et al.*, 1997). La región genómica que flanquea al exón 1.1 se extiende hasta los exones 1.3 - 10. La estructura genómica de CYP19 muestra la región codificante (exones 2 - 10) y tres 5'-UTR (región no codificada) (exones 1.1, 1.3 y 2). 5'-UTR de las variantes del transcrito, consisten de un primer exón adicional y una parte corta del exón 2. Durante el procesamiento de estos transcritos CYP19, el dinucleótido (dnt) adenina guanina (A G) dentro del exón 2 se localiza 40 nucleótidos (nt) corriente arriba, desde el codón de comienzo translacional (ATG). 3'-UTR del ARNm del bovino (2kb), se confina a uno de los exones más largos. La longitud del intrón varía entre 0.5 a más de 15kb. Estas secuencias y sus terminales 5' y 3' conforman la secuencias consenso para los intrones del mamífero (Fürbass *et al.*, 1997).

1.6.2 Expresión de aromatasa

El nivel de expresión de cada enzima esteroideogénica varía en la especificidad de la expresión en el tejido y en la célula es determinada durante la diferenciación celular; (Omura y Morohashi, 1995), en la expresión basal (en ausencia de estimulación hormonal trófica) y la expresión regulada por la señal hormonal (Hanukoglu, 1992).

La expresión específica al tejido del gen es regulada por la región promotora 2 en el ovario, contiene 2 cajas TATA consenso, una de ellas localizada en la posición -29 del sitio de comienzo transcripcional y la otra en la posición -30 del sitio de comienzo. Los tres elementos CAAT así como SF1, se encuentran dentro de las 1176 pb en la secuencia

(Fürbass *et al.*, 1997). La expresión es mediada por un promotor próximo, promotor II, cuya actividad es regulada por AMPc y requiere factores CREB (cAMP Response Protein Element Binding) y SF- 1 (Steroidogenic Factor -1, Carlone y Richards., 1997).

Recientemente se ha detectado un transcrito de CYP19 que incluye una región codificante invariable y una región variable 5' no-traducida en tejidos de ovinos y bovinos. En contraste al ovario y al cerebro que expresan variantes homólogas de transcritos, en la placenta se presentan diferentes transcritos, sugiriéndose que también hay regiones promotoras específicas a la placenta que a su vez actúan diferente en estas especies (Vanselow *et al.*, 2001).

Los sitios de expresión del gen es en el tejido adiposo, y se observa expresión en la placenta, en las CG, en glándula adrenal (Fürbass *et al.*, 1997) y en el cerebro (Lephart, 1997). En cerdos, la aromatasa se expresa en las células de la teca interna, en CG de los folículos preovulatorios y en el trofotodermo de blastocistos pre-implantados (Conley *et al.*, 1997). En equinos, también se expresa en el trofotodermo de blastocistos pre-implantados (Walters *et al.*, 2000). En ovinos y bovinos, CYP19 se expresa también en placenta fetal, CG y en otros órganos como el cerebro (Vanselow *et al.*, 2001).

En el cerebro, la biosíntesis de estradiol y la expresión de aromatasa se requiere para el comportamiento sexual normal y la exhibición de caracteres relacionados con el dimorfismo sexual. Conley y Hinshelwood (2001) mencionan que la actividad de la aromatasa es alta en la amígdala, el núcleo periventricular preóptico y el núcleo preóptico medial y baja actividad en el núcleo supraquiasmático, el hipotálamo anterior, el hipotálamo anterior periventricular y el núcleo arcuato.

En el ovario, las gonadotropinas LH y FSH actúan incrementando concentraciones de AMPc

intracelular para inducir la expresión de P450arom (Conley y Hinshelwood, 2001) en las CG de los folículos preovulatorios (Fortune *et al.* 1988, Voss y Fortune, 1993b) así como durante el reclutamiento folicular (Bao *et al.*, 1998a). La presencia de un elemento actuando en *cis* en el gen CYP19 reprime la activación. Al parecer, un elemento adicional previene la expresión total del gen CYP19 del bovino en CG luteinizadas (Hinshelwood *et al.*, 1997).

1.2. REGULACIÓN ENDOCRINA DE FOLICULOGÉNESIS

En los mamíferos existen tres órganos endocrinos que se especializan en la producción de hormonas esteroides: la glándula adrenal, el ovario y el testículo. Los ovarios son el principal sitio de producción de esteroides y conforme los folículos crecen y maduran su respuesta a esteroides se incrementa, debido a que los folículos dominantes poseen una gran capacidad de producir esteroides. Las células del ovario responden a las gonadotropinas de una manera coordinada (Amsterdam *et al.*, 1992). Las hormonas pueden influenciar la expresión de enzimas esteroidogénicas en folículos. Driancourt (2000), menciona que existen tres características en los folículos que se desarrollan hacia el estado de ovulación : 1) en cada ciclo estral, ocurren dos o tres oleadas de crecimiento folicular y cada una conlleva una fase de reclutamiento, selección, desviación, dominancia y ovulación o atresia., 2) la variabilidad de parámetros numéricos (número de oleadas por ciclo y el número de folículos por oleada, así como los requerimientos temporales como el tiempo de selección, la duración de la dominancia) y 3) la importancia de las gonadotropinas para llevar a cabo la foliculogénesis. En la vaca, el éxito reproductivo

depende de los procesos fisiológicos y de la secreción de FSH y LH desde la glándula pituitaria.

1.2.1 Gonadotropinas

La hormona liberadora de gonadotropinas se sintetiza en el hipotálamo y se libera de una manera pulsátil. La GnRH es sintetizada en neuronas distribuidas en el área preóptica; así como el hipotálamo anterior. La GnRH regula el número de receptores para GnRH, la expresión de los genes de gonadotropinas, biosíntesis y liberación (Zanisi y Messi, 1991). Igualmente, la GnRH y sus agonistas actúan sobre las células de granulosa e incrementan la producción de pregnenolona, progesterona y la actividad de la aromatasa (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Harris *et al.*, 1998). Para ello, requieren de una disminución en la sensibilidad a estrógenos, los cuales se producen por el folículo dominante, que a su vez, alcanzan la dominancia a través del soporte gonadotrópico.

La GnRH se une a receptores específicos en los gonadotropos y provocan la liberación de Ca^{++} intracelular, causando una liberación transitoria tanto de LH como de FSH aunque en menor grado (Brown y McNelly, 1997; Brown y McNelly, 1999). La GnRH libera de manera episódica a la LH y la frecuencia en que se libera se controla por la retroalimentación de estradiol. La liberación de FSH no es de carácter pulsátil y generalmente no coincide con la liberación de LH. Los gonadotropos representan sólo el 10% de las células de la pituitaria y se dividen en células monohormonales (18% de las células para LH y 22% para FSH) y el 60% multihormonal (células para LH + FSH). La GnRH se une a su receptor de 7 dominios transmembranales los cuales se acoplan a la proteína G y activan diferentes fosfolipasas para proveer Ca^{++} y moléculas mensajeras derivadas de lípidos. Inicialmente

la fosfolipasa C (phospholipase C: PLC) se activa después de la activación de fosfolipasa A2 (phospholipase 2: PLA2) y fosfatidil inositol (fosfatidil inositol: FL). La generación de los segundos mensajeros inositol trifosfato y diacilglicerol (DAG) llevan a la movilización de Ca^{++} intracelular y del AA el cual se libera por la acción de PLA2. Diferentes diálogos internos de Ca^{++} , AA y PKC, pueden generar una señal de transducción para elementos que sufren desensibilización los cuales se activan durante la acción neurohormonal. Entre estos elementos está la proteína cinasa mitógeno-activada (Mitogen Associated Activator Protein Kinase: MAPK) la cual se activa por GnRH de manera dependiente con PKC, Ca^{++} y proteína tirosina cinasas (protein tirosin kinase: PTK) (Naor *et al.*, 1998).

Roche (1996), menciona que las gonadotropinas sintetizadas se almacenan en gránulos secretores dentro del citoplasma y se secretan diferencialmente por exocitosis. La LH puede almacenarse por un tiempo prolongado, sin embargo para FSH es por corto tiempo. Igualmente, el contenido de FSH en la pituitaria anterior es sólo del 2-3% del de la LH. La expresión de los receptores para FSH en CG se regula por FSH y estradiol (Knecht *et al.*, 1984). Así mismo inhibina y estradiol actúan directamente en la pituitaria para disminuir la expresión del gen que codifica FSH (Roche, 1996).

La GnRH regula la secreción y expresión de las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH), éstas hormonas, junto con la TSH y eCG, son glicoproteínas estructuralmente similares, formadas por dos subunidades denominadas subunidad alfa y beta, unidas entre sí por fuerzas no covalentes. La subunidad alfa es idéntica entre estas glicoproteínas y está conformada por la misma secuencia de aminoácidos mientras que la subunidad beta es única para cada hormona y le confiere especificidad biológica. La secuencia primaria de aminoácidos que codifica para la subunidad alfa en diferentes especies presentan una

similitud del 75-100% por ejemplo, bovinos y equinos tiene una similitud del 82% mientras que el bovino y el humano solo tienen el 75% sin embargo entre bovinos y ovinos su secuencia es similar al 100%. La subunidad beta de cada glicoproteína tiene una secuencia de aminoácidos altamente conservada entre las diferentes glicoproteínas intra e inter especies (82% de similitud). Una particularidad de esta subunidad es que de ella depende la actividad hormonal específica en cada glicoproteína que se expresa en su totalidad, cuando esta subunidad se asocia con la subunidad alfa (Cooke *et al.*, 1996).

La LH está involucrada en los estados finales de desarrollo folicular y FSH en el crecimiento folicular, por lo que los niveles basales de gonadotropinas juegan un papel importante en la regulación del crecimiento folicular (Roche y Boland, 1991). La FSH es de gran importancia en el reclutamiento y selección de un FD. En la oveja, Campbell *et al.* (1991) muestran que la FSH puede inducir la producción de E2 e inhibina en presencia de insulina en las CG de folículos pequeños; sin embargo, requieren de grandes dosis de insulina y FSH. El incremento transitorio en la secreción de FSH precede la emergencia de las oleadas foliculares en el ganado (Webb *et al.*, 1992). Las bajas concentraciones de FSH al tiempo de la desviación pueden ser necesarias para que el folículo dominante continúe creciendo y desarrollándose (Bergfelt *et al.*, 2000). En folículos preovulatorios, el nivel de FSH en fluido folicular (FF) se incrementa antes del pico de LH y muestra una elevación alrededor de 4 hrs después del surgimiento de LH en el plasma. Alrededor de 6 horas después del pico de LH en el plasma, las concentraciones de FSH en el FF muestran una disminución gradual (Adams *et al.*, 1992) hasta alrededor de 20 hrs después del pico de LH y nuevamente incrementa otra vez. Esta disminución se asocia con la selección de un FD, el cual empieza ser dependiente de LH (Roche, 1996). La alta concentración de

FSH en fluido folicular (FF) durante el tiempo de la ovulación, se debe a que se requiere de acciones combinadas de estradiol y FSH para estimular la inducción de receptores para LH sobre CG tanto *in vivo* (Evans y Fortune, 1997, Wang y Greenwald, 1993) como *in vitro* (Segaloff *et al.*, 1990).

1.2.2 Receptor para Hormona Luteinizante

El receptor para LH es un polipéptido que contiene un dominio hidrofílico situado extracelularmente, con 7 dominios transmembranales y la región intracelular en la terminal carboxilo. La terminal -N extracelular se ha relacionado a una familia de glicoproteínas ricas en leucina, y está involucrado en la unión de grandes hormonas glicoprotéicas, hCG y LH. La terminal carboxilo del receptor se relaciona a la familia de receptores semejante a rodopsin, el cual presumiblemente está implicado en el acoplamiento del receptor con la proteína G (Segaloff *et al.*, 1990). Tayar (1996), hace una analogía para explicar este proceso: el dominio extracelular, en particular la región rica en leucina, tiene la función de la persona encargada de "atrapar" la pelota en un partido de baseball, este dominio "atrapa" a la hormona y orienta la parte apropiada de ésta hacia su interacción con los 7 dominios-transmembranales del receptor. Esto le da sentido al cambio conformacional dado por el complejo de la proteína G; lo cual lleva a la estimulación de la síntesis de AMPc y la producción de esteroides. Los receptores de hormonas glicoprotéicas (LHR, FSHR, TSHR) poseen una secuencia invariante de 10-residuos de aminoácidos. Se ha sugerido que Glu-Asp que se localizan en el punto medio de esta secuencia conservada son importantes en la señalización mediada por un ligando de LHR y/o la expresión del receptor, pero no en la unión con el receptor (Angelova y

Pret, 2002). En los mamíferos, el gen de LHR se compone de 11 exones. El dominio transmembranal de cada uno de los tres receptores para glicoproteínas es codificado por un solo exón (Kumar y Trant, 2001).

La estimulación de las hormonas tróficas hacia las células esteroideogénicas induce la vía de segundos mensajeros como el AMPc. Este se forma a través de la unión hormona-receptor acoplados a la proteína G, la cual es dependiente de guanidina tri fosfato (guanidine triphosphate. GTP). Es posible que la interacción del complejo hormona-receptor con proteínas G, active directamente la vía de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂), la cual cataliza la liberación del AA desde fosfolípidos. La proteína del AA conocida como ARTSt actúa como un intermediario en la regulación de la activación de PLA₂ por AMPc y ayuda a mediar la liberación de AA. Las observaciones de Kishi *et al.* (1997) indican que el incremento en AMPc causa la insensibilización del ARNm del receptor para LH/hCG, mientras que la actividad basal de AMPc se requiere para la expresión de ARNm de los receptores para LH/hCG.

1.2.3 Receptor para LH en la foliculogénesis.

El primer estadio reconocible de desarrollo folicular es la adquisición de la capacidad a responder a gonadotropinas. Este mecanismo se ha aceptado como fundamental en la fisiología del ovario. La capacidad de los folículos a producir estrógenos, se adquiere en los estados preantrales, cuando ellos poseen todos los componentes del modelo "dos células, dos gonadotropinas" (Drummond y Findlay, 1999). Este modelo se refiere a que se requieren tanto de los dos estratos celulares del ovario (CT y CG) como de LH y FSH. Es decir, para la síntesis de 17β-estradiol, se requiere de la producción de andrógenos por las

CT interna (CTI) por la enzima P450c17; bajo el estímulo de LH. Estos A4 sirven como un sustrato obligatorio para la síntesis de estrógenos catalizada por P450arom en CG (Tetsuka y Hillier, 1997). El ARNm de esta enzima es inducido por la FSH en folículos preovulatorios de las CG y disminuye su expresión rápidamente a consecuencia de la oleada de LH (Fitzpatrick *et al.*, 1997). Los estrógenos actúan vía receptores de estrógenos (E2r), los cuales se expresan en CG de folículos preantrales y antrales (Drummond y Findlay, 1999). Parte de las acciones locales mediadas por E2 se regulan por los efectos estimulantes sobre los receptores de LH, FSH y oxitocina. Igualmente, el estradiol secretado del FD regulan la secreción de gonadotropinas (Amiridis *et al.*, 1999). En el ganado, como en otras especies, las funciones endocrinas en el ovario se limitan a dos compartimentos. Entre los estratos celulares de las CT y las CG, se forma una membrana basal de unión anatómica, las llamadas uniones gap. La transferencia de nutrientes y citocinas mediadas por las uniones gap, es estimulada por estrógenos (Schams y Berisha, 2002). Igualmente, el E2 promueve la comunicación célula-célula, la cual puede ser necesaria para la inducción del receptor para LH en CG (Farookhi y Desjardins, 1986).

En el ovario el receptor para LH se encuentra en CT y en CG de folículos preovulatorios y en el CL. Durante el ciclo estral del bovino, los niveles de ARNm para el LHR en CG de FD incrementa conforme el desarrollo folicular progresa (Xu *et al.*, 1995a).

Los niveles de expresión de ARNm para el LHR generalmente incrementa durante la fase de crecimiento de la primera oleada (Rhodes *et al.*, 1995b) y disminuye durante la atresia. En general el ARNm para LHR, P450scc, P450c17, 3 β -HSD y StAR en CT se expresan al

tiempo de la formación del estrato de la CT hasta avanzados estados de atresia. Su expresión, sin embargo, disminuye al inicio de la atresia.

Contrario a las CT, la expresión de genes para CG depende del estado folicular. Las CG adquieren receptores para FSH y las CT adquieren para LH antes del reclutamiento (emergencia de la oleada) y selección del FD (Richards, 1994). En folículos reclutados <4mm de diámetro, se encuentra sólo la expresión de ARNm para FSHR. Después del reclutamiento, la expresión de ARNm para P450scc y P450 aromatasa se detectó solo en CG. La expresión de ARNm para LHR y 3 β -HSD en CG se detectó al inicio de la oleada, alrededor del tiempo de la selección del FD (Bao *et al.*, 1998a). La expresión de ARNm para receptores de gonadotropinas y enzimas esteroidogénicas, y StAR en CT y/o CG fueron altas en FD. En este tipo de folículos, se mantienen altos niveles de expresión de ARNm por pocos días y disminuyen con atresia de los FD. Conforme transcurre la oleada folicular, la expresión de todos los ARNm disminuyen, excepto el ARNm para LHR y P450 aromatasa en CG, las cuales permanecen en niveles similares. Sin embargo, las CG de folículos antrales saludables poseen más receptores para LH que los folículos atréticos (Spicer y Echterkamp, 1986), por lo que al comienzo de la atresia, en las CG del FD disminuyen los ARNm para LHR y P450aromatasa (Bao y Garverick, 1998b). Durante posteriores estados de desarrollo folicular, las CG de folículos saludables, secretoras de estrógeno también adquieren receptores para LH (Ireland y Roche *et al.*, 1982; Xu *et al.*, 1995). Por lo que se ha sugerido que la adquisición de LHR sobre CG juega un papel importante en la selección del FD (Jolly *et al.*, 1994). En ovejas los niveles de ARNm para LHR en CG son mayores en la fase folicular temprana que en la fase tardía (Abdennebi *et al.*, 1999).

Para resumir, los patrones de desarrollo folicular están asociados con cambios en la expresión de ARNm codificando receptores de gonadotropinas (Xu *et al.*, 1995a) y enzimas esteroideogénicas (Xu *et al.*, 1995b). Estos cambios en la selección y dominancia de folículos, permiten la ovulación en respuesta al surgimiento de gonadotropinas.

1.3. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA REPRODUCCIÓN EN GANADO BOVINO.

En México, uno de los principales problemas en la reproducción del ganado de carne es la desnutrición (García, 1996; González, 1996; Mendoza y Ricalde, 1996). Un adecuado programa nutricional es esencial para asegurar la productividad óptima y el funcionamiento reproductivo. La severa restricción de nutrientes provoca la pérdida de reservas energéticas del cuerpo, lo cual conlleva a una reducción de la masa corporal. La condición corporal (CC) es una medida subjetiva que nos permite hacer una relación entre el peso corporal y las reservas de grasa (Thompson *et al.* 1983).

Se ha sugerido que la ovulación en mamíferos depende de la grasa corporal. Bronson y Manning (1991) mencionan que una hembra joven no puede ovular por primera vez hasta que ha acumulado una cantidad crítica de masa corporal. De la misma manera una hembra adulta cesará de ovular si sus reservas de grasa están por debajo del nivel crítico. Las bases evolucionarias para esta dependencia es la necesidad de retrasar la gestación hasta que la hembra haya acumulado suficientes reservas energéticas como para sostener la gestación. En el caso que no existieran estas reservas, la habilidad del tejido adiposo a convertir y almacenar esteroides será insuficiente comparado con el funcionamiento normal con las suficientes reservas energéticas.

1.3.1 ¿Cómo es que la reproducción puede modularse por el balance energético?

En la vaca, existe una relación muy estrecha entre el eje reproductivo y los cambios en la ingestión de nutrientes. Ya que la nutrición modula la concentración sanguínea de varias hormonas; por ejemplo, éstas responden a una disminución en la ingestión de nutrientes y en consecuencia se provoca un anestro. Varios investigadores concuerdan en que las vacas empiezan en anestro 23-26 semanas después del inicio de la restricción alimenticia; cuando las vacas tienen una condición corporal de 3.5 y pierden entre 20-36% de su peso corporal inicial (Richards *et al.*, 1989, Rhodes *et al.*, 1996).

Bronson y Manning (1991) proponen dos factores que permiten que la actividad del pulso generador de GnRH sea modulada por el balance energético; el combustible metabólico e insulina. Con respecto al primer factor, se ha establecido que la ovulación depende de la disponibilidad de aceites metabólicos oxidables, como glucosa y ácidos grasos. La concentración de NEFA se relaciona negativamente con el balance energético en las vacas (Lucy *et al.*, 1991, Bossis *et al.*, 1999) ya que la pérdida del peso corporal se asocia con un incremento en las concentraciones de NEFA (Richards *et al.*, 1989, Jorritsma *et al.*, 2003). Ya que NEFA y el balance energético están directamente relacionados, NEFA puede servir como una señal periférica del balance energético al sistema nervioso central (Canfield y Butler, 1998).

Las concentraciones de glucosa en plasma están influenciadas por la condición corporal (Vizcarra *et al.*, 1998; Booth, 1990). El metabolismo de la glucosa en rumiantes se caracteriza por una gran habilidad de adaptación a los cambios en la homeorresis (Bauman y Currie, 1980). La mayoría de la glucosa utilizable en los tejidos de los rumiantes se suple con la gluconeogénesis, ya que menos del 10% de la glucosa total

utilizada se absorbe como tal en el intestino. La gluconeogénesis puede llevarse a cabo a partir de propionato, de aminoácidos, de lactato y glicerol. Primeramente, los rumiantes dependen de la gluconeogénesis hepática pues todos los carbohidratos de la dieta se fermentan a ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen. El substrato más importante que contribuye para la gluconeogénesis, es el propionato producido durante la fermentación ruminal y el intestino delgado. Aunque la utilización de propionato para la gluconeogénesis es mayor, los aminoácidos son importantes como substratos gluconeogénicos cuando la demanda de glucosa incrementa (Overton *et al.*, 1999). Por ejemplo todos los aminoácidos excepto leucina y lisina (que son completamente cetogénicos) pueden hacer una contribución neta a la síntesis de glucosa; pero típicamente, alanina y glutamina hacen la mayor contribución (Drackley *et al.*, 2001).

Krehbiel *et al.* (1992) demostraron que en vaquillas alimentadas con dietas altas en concentrados que el lactato contribuye en un 44% de carbono de glucosa. Igualmente, la conversión de lactato a glucosa aumenta si la actividad de la enzima Piruvato carboxilasa (PC) incrementa. Si se presenta una deficiencia en la ingestión de energía, la utilización de lactato para la gluconeogénesis conlleva el reciclaje de carbono, ya que el lactato circulante se forma durante el catabolismo de glucosa o por catabolismo parcial de propionato (Danfaer *et al.*, 1995). Hawkins *et al.* (2000) mencionan que en estas condiciones, ocurre una disminución del oxalacetato (OAA) el cual es un intermediario clave para la gluconeogénesis. Estos ajustes provocan la reducción en la eficiencia del metabolismo energético como lo refleja un incremento en suero de B-hidroxibutirato.

En respuesta al balance energético negativo, varias hormonas, como el eje somatotrópico (Hormona de crecimiento (GH) y factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF),

insulina (Adams *et al.*, 1996; McGuire *et al.*, 1992) y leptina (Smith *et al.*, 2002) responden a cambios en la nutrición.

En condiciones de desnutrición, la GH se eleva y estimula la gluconeogénesis y la insulina se reduce, disminuyendo la lipogénesis y la glicólisis. Sin la retroalimentación negativa de insulina, el glucagon se libera y estimula la gluconeogénesis, incrementando la pérdida de peso. El efecto de la GH sobre el ovario puede medirse a través de IGF-1 y/o insulina al nivel de ovario (Adams *et al.*, 1996). Sin embargo, esta relación entre IGF-1 se desacopla durante el balance energético negativo e IGF-1 se eleva sólo ligeramente (Downing *et al.*, 1995).

El IGF-1 podría ser un mediador entre los efectos nutricionales y la reproducción ya que, en vaquillas (Spicer *et al.*, 1992) y en vacas (Spicer y Enright, 1991) subalimentadas, se reducen las concentraciones de IGF-1 en plasma (Pushpakumara *et al.*, 2003). Esto probablemente se deba a que el estradiol tiene un efecto positivo sobre la secreción de IGF-1 por el hígado y la desnutrición inhibe el efecto positivo del estradiol sobre IGF-1 (Richards *et al.*, 1991).

Similarmente, en vaquillas (McCann y Hansel, 1986) y en vacas (Richards *et al.*, 1989) la restricción de energía disminuye las concentraciones de insulina. En un estudio se comprobó que si se les administra una infusión de glucosa a vacas alimentadas con restricción de energía, las concentraciones β en suero de insulina permanecen elevadas; comparadas con vacas alimentadas con dietas en mantenimiento (Richards *et al.*, 1989). Muchas dietas que incrementan la producción de propionato se asocian con un incremento en las concentraciones de insulina (Vizcarra *et al.*, 1998), por lo que los AGV estimulan la secreción de insulina en rumiantes (Harmon, 1992). Sin embargo, las CG de folículos de

los ovarios de vacas inducidas a anestro nutricional tienen la capacidad de responder a IGF-1 e insulina *in vitro*, indicando que la alimentación restringida no reduce la respuesta del ovario a IGF-1 o insulina (Hamilton *et al.*, 1999).

Como mencionamos anteriormente, la restricción alimenticia aguda reduce IGF-1 e insulina; igualmente se disminuye el ARNm de leptina en tejido adiposo y sus concentraciones circulantes (Amstalden *et al.*, 1999). La leptina tiene efectos directos sobre la función de las gónadas, ya que las CG y las CT tienen habilidad para responder a leptina (Spicer y Francisco, 1997; Spicer y Francisco, 1998) y en condiciones de desnutrición esta hormona inhibe la esteroidogénesis en el bovino (Spicer y Francisco, 1998). Los mismos autores mencionan que la leptina puede inhibir el efecto de la insulina sobre la producción de P4 y estradiol en CG así como la producción de P4 y androstenediona en CT.

En ruminantes con diferente nivel de ingestión de alimento o condición corporal, se ha detectado diferencia en las concentraciones de gonadotropinas circulantes y en la pituitaria (Rhind y Schanbacher, 1991). Ya que las gonadotropinas circulantes modulan el crecimiento y desarrollo de los folículos y cuerpo lúteo (Baird y McNeilly, 1981); es lógico pensar que estos cambios debidos a la desnutrición pueden inhibir la ovulación. Las vacas desnutridas carecen de actividad ovárica debido a una supresión de la liberación pulsátil de LH desde la glándula pituitaria anterior y disminución en la frecuencia de pulsos de LH (Richards *et al.*, 1989). Esta liberación se controla por la liberación de GnRH desde el hipotálamo. Algunos componentes metabólicos actúan sobre el eje ovárico-pituitaria-hipotálamo conforme se altera el estado nutricional del animal (Randel *et al.*, 1990). Richards *et al.*, (1991) sugieren que si la disminución en las reservas de energía suprime

la secreción de LH, no es por un mecanismo dependiente al de retroalimentación hormonal en el ovario; sino por un efecto directo sobre el eje hipotálamo-hipófisis.

La leptina puede actuar como una señal permisiva para incrementar la secreción de GnRH solo después de que el pulso generador ha sido sensibilizado al balance energético por otras vías metabólicas. Los receptores de leptina se co-localizan en el núcleo arcuato, ventromedial del hipotálamo con neuropéptidos, como el neuropéptido Y (sus siglas en inglés: NPY). La síntesis y secreción de NPY incrementa durante la privación del alimento (Kalra *et al.*, 1999).

La leptina, insulina y NPY se liberan para regular el apetito y la secreción de LH. La leptina podría actuar indirectamente sobre el hipotálamo regulando la disponibilidad de glucosa o por otros mecanismos como la disminución en la liberación de insulina (Smith *et al.*, 2002).

Zieba *et al* (2002) menciona que la leptina e insulina son secretadas bajo las mismas circunstancias metabólicas. Cada péptido provee señales a corto o largo término relacionadas al metabolismo y balance energético y son transportadas al sistema nervioso mediado por receptores. Los mismos autores concluyen que la leptina tiene potentes efectos positivos sobre la secreción de insulina y LH desde el gonadotropo en vacas en ayuno. El mecanismo por el cual la insulina y leptina tienen un efecto en la reproducción, es a través de la liberación de GnRH. El pulso generador monitorea los niveles de insulina y leptina en el fluido espinal cerebral. La leptina provee información al sistema nervioso central sobre la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo (Considine, 1997). La insulina influencia la disponibilidad hipotalámica de los substratos de aminoácidos, entre ellos tirosina. Este aminoácido es necesario para la síntesis de norepinefrina y serotonina,

los cuales son importantes neurotransmisores que estimulan la liberación del pulso generador de GnRH (Luck *et al.*, 1995). Estas observaciones sugieren que la leptina es una señal metabólica para el sistema reproductivo neuroendocrino y que, bajo condiciones de inadecuadas reservas energéticas, los niveles de leptina bajos actúan como una barrera metabólica para inhibir la actividad del eje reproductivo neuroendocrino (Cunningham *et al.*, 1999).

En condiciones normales, la ovulación normalmente sigue a la oleada preovulatoria de gonadotropinas. El surgimiento es inducido por la acción del incremento en las concentraciones periféricas de estradiol-17 β , el cual causa una elevación de GnRH en la sangre portal hipofiseal.

La producción de suficiente estradiol-17 β por el folículo es crítica para los cambios requeridos en las células de granulosa y de la teca, y la maduración folicular final. La esteroidogénesis por folículos preovulatorios depende de la estimulación por LH. Muchos folículos pequeños (>2mm) adquieren la habilidad a responder a LH y secretar androstenediona, pero sólo un número relativamente pequeño de folículos grandes (>5mm) tienen células de granulosa capaces de metabolizar androstenediona en estradiol-17 β . Si se presenta una estimulación insuficiente de LH en células de la teca, se produce una baja producción de andrógenos subsecuentemente, lo que conlleva a una insuficiente síntesis de estradiol-17 β y falla de la inducción de receptores de LH en células de la granulosa y en la ausencia de ovulación (Richards *et al.*, 1989).

Mackey *et al.* (1999) sugieren que la anovulación es siempre precedida por la ausencia de un surgimiento de gonadotropinas. Richards *et al.*, (1989) encontraron una disminución en la frecuencia de pulsos de LH en ganado de carne bajo una dieta en restricción de

nutrientes. Rhodes *et al.*, (1996) demostraron una asociación entre el anestro inducido nutricionalmente e insuficientes concentraciones de LH circulante para estimular la maduración del folículo ovulatorio. Richards *et al.*, (1989) encontraron una disminución en la frecuencia de pulsos de LH en ganado de carne bajo una dieta en restricción de nutrientes. Rhodes *et al.* (1996) demostraron una asociación entre el anestro inducido nutricionalmente e insuficientes concentraciones de LH circulante para estimular la maduración del folículo ovulatorio. Esto soporta lo mencionado por otros autores (Gong *et al.*, 1995 y 1996; Webb y Armstrong., 1998), que se requiere de LH para la maduración final del folículo ovulatorio en el ganado.

Dawuda *et al.* (2002) indican que las vaquillas productoras de carne, tienen diferente sensibilidad en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario a variaciones en los niveles de energía en la dieta; demostrado en la diferencia en el tiempo tomado por cada vaquilla para empezar a ser acíclica. En hembras jóvenes productoras de carne, uno de los mecanismos que pueden controlar esta aciclicidad es la hipersensibilidad a estrógenos. En vaquillas alimentadas con niveles limitados de energía en la dieta, presentan una gran inhibición de la secreción de LH en respuesta a implantes de E2, y esta sensibilidad continúa hasta después del ciclo estral siguiente a la realimentación (Imakawa *et al.*, 1986). Los mismos autores alimentaron a vaquillas de carne con restricción en energía por corto tiempo. Ellos observaron que el E2 disminuye antes de que ocurra el inicio del anestro nutricional (Imakawa *et al.*, 1987). En vaquillas alimentadas con una dieta que les provee el 50% de sus requerimientos diarios de energía por 9 semanas, se observa una inhibición de la secreción de LH por estrógenos, mientras que vaquillas cíclicas alimentadas con el 100% de sus requerimientos energéticos por un período de 8 semanas mantuvieron su

respuesta de LH a la señal de retroalimentación positiva del estradiol (Dawuda *et al.*, 2002). Los mismos autores demostraron además una carencia de progesterona en vaquillas anéstricas. El efecto primario de la carencia de P4 puede deberse a la pérdida de receptores de P4 en la unidad hipotálamo –hipófisis durante las 9 semanas de que duró el tratamiento con 50% de sus requerimientos energéticos de mantenimiento. Se reporta la existencia de dos mecanismos potenciales involucrados en la anovulación como resultado de la restricción alimenticia: la falla de la señal de retroalimentación positiva de estradiol y la falla de P4 a organizar los eventos en el eje hipotálamo-hipófisis que llevan a un incremento en la secreción de GnRH/LH.

1.3.2 Efecto de la desnutrición en folículos de bovino.

En animales desnutridos, existe crecimiento folicular hasta la desviación, pero no llegan hasta el diámetro necesario para ovular. La persistencia y el diámetro del FD se ve afectado por el tiempo de permanencia en anestro (Mackey *et al.*, 1999; Bossis *et al.*, 1999; Bossis *et al.*, 2000). Rhodes y colaboradores (1995a), investigaron el efecto de la disminución en la masa viva en vaquillas *Bos indicus*. Estos animales tuvieron una pérdida de 10 kg en masa viva, que resultó en una disminución en el diámetro folicular del ovario de 0.3mm y en la persistencia de 0.4 días. Vaquillas de carne alimentadas por 10 semanas para perder peso corporal presentan una disminución en la persistencia y disminuye el diámetro máximo del FD comparado con vaquillas alimentadas para ganar peso corporal (Murphy *et al.*, 1991). Igualmente, el FD tiene un diámetro menor en vacas con 18 semanas en anestro en comparación a las vacas con 4 semanas en anestro (Prado *et al.*, 2002). Bergfeld y colaboradores (1994) mostraron que las vaquillas prepúberes

alimentadas con mayores cantidades de energía en la dieta, presentan un FD de mayor diámetro. Por el contrario, las vaquillas alimentadas con menores cantidades de energía en la dieta desarrollan FD pequeños, los cuales están asociados con un retraso en la pubertad hasta por 63 días. Conjuntamente, los estudios de Mackey *et al.* (1999) sobre desnutrición en vaquillas de carne, han demostrado que la restricción aguda desde 1.2 a 0.4 de dieta de mantenimiento (Mn) por un período de 13-15 días, disminuye el índice de crecimiento y el diámetro máximo de FD. Induce también la falla de FD a ovular en el 60% de las vacas, sin embargo, dentro de los confines del número limitado de animales, no compromete la fertilidad en vaquillas que ovularon. En el ganado de carne, se pueden observar ejemplos específicos de la influencia de la dieta sobre la función ovárica, ya que se ha documentado la relación negativa entre la pérdida de peso y el número de folículos (Rhind y Schanbacher, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1997) y en el potencial esteroidogénico de las CG en folículos pequeños (Armstrong *et al.*, 2002).

La desnutrición aguda de vaquillas o vacas tiene efectos deletéreos sobre el crecimiento folicular y ovulación (Roche *et al.*, 2000). Los resultados encontrados indican que el inicio de anestro inducido nutricionalmente se acompaña por la falla en la ovulación del FD después de la luteólisis. Durante el período posparto temprano, la desnutrición puede provocar un estado similar al estado prepuberal, en el cual, el estradiol inhibe la secreción hipotalámica de GnRH. Esto podría crear una situación en la que el crecimiento del FD después de la desviación podría producir un aumento en la cantidad de estradiol. El incremento en estradiol circulante, podría inhibir GnRH y por consiguiente, los pulsos de LH (Wiltbank *et al.*, 2002).

Cuando el estado nutricional se mejora, las concentraciones de insulina, leptina, NPY y ciertos aminoácidos en el fluido cerebro espinal interactúan para modular la secreción de GnRH (Miller *et al.*, 1998) con la subsiguiente liberación de gonadotropinas. Ryan *et al.*, (1994) encontraron que en vacas de carne, las concentraciones de IGF-I en suero y en el fluido folicular incrementan conforme aumenta la condición corporal. Igualmente, este incremento gradual en las concentraciones de IGF-I en plasma, se asocia con un incremento gradual en el tamaño del FD durante la realimentación de vaquillas inducidas a anestro nutricional (Bossis *et al.*, 2000). De acuerdo con Rhodes y colaboradores (1995a), la ovulación en vaquillas después de terminado el anestro, ocurre cuando el diámetro máximo del FD es similar al observado en los folículos ovulatorios antes del inicio de la restricción alimenticia; y cuando presentan una CC variando entre 2.5 a 6.0. La duración del período de reinicio de ovulación después del anestro, se relacionó inversamente con el tiempo de disminución de masa viva requerido para inducir el anestro. La realimentación de vacas de carne inducidas a anestro nutricional resultan en un incremento lineal en el índice de crecimiento y el tamaño de los FD (Rhodes *et al.*, 1995a; Bossis *et al.*, 2000). Después del anestro, las vaquillas exhibieron ciclos estrales cortos caracterizados por concentraciones de progesterona excediendo a 1ng/ml por <12 días (Mackey *et al.*, 1999).

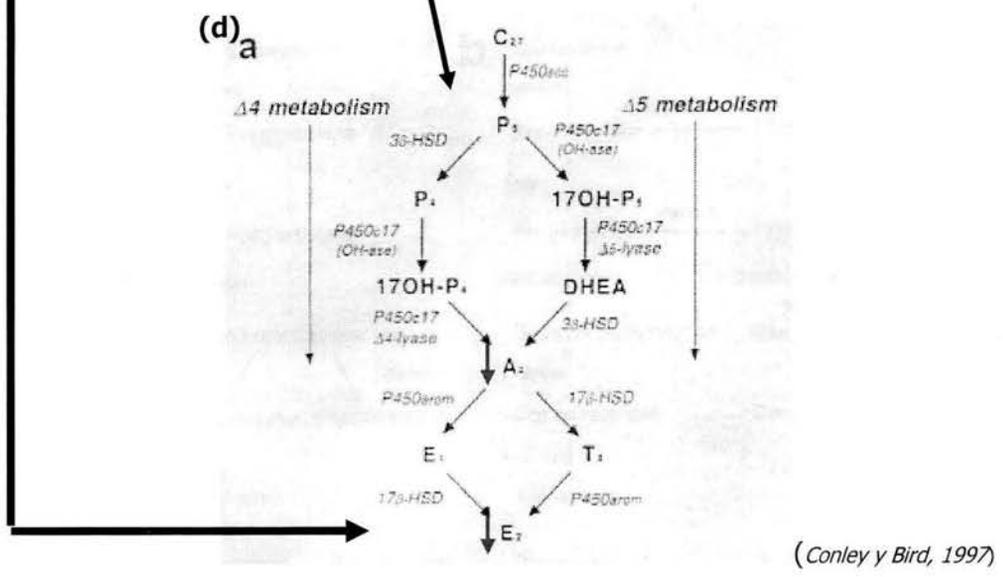
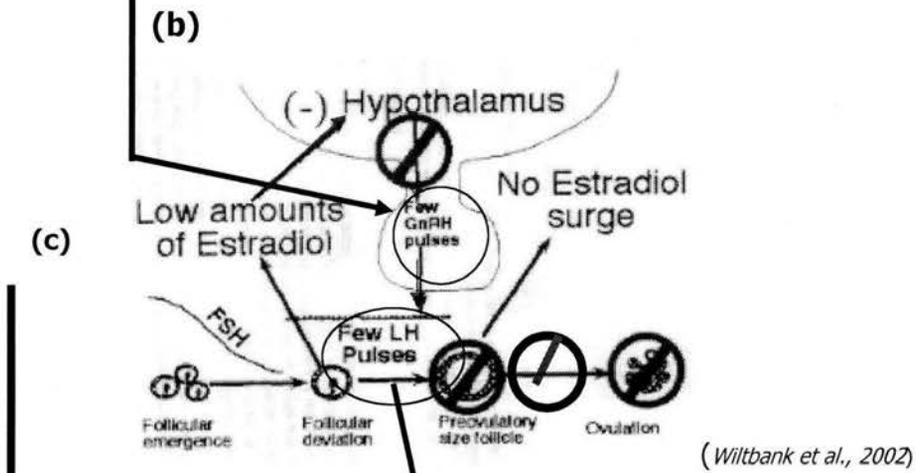
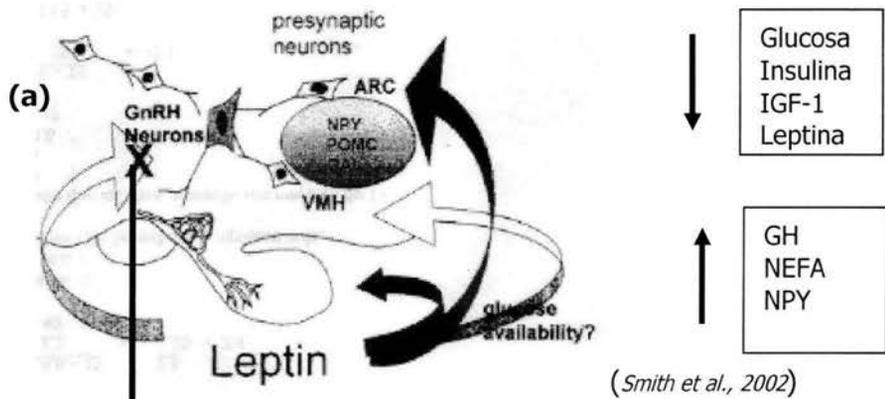


Figura 1. En esta figura se muestran los posibles sitios de acción de leptina en el sistema reproductivo neuroendócrino. El núcleo arcuato (ARC) y el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) contiene receptores para leptina, neuropéptido Y (NPY), pro-opiomelanocortina (POMC) y galanina (GAL) **(a)**. La restricción alimenticia aguda reduce IGF-1, insulina y leptina e incrementa las concentraciones de NEFA, GH y NPY. Ya que la leptina se presenta como la señal metabólica de las reservas energéticas inadecuadas, los bajos niveles de leptina actúan como una puerta metabólica para inhibir la actividad del eje reproductivo neuroendocrino. La leptina junto con los neuropéptidos antes mencionados, regulan el apetito y podrían mediar la secreción de GnRH relacionado al balance energético **(b)**. En animales desnutridos, existe crecimiento folicular hasta la desviación, pero no llegan hasta el diámetro necesario para ovular. Esto se debe a las insuficientes concentraciones de LH circulante para estimular la maduración del folículo ovulatorio, ya que se requiere de LH para la maduración final del folículo ovulatorio en el ganado. La esteroidogénesis por folículos preovulatorios depende de la estimulación por LH **(c)**. Muchos folículos pequeños (>2mm) adquieren la habilidad a responder a LH y secretar androstenediona, pero sólo un número relativamente pequeño de folículos grandes (>5mm) tienen células de granulosa capaces de metabolizar androstenediona en estradiol-17B. Si se presenta una estimulación insuficiente de LH en células de la teca, se produce una baja producción de andrógenos subsecuentemente, lo que conlleva a una insuficiente síntesis de estradiol-17B y falla de la inducción de receptores de LH en células de la granulosa y en la ausencia de ovulación **(d)**.

CAPITULO II

OBJETIVO E HIPÓTESIS

OBJETIVO

Caracterizar la expresión de P450 aromatasa y receptor para LH en folículos de bovino con condición corporal regular y ciclando o en condición corporal baja y anestro.

HIPOTESIS

La expresión de ARNm de P450 aromatasa y receptor para LH en folículos de bovino con condición corporal regular y ciclando; es diferente a la expresión de ARNm de P450 aromatasa y LHR en folículos de bovino con condición corporal baja y anestro.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir

Albert Einstein

3.1. EXPRESIÓN DE P450AROMATASA Y LHR EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE BOVINO POR HIBRIDACIÓN IN SITU.

3.1.2 Animales y tratamientos:

Se utilizaron 15 vaquillas de la raza Cebú X Suizo, de 24 a 30 meses de edad, peso corporal de 322 ± 9 kg y una condición corporal (CC) de 3.0 (1.0 = muy flaca y 9.0 = obesa, según lo descrito en la escala para el ganado bovino de carne Richards *et al.* (1986).

Las vaquillas que se encontraban ciclando regularmente se dividieron en 2 grupos (n=5) para proceder con los siguientes tratamientos.

Grupo 1): Vaquillas con alimentación para ganancia de peso (1000g/día).

Grupo 2): Vaquillas con restricción nutricional hasta desencadenar el anestro.

Adicionalmente se contó con un grupo de vaquillas que se encontraban en anestro desde el inicio del estudio.

En el grupo 1, las vaquillas fueron alimentadas para ganancia de 1 kg por día hasta que alcanzaron la condición corporal de 6.0 (8.2 kg de materia seca, 2.7 Mcal/kg de energía metabolizable y 10.3 % de PC; NRC, 1996). Además se les proporcionó agua y una mezcla de sales minerales *ad libitum* y se registró la condición corporal así como el peso vivo cada semana.

Con respecto a las vaquillas del grupo 2, después de un período de adaptación y de comprobar que estuvieran ciclando regularmente, fueron sometidas a un programa de restricción alimenticia consistente en 4.0 kg de materia seca (MS), 2.4 Mcal/kg de energía metabolizable (EM) y 7.6% de proteína cruda (PC) hasta provocar el anestro (ausencia de

estro, falla en la ovulación del folículo dominante y de la formación del cuerpo lúteo), así como niveles de progesterona por debajo de 1 ng/ml durante un período de 20 días. Una vez que las vaquillas dejaron de ciclar se continuó la restricción alimenticia por 25 días más. El grupo 3, vaquillas en anestro (n=5) se les mantuvo con la misma ración alimenticia para permanecer con una condición corporal ≤ 2.0 y en anestro durante todo el estudio. El pesaje de las vaquillas se realizó semanalmente, mientras que la condición corporal se evaluó cada dos semanas mediante la técnica descrita por Richards *et al* (1986). Además, con base a los cambios de peso vivo se ajustaron los ingredientes de la dieta cada 15 días.

El ciclo estral de las vaquillas que se encontraban ciclando fue sincronizado con un análogo de PGF₂ α 15 mg por dosis-prosolvin, (Luprostol, Lab Intervet). El estro fue detectado por observación continua entre las 24 y 100 horas posteriores al tratamiento de PGF₂ α .

Mediante ultrasonografía se detectó el día de la ovulación (día 0). En el día 3 del ciclo estral, se efectuó la ovariectomía unilateral en el ovario que manifestó la ovulación y formación del cuerpo hemorrágico. Igualmente, para el grupo de vaquillas que se encontraban en anestro, se practicó una ovariectomía unilateral 3 días después de haber iniciado una oleada folicular (crecimiento notable de folículos reclutados y seleccionados) para coincidir con la dinámica folicular de las vaquillas ciclando. Los ovarios fueron embebidos con parafina y almacenados a -20°C hasta su utilización.

3.1.3 Templado

El ADNc que codifica para un fragmento de 573 bp de P450 aromatasa y el ADNc que

codifica para un fragmento de 730bp del receptor para LH, se clonaron en el plásmido pBluescript II SK (pBlueScript® II Phagemid Vector, Stratagene) en el sitio de Sma1 y fueron donados amablemente por el Dr Armstrong.

3.1.4 Transformación del plásmido

Se transformaron 40 ng de plásmido recombinante en células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH10B. Esta mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, un minuto a 42°C y posteriormente 2 minutos en hielo. Se adicionó 900 µg de medio Luria Bertani (LB) y se incubó por una hora a 37°C. Se espatularon 100µl de la mezcla en placas de medio LB agar, suplementando con ampicilina 100 µg/ml, Xgal e IPTG 266µg/ml e incubando a 37°C por 24 horas. Se identificaron las clonas que indujeran la expresión del gen reportero Lac Z a partir de la observación de las colonias de *E coli* recombinantes (colonias blancas). Las clonas obtenidas se preservaron en LB- ampicilina (100µg/ml)/ glicerol 16% a -70°C.

3.1.5 Extracción de ADN de plásmido (Minipreparaciones)

El ADNc transformado se aisló en pequeñas cantidades, primeramente a través del protocolo de minipreparación (Sambrook et al., 1989). Una colonia recombinante de cada plásmido se cultivó en 3 ml de LB-Ampicilina (100µg/ml) durante toda la noche a 37°C en agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 12, 000 rpm durante 6 minutos. Se recuperó la pastilla la cual se resuspendió en 200 µl de solución de lisis (Sacarosa 8%, Tritón X-100 5%, EDTA 50mM, Tris-HCL pH 8) incubando 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Se agregó Lisosima (1.5 µg/ml) incubando 10 minutos a TA y posteriormente a 98°C por un minuto. Después de centrifugar 12, 000 rpm, 10 minutos,

se recuperó el sobrenadante adicionándole ARNasa (10µg/ml) incubando a 37°C por 30 minutos y Proteinasa K (50µg/ml). Se incubó a 65°C por 30 minutos y se precipitó con dos volúmenes de etanol frío. Nuevamente se centrifugó a 14, 000 rpm por 5 minutos y después de decantar se le adicionó a la pastilla 100µl de etanol 70% y se centrifugó a 14, 000 rpm por 5 minutos. Después de decantar el etanol se resuspendió el ADN en 50 µl de H₂O y se cuantificó por fluorometría. Posteriormente se purificaron usando columnas de Qiagen (QIAfilter Plasmid Midi Kit) siguiendo las indicaciones del proveedor.

3.1.6 Restricción del ADNc

Mediante la restricción con *Eco RV* en el promotor T3, se obtuvo el antisentido para los ADNc de P450aromatasa y LHR y con *Xba I* en el promotor T7 se obtuvo el sentido para ambos. Las restricciones se llevaron a cabo preparando las mezclas de reacción de la siguiente manera:

Para ambas muestras se utilizaron 10µg de plásmido, 20 µl de amortiguador 10X (Amortiguador 2, *New England, Bio Lab*), 1U/ug de la enzima *Eco RV* (*New England, Bio Lab*), 1mM de espermidina y el volumen se ajustó hasta 200µL con H₂O desionizada (dH₂O) y estéril. Una alícuota de la digestión se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X (TRIS base 10.8 g, Ácido bórico 5.5 g, EDTA 0.5M, 10 g). Las condiciones de electroforesis fueron: 85 V durante 30-40 minutos.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 µg/mL) y se fotografiaron (*Digital Graphic Printer, UD-D860, Sony*). Las masas moleculares de los plásmidos recombinantes pBluescript +P450aromatasa y pBluescript de LHR se determinaron utilizando como marcador de peso molecular λ ADN BstE II Digest (*ADN tamaño estándar New England,*

Bio Lab).

Los plásmidos linealizados por digestión se purificaron con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol/isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa, se mezcló con un volumen de cloroformo: alcohol/isoamílico (24:1), se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 10 minutos y la fase acuosa se precipitó con dos volúmenes de alcohol absoluto, incubando una hora a -20°C . Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, se decantó y se lavó con EtOH al 70%. Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos, se decantó y se resuspendió en 50 μl de agua estéril y se cuantificó.

3.1.7 Transcripción in vitro

Las sondas antisentido y sentido fueron sintetizadas *in vitro* y marcadas radioactivamente con 5' (^{35}S) rUTP (10mCi/ml) utilizando un producto comercial de transcripción (*Riboprobe Systems, PROMEGA*). Se transcribieron sondas antisentido y sentido de plantillas de ADNc para generar ARN marcado utilizando la polimerasa T3 en antisentido y T7 en sentido. El protocolo de transcripción *in vitro* fue el siguiente: Se agregan amortiguador de transcripción 1X, DTT 100 mM, ARNsin (20 U/ μl), la mezcla de nucleótidos 10 mM: rATP, rGTP, rCTP (10 mM) y rUTP (100 μM). El ADN de P450aromatasa y LHR (0.2 mg/ml), RNA polimerasa T3 y T7 (15 U/ μl), Se agregaron 5' (^{35}S) rUTP (10 $\mu\text{Ci/ml}$). Se incubó a 37°C por una hora. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron con TCA 5%. Se tomó 1 μl de la dilución 1:10 de la sonda marcada y se colocó en filtros (Whatman GF/A, 24 mm). Se diluyó la sonda marcada 1:10 y se mezcló con 100 μL de esperma de salmón y 0.5 ml de TCA 5% por 5 minutos. Se lavó dos veces

con 5 ml de TCA 5% frío y se enjuagó con 2 ml de acetona y se llevó a un contador de centelleo.

3.1.8 Hibridación

El tejido ovárico a hibridar conteniendo al folículo de mayor tamaño presente se cortó histológicamente (10 μm de espesor) utilizando un microtomo. Las secciones se montaron en laminillas y se fijaron con formaldehído al 4%, se enjuagaron con PBS 1X por 5 minutos. Posteriormente se deshidrataron con pasos sucesivos de EtOH al 60, 80, 95 y 100% por 2 minutos cada uno. Se incubaron en SSC 2X por 5 minutos, TriE/HCL/AA por 10 minutos, SSC 2X por 3 minutos y EtOH al 60, 80, 95 y 100 % por 2 minutos y se secaron al aire.

Para la hibridización, las sondas de ARN (^{35}S) se diluyeron alrededor de 2×10^7 cpm/ml en amortiguador para hibridación (formamida 50%, NaCl 0.3M, Tris (pH 8.0) 10mM, EDTA (pH 8.0) 1mM, solución Denhardt's 1x [Ficol 0.02, PVP 0.02% y BSA 0.02%], DTT 10mM, ARNt 500 $\mu\text{g/ml}$ y sulfato dextran 10%). Se utilizaron 50 μl de la sonda diluida sobre cada sección de tejido, se cubrieron con parafilm y se mantuvieron a 55°C por 20 hrs para hibridizar.

Posterior a la hibridización, los portaobjetos con el tejido se lavaron dos veces en SSC 2X (45° C), SSC 2X a temperatura ambiente (TA) por 15 minutos y se tratarán con RNAsa A (50 $\mu\text{l/ml}$ en 2X SSC) por una hora a 37°C. Las laminillas se lavaron a 55°C en SSC 2X conteniendo β -ME 0.1% por 15 minutos, SSC 1X con 50% de formamida y 0.1% de β -ME por 30 minutos, y dos veces en SCC 1X/ β -ME 0.1 X por 15 minutos. Los portaobjetos se secaron al aire. Se colocaron en una emulsión Kodak NTB-2 (*Kodak products*) por 2

semanas para el LHR y por 3 días para P450 aromatasa a 4°C. Posteriormente se revelaron los portaobjetos y se observaron en el microscopio óptico. Esta metodología se siguió según el protocolo descrito por Xu *et al.* (1995 a y b).

La hibridación *en situ* es una técnica que se utilizó para determinar la expresión de P450 aromatasa y receptor para LH. Consistió en marcar una sonda en antisentido y un control en sentido, que detectaría el ARN de interés con una marca radiactiva. La sonda se incubó con el tejido para luego ser detectada y visualizada en un microscopio óptico. Por lo anterior la calidad del tejido es un factor importante y cuánto del mismo se ha fijado. En esta técnica, no se puede tener información acerca de la integridad del ácido nucleico, por lo que es esencial la buena preservación del tejido. Probablemente el proceso de fijado en parafina y el almacenamiento de las muestras embebidas en parafina por mas de dos años a 4°C pudo haber ocasionado la degradación de ARN en el tejido por lo que no se observaron resultados. Por lo anterior se buscó la utilización de tejido fresco de folículos de ovarios de animales recientemente sacrificados, utilizando además la técnica de northern blot que sí permite evaluar la integridad del ARN y la caracterización de la expresión de genes.

3.2. EXPRESIÓN DE P450AROMATASA Y LHR EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE BOVINO POR NORTHERN BLOT

3.2.1 Animales

Se seleccionaron 5 vacas de condición corporal baja (CC:1.0-2.0) y que no estuvieran ciclando (Grupo 1) y 5 vacas con condición corporal media de 2.5-3.5 y ciclando (Grupo 2). Se tomó como criterio de ciclicidad la presencia de un CL en cualquiera de los dos ovarios. Al sacrificio se identificó nuevamente la vaca y se colectó hígado como control negativo y ambos ovarios. Se separaron el cuerpo lúteo y el folículo dominante del resto del ovario. Inmediatamente después, los ovarios se congelaron con nitrógeno líquido, se colocaron sobre hielo seco y se transportaron al laboratorio.

3.2.2 Aislamiento de ARN

El aislamiento de ARN se realizó a partir de 50-100mg de folículo dominante del ovario de bovino sacrificado recientemente. El tejido se pulverizó con un homogenizador Polytron PT 10-35 adicionándole 1 ml de TRIpure (TRIpure Isolation Reagent, Roche Molecular Biochemiclas). Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionó cloroformo (200 ul) y se incubó 15 minutos a TA. Se centrifugó 10,000rpm/15'/2°C. Se adicionó isopropanol 500 µl, se incubó por 30 minutos a 4°C. Se centrifuga 10,000rpm durante 10 minutos a 4°C y se lava a continuación con etanol al 75%, se centrifuga 10,000 rpm por 5 minutos y se le agrega H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.01%. Se cuantificó con relación 260/280.

3.2.3 Electroforesis con gel desnaturizante

La integridad del ARN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Agarosa 1%, MOPS 10X, formaldehído 6%). Se colocó 10 μ g de ARN en un cocktail (MOPS 10X, formaldehído 15%, formamida 40%) y amortiguador de carga (formaldehído 6%, formamida 50%, MOPS 1X, azul de bromofenol 0.25%). Se desnaturizó a 55°C por 10 minutos colocando la muestra inmediatamente en hielo. Se utilizó MOPS IX como amortiguador de corrida. Se corrió la electroforesis del gel a 5V por cada centímetro de longitud del gel, deteniendo la corrida hasta que el amortiguador de muestra migró aproximadamente hasta el 80% de la longitud del gel. El gel se tiñó con bromuro de etidio en H₂O tratada con DEPC y el ARN se visualizó a través de luz UV. Se enjuagó en SSC 10X (175.3 g NaCl, 88.2 g Na Citrato, 800 ml ddH₂O).

3.2.4 Transferencia de ARN en Northern Blot

El ARN se transfirió a una membrana de nylon (ICN, Biotrans Nylon Membranes, CA) mediante un dispositivo de transferencia (Posiblot 30-30 pressure Blotter and pressure control system) a una presión de 75 mm Hg por dos horas y posteriormente se fijó el ARN en la membrana con luz UV (Stratalinker UV Crosslinker) por 40 segundos.

3.2.5 Marcaje de ADNc con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimersasa PCR

El ADNc se amplificó bajo las condiciones de alineación que se muestra en el anexo II. El ADN amplificado por PCR se marcó con dATP (α -³²P) 10 μ Ci/ μ l. Las sondas marcadas se separaron de los dATP (α -³²P) no incorporados por centrifugación a través de minicolumnas con Sephadex G-50. Posteriormente se determinó el porcentaje de

incorporación tomando 2 μ l del producto de PCR antes y después del filtrado con filtros (Whatman GF/A 24 mm) y se cuantificaron. Posteriormente se determinó el porcentaje de incorporación y la actividad específica de la sonda:

$$\text{cpm totales /cpm incorporadas (50)}$$

3.2.6 Pre- hibridación e Hibridización.

Se pre-hibridizó la membrana por al menos 2 horas a 68°C en amortiguador de hibridación (SSC 6X, Denhardt's 2X y SDS 0.1%). Posteriormente se adicionó la sonda radiomarcada con al menos 1×10^6 cpm/ml directamente al amortiguador de hibridación a 68°C en un aparato de hibridación (UVP Lab Products, Hibridizer HB-1000) toda la noche. Al día siguiente se lavaron las membranas dos veces en SSC 0.1X, SDS 0.1% a 68°C por 20 minutos cada uno. Se expuso a continuación a una película para obtener la imagen (Phosphoimager) por dos horas.

En la técnica de northern blot, las moléculas de ARN tienen que ser separadas por electroforesis y transferidas a una membrana, para a continuación detectar secuencias específicas por medio de sondas marcadas de ADNc. Esto implica un paso más en el que se expone el ARN a contaminación por ARNasas. Primero se tiene que confiar en una transferencia óptima de ARN del gel hacia la membrana y en la permanencia del mismo a través de la fijación del ARN a la membrana con luz UV. Una técnica que evita la transferencia de ARN a la membrana y permite determinar si la muestra contiene la secuencia de ácidos nucleicos buscada es el Dot Blot (Hibridación sobre mancha). El ARN

fijado en una membrana se enfrenta directamente con la sonda marcada cuya secuencia reconoce y se unirá específicamente a la muestra (Darling y Brickell, 1994). El Dot blot permite conocer la integridad del ARN ya que antes de utilizarlo en la técnica se visualiza en un gel de agarosa al 1%, de tal manera que se utiliza el ARN de la calidad que se ha observado anteriormente.

3.3. EXPRESIÓN DE P450AROMATASA Y LHR EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE BOVINO POR DOT BLOT

3.3.1 Aislamiento de ARN

El aislamiento de ARN se realizó a partir de 50-100mg de folículo dominante del ovario de bovino a través del método estándar con TRIpure Isolation Reagent (Roche Molecular Biochemiclas) tal como se describió en el northern blot.

3.3.1 Preparación de las muestras de ARN

Se utilizaron muestras de ARN a una concentración de 10 µg. Se le agregó amortiguador desnaturizante (formamida 50%, formaldehído 6% y MOPS 1X). Se desnaturizó el ARN por 5 minutos a 100° C colocándose inmediatamente después en hielo.

3.3.2 Dot Blot

La membrana húmeda con H₂O-DEPC se colocó en el dispositivo de gota sobre un filtro (Whatman 3 mm) con amortiguador de NaOH 0.3M. Consecutivamente se transfirieron las muestras a la membrana colocándolas en el centro de cada círculo del dispositivo. A

continuación se procedió a fijarla con luz UV (Stratalinker UV Crosslinker) por 40 segundos.

El marcaje de ADN por PCR, la pre hibridación así como la hibridación se realizaron de manera similar a lo descrito anteriormente en el northern blot.

Debido a que no se obtuvo hibridación en las técnicas mencionadas anteriormente, en las que se tomó especial cuidado en mantener la integridad del ARN, se pensó en que probablemente existe una falla en la secuencia del ADNc con el que se trabajó en todos estos experimentos. Por lo anterior, se procedió a secuenciar el ADNc de P450aromatasa y receptor para LH (Instituto de Biotecnología, UNAM).

CAPITULO IV

RESULTADOS

Puede ser cierto en la teoría pero no vale en la práctica

Kleineno Schriftenzur

4.1 HIBRIDACIÓN IN SITU

4.1.1 Dinámica folicular.

Al inicio del programa de restricción nutricional todas las vaquillas se encontraban ciclando. En vaquillas a las que se les indujo a anestro, el cese de ciclicidad ocurrió 60 ± 5 días después de iniciada la restricción de nutrientes, cuando las vaquillas perdieron entre 15 y 18 % de su peso vivo inicial. Se observó diferencia significativa ($P < 0.01$) al compararse el índice de crecimiento del folículo dominante de vaquillas en la etapa de transición hacia la ciclicidad y vaquillas ciclando (1.1 ± 0.07 y 1.1 ± 0.04 mm/día respectivamente), respecto a vaquillas en transición al anestro y en anestro (0.70 ± 0.10 y 0.66 ± 0.07 mm/día respectivamente). Esta diferencia ($P < 0.01$) también se observa en relación con el número de folículos pequeños y medianos, donde se observa un menor número en vaquillas en transición hacia el anestro y en anestro (9.0 ± 0.70 y 10.3 ± 0.04) en comparación con vaquillas en la etapa de restricción nutricional, transición a la ciclicidad y ciclicidad (11.7 ± 0.52 , 11 ± 0.49 y 11.1 ± 0.27 , León, 2003).

4.1.2 Restricción de ADNc de P450aromatasa y LHR en pBlueScript con Eco RV en orientación antisentido y XBA1 en orientación en sentido.

Como es deseable copiar solamente la secuencia de ADNc, el plásmido se linealizó a través de la enzima *Eco RV* en orientación antisentido para P450aromatasa y LHR (Figura 2 y 3) y con la enzima *Xba 1* en orientación en sentido (Figura 4 y 5) para ambos ADNc. Después de la restricción se obtuvieron $44 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de ADNc de P450 aromatasa y $224 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de ADNc

de receptor para LH purificados con fenol: cloroformo: alcohol: isoamílico. Se obtuvieron 10 μg para P450aromatasa y 2 μg para LHR después de la restricción con *XbaI*.

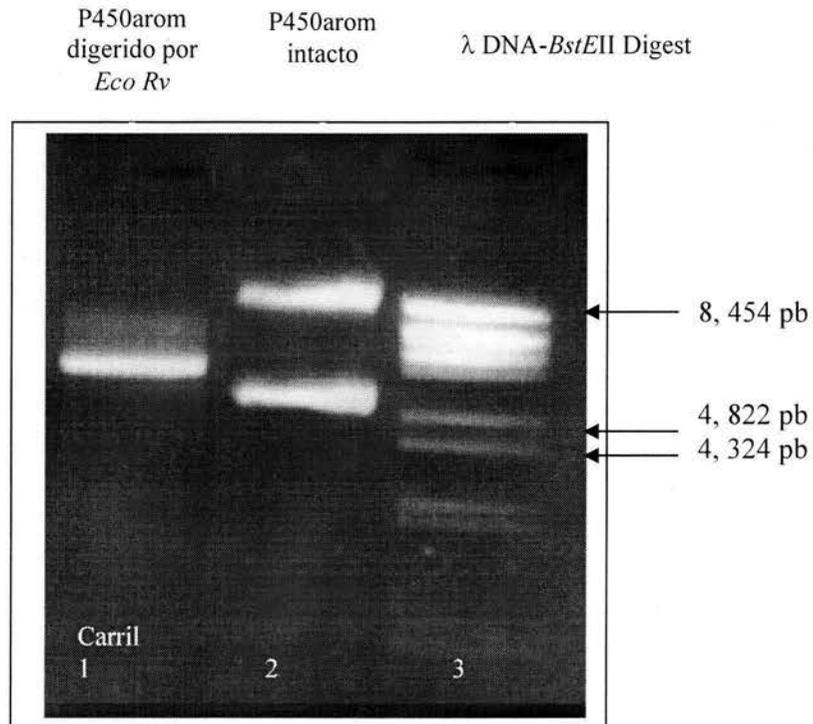


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) del producto de digestión de P450 aromatasa con *Eco RV* en el primer carril en orientación antisentido y en el segundo carril P450aromatasa intacto. En el tercer carril se observa el marcador de peso molecular λ DNA-*BstEII* Digest.

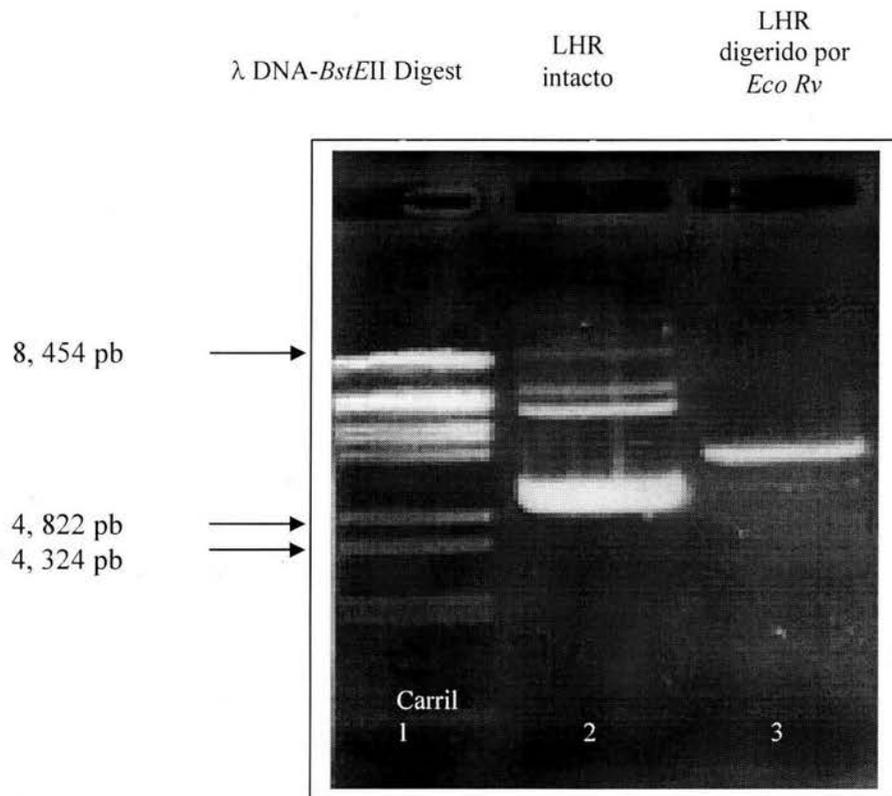


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) de productos de digestión de receptor para LH con *Eco Rv* en orientación antisentido, el cual se muestra en el tercer carril, en el segundo carril LHR intacto y en el primer carril λ DNA-*BstEII* Digest.

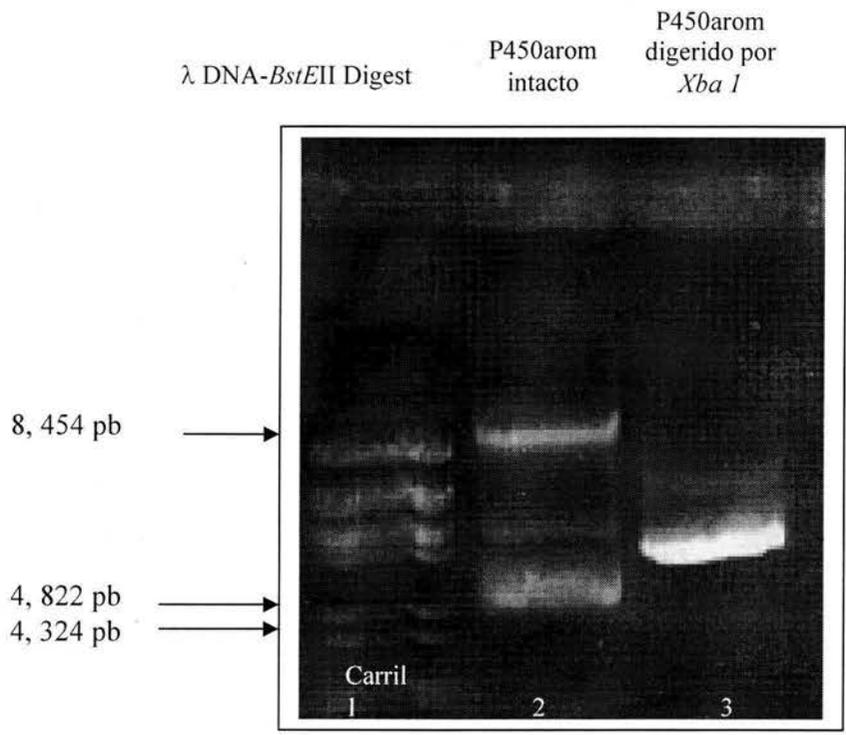


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) de productos de digestión de P450 aromatasa con *Xba I* en orientación en sentido, el cual se observa en el tercer carril, en el segundo carril P450aromatasa intacto y en el primer carril λ DNA-*BstEII* Digest.

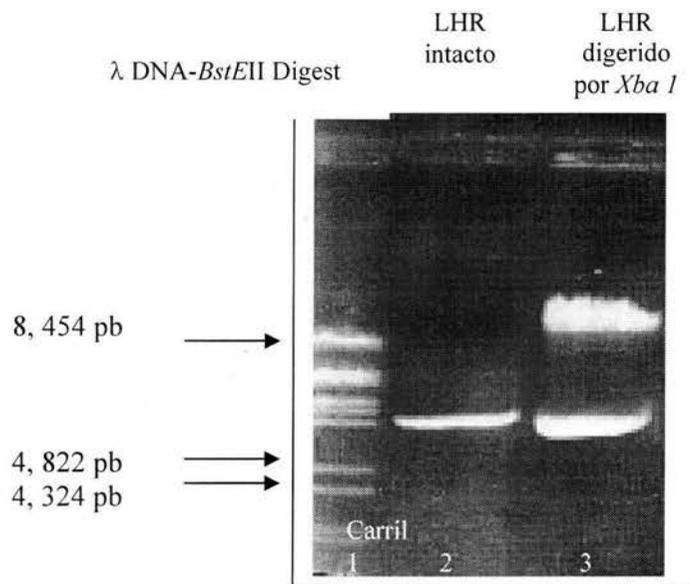


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) de productos de digestión de receptor para LH con *Xba I* en orientación en sentido (segundo carril) y LHR intacto (tercer carril). En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular λ DNA-BstEII Digest.

Después de linealizar el plásmido, el ADNc restringido se utilizó como plantilla para generar ARN marcado (utilizando la polimerasa T3 en antisentido y T7 en sentido) y poder hibridar el tejido con esta sonda radiomarcada. Después de la hibridación no se observó hibridación para el ARNm de P450aromatasa y LHR en los folículos ováricos.

4.2. NORTHERN BLOT

4.2.1 Extracción de ARN a partir de muestras de folículo dominante de ovario de vacas en diferente condición corporal.

El ARN obtenido de cada grupo (animales sin ciclar: Grupo 1 y animales ciclando: grupo 2) se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280nm, obteniéndose valores que se presentan en el cuadro 1, donde se indican las concentraciones en μg de ARN.

Cuadro 1. Cuantificación de ARN extraído de folículos de ovario de vacas sin ciclar (grupo 1) y de vacas ciclando (Grupo 2).

Grupo 1	D.O., 260nm	D.O 280nm	Relación 260/A280	ARN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1-1-A	0.080	0.048	1.7	3.4
3-1-A	0.070	0.079	1.5	2.85
7-1-A	0.052	0.032	1.7	2.05
8-1-N	0.033	0.017	1.8	1.45
9-1-N	0.033	0.016	1.7	1.55
Grupo 2				
1-2-A	0.110	0.077	1.62	3.5
2-2-A	0.073	0.044	1.7	2.7
4-1-N	0.043	0.024	1.7	2.0
4-2-N	0.083	0.049	1.6	3.55
5-1-A	0.059	0.040	1.6	2.15
Hígado control (-)	0.257	0.162	1.57	10.4

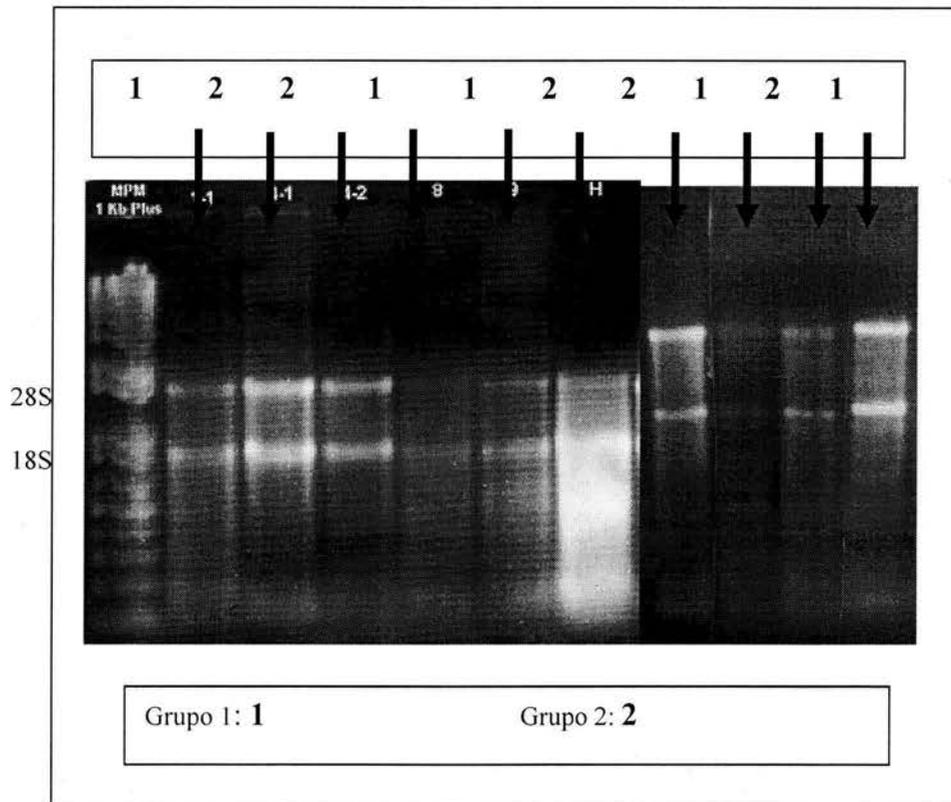


Figura 6. Electroforesis de ARN extraído de folículos de ovarios de vacas anéstricas (grupo 1) y vacas ciclando (Grupo 2). El ARN obtenido de los ovarios de las vacas se separó en un gel de agarosa-formaldehído y se tiñó con bromuro de etidio. En el carril número uno se observa el marcador de peso molecular. En el resto de los carriles el ARN total. Denotándose dos bandas correspondientes a las dos subunidades ribosomales (28S y 18S respectivamente).

4.2.2 Amplificación de ADNc producto de la alineación por PCR.

Mediante PCR se obtuvo un producto de amplificación correspondiente a los ADNc generados a partir del iniciador M13 Universal que se muestran en la figura 7. Este producto fue marcado con radioactividad produciendo una sonda específica de ADNc, capaz de reconocer la secuencia de ARN de P450 aromatasa y LHR, uniéndose a ella para formar de nuevo la doble cadena.

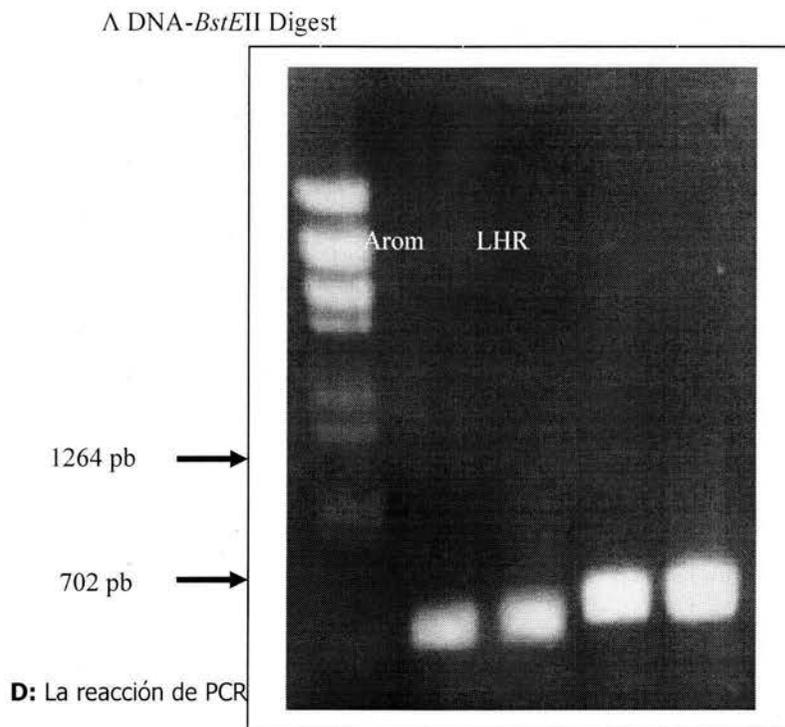


Figura 7. Electroforesis de los productos de la amplificación por PCR de ADNc para P450aromatasa y LHR en pBlueScrip. En el carril número 1 se observa el marcador de peso molecular λ DNA-*BstEII* Digest, en el carril 1 y 2 P450aromatasa y en el carril 3 y 4 LHR.

Sin embargo, no se observó la presencia de una secuencia complementaria en la muestra al exponerse a phosphoimager o un film de Rayos X. Esta sonda también se utilizó para la prueba de Dot Blot, sin encontrar hibridación en su evaluación.

Debido a la falta de hibridación en northern y dot blot y a pesar de la buena calidad de ARN (Figura 4) se decidió secuenciar el ADN para corroborar que fuera correspondiente a las secuencias buscadas.

4.3. SECUENCIACIÓN DE ADN DE P450AROMATASA Y LHR

La secuencia se comparó con el programa Chromas (Versión 1.62, Technelysium) que permite verificar el electroferograma y determinar las bases que no fueron reconocidas por el secuenciador automático. La secuencia corregida se comparó con los datos obtenidos de GenBank (NCBI, Home Page National Center for Biotechnology Information) con la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). En este programa se observó la similitud de la secuencia obtenida con secuencias que han sido reportadas anteriormente de otros organismos. En este punto, las secuencias de P450aromatasa y receptor para LH no se encontró similitud con las secuencias reportadas.

Las secuencias de los ADNc obtenidos se integraron al programa Contig Manager del paquete DNASIS (Windows versión 2.6 DNA and Protein Séquense Análisis System, Hitachi Software Engineering America LTD) para poder ser comparadas.

4.3.1 P450aromatasa

La secuencia obtenida de ADNc de P450aromatasa se alineó con la secuencia reportada por Vanselow y Furbass (1995) a la cual se refiere el GenBank No Z3274 y a continuación se muestran los resultados de alineación.

Longitud total de secuencias alineadas de 5 224 bps

Bases apareadas : 502/5 224 (9%)

Gaps: 4236/5 224 (81%)

Homología local bloqueada en este alineamiento: 0

4.3.2 Receptor para LH

Se alineó la secuencia enviada de receptor para LH con la secuencia previamente reportada por Lussier *et al.* (1995) referida en el GenBank No U20504 *Bos taurus luteinizing hormone receptor mRNA*.

Longitud total de secuencias alineadas de 2 775 bps

Bases apareadas : 412/2 775 (14%)

Gaps: 1958/2 775 (70%)

Homología local bloqueada en este alineamiento: 0

Estos resultados nos muestran que no hay similitud de pares de bases de las secuencias de P450aromatasa y receptor para LH obtenidas, comparadas con las secuencias reportadas previamente por Vanselow y Furbass (1995) y por Lussier *et al.*, (1995).

Esto indica que el ADNc utilizado para estos experimentos probablemente no haya sido el adecuado. Una manera de identificar la presencia de ARN buscado es la reacción en

cadena de la polimerasa- transcripción reversa (Reverse Trancription Polymerase Chain Reaction: RT-PCR).La RT-PCR es una técnica que simplifica y acelera el proceso de cuantificación reproducible de ARNm y también se utiliza para caracterizar patrones de expresión de ARNm. Como el ARN no sirve como templado para una PCR, el primer paso es la trascripción reversa del templado de ARN a ADNc y a su amplificación exponencial en una reacción de PCR. (En el anexo III se encuentra la secuencia de pares de bases del ADNc de P450aromatasa y LHR comparadas con la secuencia reportada por Vanselow y Furbass, (1995) y Lussier et al., (1995) respectivamente). Los iniciadores se diseñaron con base a la secuencia de β -Actina (GenBank con No. AY141970, Suchyta *et al.*, 2002), P450aromatasa y receptor para LH de bovino reportada por Vanselow y Furbass (1995) y Lussier et al., (1995) respectivamente (Cuadro 2). Por carencia de tiempo no se expondrán los resultados obtenidos a través de esta técnica en esta tesis. Estos iniciadores tienen la siguiente secuencia.

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores diseñados para la detección de P450aromatasa y LHR en folículos de ovario de vacas sin ciclar y vacas ciclando.

Iniciadores	Secuencia
β ACTINA F	ATATTGCTGCGCTCGTGGTC
β ACTINA R	CATAGATGGGCACCGTGTGG
P450AROM F	TCGTCCTGGTCACCCTTCTG
P450AROM R	TCTCCTGCCTAGCTGACAAC
LHR F	GCCTGGAGAAGATGCACAAC
LHR R	AGGCAATGAGCAGCAGGTAG

F: Forward **R:** Reverse

CAPITULO V

DISCUSIÓN

Cada afirmación, en este oficio, atrae más preguntas que las que le dieron origen, por lo que el interminable juego de la ciencia se reinicia permanentemente con una interrogación.

Kurt Mendelssohn

Como un delicado sistema de causa y efecto, muchos de los mecanismos concernientes a la supervivencia, crecimiento y diferenciación celular son el resultado de diferentes patrones de expresión de genes. En reproducción el arsenal de técnicas moleculares encontró eco en esta área, llevando progresivamente desde las primeras detecciones de expresión de genes en órganos como el ovario y el testículo hasta la clonación exitosa de mamíferos.

El estudio de la expresión de ARN se vio rápidamente implicada en investigación básica y aplicada en reproducción, con metodologías como el northern blot, dot blot, la hibridación *in situ* y el RT-PCR. Hasta el momento la principal desventaja del trabajo con ARN es su alta sensibilidad al manejo y su fácil degradación, que lleva a la continua mejora de las técnicas, no siempre con resultados favorables.

El análisis de hibridación *in situ* es un método complejo que permite la localización de transcritos en células específicas directamente sobre el tejido. En la presente investigación se planteo como primera opción, en vista de sus ventajas. Aunque los resultados fueron diferentes a lo esperado, la implementación de esta técnica amplía el potencial de trabajos futuros donde puede ser aplicada.

La hibridación se llevo a cabo como lo describieron Xu *et al.* (1995 a y b). Diferentes factores determinan el resultado óptimo de la sonda para su utilización en experimentos de hibridación. Se requiere que el ácido nucléico del tejido se desnaturalice para que la sonda pueda tener acceso al mismo, tratando de preservar la morfología del tejido, por lo que la calidad del tejido y cuánto del mismo se ha fijado es esencial (Ivell, 1998). Por lo anterior es importante utilizar tejido bien preservado y tratar de que este sea fijado adecuadamente al portaobjeto. En esta investigación, el tejido con el que se trabajó

estaba incluido en parafina, el proceso para desparafinarlo involucró un paso más de manipulación lo que aumenta el riesgo de contaminación y de disminución en la calidad del ácido nucléico de la muestra. En tejidos embebidos en parafina, la sensibilidad de la técnica disminuye, por lo que se han mejorado la detección de ARNm y ADN a través de un tratamiento llamado "microonda", que consiste en el calentamiento de las secciones de tejido por 15- to 20-minutos en 800-W en amortiguador sodio citrato 0.01M, pH 6.0 (Sperry *et al.*, 1996).

Para esta técnica, se utilizaron sondas antisentido de un solo filamento (ribosondas), pero, en la práctica, muchos científicos utilizan oligonucleótidos por su tamaño de 300pb, son, en teoría, más fáciles de hibridar (www.GeneDetect.com). Igualmente, se aplicó una sonda similar pero en sentido como control. Lo que se asume es que el filamento en sentido tendrá el mismo índice y distribución de GC que la sonda contrasentido, por lo que no codifica cualquier producto y se puede verificar la unión específica del ácido nucléico. Sin embargo, esto sólo es verdad, si la linealización del plásmido utilizado para la transcripción *in vitro* es verdaderamente complementaria, ya que algunas sondas se preparan cortando en un sitio de restricción interno. Si el producto de la transcripción en sentido y en antisentido no son complementarios, el llamado control en sentido podría ser reemplazado efectivamente por alguna secuencia aleatoria (Ivell, 1998).

Otra característica relacionada con el hibridación *in situ*, se relaciona a la cuantificación. Las sondas de ADNc marcadas radioactivamente claramente proveen una señal lineal. Se ha sugerido que se puede obtener una mejor visualización microscópica usando sondas no radiomarcadas con digoxigenina, ya que proveen el mismo grado de sensibilidad que la

sonda radio marcada con ^{35}S , el cual manifestó una débil expresión del ARN, así como mucho trasfondo (Komminoth *et al.*, 1992). Sin embargo, la sonda marcada no radioactivamente es menos sensible que la sonda radiomarcada, ya que con ésta se detecta una fuerte señal que implica la presencia de ARN de interés. En este trabajo la sonda se marcó con ^{35}S y en las laminillas se advirtió considerable trasfondo, aunque probablemente también se deba a las relaciones lineales de la sonda con el ARN buscado. Estas relaciones se rompen si las sondas radioactivas se visualizan por autoradiografía. En esta investigación, el receptor para LH estuvo con un tiempo de exposición de 15 días y P450 aromatasa 3 días, tal como lo describen Xu *et al.* (1995a y b), Bao *et al.* (1998a y b). A este respecto, Ivell (1998) muestra que el film autoradiográfico tiene una capacidad limitada para convertir la emulsión en granos de plata, las señales muy fuertes llevan a la saturación de la emulsión fotográfica y a una señal no lineal a las relaciones con el ARN buscado.

Con la experiencia obtenida se propone mejorar el procedimiento con la utilización de un procesador digital de imágenes que nos determine si la hibridación fue tan baja que no pudo ser detectada con el microscopio óptico.

En la hibridación *in situ* no se puede conocer si la integridad del ácido nucléico a los que se va a unir la sonda es la óptima, prácticamente hasta el final del experimento se asume que así es y el tiempo de espera entre cada experimento es largo. Por ello se planteó utilizar un método que también permitiera identificar y localizar secuencias complementarias a la sonda. El northern blot es una técnica que permite tener conocimiento de la integridad del ARN en la mayoría de los pasos del protocolo, y también

se utiliza para la caracterización de la expresión de genes. Mucho de lo que se ha discutido arriba es igualmente importante para la detección de transcritos de ARNm por northern blot. Este método se refiere al ARN después de una electroforesis en un gel de agarosa, transferido a una membrana e hibridado con una sonda de ADN radio marcada (Berger, 1987). En el northern blot la posibilidad de que el ARN se degrade durante el proceso es latente y no controlable. Desde la obtención, la electroforesis y la transferencia se observaron todas las normas de manejo correcto de ARN. Hasta este paso, se puede controlar la cantidad y la degradación del ARN, pero no así la transferencia a la membrana de nylon, por lo que para asegurar su calidad se requiere esperar y observar el resultado. La nula señal de hibridación tanto de la sonda del receptor para LH como de P450aromatasa, así como de la sonda control de β actina, indican la necesidad de modificar la técnica desde la obtención del ADN hasta la transferencia e hibridación. El resultado fue que esta técnica se aplicó por primera vez en el laboratorio permitiendo su posterior perfeccionamiento.

En la técnica de northern blot es necesaria la transferencia de ARN del gel hacia la membrana de nylon, un paso más que involucra manipulación del ARN. Una técnica que se utiliza cuando el objetivo es conocer las cantidades relativas de un ARN específico, en diferentes tejidos o estados de desarrollo es el dot blot. En esta investigación se empleó esta metodología para evadir la transferencia de ARN del gel a la membrana, evitando un paso más en el que es posible su degradación.

Al no observarse hibridación en P450aromatasa y receptor para LH se decidió secuenciar el ADN de los mismos. Los resultados obtenidos de las secuencias indicaron que el ADN utilizado para estos experimentos probablemente no haya sido el adecuado. Por lo

anterior, la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es un método que permitirá la la detección de los genes del receptor para LH y P450aromatasa en ARN proveniente de muestras de ovarios frescos y para obtener nuevas sondas con miras a utilizarlas en el northern blot y la hibridación *in situ*.

Los resultados a esperar son: la síntesis de los ADNc del receptor para LH y P450 aromatasa verificados en electroforesis de acuerdo a su peso molecular y secuencia de pares de bases. Esto permitirá su clonación para su manipulación posterior.

De esta manera, conociendo el origen y calidad de las sondas y con la experiencia obtenida en el hibridación *in situ*, northern blot y dot blot el presente trabajo tendrá las evidencias para soportar la hipótesis inicial.

CAPITULO VI

CONCLUSION

Pero entonces la ciencia es mucho más un proceso de aprendizaje. Al mismo tiempo es una cuestión de creer que exista una evidencia alternativa o evitar destruir la convicción

Ivell, 1998

Se concluye que las metodologías utilizadas pensadas como indicadas en primer termino no contaron con suficientes resultados para verificar la hipótesis.

El trabajo fue realizado con base en referencias de autores con experiencia en el área. Sin embargo se llega al punto de proponer nuevas metodologías como soluciones que puedan llevar a cumplir los objetivos.

Se propone realizar nuevamente la hibridación *situ*, northern blot y el dot blot con sondas verificadas por secuencia y con sonda control (β actina) que permitirá posibles puntos para confirmarlos resultados.

Se propone el PCR en tiempo real como el próximo paso para poder determinar en el caso de la hibridación *in situ* si la expresión es tan baja pero presente, pero que requiera de un sistema mas sensible de detección. Esta técnica tendrá la ventaja de la poca manipulación del ARN para evitar su posible degradación como se observo en el northern blot.

En el campo de la ciencia conforme avanza el conocimiento aparecen nuevas interrogantes. El presente trabajo permitió observar el amplio panorama que se vislumbra para resolver una pregunta, en este caso la cuestión fue la expresión de los genes de receptor para LH y P450 aromatasa en folículos de ovario de bovino ciclando y con anestro nutricional.

Las preguntas serán resueltas aunando la experiencia obtenida y nuevos acercamientos, para conocer como los genes de P450aromatasa y receptor para LH se involucran en un sistema causa efecto donde su expresión es resultado de las interacciones de mecanismos genéticos que cada día responden preguntas pero definen nuevas interrogantes.

CAPITULO VII
BIBLIOGRAFIA

1. Abdennebi L, Monget P, Pisselet C, Remy JJ, Salesse R, Monniaux D. 1999. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. *Biol Reprod.* 60:845-854.
2. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. 1992 Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94:177-188.
3. Adams NR, Briegel JR, Rigby RD, Sanders MR, Hoskinson RM. 1996. Responses of sheep to annual cycles in nutrition. Role of endogenous growth hormone during undernutrition. *Anim Sci.* 62: 279-286.
4. Akhtar M, Njar VC, Wraith JN. 1993. Mechanistic studies on aromatase and related C-C-bond cleaving P450 enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 44: 375-387.
5. Akhtar M, Robichaud PL, Akhtar ME, Wraith JN. 1997. The impact of aromatase mechanism on other P450s. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 61: 127-132.
6. Akiyama TE, González FJ. 2002. Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription factors and nuclear receptors. *Bioch Bioph Acta.* 1-12.
7. Amstalden M, García MR, Williams SW, Stanko RL, Niezielsky SE, Morrison CD, Jkeisler DH, Williams GL. 1999. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil.* 54:411-424.
8. Amsterdam A, Plehn-Dujowich D, Suh BS. 1992. Structure-function relationships during differentiation of normal and oncogene-transformed granulosa cells. Minireview. *Biol Reprod.* 46: 513-522.

9. Angelova K, Pret D. 2002. Differential responses of an invariant region in the ectodomain of three glycoprotein hormone receptors to mutagenesis and assay conditions. *Endocrine*. 19: 147-154. (ABSTR).
10. Armstrong DG, Gong JG, Garner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reprod*. 123: 371-378.
11. Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De La Sota, RL, Thatcher W. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 46:871-883.
12. Baird DT, McNeilly AS. 1981. Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. *J Reprod Fertil*. Suppl. 30, 119-133.
13. Bao B, Thomas MG, Williams GL. 1997. Regulatory roles of high-density and low-density lipoproteins in cellular proliferation and secretion of progesterone and insulin-like growth factor I by enriched cultures of bovine small and large luteal cells. *J Anim Sci*. 75:3235-3245.
14. Bao B, Calder MD, Xie S, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS, Garverick HA. 1998a. Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger Ribonucleic Acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection, and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biol Reprod*. 59: 953-959.
15. Bao B, Garverick A. 1998b. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotrophin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: A review. *J Anim Sci*. 76: 1903-1921.

16. Bauman DE, Currie WB. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanism involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci.* 63:1514-1529.
17. Bergfeld EG, Kojima FN, Cupp AS, Wherman ME, Peters KE, García-Winder M, Kinder JE. 1994 Ovarian follicular development in prepubertal heifers influenced by level of dietary energy intake *Biol of Reprod.* 51: 1051-1057.
18. Bergfeld DR, Kulick J, Kot K, Ginther OJ. 2000. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. *Biol Reprod.* 54: 1191-1206.
19. Berndtson AK, Vincent SE, Fortune JE. 1995. Low and high concentrations of gonadotropins differentially regulate hormone production by theca interna and granulosa cells from bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod.* 52:1334–1342
20. Berger SL. 1987. Preparation and characterization of RNA: Overview. *Methods in Enzymol.* 152: 215-219.
21. Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra JA, Spicer LJ, Diskin MG. 1999. Nutritional induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J Anim Sci.* 77: 1536-1546.
22. Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra JA, Spicer LJ, Diskin MG. 2000. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: Ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Bio Reprod.* 62: 1436-1444.
23. Booth PJ. 1990. Metabolic influences on hypothalamic-pituitary-ovarian function in the pig. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 40:89-100.
24. Brodie A, Lu Q, Long B. 1999. Aromatase and its inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol.*

69: 205-210.

25. Bronson FH, Manning JM. 1991. The energetic regulation of ovulation: A realistic role for body fat. *Biol Reprod.* 44: 945-950.
26. Brown P, McNelly AS. 1997. Steroidogenic factor-1 (SF-1) and the regulation of expression of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone b-subunits in the sheep anterior pituitary *in vivo* . *Int J Biochem Cell Biol.* 29:1513-1524.
27. Brown P, McNelly AS. 1999. Transcriptional regulation of pituitarygonadotrophin subunit genes. *J Reprod Fertil.* 4:117-124.
28. Burgon PG, Stanton PG Robertson DM. 1996. In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteining hormone isoforms. *Endocrinol.* 137: 4827-4836.
29. Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse trancription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25:169-193.
30. Campbell BK, McNelly AS, Picton HM, Baird DT. 1991. The effects of FSH on inhibim secretion in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil.* 91:501-509.
31. Canfield RW, Butler WR. 1998. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Theriogenol.* 50: 1263-1274.
32. Carrière PD, Harvey D, Cooke GM. 1996. The role of pregnenolone-metabolizing enzymes in the regulation of oestradiol biosynthesis during development of the first wave dominant follicle in the cow. *J Endocrinol.* 149:233-242.
33. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Evans G, Downing JA. 1991. Increased ovulation rate in androstenedione-immune ewes is not due to elevated plasma concentrations of FSH. *Reprod Fertil.* 91:2655-2666.

34. Carlone DL, Richards JS. 1997. Evidence that functional interactions of CREB and SF-1 mediate hormone regulated expression of the aromatase gene in granulosa cells and constitutive expression in R2C cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 61:223-231.
35. Clark BJ, Stocco DM. 1995. Expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein: a novel LH-induced mitochondrial protein required for the acute regulation of steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocr Res.* 21: 243-257.
36. Cooke DJ, Crowe MA, Roche JF. 1996. Headon D.R. Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Anim Reprod Sci.* 41:77-99.
37. Conley AJ, Bird IM. 1997. The role of cytochrome P450 17α -hydroxylase and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the $\Delta 5$ and $\Delta 4$ pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod.* 56: 789-799.
38. Considine RV. 1997. Weight regulation, leptin and growth hormone. *Horm Res.* 48 *Suppl* 5: 116-121. (ABSTR.)
39. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. 1999. Leptin's actions of the reproductive perspectives and mechanisms. *Biol Reprod.* 60:216-222.
40. Danfaer A, Tetens V, Agergaard N. 1995. Review and an experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. *Biochem Mol Biol.* 111:2 201-210.
41. Darling DC, Brickel PM. 1994. Nucleic Acid Blotting. The basics. Ed IRL, PRESS, Oxford University press, Oxford New York.
42. Dawuda PM, Scife JR, Hutchinson JS, Sinclair KD. 2002. Mechanisms linking under-nutrition and ovarian function in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 74: 11-26.
43. Downing JA, Joss J, Connell P, Scaramuzzi RJ. 1995. Ovulation rate and the

- concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Repro Fertil.* 103: 137-145.
44. Drackley JK, Overton TR, Douglas GN. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 84 (E. Suppl.): E100-E112.
45. Driancourt MA, Magallon PG. 2000. Ovine follicular fluid inhibits aromatase activity. *Dom Anim Endocrinol.* 18: 349-362.
46. Drummond AE, Findlay JK. 1999. The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol and Cel Endocrinol.* 151: 57-64.
47. Evans AC, Fortune JE. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger Ribonucleic acid for gonadotropin receptors *Endocrinol.* 138: 2963-2971.
48. Farookhi R, Desjardins J. 1986. Luteinizing hormone receptor induction in dispersed granulosa cells requires estrogen. *Mol Cel Endocrinol.* 47:13-24.
49. Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL, RichardS JS. 1997. Expression of aromatase in the ovary: Down-regulation of RNAm by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids.* 62:197-206.
50. Fortune JE, Quirk SM. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci.* (Supl.2) 66: 1-8.
51. Fortune JE, Sirois J, Quirk SM. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenol.* 29: 95-109
52. Fürbass R, Kalbe C, Vanselow J. 1997. Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first

- exons. *Endocrinol.* 138: 2813-2819.
53. García BC. 1996. Suplementación mineral. Memorias del Curso Internacional Avanzado de Nutrición de rumiantes, del 23 al 25 de Octubre de 1996, México D.F. UAM-X.
54. www.GeneDetect.com.
55. Gevry NY, Murphy BD. 2002. The role and regulation of the Niemann-Pick C1 gene in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res.* 28:4 403-412.
56. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod.* 55, 1187-1194.
57. Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutiérrez CG, Peters AR, Webb R. 1996. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Boil Reprod.* 55:68-74.
58. Gong JC, Bramley TA, Gutiérrez CG, Peters AR, Webb R. 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.
59. González MS. 1996. Factores ambientales en el gasto energético de bovinos en pastoreo. Memorias del Curso Internacional Avanzado de Nutrición de Rumiantes, del 23 al 25 de Octubre de 1996. México D.F. UAM-X.
60. Gore-Langton R.E., Armstrong D.T., 1994. Follicular Steroidogenesis and its control. *The physiology of Reproduction*. Second Edition. Edited by Knobil E., Neil J.D., Raven Press, Ltd, New York pp 300-312.

61. Guthrie HD, Barber JA, Leighton JK, Hammond JM. 1994. Steroidogenic cytochrome P450 enzyme messenger Ribonucleic acids and follicular fluid steroids in individual follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol Reprod.* 51: 465-471.
62. Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of estradiol production, response to Follicle-Stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod.* 56: 608-616.
63. Hamilton TD, Vizcarra JA, Wettemann RP, Keefer BE, Spicer LJ. 1999. Ovarian function in nutritionally induced anoestrous cows: Effect of exogenous gonadotropin-releasing hormone *in vivo* and effect of insulin and insulin-like growth factor I *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 117: 179-187.
64. Hanukoglu I. 1992. Current research on steroid metabolism: Transition from biochemistry to molecular-cell biology. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43: 745-749.
65. Harmon CM, Luce P, Abumrad NA. 1992. Labelling of an 88 kDa adipocyte membrane protein by sulpho-N-succinimidyl long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *Biochem Soc Trans.* 20:811-813.
66. Harris TG, Robinson JE, Evans NP, Skinner DC, Herbison EA. 1998. Gonadotropin-releasing hormone messenger Ribonucleic acid expression changes before the onset of the estradiol induced Luteinizing Hormone surge in the ewe. *Endocrinol.* 139:57-64.
67. Hawkins DE, Petersen MK, Thomas MG, Sawyer JE, Waterman RC. 2000. Can beef heifers and young postpartum cows be physiologically and nutritionally manipulated to optimise reproductive efficiency? *Proc Am Soc Anim Sci.* 1-10.

68. Hinshelwood MM, Borroni R, Simpsons ER. 1998. transcriptional regulation of the CYP17 gene in the bovine ovary before and after luteinization. *J Soc Gynecol Invest.* 5 Suppl 1: pg 10. (ABSTRAC).
69. Hinshelwood MM, Michael MD, Sun T, Simpson ER. 1997. Regulation of Aromatase expression in the ovary and placenta: A comparison between two species. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 61: 399-405.
70. Imakawa K, Day ML, García-Winder M, Zalesky DD, Kittok JR, Schanbacher BD, Kinder JE. 1986. Endocrine changes during restoration of estrous cycles following induction of anoestrous by restricted nutrient intake in beef heifers. *J Anim Sci.* 63: 565-571.
71. Imakawa K, Day ML, Zalesky DD, Clutter A, Klittck RJ, Kinder JE. 1987. Effects of 17β -oestradiol and diets varying in energy on secretion of luteinizing hormone in beef heifers. *J Anim Sci.* 1987; 64: 805-815.
72. Ireland JJ, Roche JF. 1982 Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinol.* 111:2077-2086
73. Ivell R. 1998. A question of faith- or the philosophy of RNA controls. *J Endocrinol.* 159: 197-200.
74. Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, McNatty KP. 1994. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and Luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol Reprod.* 51: 934-944.

75. Jorritsma R, Groot DE, Vos MW, Kruij PLA, Wensing TAM, Noordhuizen TH. 2003. Acute fasting in heifers as a model for assessing the relationships between plasma and follicular fluid NEFA concentrations. *Theriogenol.* 60: 151-161.
76. Kallen CB, Arakane F, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Strauss JF. 1998. Unveiling the mechanism of action and regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Cell Endocrinol.* 145:39-45.
77. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrinol Rev.* 20: 68-100.
78. Kishi H, Minegishi T, Tano M, Abe Y, Ibuki Y, Miyamoto K. 1997. Down regulation of LH/hCG receptor in rat cultured granulosa cells. *FEBS Lett.* 402:198-202 (ABSTR).
79. Knecht M, Darbon J-M, Ranta T, Baukal AJ, Catt KJ. 1984. Estrogens enhance the adenosine 3',5'-monophosphate-mediated induction of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors in rat granulosa cells. *Endocrinol.* 115:41-49.
80. Komminoth P, Merk FB, Leav I, Wolfe HJ, Roth J. 1992. Comparison of 35S- and digoxigenin-labeled RNA and oligonucleotide probes for in situ hybridization. Expression of mRNA of the seminal vesicle secretion protein II and androgen receptor genes in the rat prostate. *Histochem.* 98:217-228.
81. Krehbiel CR, Harmn DL, Schnieder JE. 1992. Effects of increasing ruminal butyrate on portal and hepatic nutrient flux in steers. *J Anim Sci.* 70: 904-914.
82. Kumar RS, Trant JM. 2001. Piscine glycoprotein hormone (gonadotropin and thyrotropin) receptors a review of recent development. *Biochem Mol Biol.* 129: 347-355. (ABSTR).

83. Lephart ED. 1997. Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 61:375-380.
84. Li XM, Juorio AV, Murphy BD. 1995. Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biol Reprod.* 53: 791-799.
85. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. 1995. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Sci.*267:1828-1831.
86. Lucy MC, Staples CR, Michel FM, Thatcher WW. 1991. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 74:473-82.
87. Luo X, Ikeda Y, Lala D, Rice D, Wong M, Parker KL. 1999. Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for endocrine development and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69: 13-18.
88. Lussier JG, Houde A, Ethier J, Silversides DW. 1995. Complementary DNA structure of the bovine LH receptor. Submitted (31-JAN-1995) Jacques G. Lussier, Veterinary Biomedicine, University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Rue Scotte, St. Hyacinthe, Quebec, J2S 7C6, Canada, citado en Pub Med con número U20504.
89. Luck MR, Jeyaseelan I, Scholes RA. 1995. Ascorbic acid and fertility. *Biol Reprod.* 52:2 262-266.
90. McCann JP, Hansel W. 1986. Relationships between insulin and glucose metabolism and pituitary-ovarian functions in fasted heifers. *Biol Reprod.* 34:630-641

91. Mackey DR, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG. 1999. Effect of acute nutritional restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentration in beef heifers. *Biol Reprod.* 61: 1601-1607.
92. Mamluk R, Greber Y, Meidan R. 1999. Hormonal regulation of Messenger Ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. *Biol Reprod.* 60: 628-634.
93. Manikkam M, Calder MD, Salfen BE, Youngquist RS, Keisler DH, Garverick HA. 2001. Concentrations of steroids and expression of messenger ARN for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. *Anim Reprod Sci.* 67:189–203.
94. Manikkam M, Calder MD, Salfen BE, Youngquist RS, Keisler DH, Garverick HA. 2001. Concentrations of steroids and expression of messenger ARN for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. *Anim Reprod Sci.* 67:189–203
95. McGuire MA, Vicine JL, Bauman DE, Veenhuizen JJ. 1992. Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation *J Anim Sci.* 70: 2901-2910.
96. McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DS, Lundy T, O'Connell A, Tisdall DJ. 2000. Growth a paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol.* 163: 11-20.
97. Mendoza MG, Ricalde VR. 1996. Suplementación nitrogenada para bovinos en

- crecimiento. Memorias del Curso Internacional Avanzado de Nutrición de rumiantes, del 23 al 25 de Octubre de 1996, México D.F. UAM-X.
98. Miller DW, Blache D, Boukhliq R, Curlewis JD, Martin GB. 1998. Central metabolic messengers and the effects of nutrition on gonadotrophin secretion in sheep. *J Reprod Fertil.* 112: 347-356.
99. Mitre H, Bread E, Leymarie P. 1996. The possible involvement of LH/hCG induced mitochondrial proteins in the regulation of steroidogenesis in bovine luteal cells *J Steroid Biochem Mol Biol.* 57: 233-238.
100. Morohashi KI, Honda S, Inomata Y, Hnada H, Omura T. 1992. A common trans-acting factor, Ad4Bp to the promoters of steroidogenic P450. *J Biol Chem* 267: 17913-17919.
101. Murphy MG, Enright WJ, Crowe MA, Mc Connell K, Spicer LJ, Boland MP, Roche JF. 1991. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicle during the oestrous cycle in beef heifers. *J Reprod Fertil.* 92: 333-338.
102. Naor C, Harris D, Shacham S. 1998. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca²⁺ and protein kinase. *Front Neuroendocrinol.* 19:1-19. (ABSTR).
103. National Research Council. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7th edition. Washington DC. National Academy Press.
104. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 80:1-29.
105. Niswender GD. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reprod.* 123:333-339.

106. Omura T, Morohashi K. 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 53: 19-25.
107. Overton TRK, Drackley CJ, Otteman AD, Beaulieu LS, Emmert LS, Clark JH. 1999. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. *J Anim Sci.* 77: 1940-1951.
108. Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Boewn AS, Reversa JL, Bernassau JM, Drieu K. 1997. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids.* 62:21-28.
109. Pate JL, Condon WA. 1982. Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol.* 28: 551-562.
110. Peet NP, Johnston JO, Burkhart JP, Writh CL. 1993. A-ring bridged steroids as potent inhibitors of aromatasa. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 44: 409-420.
111. Peltoketo H, Nokelainen P, Piao Y, Vihko R, Vihco P. 1999. Two 17 β -hidroxiesteorid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69: 431-439.
112. Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price CA, Murphy BD. 1996. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol Reprod.* 55: 485-491.
113. Peet NP, O'Neal JO, Burkhart P, Wright L. 1993. A-ring bridget steroid as potent inhibitors of aromatase. *J Steroid Molec Biol.* 44:4-6.
114. Prado TM, Wettemann RP, Spicer LJ, Vizcarra JA, Morgan GL. 2002. Influence of exogenous gonadotropin-releasing hormone on ovarian function in beef cows after short-and long -term nutritionally induced anovulation. *J Anim Sci.* 80:3268-3276.

115. Pushpakumara PG, Gardner NH, Reynolds CK, Beever DE, Wathes DC. 2003. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenol.* 60: 1165-1185.
116. Randel RD. 1990. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *J Anim Sci.* 68: 853-862.
117. Richards MW, Spitzer JC, Warner MB. 1986. Effects of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J Anim Sci.* 62:300-306.
118. Richards MW, Wettemann RP, Schoenemann HM. 1989a. Nutritional anoestrus in beef cows: concentrations of glucose and nonesterified fatty acids in plasma and insulin in serum. *J Anim Sci.* 67:2354-2362.
119. Richards MW, Wettemann RP, Schoemann HM. 1989b. Nutritional anoestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. *J Anim Sci.* 67: 1520-1526.
120. Richards MW, Wettemann RP, Spicer LJ, Morgan GL. 1991. Nutritional anoestrous in beef cows: Effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor -1. *Biol Reprod.* 44:961-966.
121. Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.*15:725-751.
122. Rhind SM, Schanbacher BD. 1991. Ovarian follicle population and ovulation rates of finish Landrace cross ewes in different nutritional states and associated profiles of gonadotrophins, inhibin, growth hormone (GH) and insulin like growth factor-1. *Dom Anim Endocrinol.* 8: 281-291.

123. Rhodes FM, Fitzpatrick LA, Entwistle KW. 1995a. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus *J Reprod Fertil.* 104: 41-49.
124. Rhodes FM, Fitzpatrick LA, Entwistle KW, Kinder JE. 1995b. Pulsatile hormone secretion during the first ovarian follicular wave in *Bos indicus* heifers. *J Reprod Fertil Suppl.* 49, 523-526.
125. Rhodes FM, Entwistle KW, Kinder JE. 1996. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anoestrus in *Bos indicus* heifers. *Biol Reprod.* 55: 1437-1443.
126. Roche JF, Boland MP. 1991. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenol.* 35: 81-90.
127. Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis –a symposium in perspective *Biol Reprod.* 1:19-27.
128. Roche JF, Mackey D, Diskin MD. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 703-712.
129. Ryan DP, Spoon RA, Griffith MK, Williams GL. 1994. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell, steroidogenic potential and growth hormone7-insuline –like growth factor-q1 relationships in suckled beef cows consuming high lipids diets: effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. *Dom Anim Endocrinol.* 11:161-174.
130. Schams D, Berisha B. 2002. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Dom Anim Endocrinol.* 23:53–65.
131. Schenkman JB. 1992. Steroid metabolism by constitutive cytochromes P450. *J*

Steroid Biochem Mol Biol. 43: 1023-1030.

132. Segaloff DL, Wang H, Richards JS. 1990. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol.* 4:1856–1865.
133. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Corbin CJ, Mendelson CR. 1993. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 44: 321-330.
134. Simpson ER. 2000. Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol.* 25:149-156.
135. Simpson E, Jones M, Davis S, Rubin G. 1999. Do intracrine mechanisms regulate aromatase expression? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69: 447-452.
136. Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers — monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39: 308–317.
137. Smith GD, Jackson LM, Foster DL. 2002. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenol.* 57:73-86.
138. Sperry A, Jin L, Lloyd RV. 1996. Microwave treatment enhances detection of RNA and DNA by in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol.* 1996 Dec;5(4):291-296.
139. Spicer LJ, Echtenkamp SE. 1986. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *J Anim Sci.* 62:428-51.
140. Spicer LJ, Enright WJ. 1991. Concentrations of insulin-like growth factor -1 and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarian follicles: Effect of daily injections of growth hormone-releasing factor analogue and (or) thyrotropin-releasing hormone. *J Anim Sci.* 69: 1133-1139.

141. Spicer LJ, Crowe DJ, Prendiville D, Goulding D, Enright WJ. 1992. Systemic but not intraovarian concentrations of insulin-like growth factor -1 are affected by short-term fasting. *Biol Reprod.* 46:920-925.
142. Spicer LJ, Francisco CC. 1997. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinol.* 138: 3374-3379.
143. Spicer LJ, Francisco CC. 1998. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Repro.* 8: 207-212.
144. Stocco DM. 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: Challenges for the future. *J Endocrinol.* 164: 247-253.
145. Stocco DM, Clark BJ. 1997. The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids.* 62:29-36.
146. Soumano K, Silversides D, Doizé F, Price CA. 1996. Follicular 3- β -Hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 α -Hydroxylase and Aromatase messenger Ribonucleic Acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod.* 55: 14919-1926.
147. Suchyta SP, Sipkovsky S, Halgren RG, Kruska R, Elftman M, Weber-Nielsen M, Vandehaar MJ, Xiao L, Tempelman RJ, Coussens PM. 2003. Bovine mammary gene expression profiling using a cDNA microarray. enhanced for mammary-specific transcripts. *Physiol. Genomics.* 16: 8-18.
148. Tayar N. 1996. Advances in the molecular understanding of gonadotropins receptors interaction. *Mol Cell Endocrinol.* 125: 65-70. (ABSTR).
149. Tetsuka M, Hiller SG. 1997. Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells *J Steroid Biochem Mol Biol.* 61: 233-239.
150. Tian XC, Berndtson AK, Fortune J.E. 1995. Differentiation of bovine preovulatory

- follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage, 3-hydroxysteroid dehydrogenase, and P450 17-hydroxylase, but not P450 aromatase. *Endocrinol.* 136: 5102–5110.
151. Thompson WR, Theuninck DH, Meiske JC, Goodrich RD JR, Byers FM. 1983. Linear measurements and visual appraisal as estimators of percentage empty body fat of beef cows. *J. Anim. Sci.* 56:755–760.
152. Vanselow J, Furbass R. 1995. Novel aromatase transcripts from bovine placenta contain repeated sequence motifs. *Gene.*154: 281-286.
153. Vanselow J, Furbas R, Zsolnai A, Kalbe C, Said HM, Schwerin M. 2001. Expression of aromatase cytochrome P450 encoding gene in cattle and sheep. *J steroid Mol Biol.* 79: 279-288.
154. Vizcarra JA, Wettemann RP, Spitzer JC, Morrison DG. 1998. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J Anim Sci.* 76:927-36.
155. Vizcarra J.A., Wettermann R.P., Morgan G.L. 1999. Influence of dose, frequency and duration of infused gonadotrophin-releasing hormone on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in nutritionally anestrus beef cows. *Dom Anim Endocrinol.* 16: 171-181.
156. Voss AK, Fortune JE. 1993a. Levels of messenger Ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the Luteinizing hormone surge. *Endocrinol.* 132:

888-894.

157. Voss AK, Fortune JE. 1993b. Levels of messenger Ribonucleic acid for cytochrome P450 17 α -hidroxilase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease ater the Luteinizing hormone surge. *Endocrinol.* 132: 2239-2245.
158. Walters RJ, Hadley SH, Morris KD, Amin J. 2000. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci.* 3:1274-1281.
159. Wang XN, Greenwald GS. 1993. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *J Reprod Fertil.* 99:403-413.
160. Wang X, Stocco DM. 1999. Cyclic AMP and arachidonic acid: A tale of two pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 158: 7-12.
161. Weeb R, Armstrong DG. 1998. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: A review *Liv Prod Sci.* 53: 95-112.
162. Webb R, Gong JG, Law AS, Rusbridge SM. 1992. Control of ovarian function in cattle. *J Reprod Fertil* [Suppl].45:141–156
163. White PC, Pascoe L, Curnow KM, Tannin G, Rosler A. 1992. Molecular biology of 11 β -hidroxylase and 11 β -hidroxisteroid dehydrogenase enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43: 827-835.
164. Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenol.* 57:21-52.
165. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. 1995a. Expression of follicle –Stimulating Hormone and Luteinizing hormone receptor

messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod.* 53: 951-957.

166. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. 1995b. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome P450 17 Hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinol.* 136: 981-989.
167. Zanisi M, Messi E. 1991. Sex steroid and the control of LHRH secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40:155-163.
168. Zieba DA, Amstalden M, Maciel MN, Keisler HK, Raver N, Gertler A, Williams GL. 2002. Divergent effects of leptin on luteinizing hormone and insulin secretion are dose dependent. *Exp Biol Med.* 325-330.

ANEXOS

ANEXO I. ARN

1.1 Cuantificación espectrofotométrica de ARN total

Se tomaron 2 μ l de ARN total de cada una de las muestras y se realizó una dilución 1:500 con H₂O DEPC al 0.1%. Se determinó la absorbancia a 260nm y 280 nm en un espectrofotómetro. La cantidad total de ARN recuperada se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{ARN total } \mu\text{l/ml} = (\text{A}_{260 \text{ nm}})(\text{FD:500})/1000 \text{ ug/ul}$$

Siendo: A₂₆₀= Absorbancia 260nm, 40= factor de conversión, FD= Factor de dilución =500, Cociente A₂₆₀/A₂₈₀= Cociente entre las lecturas del espectrofotómetro a 260 y 280nm. Este valor da una estimación de la pureza del ARN, considerándose preparaciones adecuadas las que presentan una relación 260/280 entre 1.5-2.0.

ANEXO II MARCAJE DE ADNc CON PCR

2.1 Marcaje de ADNc con PCR

Se amplificó ADNc bajo las condiciones de alineación que se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones para marcar ADNc por PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	1Rx (μl)	Condiciones
P450arom	44 ng	44 ng	3	
LH	70 ng	70 ng	3	
BActin α	50 ng	50 ng	3	94°C / 3 min
H ₂ O		cbp20 μl	7.5	58°C / 30 min 30
dNTP 2mM dATP 0.02mM	2 mM	0.02 mM	2	72°C / 90 min
Primer M13	10 μM	0.2 μM	1	
10 PCR "Lr"	3 ug/μl		1	
taq polimerasa	5 U/ml	3 U/ rx	0.5	
dATP 32P			5	
Volumen final			20	

10 PCR "Lr" (BSA 0.15%, Tritón 0.1 %, Amortiguador "C" 1X).

ANEXO III.

3.1 Secuencia de pares de bases del ADNc de P450aromatasa comparadas con la secuencia reportada por Vanselow y Furbass (1995).

```
arom seq rep 1 -----cccacggtgtcttcatcagaggctccagagaggagtgaatagtgag-----
AROM SEQ ENV 1 ccgntnggggtccggggccccccctccggagggtccggccgggtnnccggattaagccttn

arom seq rep 47 gatttgccttgagggaacttgcgctgtggtgatgacgaaggacatcccactgcagaggca
AROM SEQ ENV 61 gattnncccnnnnnnnccgccccncggngcngggcgncccnccgncctcccccgnggnt

arom seq rep 107 gctttgttactgccttcaaaggacttatcacaaccaggactttaaattacttccccctga
AROM SEQ ENV 121 gc-----nnnnncgncgnggg-----

arom seq rep 167 gatcaagtaaaacaaaatgctttggaagtgctgaacccaaggcattacaacgtcaccag
AROM SEQ ENV 138 -----ttg--ngtncgncccccgctnctnntcctcccngnggg

arom seq rep 227 catggtgtccgaagttgtgctatttgcagcattgcaatcctgctgctcatggatttct
AROM SEQ ENV 174 nnccgtnncgncgnnnngnccc-----cngncncngtccngnt-ctcccngg-----

arom seq rep 287 tctcttggtttggaattatgaggacacatcctcaataaccagggtcccagctactttctggg
AROM SEQ ENV 222 -----gggctg--tctgctg-----gtggtccgggc-----

arom seq rep 347 aattgggcccctcatttcccactgcaggttccctctggatgggatcggcagtgctgcaa
AROM SEQ ENV 247 -----cgccgtgcnctccgcccctgccnccccccggg-----cgntggtnc-----

arom seq rep 407 ttactacaacaagatgtatggagaattcatgagagtctgggtatgtggagaggaaacct
AROM SEQ ENV 289 -----gtcgggg-----

arom seq rep 467 tattattagcaagtctcaagatgttccatgtaatgaagcacagt
AROM SEQ ENV 296 -----ccg

arom seq rep 527 atttggcagtaaacttgggttgcagttcatcggcatgcacgagaaaggcatcatatttaa
AROM SEQ ENV 299 gcgtggc-----tgcentt-----

arom seq rep 587 caataatccagcactctgaaagctgttcgaccttctttacaaaagctttgtccggccc
AROM SEQ ENV 314 -----agccgt-----cgncnc

arom seq rep 647 tggcctggtgcatggtgacctctgtgctgattccatcaccaagcatctggacaggct
AROM SEQ ENV 326 gggcc---tccccngcggncngcngcctgttttcc-----gcctcngg---ggcc

arom seq rep 707 ggaggaggtctgcaatgacttgggctatgtggacgtgttgacctcatgcggcgcatcat
AROM SEQ ENV 372 ggngnngt-----ccccttgncgggggccc

arom seq rep 767 gctg-gacacctetaacatgctcttctgggatcccccttggatgaaagtgccatcgtgg
AROM SEQ ENV 399 gctgnggcncnntacnngnctc-----ggctcccc-----cgggg

arom seq rep 826 ttaaatccaggggtattttgatgcatggcaagctctccttctcaaacagacatcttct
AROM SEQ ENV 435 ggggncacggggg-----gctnccc-----8
```

arom seq rep	886	ttaagatttcttggctgtgcagaaaagtatgaaaagtctgtcaaggacttgaaaagatg
AROM ENVI	456	-----cnnngcgg-----
arom seq rep	946	tgaaattctcatagaagaaaaagacacaggatttcaacagcagagaagctggaagaca
AROM ENVI	466	tg-----nccccngcgcgncennngggg---
arom seq rep	1006	gcatagatttggccactgagttgatttttggctgagaaaagtggtgaaacttacaagagag
AROM ENVI	491	----gcccccgccccntgg-----gtggcg-----gccc
arom seq rep	1066	atgtaaacagtgcatattggaatgctgatcgagcgcagacacccatgtctgtttctg
AROM ENVI	517	ttgctggcccgtccnccggg-----gnngcg-----
arom seq rep	1126	tgttcttcatgtgtttcttattgcaaagcatccccaggttgaaagaggcaataataagg
AROM ENVI	544	-----gcggnnccctnctnccgggggcnccccng-----naagg
arom seq rep	1186	aaatccagactgttgttgggtaaagagacataaggattgatgatgcaaaagctaaaa
AROM ENVI	578	ncccc-----
arom seq rep	1246	tggtggaaaactttattaatgagagcatgcgggtaccagcccgttgggacctgggtcatgc
AROM ENVI	584	-----ccggggccngggcnnngtntgccccccccgg
arom seq rep	1306	gcaaaccttagaggatgatgtcatcgatggctaccgggtgaaaaaggggactaacatta
AROM ENVI	617	gggnccccctgncgtggccctctnc-----ccccgggggnntggggggggcccttt
arom seq rep	1366	tcctgaatcttggagaatgcatagactcgagtttttcccaaagcctaagatgatttactc
AROM ENVI	669	ncnccnc-----cgccntgcccngcggggnnnc
arom seq rep	1426	ttgaaaactttgccaagaatgttcttacaggtactttcagccattt---ggctttgggc
AROM ENVI	702	ncg-----ggccngccccnccnnggggaccgccccgccccccccggcttgggg
arom seq rep	1483	ccccggcctgtgccccgaaagtacatcaccatggtgatgatgaaggctgctcctggtcaccc
AROM ENVI	755	ccccggcc-----
arom seq rep	1543	ttctgagacgcttccacgtgcagactttgcaaggtcggtgcggtgagaagatgcagaaga
AROM ENVI		-----
arom seq rep	1603	aaaatgacttatccttgcataccagacgagaccagagaccggctagaaatgattttcacc
AROM ENVI		-----
arom seq rep	1663	caagaaattcagacaagtgctcgagcgctaaagaagtttggtcagtcctgccccagag
AROM ENVI		-----
arom seq rep	1723	cactgctcaacagaactccacatgggaaccacccatctttgccaggtagtcctcctcaca
AROM ENVI		-----
arom seq rep	1783	tgaacaaccatggcctgtgccattttataggcttacctcctgtgggttgtcagctaggca
AROM ENVI		-----
arom seq rep	1843	ggagacacggttcatctgaccagatccaaaaccagacaccagactgcaagagaaaaatagag
AROM ENVI		-----
arom seq rep	1903	gccaagagtttgtacaggaaactgcagccctaaagacccaattccacaaaacatgctttg
AROM ENVI		-----
arom seq rep	1963	catgaaagtgaaaagtgaaagtaaagtcggttcagttgtgtccgactcttagcaacctcat
AROM ENVI		-----
arom seq rep	2023	ggatttgcagcctactaggctcctccgtccatgggattttccaggcaagagtactggagt
AROM ENVI		-----

arom seq rep 2083 gggttgocattgoccttctcagttggaaaagacaagccaccagcaaaaactcaccocagctc
AROM ENVI -----

arom seq rep 2143 cttactgtcctacactgaattgggagctttttaacatctggggcagaagcactcaatttg
AROM ENVI -----

arom seq rep 2203 attacaaaggccaggccaacatctggtaccttggatcaaacatatctcctactatgaat
AROM ENVI 763 -----nncctngg-----

arom seq rep 2263 aaaacgggttttcatttgctttttgggtgggggactacaacatccatacccttggaga
AROM ENVI 771 -----gggggggg-----

arom seq rep 2323 aatgcttacaattcagcatttgacttttccacaaaactacattcaagtaactcttggtt
AROM ENVI -----

arom seq rep 2383 atccacatgtgacttgtctgcagaaaaagttaaattgaagartatcccttcccaatttct
AROM ENVI -----

arom seq rep 2443 caatttattcctctcttaacctctgatacaacaggtgtagattcaggtatatgaatacaaa
AROM ENVI -----

arom seq rep 2503 gtaacttattaatagcctgaataagatataattactaccattcatctgccatactaaaa
AROM ENVI -----

arom seq rep 2563 attcacacaatacattttaaattaataaaaattcctcttttccatctgcatagttgggt
AROM ENVI -----

arom seq rep 2623 agctccaggagtgagtaaccaagagataaatttagataatggcacctattaactcttac
AROM ENVI -----

arom seq rep 2683 tgaagcttctgtgattttcagggagggtgaagactctgaatgtatatctaaatctacaacc
AROM ENVI 780 -----C-----

arom seq rep 2743 cagtgggttcaaactctaaggagtgctccttgtaccattatccttctctctcaccatttc
AROM ENVI 781 ccgnnggg-----

arom seq rep 2803 ttcctctctctctctcttccatgaccctaagccaagagcaacaagcatatcagtagagaac
AROM ENVI -----

arom seq rep 2863 acagccagggtagaacccctacaatcacattttatcctagctccaatttaacagttacct
AROM ENVI -----

arom seq rep 2923 atgagatttaacagttaacctgatttactgaatcaccactctatgtaaccatagaaaaat
AROM ENVI -----

arom seq rep 2983 gcacatcttgggaattagcgccaaatcaaacagatgagtggaattttccaagtattaatagt
AROM ENVI -----

arom seq rep 3043 attttcttctgtgattattgatatggccttacaagtgtatctgctgaatgccacataaaa
AROM ENVI -----

arom seq rep 3103 actcaaaaactaaattcatttacaatatgtaaatgtttgccattgagtcaacctgaata
AROM ENVI -----

arom seq rep 3163 ttcttctcatcctgctgtttggcagtagggcaacagctgagtataaaatgagaatgtaag
AROM ENVI 790 -----tctcnggcgg-----

arom seq rep 3223 ctactgagagtggaagctcttttcttttcttttggaaatccatgacctgtcccttattctcac
AROM ENVI 801 -----nc-----

arom seq rep	3283	tccccatattttattttcaagatcaatactgaattgacactctggcccagagatattotaa
AROM ENVI	803	cccc-----
arom seq rep	3343	ttgaccagaaatcaagtaaaggagaagcaggaatcctaaaaattaaaggatgggcatta
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3403	ataaagcagcaagtatttgaaattgaaattatctagatcatctatatgacataaacatat
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3463	gcagaaatatactctgtgtatctggatgtatctgtgttgcaggctctagaaaatgaaagtc
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3523	actcggatcatgtccaactctttgtgacccatggactatacagtcctatggaattcctccag
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3583	accagaatactggagtgggtagtcttttctctccaggggatcttcccagggatccag
AROM ENVI	808	-----ccnnggntccc--
arom seq rep	3643	ggattgaaactcaggctctccacattgcaggctaattctttaccagctgagccacaaggga
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3703	agcagtcaggctctagatgagtatccaaacacttcaaaagcttgaaagaaaaggattttag
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3763	actgaacggatcctcattaattcacttgggtgattattaatggtttctctgtctggctgga
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3823	gctacatagtagagcaaaacagactttggatccctgtacttcatccatctaattctctcg
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3883	aacatctactgtatttaatatgcataatgcagccaaggtcatactctgcctatacaaa
AROM ENVI		-----
arom seq rep	3943	tgaaatggaaggatgaatatagttgtatatagataatgcagataccaaaatatgctcgggg
AROM ENVI	820	-----ccccgggg
arom seq rep	4003	aaaactgggggtgggggtggggccaaggagagagggaataataggttagcgttgtctaa
AROM ENVI		-----
arom seq rep	4063	aaactctcccagaaacaagttacctgggtaattgttcagcttgtcactcttttcccggga
AROM ENVI		-----
arom seq rep	4123	ttgacaaacctcataagtatgtacagacttggcttaaggaatatggaatgtcattgaatt
AROM ENVI		-----
arom seq rep	4183	tacattgggttgatgaatgtatatattgaaaatcctgttttgcacatcagaattttgcttta
AROM ENVI	828	-----ngtttt-----
arom seq rep	4243	ttgttaagtacttaattgtgactctgaatgtgctatgtattctgtcttccaccctctta
AROM ENVI		-----
arom seq rep	4303	aagaactggaatgtataaattattaaggaaatgcatacacatgaggggctctatcattttc
AROM ENVI		-----
arom seq rep	4363	aacctgtgaggaaaactgtagtctccatctttggaagttccagacacctgcctctgcct
AROM ENVI		-----
arom seq rep	4423	tcatcgacctcttactcttccctccccaaatggaaaatcatctcatttagaaagactcc
AROM ENVI	834	-----gccccnanngg-----

```

arom seq rep 4483 acataaatgggaaatgccagttggaagctgtcactttttattttottaagcagcaacccctca
AROM ENVI -----

arom seq rep 4543 ccattcatggtgctaataattccacagaagtgtggggcactggcccactggaaagagtgcct
AROM ENVI 846 -----ccncgaa-----

arom seq rep 4603 agctgggccctcctcaatctcctgtagtagttgggtctctggaactgaattttctcattctgt
AROM ENVI 853 ---tgggcccccc-----

arom seq rep 4663 atttgcaaaaaactggctaactttgtcaaagtatggagttgaatggaattttgtggtact
AROM ENVI 863 -----ggt-----

arom seq rep 4723 ttcagttgaacttagctcaaaaaaaaagtcaagcgctaagggcacaagacaaaactctccgt
AROM ENVI 866 -----nncnantonccgc-----

arom seq rep 4783 ggctcaactcaagatggttactcattctcttactgaagtttttagccggttttgacctatg
AROM ENVI 880 g-----

arom seq rep 4843 tctagggagtcactgccatgccatttccaccaggtcaacaagacaaaagggaatgcataa
AROM ENVI -----

arom seq rep 4903 gataaggtaatctgggtcctcaaaccagcccatcaggcatacatgcctcttttatgttcc
AROM ENVI -----

arom seq rep 4963 accaagaaagcattacaggaaacccaaacaggggctctgtatcaacctagaggggtggga
AROM ENVI 881 -----agngg---gggg

arom seq rep 5023 tggggaggggaaatgggagggag-----ggt-----caaaagggaggggatatatg
AROM ENVI 890 ngggg--ggcggggggcgcncgncccccgtttnccccncoccttcgggggnncgccccctt

arom seq rep 5068 tatacctatgttgatttt-----gacaatgattcatggttgatgtttgacagaaaa
AROM ENVI 948 tctcccttngggggggcncgggggggcccctccccccngtgcggggggncggggcc

arom seq rep 5118 caa-caaaattctgtaaagcaattattcttgaataaaaaaataaaaaagaaatattaccga
AROM ENVI 1008 ccncggaagcccgggggg-----ccgg

arom seq rep 5177 ctac
AROM ENVI 1031 gg--

```

3.2 Secuencia de pares de bases de receptor para LH comparada con la secuencia reportada por Lussier et al., (1995).

```

LHR   U20504   1  aattcgcggccgcgtcgacctccgggccatgggacggccgctccctcgcgctgaggetgct
LHR SEQ ENV     1  -cgatgggtccgggccccctc-----ggaggtcgacgggtatcgataagcttcat

LHR   U20504  61  gctggcgtgctgctgctgcccgcgcagcgcgcttgctgtggcgctgcgccggcgcc
LHR SEQ ENV    50  aatcgaattcctgc-----accgggcgcc-

LHR   U20504  121 ctgcccagagccctgcagctgcccgccgacggcgccctgcgctgccccggcccgaggc
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  181 cggcctcagccgactatcactcacctatctccctatcaaagtaat-cccatctcaagctt
LHR SEQ ENV    74  -----atccccatctcangctt

LHR   U20504  240 tcagag-gacttaatgaggt-cataaaaattgaaatctctcagagtgattccc-tggaaa
LHR SEQ ENV    91  tcavagtgncttnttgaggtactnagaaattgaaatctctcngagtgattcccnnggana

LHR   U20504  297 agatagaagctaattgcc--tttgscacctcctcaatttgctgtaaatactgatccagaa
LHR SEQ ENV   151  ngatanaagccaacncctttggacnncctcctntatttgncncnatnctgntncnaa

LHR   U20504  355 cactaaaaacctggcgcacattgaggtggagcgtttacsstctccctcgggttaaaata
LHR SEQ ENV   211  cncta-----

LHR   U20504  415 cctaagcatctgtaatacaggcatccacaagcttccagatgttacgaagatcttctcctc
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  475 tgaatttaatttcattctgaaatttgataacttacacataaccaccataccaagaaa
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  535 tgcttttcaagggatgaataacgaatccataacgctaaaactatatggaaatggatttca
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  595 agaaatacaaagtcattcattcaatgggacaacgctgatttccctggagctgaaggaaaa
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  655 tgcacgcctggagaagatgcacaacgacgcttccggggggccacggggcctagcatttt
LHR SEQ ENV   216  -----ggancnngcnt---

LHR   U20504  715 ggatatttcttccactaaactgcaggccctgcctacctacgggctagagtccattcagac
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  775 actaattgccacatcatcctattctctgaaaaactgccatcgagagaaaaattaccaa
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  835 cctcctggatgccacactgacttaccagccactgctgtgcttttagaaacttgccaac
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  895 aaacgagcaaaatttttcattttccatttttaaaaacttttccaaacaatgtgaaagcac
LHR SEQ ENV

LHR   U20504  955 agcaaggagaccaataatgaaacactttattctgcatctttgctgagagtgaactgag
LHR SEQ ENV

```

LHR U20504 1015 tggctgggattatgactatggtttctgcttacccaagacactccagtgtgctcctgaacc
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1075 agatgctttcaatccctgtgaagacattatgggctacaacttccttagagtcctgatttg
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1135 gctgattaatatcctagccatcacgggaaatgtgactgtcctctttgttctcctgaccag
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1195 tcgttacaactgacagtcctcccgctttctcatgtgcaacctctcctttgcagacttctg
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1255 catggggtctacctgctgctcattgcctcagtcgatgccagaccaaggccagtatta
LHR SEQ ENV 227 -----gncnat-----

LHR U20504 1315 caaccatgccatagactggcagacagggagtgggtgcagcgcggtggctttttcactgt
LHR SEQ ENV 233 -----tggagcgcng-----

LHR U20504 1375 gtttgcaagtgaactctctgtctacacctcacagtcacactagaagatggcacac
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1435 catcacctatgctattcaactggaccaaagctgcgactgaaacatgccattccagtcac
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1495 gctcggaggatggctcttttctactctcattgccgtgttgccctcttggtgggtgctcagca
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1555 ttacatgaaggtcagcatttgccctccccatggatgtggaagcactctctcacaggtcta
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1615 catcttaaccatcctgattctcaactgctgcttccatcatcatttgcttgctaca-
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1675 taaaatttattttgcagttcaaatccagagctgatggctaccaacaaagatacaaaga-
LHR SEQ ENV 243 -----gntca-----

LHR U20504 1735 tgctaagaaaatggcagtcctcatcttaccgatttcacctgatggaccaatctctt-
LHR SEQ ENV -----

LHR U20504 1795 ctttgccatctcagctgccttcaaagtgccctcattacagtaaccaactcaaa-----
LHR SEQ ENV 248 -----nttncnactnnc-cctcaantnnc

LHR U20504 1849 -----ggtt-----
LHR SEQ ENV 273 nccccgncggnncngnngnnngnncngnctccccncgcnngacngntcggtcnnc

LHR U20504 1853 -----ctactggtt-----ctcttttatcctgt-----caattcatgcgccaatc
LHR SEQ ENV 333 tccancccaacnggttcgnccacctggctgggggggncggnngcgnnttcattngganatac

LHR U20504 1893 cgtttctgtacgcaattttcacaaggcattccaaaggatttctttctgttgctgagca
LHR SEQ ENV 393 ncnntngggtcgncantt-----anagngtcgggngggngnnggggtatnngngagc-

LHR U20504 1953 aatttggtgctgtaaatatcgagctgaactttataggaggaaggatttttcagct---t
LHR SEQ ENV 447 -----cngtgggnttggngnngngt---gngnnngnntttgagngnagt

LHR U20504 2010 atatctccaactgcaaaaatggcttcaactggatcaaataagcc-----ctcccgtcta
LHR SEQ ENV 493 agngcactatgtccna-----gtcngtggntcctnncannancnactgcccgnct

LHR U20504 2064 c-----cttcaagttgactacattacaatgtcaata---ttca
LHR SEQ ENV 546 cnncgannngnngnnngnntngncntcgngnggggngnggtgcnaagngttttgngttn

LHR U20504 2099 gctgtcctggacaagacttgc-----tataaggaatgttaactg-----tgatatcagt
LHR SEQ ENV 606 gatncccgngngnngnngtgcnnngtnntnttggngngntcctctggcgtatgntatnggt

LHR U20504 2148 aaacacatta-----ctgaattatac-----
LHR SEQ ENV 666 nannaantcnngccnncgtnantatncgncnantnggc nangngnannntntngcnnnn

LHR U20504 2169 ----ttaaatatggaaaaaatttatctccacca-----gta
LHR SEQ ENV 726 gngattncgnaggnanngantngctcanagnagnnntggc nnttggcgtngtggga

LHR U20504 2202 atattaacaaagagttggtttcaggaaattatgt--gttaggcacatcaggcaaa
LHR SEQ ENV 786 atact---cgananntggcnnacnacnagggtgtagnncgnnagggtcgnngacnnaaga.

LHR U20504 2260 ct-----ctctacc-----tagctc-----
LHR SEQ ENV 843 tcnnggangnna nctcngccgtcnannncnnngc ntangnttnctntngtgtcnacnn

LHR U20504 2275 -----aaaatgtggtccatgaccatggcc
LHR SEQ ENV 903 cnnngcgttgnngtncgggt nncnncaggggcngnannntncagtggtcgatgncggcc

LHR U20504 2299 -cgtctaaaa-----actatttgtcaagaatactgttgta-gcaagatag-----
LHR SEQ ENV 963 ccggtgtncgcggttgtgttanacncacgggannnngngngncnacanagggngggcgc

LHR U20504 2343 --ggattgcattgaatctataaattgctttgg-----gtagtatactcattttcact-
LHR SEQ ENV 1023 ccggtgtncgcggttgtgttanacncacgggannnngngngncnacanagggngggcgc

LHR U20504 2393 -----atattgattcttccaatccatgaacatggat----atttctcc
LHR SEQ ENV 1083 gncngcncgccgnaggangnngcnnnttgtntgcctngt nngtgnngncatntngtn

LHR U20504 2433 atc-----
LHR SEQ ENV 1143 gttgctgtggnggan

ANEXO IV. ABREVIATURAS

Ditiotreitol (DTT)

Tri-cloro acético (TCA)

Amortiguador salino fosfatado (PBS)

Etanol (EtOH)

SSC (solución salina)

Trietanolamina (TriE)

Ácido clorhídrico (HCL)

Ácido Acético (AA)

Cloruro de sodio (NaCl)

Ácido etilendiamino tetraacetato (EDTA)

Polivinilpirolidona 8PVP)

Mercaptoetanol (β -ME)

Lauril sulfato (SDS)

N-morfino propano sulfónico (MOPS)