

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS HIPOFISIARIAS
DE LA HORMONA LUTEINIZANTE BOVINA (bLH)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

CECILIA VIZCAYA SÁNCHEZ

Asesores:

Dr. Gerardo Perera Marín
MVZ Gerardo Arrellín Rosas

México, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres, porque a pesar de todo creyeron y confiaron en mi.

A Clara y Gerardo, por su ayuda, enseñanzas, paciencia y consejos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Reproducción, por permitirme, el ingreso para poder realizarme como profesionalista, la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y el apoyo para poder realizar este trabajo.

A los asesores Dr. Gerardo Perera Marín y MVZ Gerardo Arrellín Rosas

A los miembros de jurado: Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Joel Hernández Cerón, Dra. Laura Cobos Marín, MVZ Clara Murcia Mejía, por la revisión exhaustiva de este documento.

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CoNaCyt) por el apoyo al proyecto 25748-B.

A mis amigos: Aura, Paloma y Cristian por apoyarme siempre.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Reproducción: Armando, Dr. Galina, Arnulfo, Ubaldo, Alonso, Adrian, Memo, Toño, Bety, Chistian, Omar, Tobe y los que se me olviden, por su ayuda y consejos.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIÓN.....	22
FIGURAS Y CUADROS.....	23
APENDICES.....	37
REFERENCIAS.....	46

VIZCAYA SANCHÉZ CECILIA. Caracterización de las isoformas hipofisarias de la hormona luteinizante bovina (bLH) (Bajo la dirección de: Dr. Gerardo Perera Marín y MVZ Gerardo Arrellin Rosas)

Resumen

El objetivo del estudio fue comparar el patrón de isoformas de la LH de extractos hipofisarios de machos y hembras de la especie bovina por medio del cromatoenfoco. Se analizaron cinco hipófisis de hembra y de macho sin distinción de su condición fisiológica. A cada isoforma identificada se le determinó: punto isoeléctrico (pI), movilidad relativa (Rf), peso molecular (PM) e interacción antígeno-anticuerpo. El pI, se determinó por medio del cromatoenfoco, la Rf con electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% en condiciones nativas (TRIS-PAGE), el PM con electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 %, en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) y la reacción antígeno-anticuerpo por medio de inmunotransferencia y radioinmunoensayo específico para LH. El porcentaje de las isoformas C (pI 9.1) y D (pI 9.0) en el macho y hembra no se modificó, las isoformas B (pI 9.5, $2.8 \pm 0.9\%$), E (pI 8.3, $18.4 \pm 1.3\%$), F (pI 7.4, $8.7 \pm 1.5\%$), I (pI 6.0, $10.2 \pm 1.9\%$) y K (pI 4.4, $2.7 \pm 0.9\%$) en la hembra fueron mayores ($p < 0.05$) observándose una menor cantidad ($p < 0.05$) para las isoformas G (pI 6.9, $2.9 \pm 0.2\%$) y J (pI 4.7, $4.5 \pm 0.9\%$). La Rf de la banda más importante en las isoformas D, E, F, G, H, I y J en el macho fue de 0.06, 0.07, 0.11, 0.21, 0.26, 0.25 y 0.26 cm, respectivamente. En la hembra, la Rf de las isoformas C, D, E, F, I, J y S fue de 0.11, 0.12, 0.11, 0.21, 0.05, 0.09 y 0.21 cm., respectivamente. El PM del monómero correspondió en todas las isoformas a 29.5 Kilodaltones (kDa), en tanto que la subunidad α y β fue de 21.5 y 18.2 kDa, respectivamente. La inmunotransferencia, identificó bandas de PM de 59.0, 29.5 y 21.5 kDa en el estándar USDA-bLH-5 y en las isoformas. Se presentó un paralelismo entre las isoformas de la LH y el estándar USDA-bLH-5. Los datos presentaron una distribución diferente entre machos y hembras, con un menor porcentaje de isoformas básicas en el macho que en la hembra, y un punto isoeléctrico (pI), peso molecular (PM) y movilidad relativa (Rf) semejante entre sexos.

Introducción

La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína heterodimérica,¹ involucrada en la regulación del proceso reproductivo del macho y la hembra,^{2, 3} presente en una variedad de formas moleculares en la hipófisis, suero y orina,^{4,5} polimorfismo que depende del tipo y estructura de sus oligosacáridos, así como de sus residuos de sulfato y/o ácido siálico terminal.⁶

En rumiantes la heterogeneidad de la LH se ha descrito en extractos hipofisarios, empleando métodos como la cromatografía de intercambio iónico,⁷⁻¹³ la cromatografía de interacción hidrofóbica^{14,15} y el cromatoenfoco.¹⁶⁻¹⁸ Recientemente, con el cromatoenfoco, el polimorfismo de la LH se ha identificado en el suero de caprinos,¹⁹ bovinos²⁰ y ovinos;¹⁷ no obstante, el número y cantidad de cada una de las isoformas identificadas varían con el método empleado.

El patrón de síntesis y secreción de las isoformas de la LH se ha correlacionado con el tipo de muestra,^{21,22} el estado fisiológico,^{2,4,20,23-25} sexo y edad^{26,27} del animal. Se han descrito trece isoformas de LH en extractos hipofisarios de hembras bovinas²⁸ y ovinas,^{17,29} cuyo patrón resultó más heterogéneo en el suero.^{17,20} Aunque en ambos tipos de muestra predominaron las isoformas básicas.

La proporción de isoformas que existen de la LH y FSH con relación al sexo y la edad se han descrito en humanos, cuyos resultados mostraron un incremento en las isoformas más ácidas de LH y FSH en machos como en individuos seniles de ambos sexos.²³

Dependiendo del estado fisiológico y neuroendocrino al momento de la colecta de la hipófisis y del suero, se puede encontrar que durante la fase folicular del ciclo estral del hámster,³⁰ rata,³¹ bovino²⁷ y el ciclo menstrual en humanos,²⁵ la proporción de isoformas menos ácidas de la FSH se incrementan (mayor bioactividad *in vitro*), a diferencia del porcentaje observado en un ambiente enriquecido por progesterona (fase lútea), en donde la proporción de isoformas ácidas disminuye (menor bioactividad *in vitro*).^{20,27,28,32}

En la especie bovina, el porcentaje de isoformas ácidas de LH en la fase folicular también se incrementa, mientras que en el diestro, este porcentaje

disminuye con el consiguiente aumento en el porcentaje de las isoformas básicas,²⁰ lo que sugiere una participación diferencial de cada isoforma en el proceso reproductivo de estas especies.

1. *Hormona luteinizante (LH)*

La LH es una glicoproteína, miembro de la familia de hormonas que incluye a la estimulante de la tiroides (TSH), folículo estimulante (FSH) y la gonadotropina coriónica (GC).³³⁻³⁵

La LH participa en la regulación ovárica y testicular;³⁶ induciendo la maduración folicular,³⁷ la ovulación,³⁸ el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona en hembras, mientras que en machos regula la secreción de testosterona.³⁹⁻⁴¹ Además interviene en la síntesis y modificación de las hormonas esteroides, factores de crecimiento y citocinas.³⁶

La LH es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades glicosiladas α y β ,^{42,43} ésta es sintetizada dentro de un grupo heterogéneo de células localizadas en la hipófisis anterior, llamadas gonadotropos. Los gonadotropos se dividen en mono-hormonales (llamados así por que son reconocidos específicamente por anticuerpos anti-LH o anti-FSH) y bi-hormonales (identificados por ambos anticuerpos).⁴⁴ La proporción de estas células varía de acuerdo a la fase del ciclo estral.⁴⁵⁻⁴⁷

1.1 *Subunidad α*

La subunidad α , dentro de una especie, es codificada por un solo gen, por ejemplo, en humanos el gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 6,³⁵ y su secuencia de aminoácidos es idéntica entre los miembros de una familia.

El ADN complementario y el gen de la subunidad α han sido caracterizados en humanos, bovinos, ratones y ratas.⁴⁸ El tamaño del gen varía de 8 a 16.5 kilobases (kb) debido a la variación de tamaño del primer intrón, que oscila de 5.4 kb a 13 kb.³⁵

En algunas especies, el ARNm- α está formado por 730 a 800 nucleótidos, con una homología del 70 a 90% dependiendo de la especie; el

ARNm, codifica para un péptido líder de 20 a 24 aminoácidos y para una cadena proteica de 92 a 96 aminoácidos en todas las especies.⁴⁹

La subunidad α presenta dos sitios de N-glicosilación (oligosacáridos unidos en el grupo amida del aminoácido asparagina), en posición Asn^{52 ó 56} y Asn^{78 ó 82} de la cadena primaria de aminoácidos en mamíferos, aves, anfibios y peces.^{2,42}

1.2 Subunidad β

A diferencia de la subunidad α , la subunidad β de los otros miembros de la familia de glicoproteínas (FSH, TSH y CG), no es codificada por un solo gen. La subunidad β es la que determina la especificidad.³³ Los genes de la β LH son mas pequeños, con una longitud aproximada de 1.5 kb, conformados por 352 a 233 nucleótidos en los humanos.

El gen codifica un péptido líder de 24 aminoácidos y una proteína madura de 121 aminoácidos, con una homología de aproximadamente 82% entre especies.³⁵ Además la subunidad β presenta 12 residuos de cisteína unidos por 6 puentes disulfuro.⁵⁰

El número de aminoácidos en la subunidad β , varía dependiendo de la hormona. Por ejemplo la subunidad β FSH esta formada por 110 a 111; la β TSH por 112-118; β LH por 117-121, mientras que la β hCG y la β eCG contienen de 145 a 149 aminoácidos.^{33,35}

Los sitios de glicosilación varían de acuerdo a la especie y tipo de hormona. En la β LH de especies como ovinos, bovinos, equinos, cerdos y roedores, el sitio de glicosilación se encuentra en la posición Asn¹³, mientras que en la especie humana, el sitio de glicosilación se localiza en Asn³⁰.⁽³⁾

2. Tipo y función de los oligosacáridos de la LH

La LH contiene N-oligosacáridos conformados por una o dos ramificaciones, que presentan como residuo final sulfato, ácido siálico o manosa; formando estructuras de oligosacáridos del tipo mono-sulfatados, di-sulfatados y/o sulfatados-sializados. El tipo de ramificación varía dependiendo de la especie, por ejemplo, la LH bovina y ovina se caracterizan por presentar oligosacáridos

con residuos sulfatados (mono y bisulfatados), con un 76 % de ramas bisulfatadas y un 24 % de mono-sulfatadas, mientras que la LH de origen humano presenta tanto residuos sulfatados como sializados.

La composición y estructura de la cadena de carbohidratos en las gonadotropinas, en particular en la LH, son altamente variables, con un amplio espectro en las unidades terminales del oligosacárido como son el ácido siálico y el grupo sulfato.^{6,24} Estas variaciones constituyen las bases químicas de la formación de las isoformas o la heterogeneidad estructural de la LH.^{11,34}

En las gonadotropinas, los carbohidratos representan el 30% del total de la masa de la hormona⁵¹ y la adición pos-traducciona de estos oligosacáridos en estas hormonas juegan un papel importante en la determinación de sus propiedades y funciones.^{2,52} Por ejemplo, en el plegamiento de la proteína, en el ensamblaje de las subunidades α/β , en la maduración conformacional y secreción del heterodímero, en la tasa metabólica, en la afinidad de unión a su receptor y en la capacidad de la hormona para activar a su receptor de manera eficiente e inducir una señal intracelular.^{3, 24,49}

3. Síntesis y regulación de las isoformas de la LH

En varias especies las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) son secretadas a la circulación en múltiples formas moleculares,^{23,25,32,53-59} sin embargo, pocos trabajos han caracterizado el patrón de isoformas de las gonadotropinas en la circulación en animales domésticos durante diferentes estadios fisiológicos. Mucha de la información se ha documentado en relación con el patrón de isoformas presentes en la hipófisis anterior de rumiantes. Hormonas como la GnRH, el estradiol y la progesterona participan en la regulación de la cantidad relativa y el patrón de distribución de las isoformas de la LH en la hipófisis y el suero en rumiantes.

3.1 Estradiol (E_2)

Existen evidencias que los esteroides sexuales, particularmente los estrógenos, están involucrados en la regulación, producción y secreción de las gonadotropinas en los animales domésticos. Por ejemplo, en rumiantes el E_2 es un importante regulador en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada; la

administración aguda de E₂ a animales ovariectomizados pre-sensibilizados o a ovejas anéstricas, induce un pico similar al pre-ovulatorio de LH.^{60,61} Este evento involucra dos fases, una a corto plazo (4 a 6 h en la borrega),⁶² que consiste en la síntesis y generación de receptores de la GnRH en la membrana del gonadotrofo; la segunda que incluye la secreción de la GnRH por el hipotálamo y comienza de 12 a 15 h después.⁶³ Por lo tanto, se puede asumir que el pico pre-ovulatorio inducido por E₂ es el resultado de un incremento en la sensibilidad de la hipófisis al GnRH y/o una acción en el hipotálamo, que provoca un incremento en la liberación de la GnRH con una descarga masiva de LH por el gonadotrofo, necesaria para la inducción de la ovulación.⁶⁴

Además, el E₂ regula la expresión del ARNm que codifica para las subunidades α y β de la LH;^{35,60,65} modifica la síntesis y regulación de la GnRH^{21,64} y regula el proceso de glicosilación de las gonadotropinas.²⁴

La participación del estradiol en la heterogeneidad de las gonadotropinas en rumiantes se ha descrito en ovinos^{29,66-68} y bovinos.^{69,70} Recientemente durante la fase folicular del ciclo estral, se ha demostrado el polimorfismo de la LH en suero de bovinos²⁰ y cabras.¹⁹ En suero colectado en la fase de anestro, algunos estudios indican que el medio ambiente enriquecido con estradiol, induce una tendencia hacia las isoformas de tipo ácido, con un patrón similar, aunque no idéntico al observado en extractos hipofisarios de ovinos después de un tratamiento crónico con dihidrotestosterona²⁹ y al observado por Rojas *et al.* (2001). Por el contrario, el patrón de distribución de las isoformas de la FSH en suero bajo las mismas condiciones fisiológicas, presenta una tendencia de isoformas hacia formas más básicas.^{25,27,31,70-72}

Por lo tanto, estos datos confirman la hipótesis de que la heterogeneidad de las gonadotropinas es un fenómeno regulado por el medio ambiente endocrino, con la participación de factores hipotalámicos y los productos finales generados en las glándulas blanco, bajo el control de estas hormonas tróficas.⁷³⁻⁷⁵

3. 2 Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)

La GnRH es un factor que controla los niveles de síntesis y pulsos de secreción de las gonadotropinas.⁷⁶ En las células gonadotropas la GnRH induce la

síntesis de la subunidad α , común a LH, FSH, hCG, eCG y TSH y subunidad β de LH y FSH.⁷⁷

La GnRH es liberada de forma pulsátil, la frecuencia de pulsos varia en amplitud, regulando la biosíntesis y secreción de las gonadotropinas en la hipófisis anterior. Por ejemplo, durante la fase folicular, la pulsatilidad de la GnRH/LH es alta (inicialmente es de 1 pico/h y culmina en un pico preovulatorio en vacas); por el contrario, durante la fase lútea la LH es secretada con menor frecuencia (1 pico cada 4 h en la vaca), generando pulsos de mayor amplitud.^{64,78}

Existe una considerable variación en los resultados descritos acerca del papel de la GnRH en la glicosilación de las gonadotropinas. En un estudio *in vitro*, utilizando hipófisis de ovinos y bovinos, perfundidas con una sola dosis de GnRH con el propósito de cuantificar el cambio de las isoformas de LH secretadas y almacenadas, se encontró que las isoformas en estado basal y las secretadas después del estímulo con la GnRH, reflejaron el patrón de isoformas presentes en la hipófisis anterior de ambas especies.⁷⁹ Otro estudio *in vivo* en humanos^{54,59} y ovinos,¹⁷ bajo el estímulo de una dosis única de GnRH, encontró que el perfil de secreción de las isoformas de la LH con carga, no cambian después de la administración exógena de la GnRH tanto en las mujeres adultas como en la fase lútea del ciclo estral del ovino. Además, bajo el estímulo de una sola dosis de GnRH, los gonadotropos analizados en la fase lútea del ciclo estral presentaron una expresión inestable del ARNm para la subunidad- β de LH.⁸⁰ La administración de una dosis de GnRH durante el diestro en bovinos, no incrementa el ARNm para receptores de GnRH en el gonadotropo.⁸¹

La administración pulsátil de GnRH a ovejas ovariectomizadas, restringidas en su crecimiento por la alimentación, no produce cambio en el patrón de distribución de isoformas de la FSH intracelular ni circulante.⁸² En contraste, en humanos, la infusión de GnRH incrementa la proporción de las isoformas básicas de la LH en el suero⁸³ y en la transcripción del gene para β -LH.⁸⁴ En el ovino, la inmunización contra la GnRH disminuye su pulsatilidad y favorece un patrón de isoformas de la LH hacia formas básicas, que también es regulado en conjunto con la secreción de hormonas esteroides de origen gonadal.^{22,85}

Por lo tanto, todo parece indicar, que el efecto agudo de la GnRH raramente induce la síntesis *de novo* de LH y que únicamente participa en la liberación de la LH presente en los gránulos de secreción del gonadotropo; además de los resultados de la administración pulsátil de la GnRH, infiere que la LH presente en la hipófisis y suero, en las diferentes condiciones fisiológicas, es regulada en parte por la pulsatilidad de la GnRH.

3.3 Progesterona (P_4)

La P_4 es una hormona esteroidal, esencial para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. La P_4 es secretada por el cuerpo lúteo después de la ovulación bajo el control de LH.⁴¹ En el hipotálamo, la P_4 regula la liberación pulsátil de la GnRH.^{80,86} Su papel a nivel del hipotálamo-hipófisis es principalmente la inhibición de la pulsatilidad de la GnRH y subsecuentemente de los picos de la LH.⁷⁷ Además en adenohipófisis disminuye la síntesis de receptores a GnRH.

A nivel celular, la P_4 puede actuar por diferentes vías: los efectos genómicos involucran la unión de la P_4 a sus receptores nucleares específicos para regular la transcripción de sus genes blanco.^{65,77,87} Por ejemplo, la P_4 disminuye la expresión de los genes que codifican para la subunidad α común de todas las glicoproteínas y de la subunidad β LH, además reduce el ARNm para las diferentes subunidades, presumiblemente por modificar la estabilidad del ARNm al eliminar la cadena de polyA.⁶⁵ Por otro lado también reduce la expresión del ARNm para los receptores de la GnRH, E_2 y P_4 .

Aunque es clara la participación de la P_4 en el ciclo reproductivo en diferentes especies,⁴¹ no se ha documentado su participación en la heterogeneidad de las gonadotropinas, particularmente de la LH en los animales domésticos. Recientemente Perera-Marín *et al.* (2006), analizando la cantidad relativa de las isoformas de las gonadotropinas en la hipófisis anterior de bovinos, no identificó cambio alguno en la proporción de isoformas de la LH y FSH presentes en un grupo de vaquillas ovariectomizadas comparado con otro de vaquillas ovariectomizadas tratadas con P_4 .

En contraste, las vaquillas no ovariectomizadas presentaron una alta proporción de isoformas básicas de la LH, mientras que la proporción de las

isoformas ácidas de la FSH se incrementaron en la fase lútea del ciclo estral, en tanto que las isoformas neutras disminuyeron. Estos resultados indicaron que las gonadotropinas de la hipófisis dependen en parte de la P₄.

Esta proporción observada en vaquillas en la fase lútea del ciclo estral, fue similar a la proporción de isoformas de la LH presente en el suero de humanos en la fase lútea del ciclo menstrual^{25,57} y durante la pubertad.⁵³

Planteamiento del problema

Aunque se cuenta con información de la caracterización parcial de algunas de las isoformas de la LH bovina secretadas a la circulación²⁰ y con la purificación de dos, tres y cinco isoformas de la LH a partir de extractos hipofisarios de caprinos¹⁰ bovinos¹³ y equinos,⁸⁸ respectivamente; la tasa de eliminación de las isoformas básicas de la LH es mayor al observado en las isoformas de tipo ácido.⁵² Además se ha documentado que las glicofomas básicas presentan una mayor actividad biológica *in vitro* a diferencia de su contraparte ácida. Basados en estas consideraciones, se puede asumir que las isoformas más ácidas estimulan el proceso de maduración folicular que requiere mayor tiempo, pero menor intensidad, en tanto que las isoformas menos ácidas parecen proveer un potente estímulo de corto tiempo, necesario para la inducción de la pubertad o la ovulación.

Por otro lado, actualmente no está documentada la comparación del patrón de las isoformas de la LH en extractos hipofisarios de machos y hembras en la especie bovina, así como su caracterización a través de su movilidad relativa (Rf), peso molecular (PM) y la identificación inmunológica.

Se recurrió al modelo bovino, con la finalidad de analizar el patrón en bovinos y ver si es comparable al descrito en el humano, o si es propiedad de la hormona o de la especie.

Hipótesis

En la especie bovina, la proporción relativa y el patrón de las isoformas de la LH entre el macho y la hembra son diferentes, en base a su peso molecular (PM), movilidad relativa (Rf) y punto isoeléctrico (PI).

Objetivo

Identificar la proporción relativa y patrón de distribución de las isoformas de la hormona luteinizante de la adenohipófisis bovina de machos y hembras, por medio del cromatoenfoco (PI, PM, Rf e inmunotransferencia).

Material y métodos

A) Identificación del polimorfismo de la LH

El estudio inicial se encaminó a identificar el patrón y porcentaje relativo de las isoformas de la LH presentes en los extractos hipofisarios de machos y hembras bovinas por medio del cromatoenfoque.

Colección de las hipófisis:

Las hipófisis de machos (n=5) y hembras (n=5), se colectaron en el rastro municipal de Tlalnepantla, Estado de México, sin distinción del estadio fisiológico del animal. Cada animal fue sacrificado utilizando una pistola de perno oculto dirigido a la región occipital de la cabeza del animal, con el fin de no dañar la hipófisis, posteriormente, se separó la cabeza y se colectó la hipófisis, inmediatamente se colocó en hielo seco y fue transportada en estas condiciones al laboratorio donde se mantuvo a -70°C hasta su procesamiento.

Extracción de proteínas:

Cada hipófisis se disecó del tejido que la rodeaba y el lóbulo anterior se separó del resto de la hipófisis y se pesó. El lóbulo anterior se homogeneizó en amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 (1ml/100 mg de tejido húmedo), que contenía 1 mM fenilsulfonilmetilfluoruro (PMSF), EDTA 5 mM y 200 unidades/ml de aprotinina. El extracto homogeneizado fue centrifugado y el sobrenadante obtenido se dializó a 4°C en membranas con un límite de exclusión de 12 a 14 kDa durante 48 h en bicarbonato de amonio 0.01M, pH 7.5, haciendo cambio del amortiguador cada 8 h. A cada sobrenadante se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford modificado por Bollag.⁸⁹ Una vez determinada la concentración de proteínas el sobrenadante se liofilizó. Cada muestra se conservó hasta su análisis (cromatoenfoque).

Cromatoenfoque:

Las isoformas de la LH presentes en cada extracto hipofisiario se identificaron por medio de cromatoenfoque.

Se empacó una columna de vidrio (27cm de longitud X 0.7cm de diámetro interno) con resina PBE-118 (intercambiador iónico) y se equilibró con 20 volúmenes de trietilamina-HCl 25 mM a un pH de 11.0, manteniéndola a 4°C. Se resuspendieron 50 mg de proteína de cada extracto hipofisiario dializado y liofilizado en 5 ml de Pharmalyte[®] (Pharmacia[®]), diluido 1:45, es decir, por cada volumen de pharmalyte, se adicionaron 44 volúmenes de agua desionizada ajustando a pH 7.0 con HCl 5N; para evitar la exposición de la muestra a un pH extremo, se aplicaron 3 ml del amortiguador inicial (Pharmalyte[®]). Se inició la elusión de las proteínas presentes en cada extracto hipofisiario, eluyendo con el amortiguador de pharmalyte; 1:45, pH 7.0 a un flujo de 7 ml/h y se colectaron fracciones de 2 ml cada una. Al llegar a un pH de 7.0 y estabilizarse durante mas de diez fracciones, obteniendo las proteínas de pH 7.0 a 3.5, el amortiguador de elusión se cambió por el Polybuffer 74[®] (Pharmacia[®]), diluido 1:8, es decir por cada volumen de polybuffer 74 se adicionaron siete volúmenes de agua desionizada y al volumen final se le ajustó el pH a 3.5 con HCl 5N. Finalmente las proteínas unidas a la resina, después de la elusión con pH inferior (pH 3.5), se recuperaron con NaCl 1.0 M. En total se recolectaron 150 fracciones a las cuales se les determinó el pH, las primeras 70 fracciones colectadas con pharmalyte, pH 7.0, fueron neutralizadas con 200µl de una solución Tris-HCl, 1.1M, pH 7.4 y las 80 fracciones restantes con 200µl de imidazol 1.1M. A cada una de las fracciones se les determinó la concentración de LH mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA).

RIA para la LH

Las fracciones colectadas en el cromatoenfoque, se analizaron con un sistema de RIA ovino específico para la LH. En cada tubo de reacción se colocaron 100 µl del estándar de LH (NIDDK-oLH-I-2 [AFP7071B]) a las dosis de 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 ng/tubo ó 100 µl de la dilución 1:200, 1:400, 1:1000 ó 1:4000 de extracto hipofisiario o fracciones colectadas del cromatoenfoque;

posteriormente se colocaron 200 μ l del primer anticuerpo (anti-oLH-26) diluido 1:80,000, es decir por cada μ l de anticuerpo crudo se colocaron 80ml de amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.05M, pH 7.2, que contenía 0.02M de EDTA. Además, a esta dilución se le adicionó suero normal de conejo diluido 1:1,600. Finalmente, se colocaron 100 μ l de trazador (NIDDK-oLH-I-2) u hormona marcada con 125 I (20,000 cpm). Una vez colocados todos los componentes del RIA en el tubo de reacción, los tubos se incubaron durante 20 h a 4 °C. Al término del tiempo de incubación, con el fin de separar la fracción antígeno-anticuerpo del resto de los componentes a cada tubo de reacción se le colocó 1 ml de PBS 0.05 M, pH 7.2, que contenía 10 μ l/ml de proteína A de *Staphylococcus aureus* (Pansorbin[®], Cells by Calbiochem[®]), y se centrifugaron los tubos a 1,500g durante 15 minutos a 4 °C. Con estas condiciones, la sensibilidad del radioinmunoensayo fue de 0.25 ng/ml (%B/B₀=90%) con un coeficiente de variación intra e inter-ensayo del 2.0 % y 3.5 % respectivamente. La validación del sistema fue previamente informado.¹⁷

Caracterización de las isoformas de LH

Una vez identificado el porcentaje relativo de cada isoforma y analizado el patrón cromatográfico y el PI de cada isoforma de los extractos hipofisarios de machos y hembras, se procedió a su caracterización. Para esto, las fracciones colectadas de cada isoforma (picos identificables por medio del RIA del patrón cromatográfico, Fig. 1 y 2 respectivamente) se agruparon y dializaron (membranas, Spectra-Por[®] 4, límite de exclusión de 12 a 14 kDa) a 4°C con bicarbonato de amonio 0.01M, pH 7.5 durante 48 h con cambios sucesivos cada 8h. Al término, cada sobrenadante dializado fue liofilizado.

Cuantificación de proteínas totales

Con el propósito de utilizar la misma cantidad de proteína para el análisis de cada isoforma, se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford modificado por Bollag.⁸⁹ Cada fracción liofilizada se resuspendió en 4 ml de agua desionizada y de cada volumen se analizaron 10 μ l de muestra por triplicado.

Electroforesis en condiciones nativas (TRIS-PAGE)

La Rf o carga eléctrica de las isoformas predominantes de LH de los extractos hipofisarios de machos y hembras obtenidas por medio de cromatofoco, se determinó por medio de electroforesis en tubo bajo condiciones nativas, utilizando poliacrilamida al 7.0 %, pH 8.3. Se colocaron 100 µg de proteína/tubo y se aplicó un voltaje constante de 1.5 mV/tubo durante 3 h. Al término de la corrida, los geles se tiñeron con Amido-Black 10B[®] (Bio-Rad[®]) al 0.5% disuelto en ácido acético al 5%. La decoloración se realizó con ácido acético al 5%.

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

El PM de cada isoforma, se determinó mediante electroforesis en placa utilizando geles de poliacrilamida al 12.5%, pH 8.6, en ausencia de β-mercapto-etanol (condiciones no reductoras). Los geles se tiñeron con plata[†] y se utilizaron como referencia marcadores de bajo peso molecular.[‡]

Inmunotransferencia

Con el propósito de identificar únicamente las bandas de proteínas correspondientes a LH para cada isoforma obtenida en la cromatografía de intercambiador iónico (PBE-118), las muestras fueron corridas en SDS-PAGE, aplicando 100 ng de proteína por carril. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm trans blot[®], Bio-Rad[®]) durante 90 minutos a 150 V constantes. El papel con las proteínas transferidas fue incubado con el primer anticuerpo (anti-oLH-26, diluido 1:500) durante 24 h a 4°C, posteriormente se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (1:3000)*. El revelado de las bandas inmunoreactivas** se realizó con 1 ml de agente color A (azul de tetrazolio en dimetilformamida [DMF]), 1 ml de agente de color B (5-bromo-4cloro-3-indolilfosfato en DMF), disueltos en 100 ml de amortiguador Tris (0.1 M).

[†] Estuche de tinción de plata (Bio-Rad[®])

[‡] Marcadores de bajo peso molecular (Bio-Rad[®])

* Conjugado de fosfatasa alcalina, anti IgG de conejo (Jackson Immuno Research[®]).

** Estuche del sustrato para fosfatasa alcalina (Bio-Rad[®])

Análisis estadístico

La información del porcentaje de LH obtenida en cada fracción del cromatoenfoco, se analizó por **a)** grupo de pH: básicas 10.5 a 7.5, neutras 7.4-6.5 y ácidas 6.4 a 3.5 **b)** por unidades de pH (≥ 10.0 ; 9.99-9.0; 8.99-8.0; 7.99-7.0; 6.99-6.0; 5.99-5.0; 4.99-4.0; 3.99-3.5) y **c)** por tipo de isoforma (A a la K, comenzando con la isoforma obtenida a pH más básico, isoforma A y finalizando con la isoforma obtenida a pH más ácido, isoforma K). El porcentaje de LH en cada fracción o unidad, se transformó a arco-seno y se sometió a un análisis de varianza (ANDEVA) por bloques, considerando como bloques los efectos de grupo de pH, unidad de pH y/o tipo de isoforma. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS.

El paralelismo entre las isoformas y el estándar (NIDDK-oLH-2) se midió por medio de un análisis de varianza del valor de la pendiente obtenida después de la transformación de las curvas dosis-respuesta para cada isoforma. El paralelismo fue observado en todas las isoformas de LH en relación con el estándar (Fig. 1).

Resultados

El patrón típico de elución de los extractos hipofisarios del macho (n=5) y la hembra (n=5) durante su análisis por medio del cromatofoco, se describen en la Figuras 2 y 3, respectivamente. En ambos casos, las fracciones inmunorreactivas a LH se agruparon en 12 fracciones, identificadas con letras de la A a la K y finalizando con la S, comenzando con las proteínas de elución más básicas (denominada isoforma A) y la isoforma obtenida después de la aplicación de NaCl se le denominó isoforma S. Once isoformas eluyeron en el rango de pH 10.5 a 3.5 y la isoforma 12, unida a la resina de la columna, se desprendió después de la aplicación de una solución con mayor fuerza iónica (NaCl 1M).

El análisis por grupo de isoforma (Fig. 4) y unidad de pH (Fig. 5), no mostraron diferencias significativas entre machos y hembras, aunque la mayor proporción de isoformas de ambos grupos eluyó a pH básico entre el rango de 9.99 a 8.0 y representaron el $77 \pm 2\%$ y el $73 \pm 4\%$ en machos y hembras, respectivamente. Las isoformas neutras correspondieron al $10 \pm 2\%$ en el macho y al $13 \pm 2\%$ en la hembra y las isoformas ácidas sumaron el $13 \pm 2\%$ (machos) y el $14 \pm 2\%$ (hembras). En contraste, el análisis por tipo de isoformas en la hembra (Cuadro 1) presentó un incremento ($P < 0.05$) en las isoformas B (pH 9.9 a 9.1), E (pH 8.7-7.9), F (7.8-7.0), I (pH 6.5 a 5.5), K (pH 3.39-4.9), al mismo tiempo se encontró una disminución ($P < 0.05$) en el porcentaje de las isoformas G (7.0-6.9) y J (5.5-3.4).

Los patrones electroforéticos bajo condiciones nativas (TRIS-PAGE) para las isoformas representativas de los machos (Fig. 6) y hembras (Fig. 7), mostraron diferentes bandas, predominado en el macho (Cuadro 2) la banda con Rf de 0.06, 0.07, 0.11, 0.21, 0.26, 0.25 y 0.26 cm, en las isoformas D, E, F, G, H, I y J, respectivamente. En la hembra (Cuadro 3), el Rf de las isoformas C, D, E, F, I, J y S fue de 0.11, 0.12, 0.11, 0.21, 0.05, 0.09 y 0.21 cm, respectivamente. El PM del monómero de las isoformas de machos y hembras se describe en las figuras 8 y 9, respectivamente, y correspondió en todas las isoformas a 29.5 kDa, en tanto que la subunidad α y β fue de 21.2 y 18.2 kDa, respectivamente. La inmunodetección (Figs. 10 y 11), identificó bandas de PM

de 59.0, 29.5 y 21.2 kDa en el estándar USDA-bLH-5 como en las isoformas de machos y hembras, respectivamente.

Discusión

Este estudio describe por primera vez la movilidad relativa, el peso molecular y la inmuno-detección de las isoformas predominantes obtenidas por medio del cromatoenfoco de hipófisis bovina de machos y hembras. Los resultados mostraron que existe una distribución de las isoformas de la LH hacia un patrón más básico en la hembra que en el macho, en contraste, el porcentaje de isoformas ácidas en el macho se incrementó.

El patrón electroforético en TRIS-PAGE de las diferentes isoformas de la LH confirmó la heterogeneidad de carga en esta proteína. Sin embargo, el patrón electroforético de las isoformas A, B, C, G y K en el macho y A, B, G, H y K en la hembra no se pudieron identificar, debido a la baja sensibilidad de esta técnica, ya que requiere como mínimo 100 µg de proteína y para el análisis en este estudio se utilizaron las fracciones correspondientes de cada isoforma identificada de un sólo cromatoenfoco, el procedimiento se repitió tres veces con los mismos resultados. Las isoformas D en el macho y F, I y J en la hembra, presentaron una banda mayoritaria con Rf más catiónica semejante a los estándares referencia (USDA-bLH-5; NIDDK-oLH-26)^{4,7} de una variante de LH caprina,⁴ LH equina⁸⁸ y humana;⁴³ la isoforma E en el macho, C, D y E en la hembra, presentaron una banda menos catiónica, semejante a una de las isoformas purificadas de LH equina,^{88,90} humana,^{1,2} bovina,^{3,7,91} de rata⁹² y caprina⁴. Finalmente, las isoformas F, H, I y J presentaron una banda mayoritaria mucho menos catiónica en el macho, patrón semejante a la LH equina.⁸⁸ Estas diferencias entre los diferentes patrones electroforéticos en TRIS-PAGE (heterogeneidad de carga) para las isoformas de la LH, se ha sugerido que se deben a la estructura y composición de las unidades de carbohidratos de la molécula y a la cantidad de sulfato terminal en estos oligosacáridos.^{20,22,34, 42, 51}

Con el fin de determinar el PM de las isoformas de LH, se recurrió al análisis electroforético en el sistema SDS-PAGE, en comparación con el estándar USDA-bLH-B5; en todos los casos se presentó una banda importante con PM relativo de 36.5 a 37.5 kDa, cercano a lo señalado para las especies ovina, bovina, porcina y caprina,^{4,7} sugiriendo que la banda presente en las isoformas identificadas en este estudio, corresponde a la forma nativa de esta

proteína. Por otro lado, se identificaron proteínas de alto PM, principalmente en las isoformas D, E y F, tanto en hembras como en machos. Sin embargo, no se analizaron en presencia de β -mercaptoetanol, por lo que no se puede sugerir como agregados de PM de la forma nativa. Además, se presentó una banda de peso molecular relativo de 20.8 kDa en todas las isoformas. Estos resultados se asemejan a lo informado para esta hormona^{3-5, 7, 88} y sugieren que las isoformas de alto PM corresponden a agregados de la forma nativa y ésta, a su vez, está compuesta de dos subunidades que correspondieron a las bandas de menor PM.

La inmuno-detección para cada una de las fracciones identificadas de la LH en el macho y hembra por medio del cromatofoco, identificó dos proteínas de alto PM, una banda importante con PM relativo de 37.5 kDa, así como una proteína con un peso molecular de 23.4 kDa. Estos datos confirman que las diferentes fracciones identificadas para cada isoforma de LH en la hembra y el macho, corresponden a la LH.

El RIA permitió observar un paralelismo de las diferentes isoformas de la LH, en comparación con el estándar de referencia NIDDK-OLH-I-2; esto confirma la presencia de LH. La cantidad de LH inmunorreactiva necesaria para la dosis del 50% (ED_{50}) de la curva dosis-respuesta, fue inferior en las proteínas que eluyeron a pH básico (A, B, C, D y E) en comparación con la de elusión a pH neutro (F y G) y ácido (H, I, J, K y S). La diferencia de respuesta se puede explicar en función del tipo de anticuerpo utilizado en este estudio, el cual se generó con una LH obtenida a pH básico (datos señalados por USDA y NIDDK).

Conclusión

Los resultados mostraron un patrón más básico de isoformas de la LH en la hembra que en el macho; se confirmó la presencia de heterogeneidad de la LH en la hipófisis anterior con características fisicoquímicas e inmunológicas de cada isoforma semejante entre sexos.

En la actualidad es conocido que la actividad biológica *in vivo* de las isoformas básicas de las gonadotropinas es menor debido a su alta tasa de eliminación, en comparación a las isoformas ácidas,⁹³ contrario a lo que ocurre *in vitro*.⁹⁴ Aunque se cuenta con esta información, la importancia fisiológica de las distintas isoformas de las gonadotropinas no es del todo clara; más aun, si las técnicas empleadas para su obtención limitan el número y cantidad de isoformas identificadas en la hipófisis anterior,¹³ cuya caracterización fisicoquímica únicamente se ha descrito en proteínas con alta pureza.^{7-13,88}

Basados en estas consideraciones, se pudiera pensar que las isoformas ácidas de las gonadotropinas estén participando el proceso de maduración folicular, evento que requiere mayor tiempo, pero de menor intensidad, en tanto que las isoformas básicas pueden proveer un potente estímulo de corto tiempo, necesario para la inducción de la pubertad o la ovulación; en el caso de los machos, se puede sugerir que las isoformas ácidas estimulan la capacitación espermática en tanto que las isoformas básicas pueden inducir la maduración.

Por lo tanto, la caracterización de las isoformas de la LH presentes en los extractos hipofisarios de machos y hembras bovinas, así como su distribución, son el paso inicial de un proyecto más amplio, encaminado a conocer la relación estructura-función de las isoformas de las gonadotropinas.

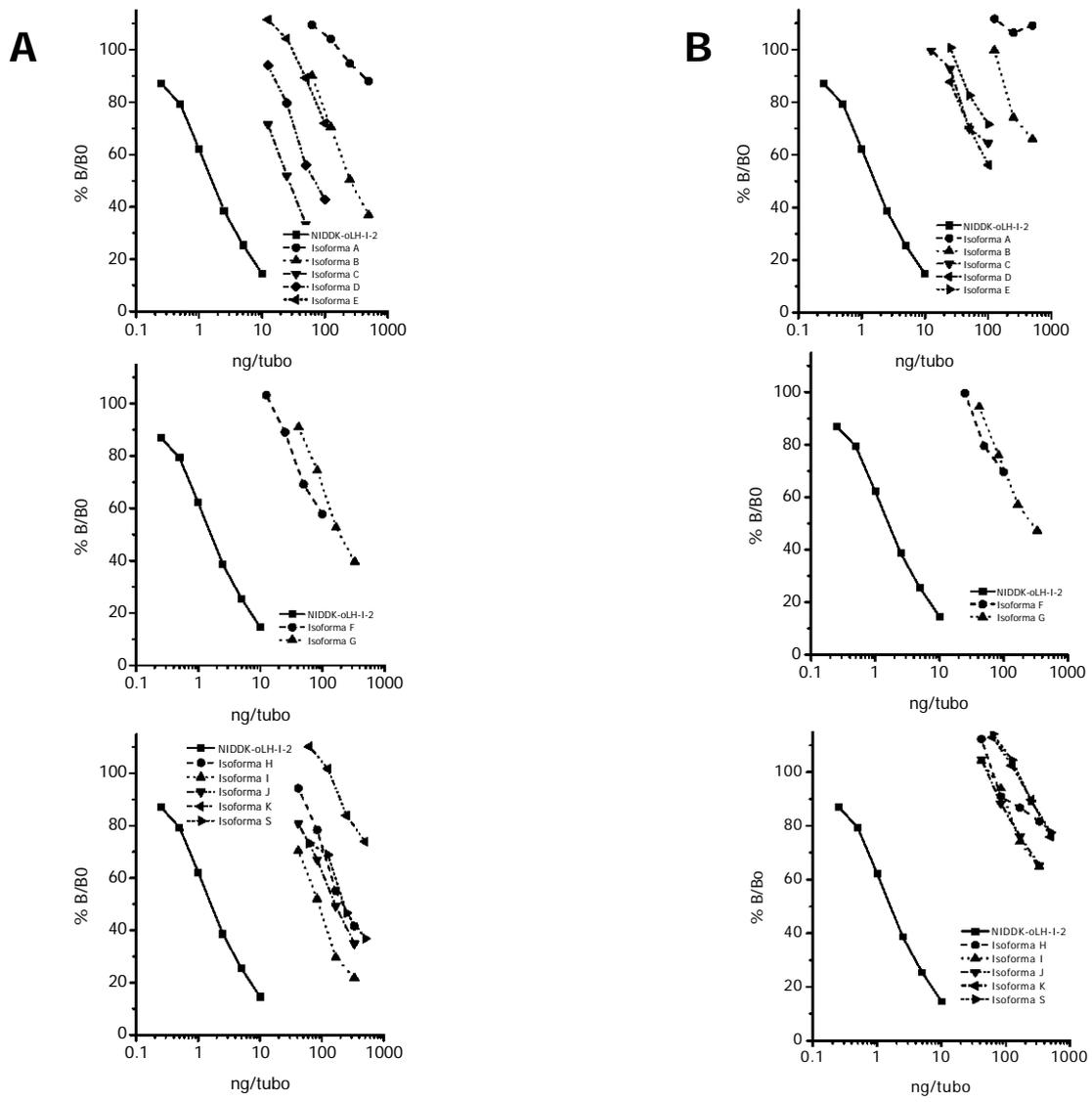


Fig. 1 Caracterización de las isoformas obtenidas de extractos hipofisarios de machos (A) y hembras (B) bovinas por medio de cromatoenfoque. Todas las fracciones se analizaron por triplicado mediante RIA.

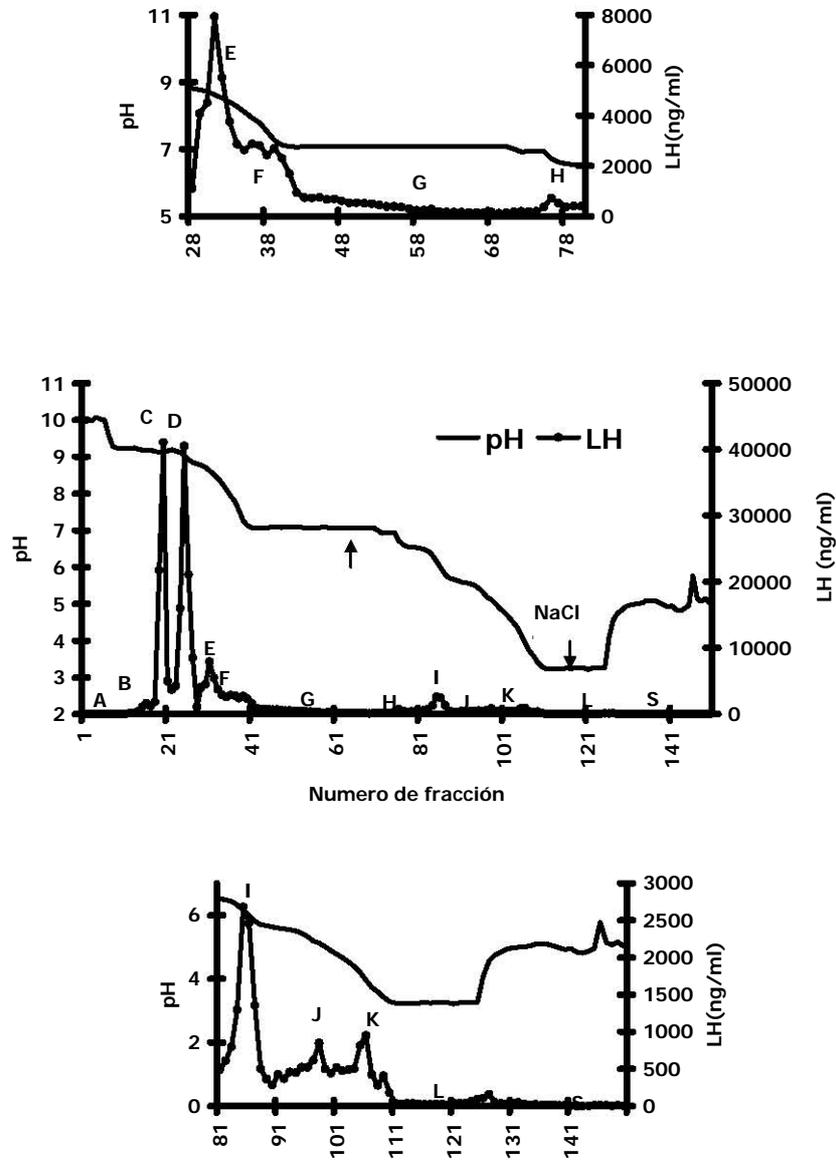


Fig. 2 Patrón de distribución de las isoformas de la LH de los extractos hipofisarios de machos bovinos, después de la separación por medio del cromatoenfoco. Las flechas indican en momento de cambio de amortiguador durante la corrida cromatografica y después de la aplicación de 1M NaCl.

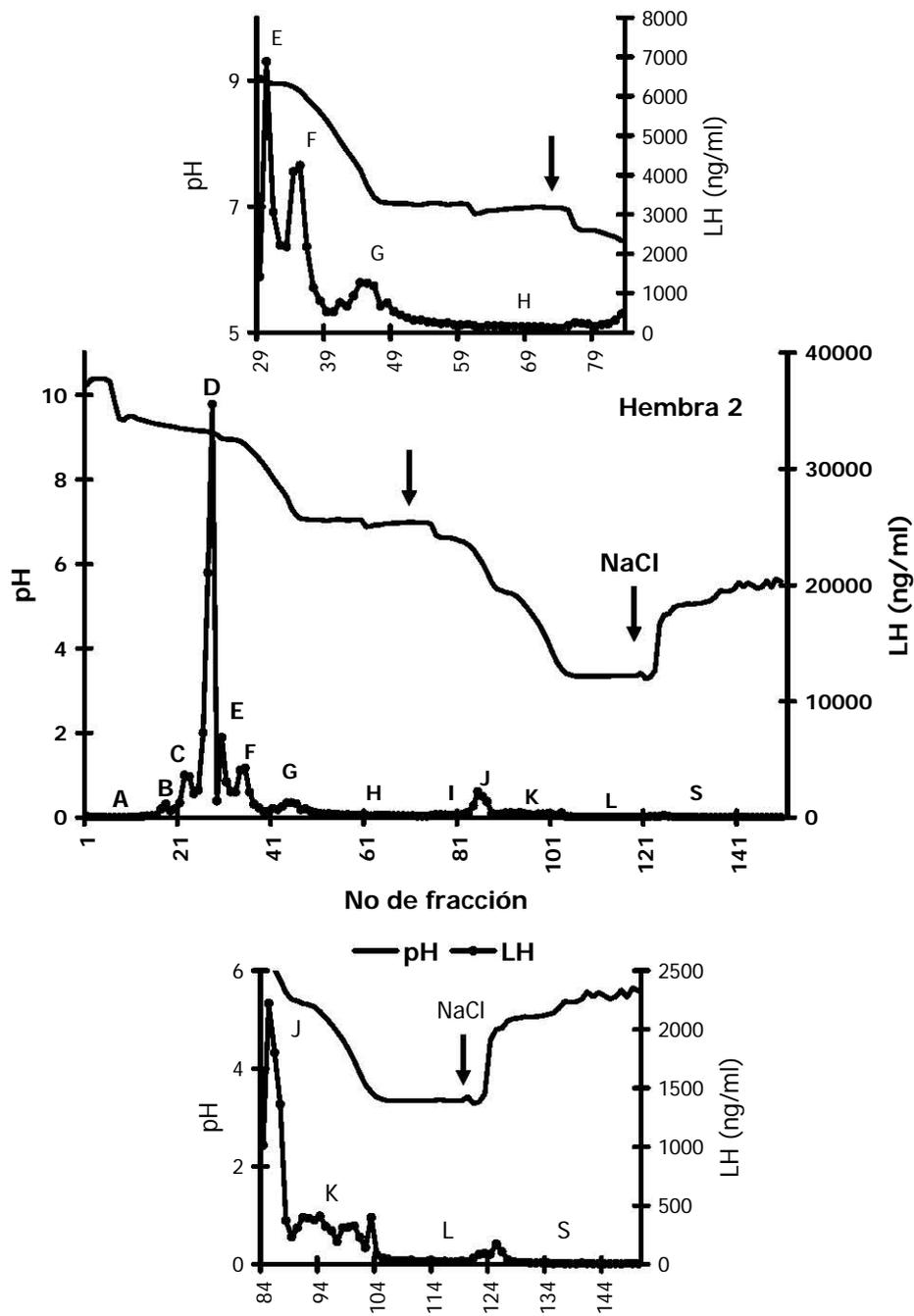


Fig. 3 Patrón de distribución de las isoformas de la LH de los extractos hipofisarios de hembras bovinas, después de la separación por medio del cromatofoco. Las flechas indican en momento de cambio de amortiguador durante la corrida cromatografica y después de la aplicación de 1M NaCl.

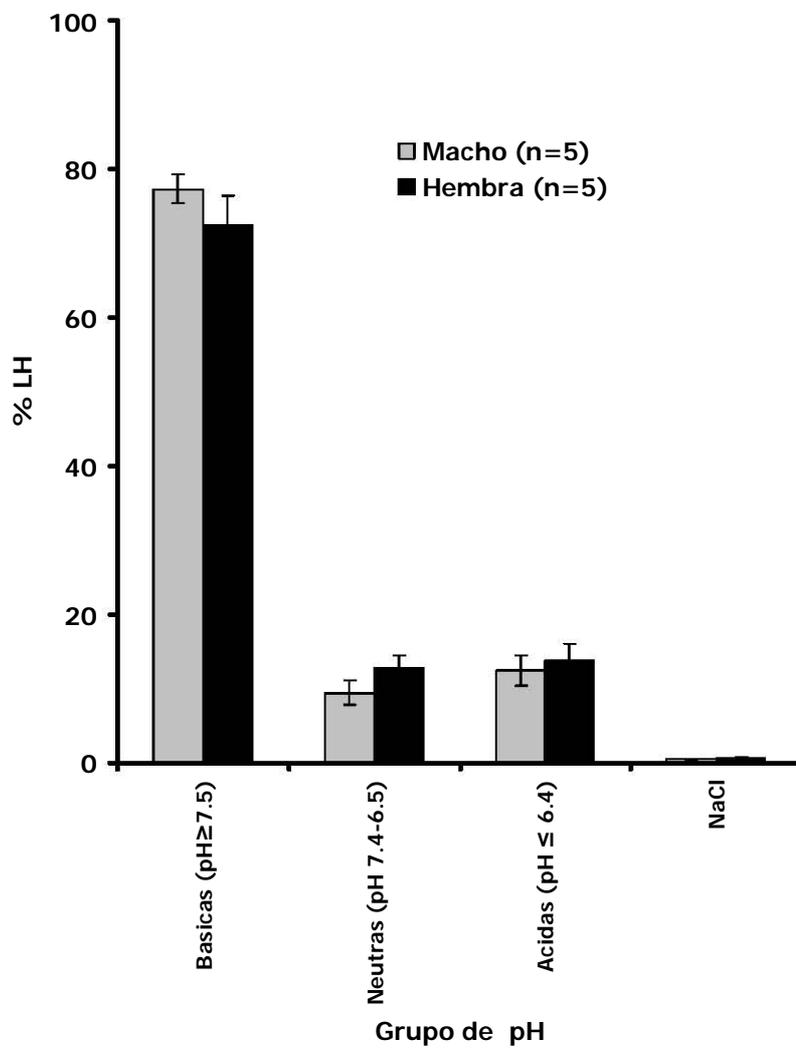


Fig. 4 Porcentaje de distribución de las isoformas de la LH por grupo de pH en la hipófisis bovina de machos y hembras, analizadas mediante el cromatofoco eluido entre un rango de pH de 10.5 a 3.5. Los resultados presentan el porcentaje \pm error estándar para cada grupo de pH.

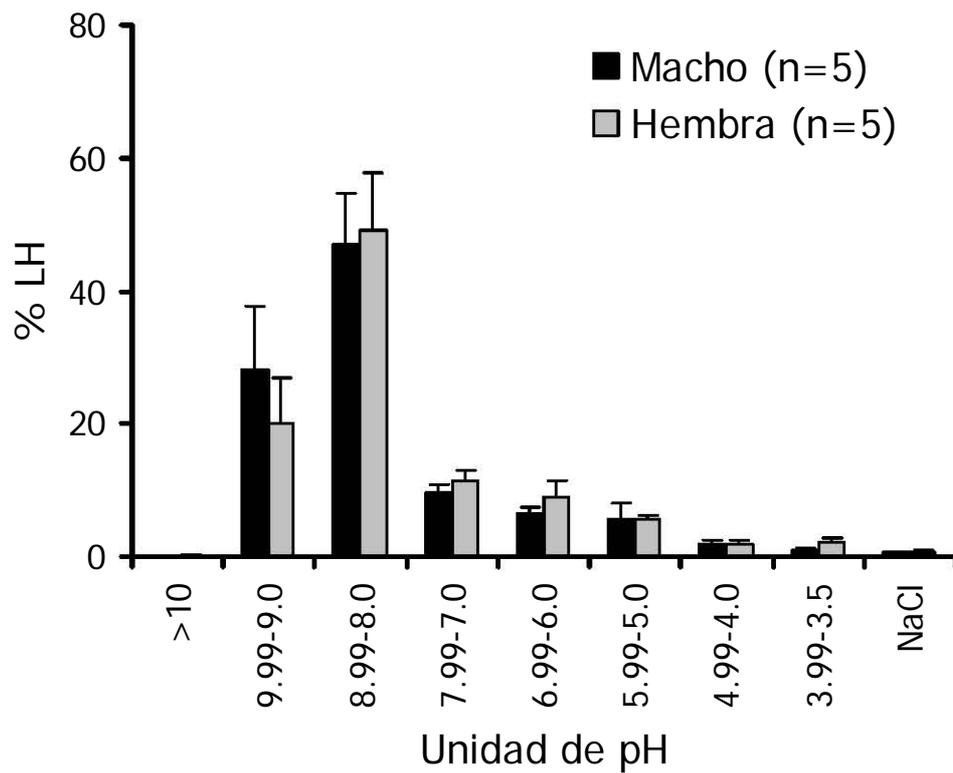


Fig. 5 Porcentaje de distribución de las isoformas de la LH por unidad de pH en la hipófisis bovina de machos y hembras, analizadas mediante el cromatograma eluido entre un rango de pH de 10.5 a 3.5. Los resultados presentan el porcentaje \pm error estándar para cada grupo de pH.

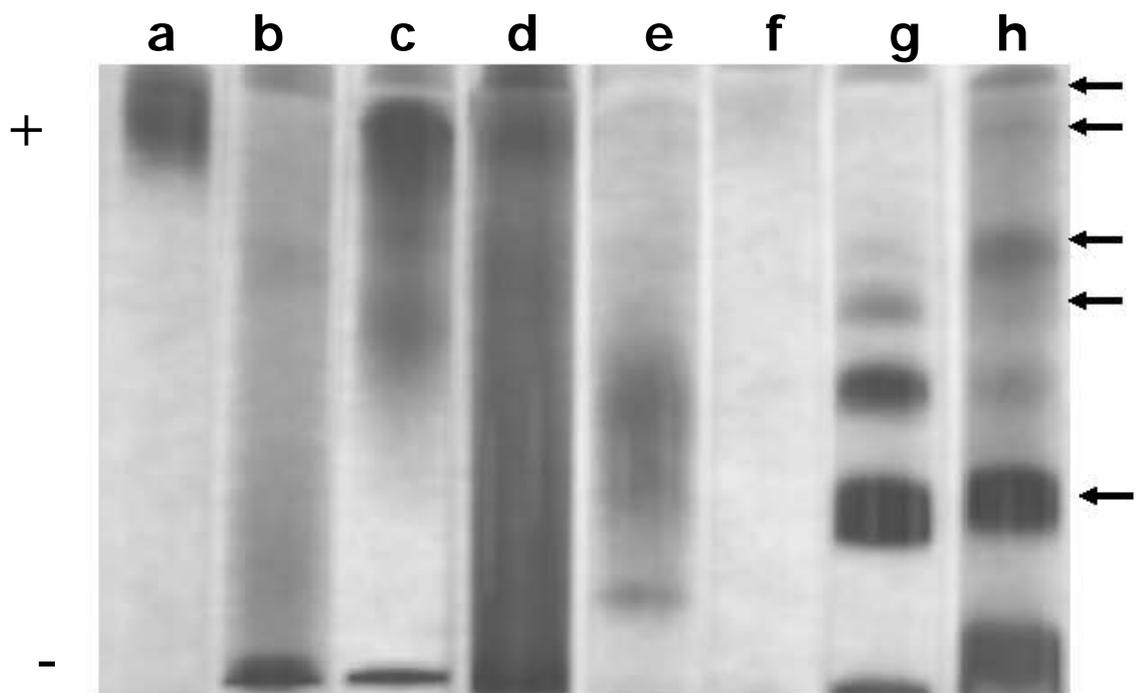


Fig. 6 Electroforesis discontinua de isoformas de machos bovinos, geles en tubo, poliacrilamida al 7.0% en condiciones nativas (TRIS-PAGE), pH 8.3. **a)** USDA-bLH-5; **b)** Isoforma C; **c)** Isoforma D; **d)** isoforma E; **e)** Isoforma F; **f)** Isoforma H; **g)** Isoforma I; **h)** Isoforma J. Las flechas de arriba hacia abajo indican bandas de proteínas de mayor a menor carga catiónica.

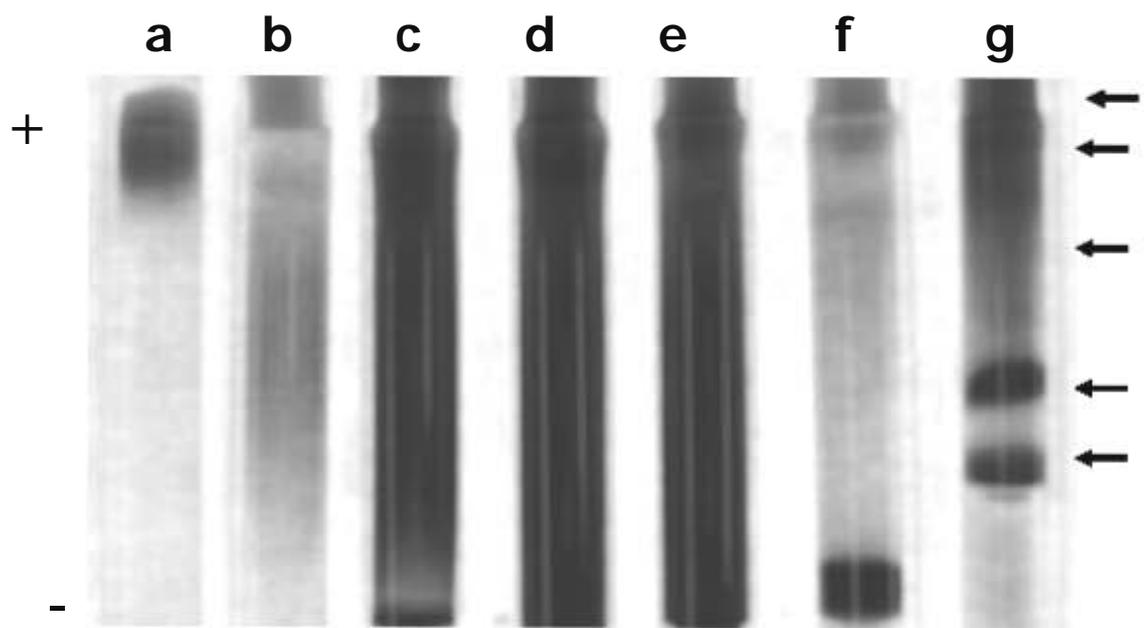


Fig. 7 Electroforesis discontinua de isoformas de hembras bovinas, geles en tubo, poliacrilamida al 7.0% en condiciones nativas (TRIS-PAGE), pH 8.3. **a)** USDA-bLH-5; **b)** isoforma C; **c)** Isoforma D; **d)** isoforma E; **e)** Isoforma F; **f)** Isoforma I; **g)** Isoforma J. Las flechas de arriba hacia abajo indican bandas de proteínas de mayor a menor carga catiónica.

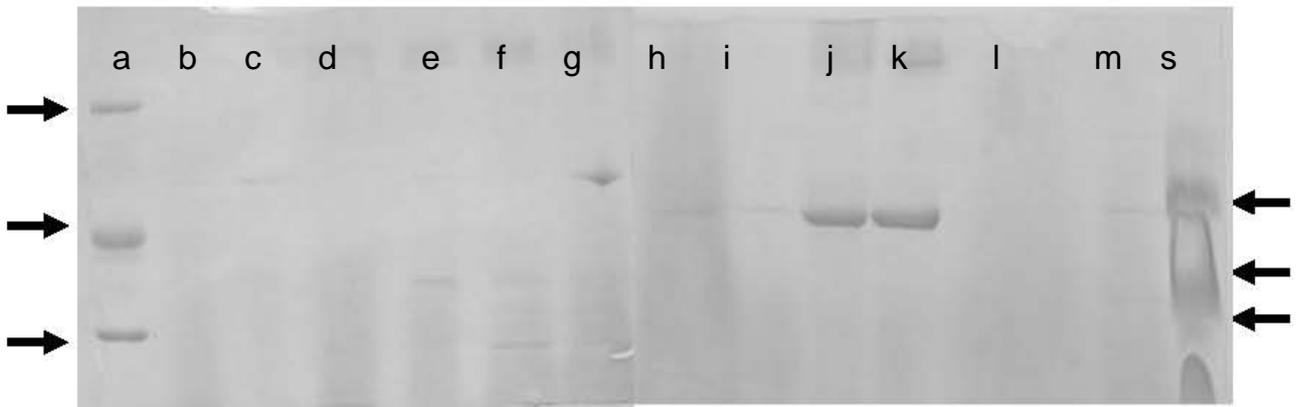


Fig. 8 Electroforesis discontinua de las isoformas de LH en los extractos hipofisarios, de machos, en condiciones desnaturalizantes en SDS-PAGE, al 12.5%, pH 8.6. **a)** Marcadores de peso molecular (45,000, 31,000 y 21,500 daltones); **b)** isoforma a; **c)** Isoforma B; **d)** Isoforma C; **e)** Isoforma D; **f)** Isoforma E; **g)** Isoforma F; **h)** Isoforma G; **i)** Isoforma H; **j)** Isoforma I; **k)** Isoforma J; **l)** Isoforma K **m)** Isoforma S; **s)** Estándar USDA-bLH-5. Las flechas de la izquierda indican los marcadores de peso molecular. Las flechas de la derecha señalan agregados de formas nativas.

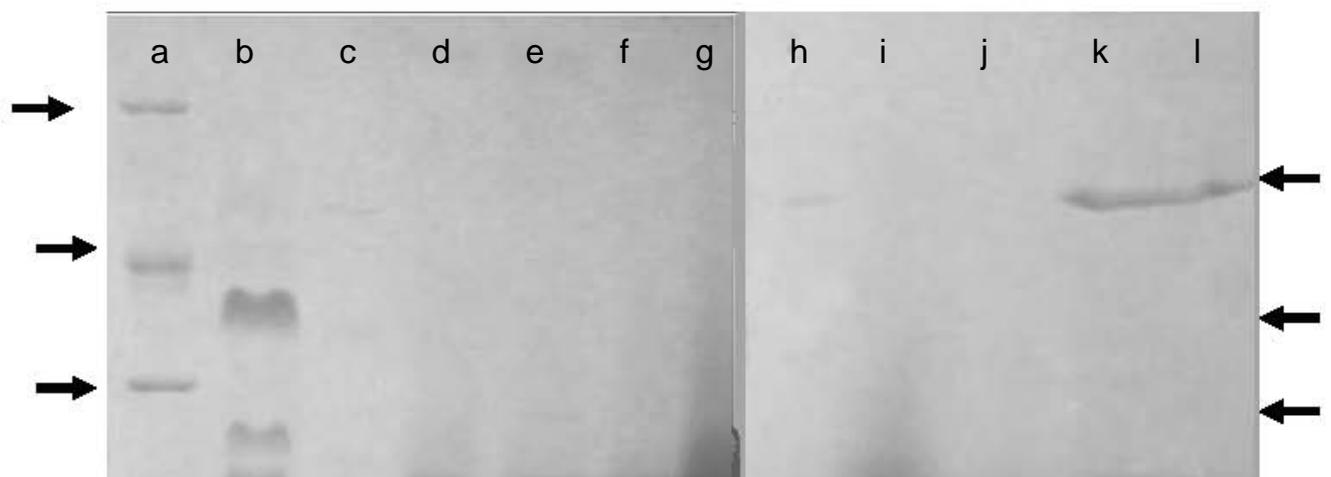


Fig. 9 Electroforesis discontinua de las isoformas de LH en los extractos hipofisarios, de hembras, en condiciones desnaturalizantes en SDS-PAGE, al 12.5%, pH 8.6. **a)** Marcadores de peso molecular (45,000, 31,000 y 21,500 daltones); **b)** USDA-bLH-B5; **c)** Isoforma A; **d)** Isoforma B; **e)** Isoforma C; **f)** Isoforma D; **g)** Isoforma E; **h)** Isoforma F; **i)** Isoforma G; **j)** Isoforma H; **k)** Isoforma I; **l)** Isoforma J. Las flechas de la izquierda indican los marcadores de peso molecular. Las flechas de la derecha señalan agregados de formas nativas.

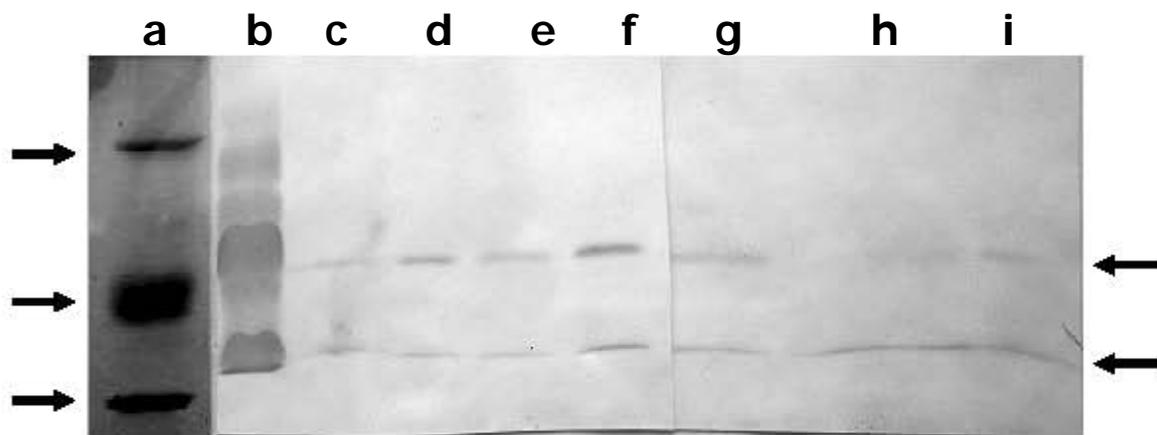


Figura 10. Inmunodetección de las isoformas mayoritarias de la LH de machos bovinos, identificadas por medio del cromatoenfoco. **a)** Marcadores de peso molecular (45.0, 31.0 21.5 kDaM; flechas de la izquierda); **b)** USDA-bLH-b5; **c)** isoforma G; **d)** Isoforma F; **e)** isoforma E; **f)** isoforma D; **g)** isoforma J; **h)** isoforma I; **i)** isoforma H. La banda de 37.5 kDa corresponde a la forma nativa de la LH (flecha superior) y la banda de 23.4 kDa, muestra la subunidad alfa (flecha inferior; flechas de la derecha).

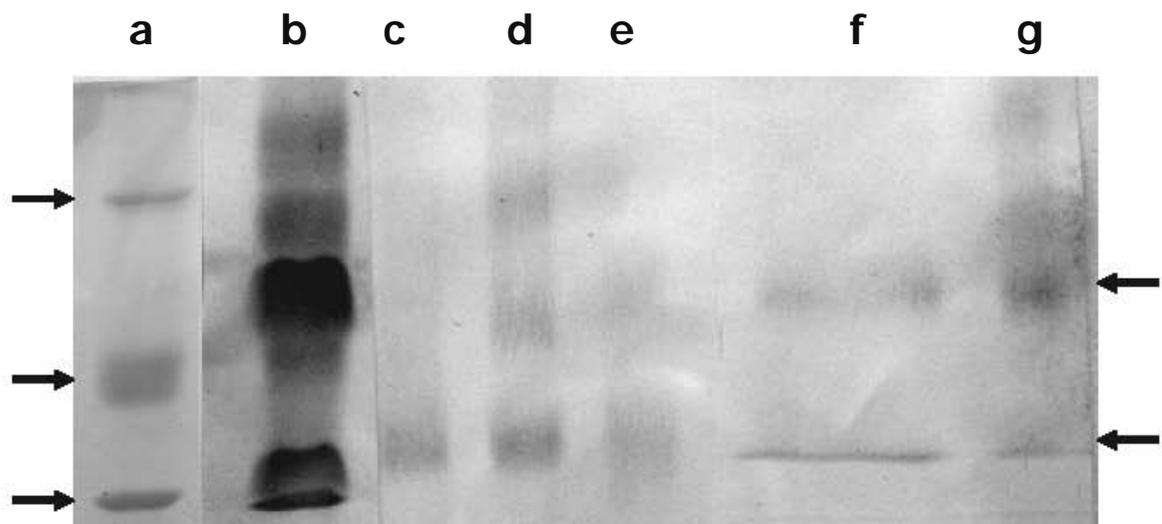


Figura 11. Inmunodetección de las isoformas mayoritarias de la LH de hembras bovinas, identificadas por medio del cromatoenfoco. **a)** Marcadores de peso molecular (45.0, 31.0 21.5 kDa; flechas de la izquierda); **b)** USDA-bLH-b5; **c)** isoforma E; **d)** Isoforma D; **e)** isoforma C; **f)** isoforma G; **g)** isoforma F. La banda de 37.5 kDa corresponde a la forma nativa de la LH (flecha superior) y la banda de 23.4 kDa, muestra la subunidad alfa (flecha inferior; flechas de la derecha).

Cuadro 1. Porcentaje de distribución de las isoformas de la hormona luteinizante en extractos hipofisarios de machos y hembras bovinas. Los valores representan el promedio \pm error estándar.

Isoforma	Machos (n=4)		hembras (n=4)	
	pH (Rango)	LH (%)	pH (Rango)	LH (%)
A	10-9.6	0.0 \pm 0.01	10.2-10.1	0.05 \pm 0.03
B	9.5-9.2	0.2 \pm 0.1 ^a	9.9-9.1	2.8 \pm 0.9 ^b
C	9.1-9.0	23.6 \pm 9.7	9.0-9.0	17.2 \pm 6.2
D	8.9-8.5	46.5 \pm 8.3	8.9-8.8	31.2 \pm 7.7
E	8.4-7.8	5.4 \pm 1.3 ^a	8.7-7.9	18.4 \pm 1.3 ^b
F	7.7-7.1	4.4 \pm 0.7 ^a	7.8-7.0	8.7 \pm 1.5 ^b
G	7.0-6.9	4.7 \pm 0.7 ^a	6.9-6.9	2.9 \pm 0.2 ^b
H	6.8-6.5	1.6 \pm 0.3	6.8-6.6	1.3 \pm 0.4
I	6.4-5.7	6.9 \pm 0.8 ^a	6.5-5.5	10.2 \pm 1.9 ^b
J	5.5-3.4	6.0 \pm 1.5 ^a	5.4-3.9	4.5 \pm 0.9 ^b
K	3.3-4.9	0.8 \pm 0.3 ^a	3.8-5.0	2.7 \pm 0.9 ^b
S	5.0-5.0	0.0 \pm 0.01	5.1-5.3	0.07 \pm 0.01

^{a,b} P \leq 0.05

Cuadro 2. Punto isoelectrico (pI) y movilidad relativa (Rf) de la isoformas identificadas en extractos hipofisarios de machos bovinos por medio del cromatoenfoco. Los datos presentan el Rf en cms de las bandas más importante en cada gel. oLH corresponde al estándar de referencia (NIDDK-oLH-I-2), BSA, corresponde a la albúmina sérica bovina. Se presentan las isoformas con un pI más alto (A) hasta la obtenida después del NaCl (S).

Producto	pI	Rf					
oLH	0.07						
BSA					0.49		0.72
A	9.8						
B	9.4						
C	9.1						
D	8.7	0.06			0.4		
E	8.1		0.11	0.26		0.45	0.79
F	7.4			0.21	0.33	0.39	0.65
G	7.0						
H	6.7	0.07		0.26			
I	6.1	0.08	0.19	0.25			
J	4.5	0.08		0.26		0.39	0.55
K	4.1						
S	5.0						0.79

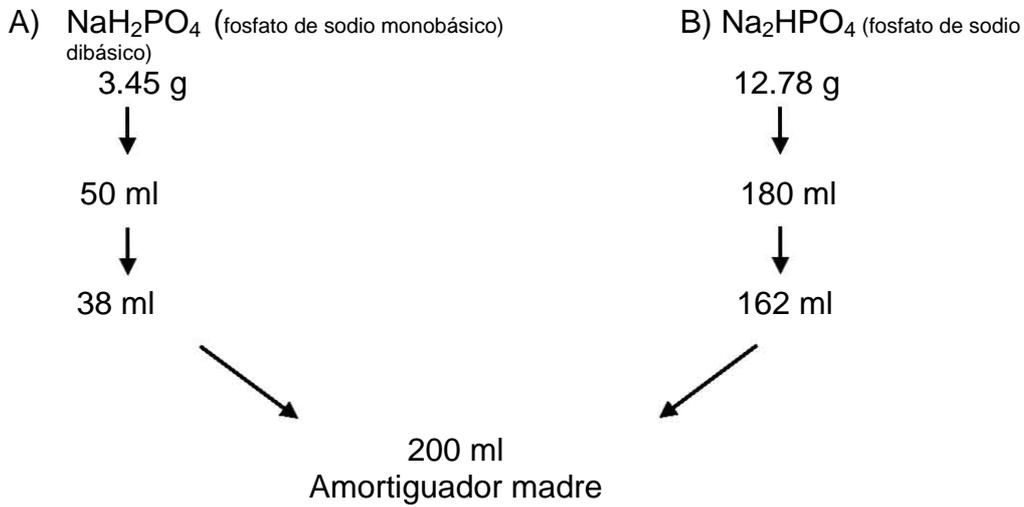
Cuadro 3. Punto isoelectrico (pI) y movilidad relativa (Rf) de la isoformas identificadas en extractos hipofisarios de hembras bovinas por medio del cromatofoco. Los datos presentan el Rf en cms de las bandas más importante en cada gel. oLH corresponde al estándar de referencia (NIDDK-oLH-I-2), BSA, corresponde a la albúmina sérica bovina. Se presentan las isoformas con un pI más alto (A) hasta la obtenida después del NaCl (S).

Producto	PI	Rf		
oLH		0.07		
BSA			0.49	0.72
A	10.2			
B	9.5			
C	9.0	0.11	0.32	
D	8.9	0.12	0.25	
E	8.3	0.11		0.38
F	7.4	0.05	0.21	0.49
G	6.9			
H	6.7			
I	6.0	0.05	0.19	
J	4.7	0.09	0.22	0.55 0.73
K	4.4			
S	5.2		0.21	0.71

Apéndice I

AMORTIGUADORES PARA RIA

PB 0.5 M pH 7.2-7.4



PB 0.05 M pH 7.4

PB 0.5 M

↓
50 ml

↓
500 ml

Equilibrar columna de Shepadex
Preparar cloramina T y metabisulfito de sodio
Amortiguador de corrida

PBS 0.05 M

PB 0.05 M + 0.14 M NaCl

1000 ml + 8.18 g

Preparar PEG (polietilenglicol) 6%
Preparar 2do anticuerpo
Centrifugación de muestras de plasma

PBS-EDTA

PBS + 0.02 M EDTA

1000 ml + 7.60 g

100 ml + 0.76 g

Preparar 1er anticuerpo
Preparar suero normal de conejo (SNC)

PBS-BSA

PBS + BSA 1%

100 ml + 1g

Amortiguador de ensayo
Dilución de estándares

PBS-BSA

PBS + BSA 0.1 %

100 ml + 0.1 g

Diluir fracciones obtenidas de la marcación

Apéndice II

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS TOTALES (METODO DE BRADFORD)

CURVA ESTANDAR (MACROMETODO)

- 1.- Preparar concentraciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA)
(10, 20, 40, 80, y 100 µg de proteína).
- 2.- Llevar cada solución a 100 µl con agua desionizada.
- 3.- Agregar 4.9 ml de reactivo Bradford (1: 5).
(Del reactivo original se toma un volumen y se adicionan cuatro volúmenes de H₂O)
- 4.- Dejar que reaccione durante 5 minutos.
- 5.- Leer a 590 nm (Perkin Elmer, Lambda BIO-10)

CURVA ESTANDAR (MICROMETODO)

- 1.- Preparar concentraciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA)
(1, 2, 4, 8, 10 y 12 µg de proteína)
- 2.- Llevar cada solución a un volumen final de 800 µl con agua desionizada.
- 3.- Agregar 200 µl de reactivo Bradford (concentrado)
- 4.- Dejar que reaccione durante 5 minutos
- 5.- Leer a 590 nm (Perkin Elmer Lambda-Bio 10)

PREPARACION DE ALBUMINA SERICA BOVINA

De la solución estándar (BSA al 20 %), se tomaron 10 µl que contienen 2 mg de proteína. Esta concentración de proteína, se ajusto a un volumen de 2 ml con agua desionizada, generando una concentración de 1µg/µl de solución.

Apéndice III

ELECTROFORESIS TRIS-PAGE

Soluciones:

GEL RESOLVEDOR

Solución A1:

HCl 1N	24ml
TRIS	18.5 g
TEMED	115 µl
H ₂ O	50ml

Ajustar a pH 9.4

Solución A2, al 7%:

Acrilamida	28 g
Bisacrilamida	0.74 g
H ₂ O	100ml

Filtrar en papel Whatman No. 42

Solución C:

Persulfato de Amonio	140 mg
H ₂ O	100 ml

Preparar al momento de la electroforesis

GEL CONCENTRADOR

Solución B:

HCl (1N)	48.0 ml
TRIS	6.0 g
TEMED	460 µl
H ₂ O	52.0 ml

Ajustar a pH 7.2

Solución D:

Acrilamida	10.0 g
Bisacrilamida	2.5 g
H ₂ O	100 ml

Filtrar en papel Whatman No. 42

Solución E:

Riboflavina	4.0 mg	0.12mg
H ₂ O	100 ml	3.0 ml

Preparar al momento de la electroforesis

AMORTIGUADOR DE CORRIDA

	1x	10x
TRIS	3.0 g	30.0 g
Glicina	14.4 g	144.0 g
H ₂ O	1000ml	1000 ml

Ajustar a pH 8.3

AMORTIGUADOR DE MUESTRA

TRIS	15.0 mg
Glicina	72.5 mg
Azul de Bromoferol	2.5 mg
Glicerol	500.0 µl
H ₂ O	4.5 ml

SOLUCIÓN PARA TEÑIR

Amino Black 70B	5g
Acido acetico (75%)	1000ml

SOLUCIÓN PARA DESTEÑIR

Acido acético al 5%

PROCEDIMIENTO

<i>GEL RESOLVEDOR</i>	PROPORCION	VOLUMEN
Solución A1	1 parte	9 ml
Solución A2	1 parte	9ml
Solución C	2 partes	18ml
<i>GEL CONCENTRADOR</i>		
Solucion B	1 parte	1.5ml
Solucion D	2 partes	3.0ml
Solucion E	1 parte	1.5ml

1.- La electroforesis se inicia con un voltaje de 1.5 mV por tubo en gel concentrador y de 3.0 mV en gel revolver. Esta electroforesis se desarrolla en tubos de vidrio de 0.8 cm de diámetro interno, longitud de 10 cms, previamente siliconizados.

2.- Los tubos previamente se miden a una longitud de 6.5 cms y 7.5cms, posteriormente se sellan con parafilm en el extremo inferior del tubo.

Apéndice IV

ELECTROFORESIS SDS- PAGE

Soluciones:

Solución A (Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0.8%)

Acrilamida	30.0 g
Bisacrilamida	0.8 g
H ₂ O	100.0 ml

Solución B (Amortiguador para gel resoledor)

TRIS	18.17 g
SDS	0.40 g
H ₂ O	100.0 ml

Ajustar a pH 8.8 con HCl concentrado

Solución C (Amortiguador para el gel concentrador)

TRIS	6.06 g
SDS	0.40 g
H ₂ O	100.0 ml

Ajustar a pH 6.8 con HCl concentrado

Solución D (Amortiguador de corrida)

	1x	5x
TRIS	1.52 g	7.60 g
Glicina	7.21 g	36.05 g
SDS	0.50 g	2.50 g
H ₂ O	500 ml	500 ml

Ajustar a pH 8.3 con NaOH 10N

Solución E (Amortiguador de muestras no reductoras)

Solución C	1.25 ml
SDS al 10%	0.10 ml
Glicerol (0.05%)	1.0 ml
Azul de bromoferol (0.5%)	0.4 ml

Solución F (Persulfato de amonio al 10%)

Persulfato de Amonio	10 mg
H ₂ O	100 µl

Solución G (Amortiguador de muestras reductoras)

β- mercaptoetanol	10 µl
Solución E	990 µl

Marcadores de peso molecular:

Marcadores de BIO-Rad (bajo peso molecular)	5 µl
Solución E o G	95 µl

NOTA: La aplicación de cada muestra no sobrepase los 20 μ l

PROCEDIMIENTO

GEL RESOLVEDOR AL 12.5%	
Solucion B	2.25 ml
Solucion A	3.75 ml
H2O	3.0 ml
TEMED	7.5 μ l
Solución F	30.0 μ l
GEL CONCENTRADOR AL 4%	
Solución C	1.26 ml
Solución A	0.66 ml
H2O	3.08 ml
TEMED	5.0 μ l
Solución F	25.0 μ l

La corrida electroforética del gel se realiza a 70 volts en el gel concentrador y a 140 volts en el gel resolvedor.

Apéndice V

TINCIÓN DE PLATA

- 1.- Fijador 1: metanol (40%) + ácido acético (10%)
- 2.- Fijador 2: etanol (10%) + ácido acético (5%)
- 3.- Reactivo oxidante: 2.5 ml del reactivo y aforar a 25 ml con H₂O d
- 4.- Reactivo de plata: 2.5 ml del reactivo y aforar a 25 ml con H₂O d
- 5.- Solución reveladora: 3.2 g del reactivo y aforar a 100 ml con H₂O d, proteger de la luz.

PROCEDIMIENTO

Una vez realizada la electroforesis en placa colocar el gel en:

Fijador 1	Hacer 2 cambios de 15 minutos c/u
Fijador 2	Hacer 2 cambios de 15 minutos c/u
Reactivo oxidante	Dejar durante 5 minutos
H ₂ O d	Hacer cambios cada 5 minutos (obtener gel transparente)
Reactivo de plata	Dejar durante 20 minutos
H ₂ O d	Lavar y quitar inmediatamente (aprox. 1 minuto)
Reactivo revelador	Hacer lavados y dejar hasta que aparezcan las bandas
Detener la reacción	Con ácido acético al 5%

NOTA: Esta tinción esta basada en el KIT de BIO-RAD. Es importante la utilización de H₂O desionizada exclusivamente.

Apéndice VI

IMMUNODETECCIÓN (Western- Blot)

Soluciones:

Solución TBS:

TRIS	1.211 g	2.422 g
NaCl	14.61 g	29.22 g
H ₂ O	500 ml	1000 ml

Ajustar a pH 7.5

Solución de TTBS

Tween 20 (0.05%)	50 µl	500 µl
TBS	100 ml	1000 ml

Esta solución se utiliza para los lavados del papel

Solución de TTBS-BSA 3%

BSA	3 g
TTBS	100 ml

Esta solución se utiliza para bloquear el papel de nitrocelulosa

Solución de TTBS-BSA 1%

BSA	1g
TTBS	100 ml

Esta solución se utiliza para la preparación del 1° y 2° anticuerpo

Solución reveladora

Se utiliza el Kit BIO-RAD (Alkaline phosphatase conjugate substrate Kid) No. Cat. 170-6432

TRIS(0.1 M)	0.1816 g
H ₂ O	15.0 ml
Agente A*	150.0 µl
Agente B**	150.0 µl

* Nitroblue tetrazolium in dimethylformamide (DMF) + magnesium chloride

** 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfate in DMF

PROCEDIMIENTO

ACTIVIDAD	REACTIVO	TIEMPO
Electroforesis SDS-PAGE	Transferir	Papel nitrocelulosa
Secar papel	Agitación	30 minutos
Humedecer	TBS	5 minutos
Bloquear	TTBS-BSA 3%	60 minutos
Decantar	Lavar TTBS	10 minutos
Decantar	Añadir 1er anticuerpo	16 horas (4°C)
Decantar	Lavar TTBS	5 minutos (2 veces)
Decantar	Añadir 2do anticuerpo	120 minutos
Decantar	Lavar TTBS	5 minutos (2 veces)
Decantar	Lavar TBS	5 minutos (3 veces)
Decantar	Añadir solución reveladora	Hasta reveler
Decantar	Añadir agua	Secar papel

Una vez realizada la electroforesis en SDS-PAGE (12.5%), las proteínas son transferidas a papel de nitrocelulosa en condiciones de 100 volts por 60 minutos a 4°C.

Referencias

1. Andersen CY, Leonardsen L, Ulloa-Aguirre A, Barrios-De-Tomasi J, Kristensen KS, Byskov AG. Effect of different FSH isoforms on cycle-AMP production by Mouse cumulus-oocyte-complexes: a time course study. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7: 129-135.
2. Lambert A, Talbot JA, Anobile CJ, Robertson WR,. Gonadotrophin heterogeneity and biopotency: implication for assisted reproduction. *Molecular Human Reproduction* 1998; 4: 619-629.
3. Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JWM, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL. Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: Comparison of effects on murine follicle development in vitro. *Biology of Reproduction* 1998; 59: 854-861.
4. Ulloa-Aguirre A, Midgley R Jr, Beitins, I.Z, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. *Endocrinology Reviews* 1995; 16: 765-787.
5. Cooke DJ, Crowe MA, Roche JF, Headon DR. Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Animal Reproduction Science* 1996; 41:77-99.
6. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios- De- Tomasi, Maldonado A, Nayudu P. Impact of carbohydrate heterogeneity in fuction of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biology of Reproduction* 2003; 69: 379-389.
7. Hartree AS. Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. *The Biochemical Journal* 1966; 100(3): 754-761.
8. Bates RW, Garrison MM, Cooper JA, Condliffe PG. Further studies on the purification of human thyrotropin. *Endocrinology* 1968; 83:721-730.
9. Carranza SME, Amezcua MEV, Neri BR, Salas VA. Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Técnica Pecuaria México* 1994;32: 5-17.
10. Perera MG, Ortiz RF, Gamboa VJJ, Reynoso MW, Falcón AA, Salas VA. Obtención, purificación y caracterización de dos formas de hormona luteinizante de la adenohipófisis caprina (gLH). *Veterinaria México* 1996; 27: 1-10.
11. Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996; 125:133-141.

12. Burgon PG, Stanton PG, Robertson DM. *In vivo* bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 1996; 137:4827-4836.
13. Perera MG, Falcón AA, Murcia MC, Hernández CJ, González PE. Purification of five bovine luteinizing hormone (bLH) isoforms. Chemical, physical, biological and immunological characterization. *Veterinaria México* 2004; 35: 129-145.
14. Jack GW, Blazek R, James K, Boyd JE, Micklem LR. The automated production by immunoaffinity chromatography of the human pituitary glycoprotein hormones thyrotropin, follitropin and lutropin. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1987; 39: 45-58.
15. Hiyama J, Surus A, Renwick AGC. Purification of human pituitary LH and thyrotrophin by hydrophobic chromatography. *Journal of Endocrinology* 1990; 125: 493-500.
16. Grotjan HE, Schanbacher BD, Keel BD. Ovine luteinizing hormone. Significance of flow-through peaks observed during chromatofocusing as revealed by various methods of sample preparation and application. *Journal of Chromatography* 1991;549:141-152.
17. Arrieta E, Porrás A, González-Padilla E, Murcia C, Rojas S, Perera-Marín G. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinizing hormone during the luteal phase. *Reproduction and Fertility Development* 2006; 18: 15-30.
18. Perera-Marín G, Gutiérrez CG, Murcia C, León H, González-Padilla E. Effect of progesterone on the distribution of pituitary gonadotropin isoforms in bovines. *Animal Reproduction Science*, 2006 en prensa.
19. Rojas-Maya S, González-Padilla E, Murcia-Mejía C, Olivares-Segura A, Hernández-Cerón J, Perera-Marín G. Caprine luteinizing hormone isoforms during the follicular phase and anestrus. *Animal Reproduction Science*, 2006 en prensa.
20. Perera-Marín G, Murcia C, Rojas S, Hernández-Cerón J, González-Padilla E. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phase in Holstein heifers. *Animal Reproduction Science* 2005; 86: 53-69.
21. Cowley MA, Rao A, Wright PJ, Illing N, Millar RP, and Clarke IJ. Evidence for differential regulation of multiple transcripts of the gonadotropin releasing hormone receptor in the ovine pituitary gland; effect of estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998; 146: 141-149.

22. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Méndez JP. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Human Reproduction* 2001; 16: 599-604.
23. Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1988; 67: 465-473.
24. Perez GT, Apfelbaum ME. 1996 GnRH-stimulated glycosylation (proximal and distal) of luteinizing hormone by cultured rat pituitary cells. *Neuroendocrinology*. 1996 Dec; 64(6):456-61.
25. Cooke DJ, Crowe MA, Roche JF. Circulating FSH isoforms patterns during recurrent increases in FSH throughout the oestrus cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 1997;110: 339-345.
26. Wide L. Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. II. Relationship to sex and age. *Acta Endocrinology (Copenh)*. 1985;109: 190-197.
27. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1999; 11: 205-215.
28. Perera-Marín G. Patrón de distribución de isoforms de la hormona luteinizante (LH) intrahipofisaria y sérica en la especie bovina (tesis de doctorado). México, D.F. FMVZ-UNAM, 2003.
29. Christianson SL, Zalesky DD, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone heterogeneity: Androgens increase the percentage of less basic isoform. *Domestic Animal Endocrinology* 1998; 15: 87-92.
30. Cameron JL, Chappel SC. Follicle-stimulating hormone within and secreted from anterior pituitaries of female golden hamster during the estrous cycle after ovariectomy. *Biology of Reproduction* 1985; 33: 132-139.
31. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales I, Domínguez R. Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric pattern throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 1988; 38: 70-78.
32. Padmanabhan V, Christman GM, Randolph JF, Kelch RP, Marshall JC, Beitins IZ. Dynamic of bioactive follicle-stimulating hormone secretion in women with polycystic ovary syndrome: effects of estradiol and progesterone. *Fertility and Sterility* 2001;7: 881-888.
33. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones structure and function. *Annual Review of Biochemistry* 1981;50: 465-495.

34. Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1988; 947: 287-306.
35. Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrinology Review* 1990; 11: 177-199.
36. Rao CV. Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility* 2001; 76: 1097-1100.
37. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 1995; 49 : 335-350.
38. Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science* 2004; 82: 461-477.
39. Baird DT. Luteotrophic control of the corpus luteum. *Animal Reproduction Science* 1992; 28: 95-110.
40. Smith MF, McIntush EV, Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science* 1994; 72: 1857-1872.
41. Niswender GD, Jennifer LJ, Patrick JS, Keith R, Eric W Mc. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiology Review* 2000; 80: 1-29.
42. Combarrous Y. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reproduction, nutrition, development* 1988; 28: 211-228.
43. Stockell-Hartree A, Renwick GC. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochemical Journal* 1992; 287: 665-679.
44. Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vitamins and hormone*. 1994; 50: 215-286.
45. Taragnat C, Bernier A, Fontaine J. Gonadotrophin storage patterns in the ewe during the oestrous cycle or after long-term treatment with a GnRH agonist. *Journal of Endocrinology* 1998; 156: 149-157.
46. Crawford JL, Currie RJ, McNeilly AS. Replenishment of LH stores of gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH after the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. *Journal of Endocrinology* 2000; 167(3):453-63.

47. McNeilly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nichol L, McNeilly JR. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reproduction. Suppl.* 2003; 61: 463-476.
48. Fiddes JC, Goodman HM. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1981;1(1):3-18
49. Bousfield GR. LH (Luteinizing Hormone). En Knobil L. and Neill JD (Editores). *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press. 1998; 1034-1054.
50. Combarrous Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrinology Review* 1992; 13: 670-691.
51. Dias JA. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Human Reproduction* 2001; 16: 825-830.
52. Fiete D, Srivatava V, Hindsgaul O, Baenziger JU. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO_4 -4GalNAc β 1,4GlcNAc β 1,2Man α . That mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 1991; 67: 1103-1110.
53. Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K. Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1997; 82: 3103-3106.
54. Zambrano E, Olivares A, Mendez JP. et al. Dynamic of basal and gonadotropin-releasing hormona-releasable serum follicle-stimulating hormona charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1995; 80: 1647-1656.
55. Wide L, Naessen T, Eriksson K, Rune C. Time-related effects of a progestogen on isoforms of serum gonadotrophins in 17 beta-oestradiol treated post-menopausal women. *Clinical Endocrinology* 1996; 44: 651-658.
56. Zariñan T, Olivares A, Soderlund D, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. Changes in the biological:immunological ratios of basal and GnRH-releasable FSH during the follicular, pre-ovulatory and luteal phases of the human menstrual cycle. *Human Reproduction* 2001; 16: 1611-1618.
57. Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, Padmanabhan V, Robertson WR. Glycoforms composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Molecular Human Reproduction* 1998; 4: 631-639.

58. Ropelato MG, García-Rudaz MC, Castro Fernández C, Ulloa-Aguirre A, Escobar ME, Barontini M, Veldhuis JD. A Preponderance of basic luteinizing hormone (LH) Isoforms accompanies inappropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian síndrome. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1999; 84: 4629-4636.
59. Castro-Fernández C, Olivares A, Soderlung D, López-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP. A Preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 2000; 85: 4603-4610.
60. Nett TM. Regulation of genes controlling gonadotropin secretion. *Journal of Animal Science. Suppl.* 1990; 68: 3-17.
61. Hamernik DL. Molecular biology of gonadotropins. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 1995; 49: 257-269.
62. Gregg DW, Allen MC, Nett TM. Estradiol-induced increase in number of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured ovine pituitary cells. *Biology of Reproduction* 1990; 43: 1032-1036.
63. Moenter SM, Caraty A, Lacatelli A, Karsch FJ. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* 1991; 129: 1175-1182.
64. Nett TM, Turzillo AM, Baratta M, Rispoldi LA. Pituitary effects of steroid hormone on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domestic Animal Endocrinology* 2002; 23: 33-42.
65. De Gregorio GB, Nett T. Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biology of Reproduction* 1995; 53: 166-172.
66. Keel BA, Schanbacher BD, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone. I Effects of castration and steroid administration on the charge heterogeneity of pituitary luteinizing hormone. *Biology of Reproduction* 1987; 36: 1102-1113.
67. Keel BA, Schanbacher BD. Change heterogeneity of ovine follicle-stimulating hormone in rams and steroid-treated wethers. *Biology of Reproduction* 1987; 37: 86-796.
68. Zalesky DD, Nett TM, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone: isoforms in the pituitary during the follicular and luteal phases of the estrous cycle and during anestrus. *Journal of Animal Science* 1992; 70: 3851-3856.

69. Stumpff TT, Roberson MS, Wolfe MW, Zalesky DD, Cupp AS, Werth LA, Kojima N, Hejl KL, Kittok RJ, Grotjan HE, Kinder JE. A similar distribution of gonadotropin isohormones is maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. *Biology of Reproduction* 1992; 46: 442-450.
70. Kojima FN, Cupp AS, Stumpff TT, Zalesky DD, Robertson MS, Werth LA, Wolfe MW, Kiuok RJ, Grotjan HE, Kinder JE. Effect of 17 β -estradiol on distribution of pituitary isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction* 1995; 52: 297-304.
71. Chappel SC, Norman RL, Spies HG. Effects of estradiol on serum and pituitary gonadotropins concentrations during selective elevations of follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 1978; 19: 159-166.
72. Phillips DJ, Wide L. Serum gonadotropins isoforms become more basic after and exogenous challenge of gonadotropins-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1994; 79: 814-819.
73. Vogel DL, Magner JA, Sherins RJ, Weintraub BD. Biosynthesis, glycosylation and secretion of rat luteinizing hormone α and β -subunits: differential effects of orchietomy and gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1986; 119: 202-213
74. Dharmesh SM, Baenziger JU. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides of lutropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 11127-11131.
75. Helton TE, Magner JA. Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an in situ hybridization study. *Endocrinology* 1994; 134: 2347-2352.
76. Bauer-Dantoin AC, Weiss J, Jameson L. Roles of estrogen, progesterone and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology* 1995; 136: 1014-1019.
77. Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A, Bouchard P. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids* 2000; 65: 613-620.
78. Caraty A, Fabre-Nys C, Delaleu B. et al. Evidence that the medio-basal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology.* 1998; 139: 1752-1760.
79. Zalesky DD, Grotjan HE. Comparison of Intracellular and Secreted Isoforms of Bovine and Ovine Luteinizing Hormone. *Biology of Reproduction* 1991; 44: 1016-1024.

80. Brown P, McNeilly AS. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. *Review of Reproduction* 1999; 4:117-124.
81. Crowe MA, Padmanabhan V, Mihm M, Beitins IZ, Roche JF. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major change in steroid and luteinizing hormone concentration. *Biology of Reproduction* 1998; 58: 1445-1450
82. Hassing JM, Kletter GB, I'anson H, Wood RI, Beitins IZ, Foster DL, Padmanabhan V. Pulsatile Administration of Gonadotropin-Stimulating Hormone (FSH) Isoform Distribution Pattern of Pituitary of Circulating FSH in Nutritionally Growth-Restricted Ovariectomized Lambs. *Endocrinology* 1993; 132: 1527-1536.
83. Wide L, Bakos O. More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1993; 76: 885-889.
84. Burger LL, Dalkin AC, Aylor KW, Haisenleder DJ, Marshall JC. GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes—assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology*. 2002; 143: 3243-3249.
85. Zalesky DD, Schanbacher BD, Grotjan HE. Effect of immunization against LHRH on isoforms of LH in the ovine pituitary. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 99: 231-235.
86. Helton and Magner. Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an in situ hybridization study. *Endocrinology*. 1994; 134: 2347-2352.
87. Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. Inhibition of oxytocin receptor functions by direct binding of progesterone. *Nature* 1998; 392: 509-512.
88. Matteri RL, Papkoff DA, Swedlow JR, Chang Y-S. Isolation and characterization of three forms of luteinizing hormone from the pituitary gland of the horse. *Biology of Reproduction* 1986; 34: 571-578.
89. Bollag DM, Edelman SJ. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss, 1991.
90. Braselton WE Jr, McShan WH. Purification and properties of follicle-stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1970 Jul; 139(1): 45-58.

91. Muralidhar K, Rajendrakumar T, Sharma HP. Heterogeneity in buffalo lutropin. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 1992 Apr; 29(2): 168-72.
92. Ward DN, Reichert Jr. JE, Fitak BA, Nahm HS, Sweeney CM, Neill JD. Isolation and properties of subunits of rat pituitary luteinizing hormone. *Biochemistry* 1971; 10: 1796-180.
93. Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenziger JU. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 1991 Dec 20; 67(6): 1103-10.
94. Talbot JA, Mitchell R, Hoy AM, Lambert A, Gauher A, Hilton B, McLoughlin JD, Robertson WR. Recombinant human luteinizing hormone: a partial physicochemical, biological and immunological characterization. *Molecular Human Reproduction*. 1996 Oct; 2(10): 799-806.