

Purificación de cinco isoformas de la hormona luteinizante bovina (bLH). Caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica

Purification of five bovine luteinizing hormone (bLH) isoforms. Chemical, physical, biological and immunological characterization

Gerardo Perera Marín*
Andrés Falcón Alcántara**
Clara Murcia Mejía*
Joel Hernández Cerón*
Everardo González Padilla*

Abstract

The study describes the purification of five LH isoforms from bovine pituitary extracts. Cationic interchange chromatography was used to obtain fractions at a pH of 6.8 and 9.5. These were then repurified under identical conditions in DEAE-Sephacel to obtain LH-I (1.2 mg/kg of pituitary), and LH-II (1.8 mg/kg), LH-III (1.5 mg/kg), LH-IV (1.2 mg/kg) and LH-V (7.0 mg/kg), respectively. The relative mobility (Rf) of each isoform was determined using polyacrylamide gel electrophoresis under native conditions. LH-I presented an Rf of 0.16 cm; LH-II, LH-III and LH-IV had an Rf of 0.044 cm, while LH-V had a 0.11 cm Rf. The molecular weight (MW) of LH-I and LH-V was 37.5 kDa, while LH-II, LH-III and LH-IV had a MW of 38.5 kDa. The immunotransference analysis identified MW bands weighing 59.0, 37.5 and 22.0 kDa in the standards as well as in the different isoforms. The *in vivo* biological potency corresponded to 1.04 U/mg (LH-I); 5.9 U/mg (LH-II); 0.16 U/mg (LH-III); 0.86 U/mg (LH-IV) and 1.4 U/mg (LH-V) and their LH radioimmunoassay (RIA) 50% expected dose (ED₅₀) were 2.27 ng/tube (LH-I), 1.19 ng/tube (LH-II), 1.35 ng/tube (LH-III), 0.66 ng/tube (LH-IV) and 1.71 ng/tube (LH-V). These data show that it is possible to obtain two LH isoforms at pH 6.8 (I and V) and three at pH 9.5 (II, III and IV), with heterogeneous charges, RIA and biological activity, with sufficient yield as to try to develop simpler and more precise analytical methods.

Key words: PITUITARY, BOVINE, LUTENIZING HORMONE (LH) ISOFORMS, IONIC INTERCHANGE.

Resumen

El estudio describe la purificación de cinco isoformas de LH a partir del extracto hipofisario bovino. Las fracciones obtenidas a pH 6.8 y a pH 9.5 de la cromatografía de intercambio catiónico, se repurificaron en condiciones idénticas en DEAE-Sephacel para obtener a la LH-I (1.2 mg/kg de hipófisis) y las LH-II (1.8 mg/kg), LH-III (1.5 mg/kg) LH-IV (1.2 mg/kg) y LH-V (7.0 mg/kg), respectivamente. La movilidad relativa (Rf) de cada isoforma se determinó por una electroforesis en geles de poliacrilamida. La LH-I presentó un Rf de 0.16 cm; las LH-II, III y IV de 0.044 cm y la LH-V de 0.11cm. El peso molecular (PM) de las LH-I y LH-V correspondió a 37.5 kilodaltones (kDa), y de 38.5 kDa para la LH-II, LH-III y LH-IV. El análisis por inmunotransferencia identificó bandas de PM de 59.0, 37.5 y 22.0 kDa en los estándares como en las isoformas. La potencia biológica *in vivo* correspondió a 1.04 U/mg (LH-I); 5.9 U/mg (LH-II), 0.16 U/mg (LH-III), 0.86 U/mg (LH-IV) y 1.4 U/mg (LH-V) y la concentración de LH por radioinmunoensayo (RIA) a la dosis ED₅₀ fue de 2.27 ng/tubo (LH-I), 1.19 ng/tubo (LH-II), 1.35 ng/tubo (LH-III), 0.66 ng/tubo (LH-IV) y 1.71 ng/tubo (LH-V). Los datos muestran la obtención de

Recibido el 22 de abril de 2003 y aceptado el 14 de agosto de 2003.

* Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

** Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Laboratorio de Farmacología Marina, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P.1-1141, Juriquilla, Querétaro, México.

Correspondencia: Gerardo Perera Marín, Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., Tel. (55)56225860, Correo electrónico: pererag @ servidor.unam.mx

dos isoformas de elución a pH 6.8 (I y V) y tres isoformas a pH 9.5 (II, III y IV), con heterogeneidad de carga, diferente actividad biológica y concentración inmunorreactiva de LH en un sistema estándar, con rendimientos superiores para intentar el desarrollo de sistemas analíticos más precisos.

Palabras clave: HIPÓFISIS, BOVINOS, ISOFORMAS DE HORMONA LUTEINIZANTE (LH), INTERCAMBIO IÓNICO.

Introduction

The luteinizing hormone (LH) is a protein composed by two subunits (α and β) in a non-covalent bond.¹ Subunit α is common in gonadotropins, while subunit β confers biological and immune specificity.² LH presents a polymorphism that, in recent years, has been partly attributed to the diverse internal structure of its oligosaccharides,^{1,3,4} which have an effect on its physicochemical,⁵ biological and immune³ properties.

This polymorphism has been identified in pituitary gland, serum and urine⁶ in various species under distinct physiological conditions,⁷ using methods such as ion exchange,⁸⁻¹⁴ hydrophobic interaction chromatography^{15,16} and chromatofocusing.^{5,17} However, the number and quantity of each of the identified isoforms differs depending on the employed method.

In ruminants, especially in bovine species, LH polymorphism has been described in pituitary extracts and the heterogeneity of LH present in bovine¹⁸ and caprine¹⁹ serum has been recently reported. It was demonstrated that the proportion of basic (characterized by high *in vitro* biological activity and short circulating half-life) and acid (lower *in vitro* biological activity and longer time in circulation) isoforms varies according to the studied physiological status, which suggests the differential participation of each isoform in the reproductive process of these species. It is important to develop accurate and specific analytic systems for each of the LH isoforms²⁰⁻²³ to facilitate the study of their participation in different processes of the reproductive physiology. On the other hand, multiple evidence has presented different immunoreactivity values for the same isoforms, results depending on the employed radioimmunoassay system type (RIA; homologous or heterologous) and antibody type (monoclonal or polyclonal). It is therefore pertinent to obtain and purify enough amount of each isoform, to secure the material required for the development of a specific and simple quantitation system for each isoform.

The aim of this study was to obtain and purify LH isoforms from glycoprotein extracts of bovine anterior pituitary and to determine their physicochemical characteristics, immunoreactive concentration (standard RIA) and biological activity.

Introducción

La hormona luteinizante (LH) es una proteína compuesta de dos subunidades (α y β) en unión no covalente.¹ La subunidad α es común en las gonadotropinas, mientras que la subunidad β les confiere especificidad biológica e inmunológica.² La LH presenta un polimorfismo que en los últimos años se ha atribuido, en parte, a la variada estructura interna de sus oligosacáridos,^{1,3,4} lo que repercute en sus propiedades fisicoquímicas,⁵ biológicas e inmunológicas.³

Este polimorfismo se ha identificado en la hipófisis, suero y orina⁶ en diversas especies bajo distintas condiciones fisiológicas,⁷ empleando métodos como el intercambio iónico,⁸⁻¹⁴ la cromatografía de interacción hidrofóbica^{15,16} y el cromatofocoque,^{5,17} no obstante, el número y cantidad de cada una de las isoformas identificadas varían con el método.

En los rumiantes, particularmente en la especie bovina, el polimorfismo de la LH se ha descrito en extractos hipofisarios y recientemente se ha informado la heterogeneidad de la LH presente en suero de la especie bovina¹⁸ y caprina,¹⁹ en donde se señala que la proporción de isoformas básicas (caracterizadas por alta actividad biológica *in vitro* y baja vida media en la circulación) y ácidas (menor actividad biológica *in vitro* y mayor tiempo en la circulación) varía de acuerdo con el estado fisiológico estudiado, lo que sugiere la participación diferencial de cada isoforma en el proceso reproductivo de estas especies. Resulta importante desarrollar sistemas analíticos, precisos y específicos para cada una de las isoformas de la LH,²⁰⁻²³ para facilitar el estudio de su participación en diferentes procesos de la fisiología reproductiva. Por otro lado, múltiples evidencias han presentado diferentes valores de inmunoreactividad para una misma isoforma; los resultados dependen del tipo de sistema de radioinmunoanálisis (RIA; homólogo o heterólogo) y tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) utilizado; por ello es relevante obtener y purificar cantidades suficientes de cada una de las isoformas, con el fin de contar con el material necesario para el desarrollo de un sistema de cuantificación específico y sencillo para cada isoforma.

El objetivo de este estudio fue obtener y purificar

Material and methods

One thousand bovine glands were collected at the State Slaughterhouse of La Habana, Cuba, during six months; the glands were obtained 30 to 45 min after sacrifice and preserved in acetone until their processing and transportation to Mexico City. All extraction and purification phases were performed at 4°C with analytic grade reagents.

Glycoprotein fraction (GLP)

Glands were dissected from the surrounding tissue and the posterior lobes were separated; the anterior lobes were homogenized in acidified water (pH 5.1) containing a protease inhibitor (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) at 0.02%; the homogenate was mechanically stirred for 16 h. The proteins of the centrifuge-obtained supernatant (3 000 g/ 30 min /4°C) were precipitated in ethanol, thoroughly dialyzed with water, and lyophilized for further studies. Six volumes of 10%, pH 5.1 ammonium acetate and four volumes of 96% ethanol with PMSF (0.02%) were added for each gram of the obtained precipitate. This mixture was mechanically stirred for 48 h and centrifuged at 6 000 g for 30 min. The precipitate was resuspended and the whole process repeated; the last residue was preserved frozen for further studies. The proteins of each supernatant were previously adjusted to pH 5.1 and precipitated with cold ethanol, drop by drop with constant stirring. The mixtures were left to rest for 48 h, and the supernatant was subsequently extracted and the precipitate was centrifuged in the mentioned conditions. The precipitates corresponded to the glycoprotein fraction (GLP) and were resuspended in water and dialyzed* for 24 h, with three water changes; finally, the precipitates were lyophilized.**

Cation exchange chromatography (CM-Sepharose)***

The glycoprotein fraction was purified in accordance with the method described for ruminants.^{10,11} The glycoprotein extract (61.4 mg of protein) was dissolved in 27 ml of 0.005 M, pH 5.1 ammonium acetate; the insoluble material was discarded by centrifugation at 6 000 g for 30 min and the supernatant was applied to the cation exchange column (1.5 cm × 27 cm), balanced with 0.005 M, pH 5.1 ammonium acetate. The column was eluted applying a scaled gradient of buffers with a pH range of 5.1 to 9.5, which corresponded to 0.005 M, pH 5.1 ammonium acetate, 0.1 M, pH 6.8 ammonium acetate and 1.0 M ammonium acetate plus 0.1 M, pH 9.5 glycine, with a 23 ml/h flow. Frac-

isoformas de LH a partir de extractos glicoproteínicos de adenohipófisis de bovinos, y determinar sus características fisicoquímicas, concentración inmuno-reactiva (RIA estándar) y actividad biológica.

Material y métodos

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

Fracción glicoproteínica (GLP)

Las glándulas se disecaron del tejido que las rodea y se separaron los lóbulos posteriores, los lóbulos anteriores se homogeneizaron en agua acidificada (pH 5.1) que contenía un inhibidor de proteasas (fenilsulfonilmetilfluoruro, PMSF) al 0.02%; el homogeneizado se agitó mecánicamente durante 16 h. Las proteínas del sobrenadante obtenido por centrifugación (3 000 g/ 30 min/4°C) se precipitaron con etanol, se dializaron exhaustivamente con agua y se liofilizaron para estudios posteriores. Por cada gramo de precipitado obtenido se añadieron seis volúmenes de acetato de amonio al 10%, pH 5.1 y cuatro volúmenes de etanol al 96% que contenía PMSF (0.02%). Esta mezcla se agitó mecánicamente durante 48 h y se centrifugó a 6 000 g durante 30 min. El precipitado se resuspendió nuevamente y se repitió el proceso; el último residuo se conservó en congelación para estudios posteriores. Las proteínas de cada sobrenadante fueron previamente ajustadas a pH 5.1 y precipitadas con etanol frío, agregado gota a gota y con agitación constante. Las mezclas se mantuvieron en reposo durante 48 h, después se extrajo el sobrenadante y el precipitado se centrifugó en las condiciones señaladas. Los precipitados correspondieron a la fracción glicoproteínica (GLP) y se resuspendieron en agua y se dializaron* durante 24 h, con tres cambios de agua; finalmente se liofilizaron.**

Cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa)***

La fracción glicoproteínica se purificó de acuerdo con el método descrito para rumiantes.^{10,11} En breve

* Membrana de diálisis con límite de exclusión de 12 a 14 000 daltones (Spectrapor 4).

** Liofilizadora (Labconco 5).

*** Carboximetil-Sepharosa 6B (Farmacia, Biotech).

tions of 3 ml were collected and protein detection was performed by spectrometry at 280 nm.

Anion exchange chromatography (DEAE-Sephacel)*

The protein fractions obtained with the second (CM-2ab, 7.6 mg of protein) and third buffers (CM-3ab, 27.7 mg of protein) of the GLP run in CM-Sephacel were resuspended in 0.1 M, pH 9.5 glycine buffer and placed independently into the DEAE-Sephacel columns (1.2 cm × 34 cm; 1.5 cm × 24 cm), balanced with 0.1 M, pH 9.5 glycine. Column elution was performed with a 18 ml/h and 23 ml/h flow, respectively; a pH gradient within a range of 9.5 to 5.1 was added with the buffers: 0.1 M, pH 9.5 glycine, 0.1 M, pH 6.8 ammonium acetate and 1.0 M, pH 5.1 ammonium acetate. Fractions of 3 ml were collected and proteins were detected at 280 nm.

Physical-chemical characterization

Quantitation of total protein

This was performed in accordance with the method described by Bradford,²⁴ modified²⁵ using bovine serum albumin as standard.

Electrophoresis under native conditions (TRIS-PAGE)

Each fraction obtained from the extraction and purification was determined for relative mobility (Rf) or electric charge through tube electrophoresis, in native conditions, using 7.0 %, pH 8.3 polyacrylamide.²⁶ Then, 100 µg of protein were placed in the tube and a constant voltage of 1.5 m A/tube was applied for 3 h. At the end of the run, gels were dyed with 0.5 % Amido-Black 10B (Bio-Rad) dissolved in 5 % acetic acid. Discoloration was done with 5 % acetic acid.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The molecular weight of each fraction obtained by the DEAE-Sephacel was determined through plate electrophoresis,²⁷ using 12.5 %, pH 8.6 polyacrylamide gels, in the presence of β-mercaptoethanol (reducing conditions) or in its absence (non-reducing conditions). The gels were dyed with silver* and used as standard reference of low molecular weight.**

el extracto glicoproteínico (61.4 mg de proteína) se disolvió en 27 ml de acetato de amonio 0.005 M, pH 5.1; el material insoluble se descartó por centrifugación a 6 000 g durante 30 min y el sobrenadante se aplicó a la columna (1.5 × 27 cm) de intercambio catiónico, equilibrada con acetato de amonio 0.005 M, pH 5.1. La columna se eluyó aplicando un gradiente escalonado de amortiguadores con un rango de pH de 5.1 a 9.5, que correspondió a acetato de amonio 0.005 M, pH 5.1, acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8 y acetato de amonio 1.0 M más glicina 0.1 M pH 9.5, con flujo de 23 ml/h. Se colectaron fracciones de 3 ml y la detección de proteína se realizó por espectrometría a 280 nm.

Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel)*

Las fracciones proteínicas obtenidas con el segundo (CM-2ab, 7.6 mg de proteína) y tercer amortiguadores (CM-3ab, 27.7 mg de proteína) de la corrida del EGP en la CM-Sephacel se resuspendieron en amortiguador de glicina 0.1 M, pH 9.5 y se aplicaron de manera independiente a columnas (1.2 × 34 cm; 1.5 × 24 cm) de DEAE-Sephacel, equilibradas con glicina 0.1 M, pH 9.5. La elución de las columnas se realizó con un flujo de 18 y 23 ml/h, respectivamente; se aplicó gradiente de pH con rango de pH de 9.5 a 5.1, con los amortiguadores: glicina 0.1 M, pH 9.5, acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8 y acetato de amonio 1.0 M, pH 5.1. Se colectaron fracciones de 3 ml y la detección de proteína se realizó a 280 nm.

Caracterización fisicoquímica

Cuantificación de proteínas totales

Se realizó de acuerdo con el método descrito por Bradford,²⁴ modificado²⁵ utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Electroforesis en condiciones nativas (TRIS-PAGE)

A cada fracción obtenida durante la extracción y purificación se le determinó la movilidad relativa (Rf) o carga eléctrica por medio de electroforesis en tubo, en condiciones nativas, utilizando poliácridamida al 7.0%, pH 8.3.²⁶ En breve se colocaron 100 µg de proteína/tubo y se aplicó un voltaje constante de 1.5 m A/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%.

* Dietilaminoetil-Sephacel (Farmacia, Biotech).

LH identification

Immunoblotting

An SDS-PAGE electrophoresis was developed applying protein concentration, 100 ng per lane, in order to identify only the bands that corresponded to LH in the fractions obtained with the anion exchanger (DEAE-sephacel). Following the electrophoresis, protein bands were transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 µm trans, blot, Bio-Rad) for 90 min at 150 volts.^{11,28} The transferred proteins were incubated with the first antibody (anti-oLH, CSU-204, diluted 1:500) for 24 h, and then incubated for 2 h with the second goat antibody (1:3000) against rabbit IgG^{***} coupled to alkaline phosphatase. Immunoreactive bands[†] were developed with 1 ml of A color agent (tetrazolium blue in dimethylformamide DMF), 1 ml of B color agent (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate in DMF), dissolved in 100 ml of Tris buffer (0.1 M).

Radioimmunoassay (RIA) for luteinizing hormone (LH)

LH concentration present in the final fractions of the purification process was determined by liquid phase RIA with 20 h of incubation at 4°C. The hormone NIDDK-oLH-I-2, AFP-7071B was used as tracer, marked with Na¹²⁵I by the IODO-GEN method,²⁹ while NIDDK-oLH-26 was used as reference or standard, at doses from 0.325 ng/tube to 45.0 ng/tube. The first antibody (NIDDK-anti-oLH-1, AFP-192279) was used at a final dilution of 1:500 000 and the antigen-antibody complex was obtained after the addition of 1 ml of a cell suspension of *Staphylococcus aureus*, coupled to protein A* (1.5 µg/tube). The LH concentration for each purified fraction was analyzed three times, with protein concentrations similar to that of the standard one, and LH immunoreactivity was calculated based on the 50% expected dose (ED₅₀) of Logit-log linear regression of the dose-response curve for any studied fraction.³⁰ Parallelism was determined through the comparison of each slope and the correlation coefficient between the standard and the proteins in this study.

Radioimmunoassay for the follicle-stimulating hormone (FSH)

Contamination with FSH present in the final fraction of each purification was determined through liquid phase RIA for FSH, with an incubation period of 48 h at room temperature, using the second antibody as a separation system. The hormone USDA-bFSH-I-2, AFP-5318C was used as tracer and as reference for

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

El peso molecular para cada una de las fracciones obtenidas en DEAE-Sephacel se determinó mediante electroforesis en placa,²⁷ utilizando geles de poliacrilamida al 12.5%, pH 8.6, en presencia de β-mercaptoetanol (condiciones reductoras) o en su ausencia (condiciones no reductoras). Los geles se tiñeron con plata* y se utilizaron como referencia estándares de bajo peso molecular.**

Identificación de la LH

Inmunotransferencia

Con el propósito de identificar sólo las bandas de proteínas correspondientes a LH en las fracciones obtenidas en el intercambiador aniónico (DEAE-Sephacel) se desarrolló electroforesis de SDS-PAGE aplicando concentración de proteína, 100 ng por carril. Una vez realizada la electroforesis las bandas de proteína se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm trans, blot, Bio-Rad) durante 90 minutos a 150 volts.^{11,28} Transferidas las proteínas se incubaron con el primer anticuerpo (anti-oLH, CSU-204, diluido 1:500) durante 24 h, posteriormente se incubaron durante dos horas con el segundo anticuerpo (1:3 000) de cabra dirigida contra IgG de conejo^{***} acoplado a fosfatasa alcalina. El revelado de las bandas inmunorreactivas[†] se realizó con 1 ml de agente color A (azul de tetrazolio en dimetilformamida [DMF]), 1 ml de agente de color B (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato en DMF), disuelto en 100 ml de amortiguador TRIS (0.1 M).

Radioinmunoanálisis (RIA) para la hormona luteinizante (LH)

La determinación de la concentración de la LH presente en las fracciones finales de la purificación se realizó mediante RIA en fase líquida, con 20 h de incubación a 4°C. Para ello se utilizó como trazador a la hormona NIDDK-oLH-I-2, AFP-7071B que se marcó con Na¹²⁵I, por el método del IODO-GEN,²⁹ en tanto que la NIDDK-oLH-26 se utilizó como referencia o estándar, a las dosis de 0.325 a 45.0 ng/tubo. El primer anticuerpo (NIDDK-anti-oLH-1, AFP-192279) se utilizó a una dilución final de 1:500 000 y el complejo antígeno-anticuerpo, se obtuvo después de

* 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).

the doses ranging from 0.2 ng/tube to 12.8 ng/tube. The first antibody (anti β -bFSH-USDA) was used at a final dilution of 1:9 600 in presence of 1:1 600 normal rabbit serum. The antigen-antibody complex was precipitated with a second ovine antibody (1:40) against rabbit IgG. Fractions were analyzed three times from 0.4 ng/tube to 204 ng/tube. Contamination with FSH present in each fraction was determined, based on the 50% expected dose at (ED₅₀) of the Logit-log regression obtained from the reference standard curve.

Radioimmunoassay for thyroid-stimulating hormone (TSH)

TSH concentration in LH fractions was quantified with bovine liquid phase RIA for TSH with an incubation period of 20 h at room temperature. The hormone USDA-bTSH-I-1 was used as tracer and standard for the doses from 0.1 ng/tube to 12.8 ng/tube. The first antibody (anti-bTSH, AFP-284246) was used at a final dilution of 1:500 000. Precipitation of the antigen-antibody complex and TSH concentration in the analyzed fractions were determined as for LH RIA.

Biological activity

Biological potency was determined by the *in vivo* bioassay of the ascorbic acid ovarian depletion in pseudopregnant rats.¹¹ Three independent bioassays were performed: the first one included LH-I and LH-II; the second one included LH-III and LH-IV; and the third one included LH-V and also LH-I. Each bioassay was performed under the same conditions as described previously.¹¹ Quantitation of ascorbic acid was done through densitometry at 245 nm. Fifty Wistar rats, 23 days old and with a mean weight of 40-50 g, were used in each bioassay. Pseudopregnancy was induced by a subcutaneous injection of 50 UI of PMSG/animal in 0.5 ml of saline solution; 60 h later, 25 UI of HCG were injected to each animal by the same procedure. The bioassay was developed eight days later; animals were randomly distributed into ten groups: control group (n = 5), standard groups (NIDDK-oLH-26) were administered doses of 0.75 μ g (n = 5), 3 μ g (n = 5) and 12 g of protein (n = 5), respectively, while the same number of animals (n = 15) was distributed into three groups (n = 5 each) which were used for LH-I and LH-II, receiving the hormone isomorph at the same protein doses as those used with the standard. Bioassays 2 and 3 were performed in a way similar as bioassay 1, using the same standard doses in each situation. Pseudopregnant animals received 0.5 ml of intraperitoneal saline solution (control group) or protein solution (standard or problem groups) with the afore-cited concentrations. Four hours after

la aplicación de 1 ml de una suspensión celular de *Staphylococcus aureus*, acoplada a la proteína A* (1.5 μ g/tubo). La concentración de LH para cada fracción purificada se analizó por triplicado, con concentraciones de proteína semejantes a las dosis del estándar y la inmunorreactividad de la LH se calculó en función de la dosis esperada del 50% (ED₅₀) de la regresión lineal Logit-log de la curva dosis-respuesta para cualquier fracción estudiada.³⁰ El paralelismo se determinó mediante la comparación de cada pendiente y el coeficiente de correlación entre el estándar y las proteínas de este estudio.

Radioinmunoanálisis para la hormona estimulante del folículo (FSH)

La contaminación con FSH presente en cada fracción final de purificación se determinó mediante RIA para FSH en fase líquida, con periodo de incubación de 48 h a temperatura ambiente, utilizando como sistema de separación al segundo anticuerpo. La hormona USDA-bFSH-I-2, AFP-5318C se utilizó como trazador, así como de referencia a las dosis de 0.2 a 12.8 ng/tubo. El primer anticuerpo (anti β -bFSH-USDA) se utilizó a dilución final de 1:9 600 en presencia de suero normal de conejo 1:1 600. El complejo antígeno-anticuerpo se precipitó con segundo anticuerpo (1:40) de ovino dirigido contra IgG de conejo. Las fracciones se analizaron por triplicado desde 0.4 a 204 ng de proteína/tubo. La contaminación de FSH presente en cada fracción se determinó en función de la dosis esperada al 50% (ED₅₀) de la regresión logit-log obtenida de la curva estándar de referencia.

Radioinmunoanálisis para la hormona estimulante de la tiroides (TSH)

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

Actividad biológica

La potencia biológica se determinó por medio del bioensayo *in vivo* de la depleción ovárica del ácido ascórbico en ratas seudopregnadas.¹¹ Se hicieron tres bioensayos independientes; el primero incluyó a la

hormone application, animals were sacrificed with carbon dioxide and the left ovary of each animal was dissected, weighed and then homogenized in 10 ml of 2.5 % metaphosphoric acid. The homogenate was filtered (Whatman 40-42, 11 cm) and immediately read at 245 nm. The obtained results were interpolated in a curve of ascorbic acid (1 - 256 µg/ml) dissolved in metaphosphoric acid at the same concentration. The bioassay validation criteria and the biological activity calculations refer to the 3 + 3 dose assays or six point assays: three corresponded to the standard and three corresponded to each isomorph. The accuracy index (λ = mean standard deviation per slope dose of the doses log) and parallelism between the slopes of the dose-response of the standard and each isomorph in each assay (g) were calculated. In both cases, values smaller than 1.0 were considered as acceptable.

Results

Figure 1a shows the elution pattern of the glycoprotein fraction in CM-sepharose; three protein peaks were identified with the application of the scale gradient of buffers with 91.8% of protein recovery. The protein fraction not retained in the column (designated as CM-1ab) was 32.4% of the protein quantity of the EGP applied to the column, while the fraction that eluted with 0.1 M, pH 6.8 ammonium acetate (designated as CM-2ab) represented 14.2% and the fraction obtained with 1 M ammonium acetate plus 0.1 M, pH 9.5 glycine (designated as CM-3ab) was 45.2%. Figure 1b depicts the chromatographic pattern of CM-2ab fraction repurified by anion exchange (DEAE-Sepha-cel), where a small fraction of proteins that eluted with the second buffer (0.1 M, pH 6.8 ammonium acetate) was obtained, which corresponded to the protein named as LH-I, and represented 16.1% of the total protein added to the column, while a protein fraction with 8.4 % yield was obtained with 1 M, pH 5.1 ammonium acetate, which presented a relative mobility (Rf) of 0.48 cm with molecular weight of 47.6 kilodaltons (kDa), and FSH biological activity of 421 U/mg and FSH immune concentration of 1.218 ng/ml, reason for which it was discarded from the study. Figure 1c shows the CM-3ab fraction repurified in DEAE-Sepha-cel; three protein fractions eluted with the first buffer (0.1M, pH 9.5 glycine), which corresponded to LH II, III and IV, and represented 6.4%, 5.6% and 4.3% of the recovered protein, respectively. The peak corresponding to LH-V eluted with the second buffer (0.1 M, pH 6.8 ammonium acetate), which represented 25.3% of the recovered protein. A fifth peak of protein eluted with physicochemical, biological and immune features similar to those of FSH with the third buffer (1 M, pH 5.1 ammonium acetate); therefore, it was not

LH-I y LH-II, el segundo a las LH- III y LH-IV y el tercero a la LH-V y de nuevo a la LH-I. Cada bioensayo se desarrolló bajo las mismas condiciones previamente descritas,¹¹ la cuantificación del ácido ascórbico se hizo por densitometría a 245 nm. Para cada bioensayo se utilizaron 50 ratas de la cepa Wistar, de 23 días de edad, con peso promedio de 40-50 g. La seudopreñez en los animales se indujo con aplicación de 50 UI de PMSG/animal en 0.5 ml de solución salina por vía subcutánea, 60 h después se administró por la misma vía 25 UI de HCG a cada animal. Ocho días después el bioensayo se desarrolló, para ello los animales se distribuyeron al azar en diez grupos: grupo testigo (n = 5), el estándar (NIDDK-oLH-26) se administró a las dosis de 0.75 µg (n = 5), 3 µg (n = 5) y 12 g de proteína (n = 5), respectivamente; en tanto que para LH-I y LH-II se utilizaron el mismo número de animales (n = 15) distribuidos en tres grupos (n = 5 c/u) a las que se les administró la isoforma de hormona en las mismas dosis de proteína que las utilizadas con el estándar. Los bioensayos dos y tres se realizaron de manera semejante al bioensayo uno, utilizando las mismas dosis del estándar en cada ocasión. A los animales seudopreñados se les administró por vía intraperitoneal 0.5 ml de solución salina (grupo testigo) o solución de proteína (estándar o problema) con las concentraciones ya señaladas. Cuatro horas después de la aplicación de las hormonas, los animales se sacrificaron con dióxido de carbono y se disecó el ovario izquierdo de cada animal que se pesó y posteriormente se homogeneizó en 10 ml de ácido metafosfórico al 2.5%. El homogeneizado se filtró (Whatman 40-42, 11 cm) e inmediatamente se leyó a 245 nm. Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva de ácido ascórbico (1 a 256 µg/ml) disuelto en ácido metafosfórico a la misma concentración. Los criterios de validez del bioensayo y los cálculos de la actividad biológica se refieren a los ensayos de dosis 3 + 3 o ensayos de seis puntos; tres del estándar y tres de cada isoforma. Para cada caso se calculó el índice de precisión (λ = desviación estándar promedio por dosis pendiente del logaritmo de las dosis) y el paralelismo entre las pendientes de la dosis-respuesta del estándar y de cada isoforma en cada ensayo (g). En ambos casos se consideraron como valores aceptables los menores a 1.0.

Resultados

El patrón de elución de la fracción glicoproteínica en CM-Sepharosa se presenta en la Figura 1a, se identificaron por espectrometría tres picos de proteína con la aplicación del gradiente escalonado de amortiguadores con 91.8% de recuperación de proteína. La fracción de proteína no retenida en

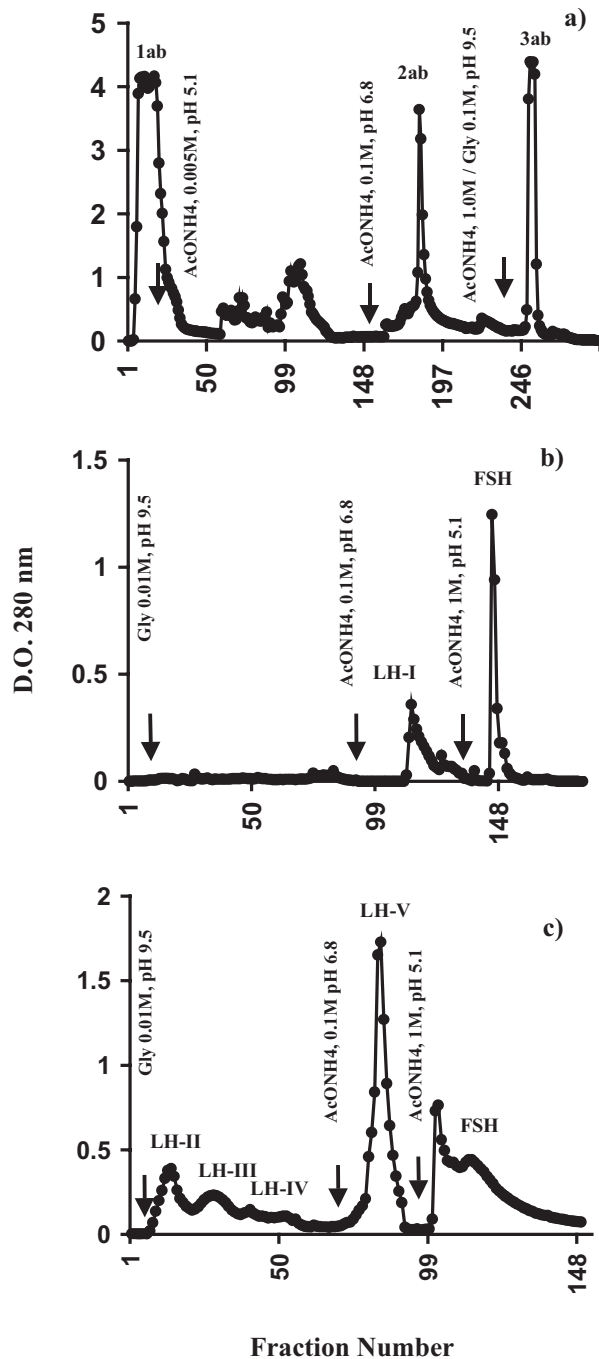


Figura 1. a) Cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa) de la fracción glicoproteínica (GLP: 61.86 mg de proteína). La columna (1.5 × 27 cm) se equilibró con acetato de amonio 0.005 M, pH 5.1, con un flujo de 23 ml/h, se colectaron fracciones de 3 ml. La fracción no retenida en la columna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

a) Cation exchange chromatography (CM-Sepharose) of the glycoprotein fraction (GLP: 61.86 mg of protein). The column (1.5 cm × 27 cm) was balanced with 0.005 M, pH 5.1 ammonium acetate, with a 23 ml/h flow; 3 ml fractions were collected. The fraction not retained in the column (CM-1ab) was eluted with this buffer, while fractions CM-2ab and CM-3ab were obtained with 0.1 M, pH 6.8 ammonium acetate and 1 M ammonium acetate plus 0.1 M, pH 9.5 glycine, respectively. b) Anion exchange chromatography (DEAE-Sephacel) of CM-2ab fraction (7.6 mg of protein), the column (1.5 cm × 25 cm) was balanced with 0.1 M, pH 9.5 glycine, with a 18 ml/h flow; fractions of 3 ml were collected. Fraction LH-I eluted with 0.1 M, pH 6.8 ammonium acetate and fraction FSH eluted with 1 M, pH 5.1 ammonium acetate. c) Anion exchange chromatography (DEAE-Sephacel) of fraction CM-3ab (27.72 mg of protein), the column (1.5 cm × 24.5 cm) was balanced with 0.1 M, pH 9.5 glycine, with 22.9 ml/h flow; fractions of 3 ml were collected. Fractions LH-II, LH-III and LH-IV eluted with 0.1M, pH 9.5 glycine, fraction LH-V eluted with 0.1 M, pH 6.8 ammonium acetate and fractions FSH eluted with 1 M, pH 5.1 ammonium acetate.

considered in this study. Results are summarized in Table 1.

Electrophoretic patterns under native conditions (TRIS-PAGE) of each fraction obtained by the cation exchange chromatography (CM-Sepharose) are shown in Figure 2. CM-1ab fraction presented two bands with relative mobility of 0.39 cm and 0.49 cm, while fraction CM-2ab presented Rf of 0.12 cm and 0.38 cm; finally, CM-3ab fraction presented a band right next to the application line with Rf of 0.049 cm.

la columna (designada CM-1ab), fue 32.4% de la cantidad de proteína del EGP aplicado a la columna, en tanto que la fracción que eluyó con acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8 (designada CM-2ab) representó 14.2% y la fracción obtenida con acetato de amonio 1 M más glicina 0.1 M, pH 9.5 (designada CM-3ab) fue 45.2%. La Figura 1b muestra el patrón cromatográfico de la fracción CM-2ab repurificada en intercambio aniónico (DEAE-Sephacel), donde se obtuvo una pequeña fracción de proteínas que eluyeron con el

Figure 3 shows the TRIS-PAGE patterns in the various fractions obtained in DEAE-sephacel; LH-I presented Rf of 0.16 cm, while LH II, III and IV presented Rf of 0.044 cm, and isoform V showed Rf of 0.11 cm, similar to the USDA-bLH-5 standard.

The electrophoretic pattern in SDS-PAGE of the fractions obtained by DEAE-Sephacel is shown in Figure 4. In absence of β -mercaptoethanol (non-reducing conditions; panel A), LH-I and LH-V showed a high molecular weight band that corresponded to 59.02 kDa, a predominant band with molecular weight of 37.5 kDa and two bands with molecular weight of 23.44 kDa and 20.82 kDa (less present bands), and a pattern similar to the USDA-bLH-B5 standard reference, although LH-II, LH-III and LH-IV presented the same high molecular weight band (59.02 kDa). The most important band corresponded to a molecular weight slightly higher than 38.5 kDa, and three bands of 24.6 kDa, 20.8 kDa and 17.2 kDa, respectively. Panel (B) depicts the electrophoretic pattern in presence of β -mercaptoethanol (reducing conditions) of the same fractions. Under these conditions, the high molecular weight bands disappeared completely; the predominant band of 37.6 kDa was conserved and the molecular weight bands of 20.9 kDa and 19.1 kDa were intensified, both for standard and for the different LH fractions.

The immunoblotting analysis using the antibody (anti-oLH-CSU-204) identified immunoreactive bands with molecular weight similar to that of the reference standards (Figure 5), with predominance of the band with molecular weight of 37.6 kDa and 38.5 kDa, as well as the band of 23.4 kDa; however, the high molecular weight bands were dyed.

segundo amortiguador (acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8) que correspondió a la proteína que se denominó LH-I, y representó 16.1% del total de proteína aplicado a la columna, mientras que con acetato de amonio 1 M, pH 5.1 se obtuvo una fracción de proteína con rendimiento del 8.4%, que presentó una movilidad relativa (Rf) de 0.48 cm con peso molecular de 47.6 kilodaltones (kDa), y actividad biológica de FSH de 421 U/mg y una concentración inmunológica de FSH de 1.218 ng/ml, por lo que se descartó del estudio. En cuanto a la fracción CM-3ab repurificada en DEAE-Sephacel, se presenta en la Figura 1c; con el primer amortiguador (glicina 0.1M, pH 9.5) eluyeron tres fracciones proteínicas que correspondieron a las LH II, III y IV, que representaron 6.4%, 5.6% y 4.3% de la proteína recuperada, respectivamente. Con el segundo amortiguador (acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8) se eluyó el pico correspondiente a la LH-V, que constituyó 25.3% de la proteína recuperada. Con el tercer amortiguador (acetato de amonio 1 M, pH 5.1) eluyó un quinto pico de proteína con características fisicoquímicas, biológicas e inmunológicas de FSH, por lo que no se consideró en este estudio. Los rendimientos se resumen en el Cuadro 1.

Los patrones electroforéticos en condiciones nativas (TRIS-PAGE) de cada fracción obtenida durante la cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa) se presentan en la Figura 2. La fracción CM-1ab presentó dos bandas con movilidad relativa de 0.39 cm y 0.49 cm, en tanto que la fracción CM-2ab presentó un Rf de 0.12 cm y 0.38 cm, finalmente la fracción CM-3ab presentó una banda pegada a la línea de aplicación con un Rf de 0.049 cm. La Figura 3 presenta los patrones en

Cuadro 1
FRACCIONES OBTENIDAS DURANTE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LH
FRACTIONS OBTAINED DURING EXTRACTION AND PURIFICATION OF LH ISOFORMS

<i>Fraction</i>	<i>mg of powder/kg of pituitary</i>	<i>µg of protein/mg of powder</i>	<i>mg de protein/kg of pituitary</i>
GLP ¹	660	93	61.4
CM-1ab ²	99.5	200	19.9
CM-2ab ²	33.7	258.7	8.7
CM-3ab ²	138.6	200	27.2
LH-I ³	7.2	170.3	1.2
LH-II ³	15.2	117	1.8
LH-III ³	15.9	97	1.5
LH-IV ³	15	80	1.2
LH-V ³	40.7	172	7

¹ Glycoprotein extract.

² Fractions obtained in cation exchange chromatography (CM-Sepharose).

³ Fractions obtained in anion exchange chromatography (DEAE-Sephacel).

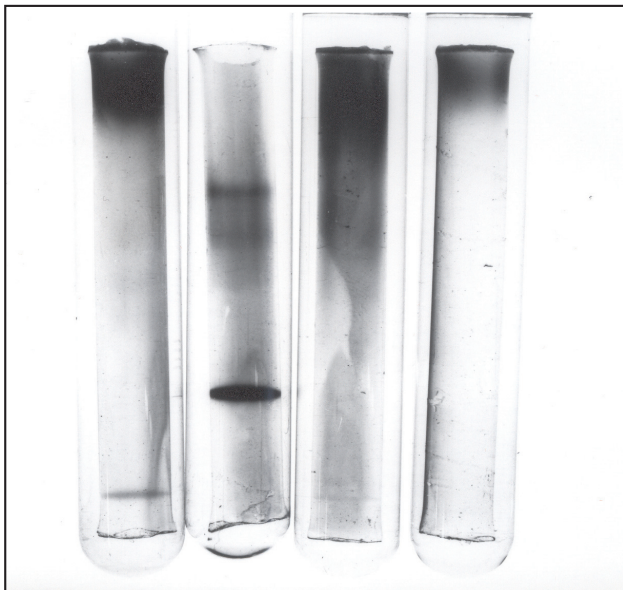
LH concentration quantified by the radioimmunoassay in relation with the Logit-log regression curve at the 50% expected dose (ED_{50}) corresponded to 2.27 ng/tube for LH-I; 1.19 ng/tube for LH-II; 1.35 ng/tube for LH-III; 0.664 ng/tube for LH-IV; and 1.71 ng/tube for LH-V, while the NIDDK-oLH-26 standard reference represented 3.97 ng/tube and the USDA-bLH-b5 had 1.716 ng/tube. All the purified isoforms presented high parallelism with a slope that corresponded to -2.04 (NIDDK-oLH-26), -1.89 (USDA-bLH-b5), -2.01 (LH-I), -1.97 (LH-II), -2.06 (LH-III), -2.23 (LH-IV), and -2.12 (LH-V) (Figure 6). These results are summarized in Table 2.

The results obtained by the radioimmunoassay system for FSH in each of the proteins with LH characteristics did not show contamination by FSH, as happens with the USDA-bLH-B5 standard, while the results with the bovine TSH system revealed contamination of 7.6% in LH-II to 36% in LH-I; however, there was no parallelism between the samples. Table 3 itemizes the results.

Biological potency determined in a balanced 3 + 3 assay was: 1.04 U/mg for LH-I with a λ of 0.88 and a g of 0.46; 5.92 U/mg for LH-II ($\lambda = 0.54$ and $g = 0.71$); LH-III presented an activity of 0.16 U/mg without confidence limits, while LH-IV showed an activity of 0.865 U/mg ($\lambda = 0.29$ and $g = 0.27$), and finally, LH-V presented 1.4 U/mg ($\lambda = 0.61$ and $g = 0.23$).

Discussion

Five LH isoforms were isolated and purified from the glycoprotein extract of bovine anterior pituitary. LH-I was obtained from CM-2ab fraction, while LH-II, LH-III, LH-IV and LH-V were obtained from CM-3ab fraction. Both fractions were obtained during the



TRIS-PAGE de las diferentes fracciones obtenidas en DEAE-Sephacel, la LH-I presentó R_f de 0.16 cm, en tanto que las LH II, III y IV presentaron R_f de 0.044 cm, y la isoforma V mostró R_f de 0.11 cm, semejante al estándar USDA-bLH-5.

El patrón electroforético en SDS-PAGE, de las fracciones obtenidas en DEAE-Sephacel, se presenta en la Figura 4. En ausencia de β -mercaptoetanol (condiciones no reductoras; recuadro A), la LH-I y LH-V mostraron una banda de alto peso molecular que correspondió a 59.02 kDa, una banda predominante de peso molecular de 37.5 kDa y dos bandas con un peso molecular de 23.44 kDa y 20.82 kDa (bandas poco presentes), patrón semejante al estándar de referencia USDA-bLH-B5, aunque la LH-II, LH-III y LH-IV presentaron la misma banda de alto peso molecular (59.02 kDa), la banda más importante correspondió a un peso molecular ligeramente superior de 38.5 kDa, y tres bandas de 24.6 kDa, 20.8 kDa y 17.2 kDa, respectivamente. El recuadro (B) muestra el patrón electroforético en presencia de β -mercaptoetanol (condiciones reductoras) de las mismas fracciones. Bajo estas condiciones las bandas de alto peso molecular desaparecieron en su totalidad, se conservó la banda mayoritaria de 37.6 kDa y se intensificaron las bandas con peso molecular de 20.9 kDa y 19.1 kDa, tanto para el estándar como para las diferentes fracciones de la LH.

El análisis por inmunotransferencia utilizando el anticuerpo (anti-oLH-CSU-204) identificó bandas inmunorreactivas de peso molecular de manera idéntica a los estándares de referencia (Figura 5), predominando la banda de peso molecular de 37.6 y 38.5 kDa, así como la banda de 23.4 kDa; sin embargo, se tiñeron las bandas de alto peso molecular.

La concentración de LH cuantificada por el

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

Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis at 7.0% in native conditions (TRIS-PAGE), pH 8.3. A total of 100 μ g of protein per gel with a constant voltage of 3 mV were used. Fractions collected during the glycoprotein extract purification by cation exchange chromatography (CM-Sephacel). Glycoprotein extract or GLP; fraction of proteins collected at pH 5.1 (CM-1ab); second protein peak eluted at pH 6.8 (CM-2ab) and third protein peak obtained at pH 9.5 (CM-3ab).

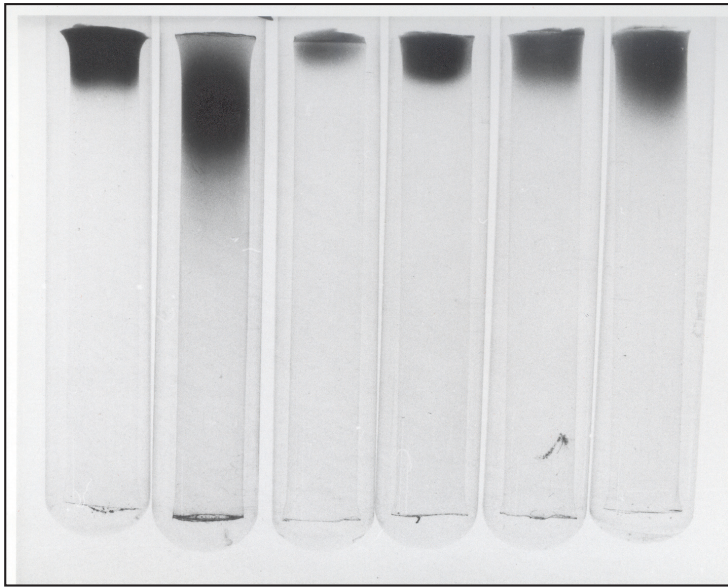


Figura 3. Electroforesis discontinua en geles de tubo de poliacrilamida al 7.0% en condiciones nativas (TRIS-PAGE), pH 8.3. Se aplicaron de 100 µg de proteína por gel, con un voltaje constante de 3 mV. USDA-bLH-b5 (Rf = 0.11 cm.); LH-I (Rf = 0.16 cm.); LH-II,III, IV (Rf = 0.04) y LH-V (Rf = 0.11).
 Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis at 7.0% in native conditions (TRIS-PAGE), pH 8.3. A total of 100 µg of protein per gel with a constant voltage of 3 mV was used. USDA-bLH-b5 (Rf = 0.11 cm.); LH-I (Rf = 0.16 cm.); LH-II, LH-III, LH-IV (Rf = 0.04) and LH-V (Rf = 0.11).

purification of the glycoprotein extract in CM-Sepharose and repurified under the same conditions in an anion exchanger (DEAE-Sephacel). The chromatographic pattern of the glycoprotein extract of bovine anterior pituitary in CM-Sepharose was similar to that described for bovine¹⁰ and caprine¹¹ glycoprotein extracts in the same conditions; although the fraction obtained from 0.005 M, pH 5.1 ammonium acetate, designated as CM-lab, was discarded from the study due to the high FSH yield and activity.^{8,10} Perera *et al.*¹¹ reported the obtention of a molecular morph of LH in caprines from this fraction. Probably, another LH isoform may be obtained from this fraction in bovines. Although the yield (mg of protein per kg of tissue) obtained for each of the fractions considered as LH was lower than that reported for other species,^{8,11,30-33} none of these studies described the obtention of four proteins with physicochemical, biological and immune LH features from CM-3ab fraction, considered as an important source of TSH.¹⁰

The electrophoretic pattern in TRIS-PAGE of the different LH isoforms confirmed the charge heterogeneity of this protein, since LH-I and LH-V showed a less cationic behavior, a pattern similar for equine,^{30,34} human,^{8,9} bovine,^{10,33} rat³⁵ and caprine¹¹ isoforms. LH-II, LH-III and LH-IV eluted at pH 9.5, presented a cationic-type electrophoretic pattern similar to USDA-bLH-5, AFP5500 and NIDDK-oLH-26, AFP5551B standards, as well as a variant of caprine LH,¹¹ equine LH³⁰ and human LH.³⁶ It has been suggested that the difference among the various electrophoretic patterns in TRIS-PAGE (charge heterogeneity) for LH that eluted at pH 6.8 and those that eluted at pH 9.5 is due to the different composition of the carbohydrate units of the molecule and the quantity of terminal sulfate in these carbohydrates.^{1,4,20,37}

radioinmunoensayo con relación a la curva de regresión Logit-log a la dosis esperada al 50% (ED₅₀) correspondió a 2.27 ng/tubo para la LH-I; 1.19 ng/tubo en la LH-II; 1.35 ng/tubo para la LH-III; 0.664 ng/tubo en la LH-IV; 1.71 ng/tubo para la LH-V, en tanto que los estándares de referencia NIDDK-oLH-26 presentaron 3.97 ng/tubo y el USDA-bLH-b5 de 1.716 ng/tubo. Todas las isoformas purificadas presentaron un alto paralelismo con una pendiente que correspondió a -2.04 (NIDDK-oLH-26), -1.89 (USDA-bLH-b5), -2.01 (LH-I), -1.97 (LH-II), -2.06 (LH-III), -2.23 (LH-IV), y -2.12 (LH-V) (Figura 6), cuyos resultados se resumen en el Cuadro 2.

Los resultados obtenidos con el sistema de radioinmunoensayo para FSH en cada una de las proteínas con características de LH no mostraron contaminación de FSH, como se presentó con el estándar USDA-bLH-B5; en tanto que los resultados con el sistema de TSH bovino mostraron contaminación del 7.6% en la LH-II al 36% en la LH I; sin embargo, no existió paralelismo con las muestras. El Cuadro 3 resume los resultados.

La potencia biológica determinada en un bioensayo 3 + 3 balanceado correspondió: Para la LH-I a 1.04 U/mg con una λ de 0.88 y una g de 0.46; para la LH-II de 5.92 U/mg ($\lambda = 0.54$ y $g = 0.71$); la LH-III presentó una actividad de 0.16 U/mg sin límites de confianza, en tanto que la LH-IV fue de 0.865 U/mg ($\lambda = 0.29$ y una $g = 0.27$), y finalmente la LH-V fue de 1.4 U/mg ($\lambda = 0.61$ y $g = 0.23$).

Discusión

Se aislaron y purificaron del extracto glicoproteínico de adenohipófisis bovinas, cinco isoformas de la

Cuadro 2
ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y CONCENTRACIÓN INMUNORREACTIVA DE LH EN LAS ISOFORMAS PURIFICADAS
BIOLOGICAL ACTIVITY AND IMMUNOREACTIVE CONCENTRATION OF LH IN PURIFIED ISOFORMS

Hormone	pH of elution	Biological Activity ¹			Immunoreactive concentration of LH ²	
		U/mg	λ	g	ED ₅₀ (ng/tube)	Slope
NIDDK-oLH-26	-----	2.3	-----	-----	3.97	-2.04
USDA-bLH-5	-----	2.1	-----	-----	1.72	-1.89
LH-I	6.8	1.04	0.88	0.46	2.27	-2.01
LH-II	9.5	5.93	0.53	0.71	1.19	-1.97
LH-III	9.5	0.15	1.02*	3.20*	1.35	-2.06
LH-IV	9.5	0.87	0.29	0.27	0.66	-2.23
LH-V	6.8	1.40	0.61	0.23	1.71	-2.12

¹ *In vivo* bioassay consisting of ascorbic acid depletion in prepubescent pseudopregnant rats (n = 5), reference NIDDK-oLH-26 standard, with a biological activity of 2.3 U/mg. The statistical analysis of the biological activity was performed with a 3 + 3 analysis with 95% confidence limits for the bioassay.

² Radioimmunoassay of ovine LH, NIDDK-oLH-1-2 was marked with Na¹²⁵I using the IODO-GEN technique and NIDDK-oLH-26 was used as standard. The immunoreactive LH concentration was determined based on the quantity of hormone required for the displacement to 50% of the B/BO ratio. Parallelism was determined by the slopes with a P > 0.05.

* The values of λ and g indicate that the bioassay was not valid.

The electrophoretic analysis of the SDS-PAGE system, in comparison with the standard USDA-bLH-B5 in non-reducing conditions was used in order to determine the molecular weight of the LH isoforms. An important band with relative molecular weight of 37.5-38.5 kDa was present in all cases, close to that reported for ovines, bovines, porcines and caprines,¹¹ suggesting that this band, present in the various purified fractions in this study, corresponds to the native form of this protein. On the other hand, high molecular weight proteins were identified, mainly in LH-I and LH-V, which, when analyzed in reducing conditions (in presence of β -mercaptoethanol), disappeared suggesting that these proteins are molecular weight aggregates of LH, since the band of 37.5 kDa was slightly conserved and the bands with relative molecular weight of 23.4 kDa and 20.8 kDa were enriched. Results similar to those reported for this hormone^{10-12,30} suggest that the high molecular weight forms correspond to aggregates of the native forms, and that this, in turn, is composed by two subunits corresponding to the bands with lower molecular weight.

Immunoblotting analysis for each of the purified LH fractions identified high molecular weight proteins, an important band with a relative molecular weight of 37.5 kDa, as well as a protein with a molecular weight of 23.4 kDa. These data confirmed that the various fractions purified in this study corresponded to LH. In order to analyze the specificity of the antibody used in this system USDA-bTSH was simultane-

LH. La LH-I se obtuvo a partir de la fracción CM-2ab, mientras que la LH-II, LH-III, LH-IV y LH-V se obtuvieron de la fracción CM-3ab, ambas fracciones obtenidas durante la purificación del extracto glicoproteínico en CM-Sepharosa y repurificadas en las mismas condiciones en un intercambiador aniónico (DEAE-Sepharcel). El patrón cromatográfico del extracto glicoproteínico de adenohipófisis bovina en CM-Sepharosa fue similar a lo descrito para extractos glicoproteínicos bovinos¹⁰ y caprinos,¹¹ en las mismas condiciones. Aunque la fracción obtenida a partir de acetato de amonio 0.005 M, pH 5.1, designada como CM-1ab se descartó del estudio debido al alto rendimiento y actividad de FSH,^{8,10} Perera *et al.*¹¹ informaron de la obtención de una forma molecular de la LH en la especie caprina a partir de esta fracción, probablemente en la especie bovina se obtenga otra isoforma de LH a partir de esta fracción. Aunque el rendimiento (mg de proteína/kg de tejido) obtenido para cada una de las fracciones consideradas como LH fueron inferiores a lo notificado en otras especies,^{8,11,30-33} ninguno de estos estudios describen la obtención de cuatro proteínas con características fisicoquímicas, biológicas e inmunológicas de LH a partir de la fracción CM-3ab, considerada como una fuente importante de TSH.¹⁰

El patrón electroforético en TRIS-PAGE de las diferentes isoformas de la LH confirmó la heterogeneidad de carga de esta proteína, ya que la LH-I y la LH-V mostraron un comportamiento

Cuadro 3
PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN DE FSH Y TSH PARA CADA ISOFORMA DE LH
PURIFICADA
PERCENTAGE OF FSH AND TSH CONTAMINATION FOR EACH PURIFIED LH
ISOFORM

<i>Hormone</i>	<i>RIA-TSH</i> ¹		<i>RIA-FSH</i> ²	
	<i>ED</i> ₅₀ ³ (ng/tube)	<i>Contamination</i> (%)	<i>ED</i> ₅₀ ³ (ng/tube)	<i>Contamination</i> (%)
USDA-bLH-5	62.0	1.22	ND	ND
LH-I	2.10	36.2	52.8	3.69
LH-II	5.6	13.6	ND	ND
LH-III	10.0	7.6	ND	ND
LH-IV	3.3	23.0	ND	ND
LH-V	ND	ND	ND	ND
NIDDK-oLH-26	ND	ND	ND	ND

¹ Bovine homologous liquid phase radioimmunoassay, 20 h incubation at room temperature. Standard USDA-bTSH-I-1 (0.1-12.8 ng/tube), anti-bTSH, AFP-284246, final dilution of 1:500 000.

² Bovine homologous liquid phase radioimmunoassay, 48 h incubation at room temperature. Standard USDA-bFSH-I-2, AFP-5318C (0.2-12.8 ng/tube), anti-β-bFSH-USDA, final dilution of 1:40,000.

³ The percentage of FSH and TSH contamination was calculated based on the ED₅₀ of the Logit-log linear regression of the dose-response curve for any studied hormone, in relation to standard USDA-bTSH-I-1 (0.76 ng/tube) and USDA-bFSH-I (1.95 ng/tube), respectively. ND = Not detectable by the system.

ously included, which was recognized with very low intensity bands of 37.5 kDa and 23.4 kDa, confirming that the standard presented contamination with LH and also suggesting that the band with low molecular weight corresponded to the subunit alpha, common among glycoproteins.

The radioimmunoassay system revealed a parallelism of the different LH isoforms, which was confirmed with the slope values in comparison with the oLH and bLH standard values. This confirmed the presence of LH. The amount of immunoreactive LH required for the ED₅₀ of the dose-response curve was lower in the proteins that eluted at pH 9.5 (LH-II, LH-III and LH-IV) than in those that eluted at pH 6.8 (LH-I and LH-V). The difference in response can be explained based on the type of antibody used in this study, which was produced with an LH obtained at pH 9.5 (data reported by USDA and NIDDK).

The contamination degree of LH isoforms with structurally similar proteins (FSH and TSH) was not observed in the systems used for LH identification, particularly with FSH, which demonstrates that these isoforms were not contaminated with FSH. In contrast, contamination of 7.6 % for LH-III and 36.2 % for LH-I was observed with the TSH system, while percentage in LH-V was minimum or not detectable; the dose-response curves were not parallel, which was reflected in their slope establishing that there was no identity; however, the antibody used in the TSH system can recognize antigenic sites common with the LH, since both proteins are very similar in structure; therefore, the various proteins purified in this

menos catiónico, patrón semejante para isoformas equinas;^{30,34} humana;^{8,9} bovina;^{10,33} rata³⁵ y caprina.¹¹ La LH-II, LH-III y LH-IV eluyeron a pH 9.5, presentaron patrón electroforético del tipo catiónico, semejante a los estándares USDA-bLH-5, AFP5500 y NIDDK-oLH-26, AFP5551B, así como una variante de LH caprina,¹¹ LH equina³⁰ y humana.³⁶ La diferencia entre los diferentes patrones electroforéticos en TRIS-PAGE (heterogeneidad de carga) para las LH que eluyeron a pH 6.8 y aquellas que eluyeron a pH 9.5, se ha sugerido que se debe a la distinta composición de las unidades de carbohidratos de la molécula y a la cantidad de sulfato terminal que se observa en estos carbohidratos.^{1,4, 20,37}

Con el fin de determinar el peso molecular de las isoformas de LH, se recurrió al análisis electroforético en el sistema SDS-PAGE, en comparación con el estándar USDA-bLH-B5 en condiciones no reductoras; en todos los casos se presentó una banda importante con peso molecular relativo de 37.5 a 38.5 kDa, cercano a lo señalado para las especies ovina, bovina, porcina y caprina,¹¹ sugiriendo que esta banda presente en las diferentes fracciones purificadas de este estudio, corresponde a la forma nativa de esta proteína. Por otro lado, se identificaron proteínas de alto peso molecular, principalmente en la LH-I y LH-V, que cuando se analizaron en condiciones reductoras (en presencia de β-mercaptoetanol) desaparecieron, ello sugiere que estas proteínas son agregados de peso molecular de la LH, ya que se conserva ligeramente la banda de 37.5 kDa y se enriquecen las bandas de peso molecular relativo de

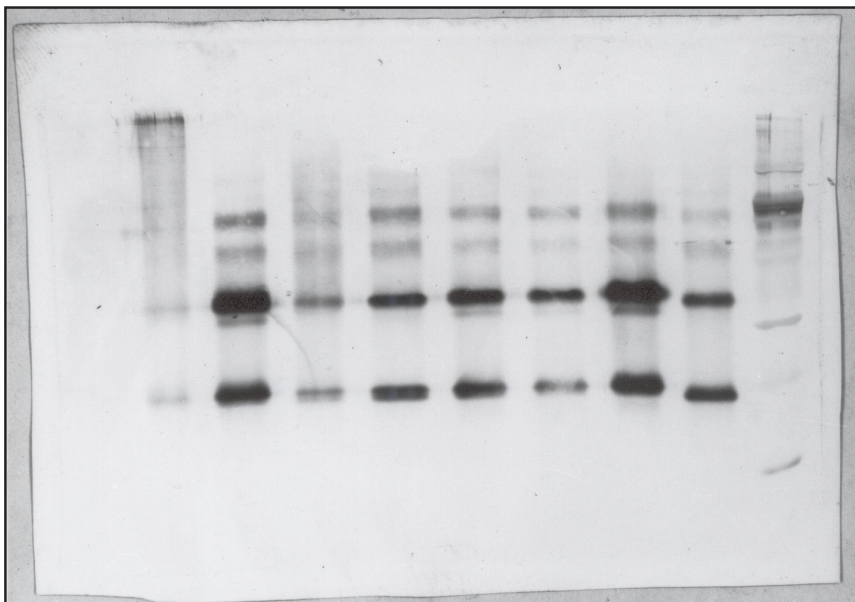
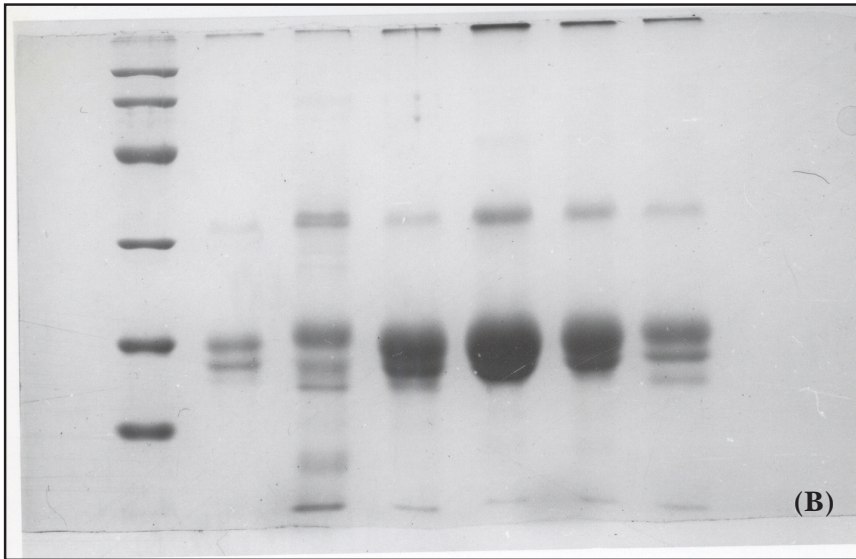
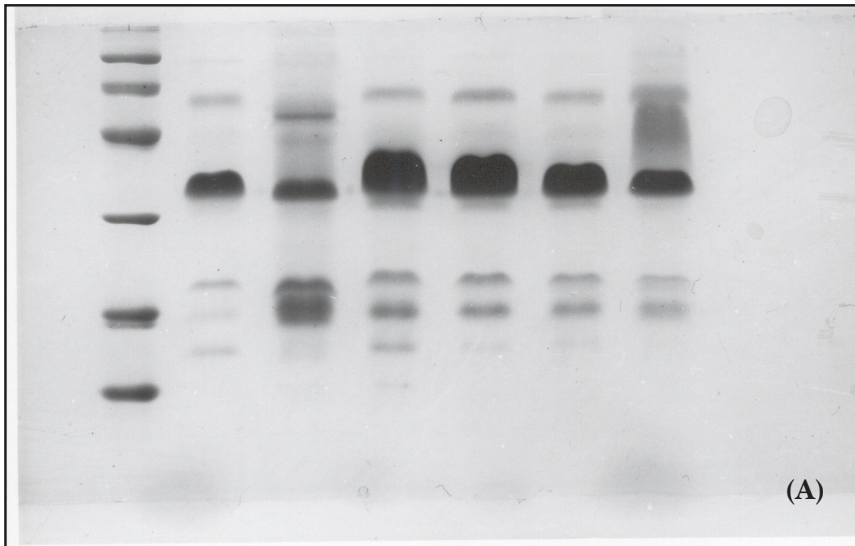


Figura 4. Electroforesis discontinua en condiciones desnaturalizantes en SDS-PAGE, al 12.5%, pH 8.6. El panel (A) corresponde a las condiciones no reductoras (ausencia de β -mercaptoetanol) y el panel (B) corresponde a las condiciones reductoras (presencia de β -mercaptoetanol): Marcadores de peso molecular; USDA-bLH-b5; LH-I; LH-II; LH-III; LH-IV y LH-V. La concentración de proteína en cada carril correspondió a 1 μ g. La tinción se realizó con nitrato de plata (BIO-Rad). Las flechas a la izquierda indican los marcadores de peso molecular. Las flechas de la derecha señalan agregados de la forma nativa (59.02 kDa); la forma nativa de la LH (37.6 kDa). Las bandas de 23.4 kDa y 20.8 kDa corresponden a la subunidad alfa y beta de LH, respectivamente.

Denaturing discontinuous electrophoresis in SDS-PAGE, at 12.5%, pH 8.6. Panel (A) corresponds to non-reducing conditions (absence of β -mercaptoethanol) and panel (B) corresponds to reducing conditions (presence of β -mercaptoethanol). Molecular weight markers; USDA-bLH-b5; LH-I; LH-II; LH-III; LH-IV and LH-V. Protein concentration in each lane corresponds to 1 μ g. Dying was performed with silver nitrate (BIO-Rad). The arrows at the left indicate the molecular weight markers. The arrows at the right indicate native aggregates (59.02 kDa); the native morph of LH (37.6 kDa). The bands of 23.4 kDa and 20.8 kDa correspond to LH subunits alpha and beta, respectively.

Figura 5. Inmunotransferencia de las diferentes isoformas de la LH purificadas en este estudio. El anticuerpo (anti-oLH-CSU-204) se utilizó a una dilución 1:500, con un periodo de incubación de 24 h USDA-bTSH; NIDDK-oLH-26; USDA-bLH-b5; LH-V; LH-IV; LH-III; LH-II; LH-I. Marcadores de peso molecular (92.5; 62.5, 45.0, 31.0, 21.5 y 14.4 kDa). La banda de 37.5 kDa corresponde a la forma nativa de la LH y la banda de 23.4 kDa, muestra la subunidad alfa.

Immunoblotting of the different LH isoforms purified in this study. The antibody (anti-oLH-CSU-204) was used at a dilution of 1:500, with a 24 h incubation period USDA-bTSH; NIDDK-oLH-26; USDA-bLH-b5; LH-V; LH-IV; LH-III; LH-II; LH-I. Molecular weight markers (92.5 kDa, 62.5 kDa, 45.0 kDa, 31.0 kDa, 21.5 kDa and 14.4 kDa). The band of 37.5 kDa correspond to the native morph of LH and the band of 23.4 kDa shows the alpha subunit.

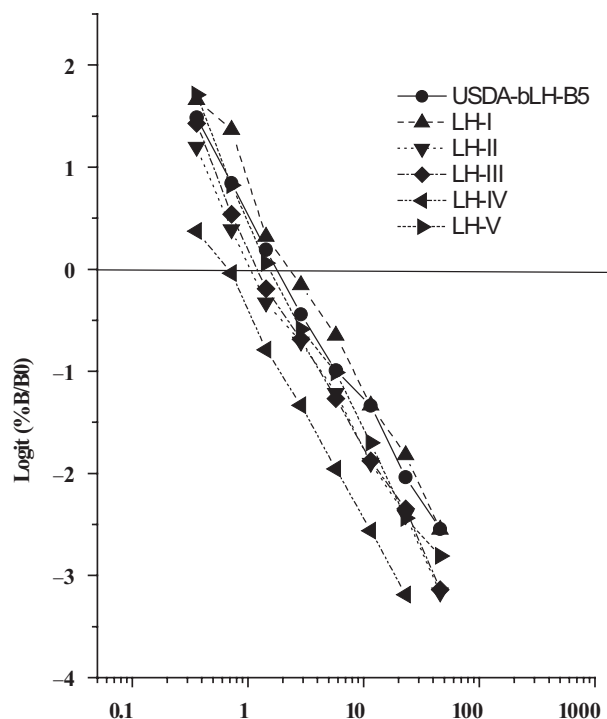


Figura 6. Curvas dosis-respuesta de las isoformas de la LH bovina. Se presenta la transformación logística (Logit % B/B₀) del porcentaje de unión máxima en relación con el logaritmo de las dosis en cada curva.
Dose-response curves of bovine LH isoforms. The logistic transformation (Logit % B/B₀) of the maximum bond percentage in relation to the dose log in each curve is presented.

study are LH with null immune activity of FSH and TSH.

Recently, Ulloa-Aguirre *et al.*²⁰ pointed out the significance of the relationship of biological and immune activity as an index (B/I) of the biopotency of individual isoforms, which varies according to protein acidity. For example, Castro-Fernandez *et al.*³⁸ reported that the relationship decreases as acidity increases, data that confirms the results obtained for LH-II (elution at pH 9.5), when compared to isoforms that eluted at pH 6.8 (LH-I and LH-V); however, variants LH-III and LH-IV showed a very low relationship, although they eluted at pH 9.5. May be, this difference in biological activity is due to the fact that the biological approach (ascorbic acid depletion) used for their determination was not sufficiently sensitive or specific for them, since the antibody recognized each isoforms without distinction in all cases.

Therefore, physicochemical, biological and immunological results of this study confirm that the used methodology allowed the purification of five LH isoforms from the bovine glycoprotein extract with satisfactory yield for each relatively pure isoform. The isolated isoforms showed differences among each other in biological activity and in their interaction with a reference antibody.

Acknowledgements

We wish to thank the United States Department of Agriculture (USDA) and the National Institute of Dia-

23.4 y 20.8 kDa. Resultados semejantes a lo informado para esta hormona^{10-12,30} sugieren que las formas de alto peso molecular corresponden a agregados de la forma nativa y ésta, se compone de dos subunidades que correspondieron a las bandas de menor peso molecular.

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

El sistema de radioinmunoensayo permitió observar un paralelismo de las diferentes isoformas de la LH, lo que se pudo confirmar en los valores de las pendientes, en comparación con los de los estándares de oLH y bLH; ello confirma la presencia de LH. La cantidad de LH inmunorreactiva necesaria para la dosis del 50% (ED₅₀) de la curva dosis-respuesta, fue inferior en las proteínas que eluyeron a pH 9.5 (LH-II, LH-III y LH-IV) en comparación con la de elución a pH 6.8 (LH-I y LH-V). La diferencia

betes & Digestive & Kidney Diseases (NIDDK) for the donation of reference standards for the immunological and biological quantitation and characterization of the proteins for this study, as well as the Mexican National Council for Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) for the financial support of the project 25748-B, and Gerardo Arrellin Rosas, the person in charge of the Animal House of the Institute of Biomedical Research, UNAM, Mexico and Dr. Carlos Gutierrez Aguilar for his comments on this work.

Referencias

1. Combarrous Y. Structure and structure-function relationships in gonadotrophins. *Reprod Nutr Dev* 1988; 28:211-228.
2. Pierce JG, Parson TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:465-495.
3. Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Ulloa-Aguirre A, Campo S. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of *in-vitro* bioactivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001;174: 41-49.
4. Baenzinger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-like oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988; 947:287-306.
5. Kojima FN, Cupp AS, Stumpf TT, Zalesky DD, Robertson MS, Werth LA. Effects of 17 β -estradiol on distribution of pituitary isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 1995; 52:297-304.
6. Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-Stimulating Isohormone: Characterization and Physiological Relevance. *Endocr Rev* 1995;16:765-787.
7. Cooke DJ, Crowe MA, Roche JF, Headon DR. Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 1996; 41:77-99.
8. Stockell Hartree A. Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. *J Biol Chem* 1966; 100:754-761.
9. Bates RW, Garrison MM, Cooper JA, Condliffe PG. Further studies on the purification of human thyrotropin. *Endocrinology* 1968; 83:721-730.
10. Carranza SME, Amezcua MEV, Neri BR, Salas VA. Extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina. *Tec Pecu Mex* 1994;32: 5-17.
11. 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). *Vet Mex* 1996; 27: 1-10.
12. Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. Structural and functional characterization of

de respuesta se puede explicar en función del tipo de anticuerpo utilizado en este estudio, el cual se generó con una LH obtenida a pH 9.5 (datos señalados por USDA y NIDDK).

El grado de contaminación de las isoformas de la LH, con proteínas estructuralmente semejantes (FSH y TSH) no se observó en los sistemas utilizados para la identificación de LH, en particular con FSH, lo que demuestra que estas isoformas no tienen contaminación con FSH. En contraparte, con el sistema de TSH se observó contaminación de 7.6% para la LH-III y de 36.2% para la LH-I, mientras que en la LH-V el porcentaje fue mínimo o no detectable; el comportamiento de sus curvas dosis-respuesta no fueron paralelas, lo que se reflejó en su pendiente y establece que no hay identidad; sin embargo, el anticuerpo utilizado en el sistema de TSH puede reconocer sitios antigénicos comunes con la LH, ya que ambas proteínas son estructuralmente muy semejantes; por tanto, las diferentes proteínas purificadas en este estudio son LH con nula actividad inmunológica de FSH y TSH.

Recientemente, Ulloa-Aguirre *et al.*²⁰ enfatizan la importancia de la relación de la actividad biológica e inmunológica (B/I) como un índice (B/I) de la biopotencia de isoformas individuales, que varía con la acidez de la proteína; por ejemplo, Castro-Fernández *et al.*³⁸ señalan que la relación disminuye con el incremento de la acidez, datos que se confirman con los resultados obtenidos para la LH-II (elución a pH 9.5), cuando se comparó con las isoformas que eluyeron a pH 6.8 (LH-I, V); sin embargo, las variantes LH-III y LH-IV mostraron una relación muy inferior a pesar de haber eluido a pH 9.5. Quizá esta discrepancia en actividad biológica se deba a que el modelo biológico (depleción del ácido ascórbico) utilizado para su determinación no es suficientemente sensible o específico para ellas, ya que en todos los casos el anticuerpo reconoció de manera indistinta a cada isoforma.

Por tanto, los resultados fisicoquímicos, biológicos e inmunológicos de este estudio confirman que la metodología empleada permitió la purificación de cinco isoformas de LH a partir del extracto glicoproteínico bovino, con adecuado rendimiento para cada isoforma, relativamente puras. Las isoformas aisladas muestran entre sí diferencias en su actividad biológica y en su interacción ante un anticuerpo de referencia.

Agradecimientos

Se agradece al United States Department of Agriculture (USDA) y al National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney diseases (NIDDK), la donación

hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125:133-141.

13. Burgon PG, Stanton PG, Robertson DM. *In vivo* bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 1996; 137:4827-4836.
14. Chlenov MA, Kandyba EI, Nagornaya LV, Orlova IL, Volgin YV. High-performance liquid chromatography of human glycoprotein hormones. *J Chromatogr* 1993; 631:261-267.
15. Jack GW, Blazek R, James K, Boyd JE, Micklem LR. The automated production by immunoaffinity chromatography of the human pituitary glycoprotein hormones thyrotropin, follitropin and lutropin. *J Chem Technol Biotechnol* 1987; 39: 45-58.
16. Hiyama J, Surus A, Renwick AGC. Purification of human pituitary LH and thyrotrophin by hydrophobic chromatography. *J Endocrinol* 1990; 125: 493-500.
17. 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. *J Chromatogr* 1991; 549:141-152.
18. Perera MG, Rojas MS, Murcia MC, Hernandez CJ, Gonzalez PE. Identification of molecular forms of luteinizing hormone in the serum of cows and goats during the preovulatory peak. 27th World Veterinary Congress; 2002 September 25-29; Tunis -Tunisia, Ed. Dr. Faouzi Kechrid, 2002, Res 446.
19. Rojas MS, Perera MG, Murcia MC, Hernández CJ, Zarco QL y González PE Formas moleculares de la hormona luteinizante (LH) en el pico preovulatorio de cabras ciclando o en el inducido con GnRH durante el anestro. XXXVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 2001 octubre 9-12; Chiapas (México). México (D.F.): 2001,20.
20. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Mendez JP. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Hum Reprod* 2001;16: 599-604.
21. Rose PM, Das Gaines RE, Balen HA. Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev* 2000;21:5-22.
22. Padmanabhan V, Lee JS, Beitins IZ. Follicle-stimulating isohormones: regulation and biological significance. *J. Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 87-89.
23. Ulloa-Aguirre A, Midgley R Jr., Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 1995; 16:765-787.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
25. Bollag DM, Edelstein SJ. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss, 1991.
26. Nicoll SC, Linch P. Evolutionary biology of prolactin and somatotropin. II Electrophoretic comparison of

de los estándares de referencia para la cuantificación y caracterización inmunológica y biológica de las proteínas de este estudio, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, el financiamiento al proyecto 25748-B, de igual manera a Gerardo Arrellin Rosas, encargado del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar sus comentarios a este trabajo.

tetrapod somatotropin. *Gen Comp Endocrinol* 1971; 17:490-507.

27. Laemmli LVK. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 224: 680-685.
28. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
29. Perera MG, Falcón AA, Salas VA. Estandarización de la técnica de radiomarcaje con Iodo-Gen. Memorias del XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas; 1996 septiembre 24-26; Puebla (Puebla) México. México (DF). Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, AC, 1996: 40.
30. 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. *Biol Reprod* 1986; 34: 571-578.
31. Alatorre FS. Programa manual para bioensayos. Unidad de Investigaciones Biomédicas. México (DF): Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social 1976
32. Finney DJ. *Statistical methods in biological assay*. 2ª Ed London Griffin, 1978.
33. Muralidhar K, Rajendrakumar T, Sharma HP. Heterogeneity in buffalo lutropin. *Indian J Biochem Biophys* 1992; 29:168-172.
34. Braselton Jr. WE, Mcshan WH. Purification and properties of follicle stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands. *Arch Biochem Biophys* 1970; 139:45-58.
35. 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.
36. Stockell-Hartree A, Renwick GC. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 1992; 287:665-679.
37. Dias JA. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Hum Reprod* 2001; 16: 825-830.
38. Castro-Fernandez C, Olivares A, Soderlung D, Lopez-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, *et al.* A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4603-4610.