

161
20je.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**CARACTERIZACION DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO CAPRINA (GH): SUS
EFECTOS SOBRE LA PRODUCCION
CUALITATIVA Y CUANTITATIVA EN LA
LECHE DE CABRA MESTIZA**

T E S I S

**Presentada ante la División de
Estudios Profesionales
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
EDUARDO RIGADA SOTO**

**Asesores: MVZ. Andrés Ducoing Watty
IA en C. J. Gerardo Perera M.
M en C. Angélica Salas Valdés**



México, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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, Eduardo y Mariechen, quienes cual tierra fértil, han permitido el crecimiento de cada vez más profundas raíces.

A mi abuela Mariechen, por tu decisiva influencia en los sucesos que ahora ocurren.

A Marcoflavio, pues las ideas viajan, las modas cambian y hermano... solo hay uno.

Al Dr. Carlos Calderón F.; "La plena admiración no es hacia la persona en sí, sino a lo que en su esencia le otorga sentido a la vida". Gracias por ser mi amigo y maestro... siempre.

A la Dra. Aurora Velazquez E., por siempre creer tanto en mí, por dar rumbo fijo a mis aspiraciones y proyectos de vida.

Gracias por ese apoyo incondicional que inexplicablemente siempre me brinda.

A Karla, Adrián y Samuel, por su amistad y compañía.

Y finalmente a la "Chachis"...

* * *

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angélica Salas V., por su fé y confianza, por su don de gente, por la convicción en sus ideales, por su amistad y su persistente actitud crítica ante la vida y sobre todo por encausarme en el camino de la ciencia.

Al M en C. Gerardo Perera M., por tu alentador apoyo, por tu decisivo impulso, por creer en el proyecto, y por ser siempre mi amigo y asesor.

Al M.V.Z. Andres Ducoing Watty, por ser mi asesor y por su valioso y significativo apoyo para la realización y termino de mi tesis.

A los miembros del jurado, por dedicar su tiempo en la revisión y crítica del trabajo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme dado una profesión y criterio ante la vida.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por las facilidades prestadas para la realización del proyecto.

Al Centro de Neurobiología por haberle dado un marco teórico al presente trabajo.

A la Dra. Zoila Nieto V., jefa del departamento de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Química quien con apoyo desinteresado ayudó a sacar adelante este trabajo en uno de sus momentos mas difíciles. Gracias.

Al personal del Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Ruminantes (C.E.P.I.E.R) por facilitar material e instalaciones para la realización del proyecto.

A Luz Torner, por su desinteresada colaboración, consejos y apoyo durante la caracterización inmunológica de la hormona de crecimiento caprina.

Al Dr. Andrés Quintanar S., por la donación de las ratas hipofisectomizadas para la caracterización biológica de la hormona.

A Edilberto, por su valiosa ayuda durante los ordeños de las cabras.

Al CONACyT, por el financiamiento parcial del proyecto (P124CCOT894567).

A la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Sinaloa por la donación de las hipófisis caprinas empleadas para el trabajo.

A la "banda": Rodolfo, Juan, Raymundo, Benjamín, "Nacho", y "El Flaco", por ese inicio de carrera tan formidable.

A mis demás compañeros y amigos: Lulú, Margarita, Mariano, Armando, Alejandra, Lillian, Verónica y Viridiana, por esos momentos.

Y finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México, pues en su esencia encuentro la pasión por la vida.

"El conocimiento es una actitud, una pasión. De hecho una actitud ilícita. Pues la compulsión de conocer es una manía, ni mas ni menos que la dipsomanía, la erotomanía, la manía homicida: produce un caracter desequilibrado. No es cierto en absoluto que el hombre de ciencia persiga la verdad. Ella lo persige a él. Es algo que el padece".

Kierkegaard

"Hay quien obedece a sus propias reglas
porque se sabe en lo cierto;
quien cosecha un especial placer
en hacer algo bien; quien adivina
algo mas de lo que sus ojos ven;
quien prefiere volar a comprar y comer..."

R. Bach.

"El diablo es el que tiene respecto a Dios las más vastas perspectivas; por eso se mantiene lejos del él. ¿No es el diablo el amigo mas viejo del conocimiento?"

F. Nietzsche.

INDICE

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION	2
A) La hormona de crecimiento (GH)	2
1. Regulación de la secreción	3
2. Acciones fisiológicas y bioquímicas generales .	5
B) La GH y la lactación	8
1. Homeostasis y homeorresis	9
2. La GH y su mecanismo de acción	17
2.1 Efectos en la glándula mamaria	18
2.2 Efectos en el metabolismo lipídico	19
2.3 Efectos en el metabolismo de los glúcidos ...	21
2.4 Efectos en el metabolismo de las proteínas ..	22
2.5 Efecto sobre el metabolismo mineral	23
2.6 Consideraciones finales	24
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	27
4.- MATERIAL Y METODOS	29
A) Extracción de la hormona de crecimiento (gGH) ...	29
B) Caracterización fisicoquímica	31
C) Identificación inmunológica	35
D) Caracterización biológica	39
E) Ensayo en cabras	42
F) Determinación de grasa butírica	43

5.- RESULTADOS.....	45
A) Proceso de purificación	45
B) Caracterización fisicoquímica	46
C) Caracterización inmunológica	50
D) Caracterización biológica	52
E) Ensayo en cabras	54
6.- DISCUSION	64
A) Preparación de la gGH.	65
B) Caracterización biológica	69
C) Ensayo en cabras	72
7.- CONCLUSIONES	77
8.- LITERATURA CITADA	80

1. RESUMEN

RIGADA SOTO EDUARDO. Caracterización de la hormona de crecimiento caprina (gGH): Efectos sobre la producción cualitativa y cuantitativa en la leche de la cabra mestiza, bajo la asesoría del M.V.Z. Andrés Duccing Watty, M en C. Gerardo Perera Marín y la M en C. Angélica Salas Valdés.

Se trabajó con un lote de 12 cabras mestizas divididas en un grupo experimental y uno testigo de 6 animales cada uno. El grupo experimental recibió 9 mg totales por la vía intramuscular de gGH parcialmente purificada a partir de hipófisis de cabras Cimarronas obtenidas en la isla de Guadalupe. Fué caracterizada de forma biológica, fisicoquímica e inmunológica. Se liofilizó y resuspendió en solución salina fisiológica (S.S.F.) para su aplicación. De acuerdo a su bioactividad contó con una actividad biológica de 0.5 U.I/mg y con la finalidad de poder evaluar las posibles modificaciones en el de volúmen de leche producido y porcentaje de grasa butírica, se sometieron a los animales a un tratamiento de 21 días de duración, de los cuales, 15 días correspondieron a la etapa de aplicación de la hormona en el lote experimental, mientras que al lote control le fue aplicada S.S.F. a razón de 1 ml por vía intramuscular en ese mismo periodo.

Los resultados obtenidos señalan la ausencia total del efecto endócrino esperado, ya que se obtuvo una respuesta al estímulo de 0.32% de aumento en el volumen de leche; en tanto que la grasa decreció 9.04% . Lo anterior fue debido a que la potencia biológica de la hormona no fue suficiente para reorientar el metabolismo del animal hacia una modificación en su producción de leche, además de no haberse cubierto la dieta mínima para modificar la producción de leche bajo este tipo de manejo farmacológico.

1. INTRODUCCION.

A) La hormona de crecimiento (GH).

La hormona de crecimiento o GH es una familia de proteínas (variantes de carga y masa) que se sintetiza en los somatotropos, una subclase de células acidófilas de la glándula hipófisis (59).

El componente mayoritario comprende a un polipéptido de cadena única constituida por 191 aminoácidos en donde predomina una estructura secundaria de alfa hélice (55%) (50), con un punto isoeléctrico de 4.9 (48,49) y con un peso molecular aproximado de 22,000 (22 K) daltones en todas las especies estudiadas (13,78).

Con la introducción de una serie de técnicas, tales como la electroforesis en geles de almidón y de poliacrilamida (15,17), que separan a las proteínas de acuerdo a su carga y peso molecular se han identificado de 4 a 6 componentes de la GH humana (hGH) conocidos como variantes de carga y con base en su peso molecular se han aislado de 2 a 4 componentes conocidas como variantes de masa; en este caso haciendo uso además de la cromatografía de exclusión molecular (37,48). Se considera que las variantes de masa se forman como el resultado de la agregación molecular o por la eliminación de ciertos aminoácidos de la estructura 22K (29,48,49). La variante 45K obtenida a partir de extractos de hipófisis y purificada por cromatografía de exclusión molecular, resultó de esta misma forma, ser un agregado de la especie mayoritaria 22K (29,48,49).

Otra variante de masa interesante es la 20K que se caracteriza por la ausencia de los residuos 32-46 y por una muy baja actividad de tipo insulinoide comparada con su variante 22K (13). En el plasma se han encontrado agregados moleculares de la GH que son las variantes 45K, 70K y una mayor 100K (big-big hGH) (73,77).

Por otro lado, se han realizado digestiones parciales de la GH bovina (bGH) con tripsina, pepsina y quimotripsina que han conducido al aislamiento de un pequeño fragmento que muestra algunas de las propiedades de la hormona nativa (variante 22K) y que demostró ser metabólicamente activa en el ser humano (78). Estos estudios se han extendido a la fragmentación por medio de tratamientos químicos y a la síntesis de algunas secuencias seleccionadas para la hGH (50).

1) Regulación de la secreción.

La secreción de GH está influenciada por diversos estímulos y al igual que varias de las hormonas hipofisarias es pulsátil y episódica (59). Entre los estímulos encontramos principalmente: el estrés (dolor, frío, etc..), el ejercicio, la hipoglucemia grave, el ayuno, dietas ricas en proteína, los estrógenos, la dopamina, los agentes alfa adrenérgicos, serotonina, polipéptidos opiáceos, hormonas intestinales y el glucagón; al parecer todos ellos convergen en el núcleo ventromedial del hipotálamo, donde la liberación de GH es regulada por el sistema de retroalimentación (59), como se ilustra en la figura 1.

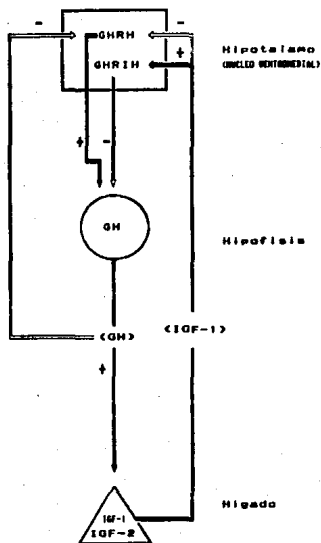


Figura 1. Sistema de regulación de la secreción de la hormona del crecimiento (GH) (59).

En este sistema, el circuito corto comprende al regulador positivo GHRH o somatoliberina y el regulador negativo GHRH o somatostatina y el circuito periférico comprende al factor I de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I ó somatomedina C) (59).

Se considera que las acciones de la GH que promueven el crecimiento son mediadas por el IGF-1, que es producido en el hígado. El IGF-1 regula la secreción de la GH inhibiendo la liberación de GHRH desde el hipotálamo y estimulando la liberación de somatostatina. La inhibición por retroalimentación de circuito corto es realizada por la GH misma, estableciendo un mecanismo de naturaleza autocrina la cual inhibe la liberación de GHRH (59).

2) Acciones fisiológicas y bioquímicas generales.

La GH es una hormona esencial para el crecimiento posnatal y regula el metabolismo de los lípidos, carbohidratos, proteínas y minerales (59). Así, aunque es ampliamente aceptado el hecho de que la GH promueve el crecimiento somático, el sitio y su mecanismo de acción aún permanecen poco claros (38). La administración de GH in vivo en animales deficientes de esta misma hormona provoca una intensa estimulación de la condrogénesis y la miogénesis dando como resultado el crecimiento somático posnatal (14, 44, 66).

Sin embargo, al ser añadida en cultivos celulares in vitro como condrocitos o preparaciones musculares incubadas, la GH desarrolla efectos muy disminuidos y poco consistentes en términos de crecimiento y desarrollo y de acuerdo a la hipótesis de las somatomedinas, la GH no ejerce un efecto directo en el cartílago sino que estimula la condrogénesis y el crecimiento somático mediante el incremento en el nivel de síntesis de somatomedinas a partir del hígado (36).

Aparentemente sólo el tejido adiposo es sensible a la acción directa de la GH, además se ha planteado la presunta existencia de receptores para GH en la glándula mamaria, lo cual pretende aclarar el conocido efecto lactopoyético que esta hormona produce en los mamíferos (31).

Además del crecimiento, la GH regula el metabolismo bioenergético de los animales. En el caso concreto del metabolismo proteico, la GH incrementa el transporte de aminoácidos hacia el interior de las células musculares y también incrementa la síntesis de las proteínas por un mecanismo separado del efecto de dicho transporte. A este respecto, las acciones de la GH son semejantes a las de la insulina (59).

Dentro del metabolismo de los carbohidratos, por lo general antagoniza los efectos de la insulina. La hiperglucemia resultante de su aplicación será el resultado combinado de la disminución en el uso periférico de la glucosa y del incremento en su producción hepática por la vía de la gluconeogénesis. En el hígado, la GH incrementa el glucógeno, probablemente por la activación de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos. La GH también puede inhibir el transporte de la glucosa (5,8,59).

En el metabolismo lipídico, la GH promueve la liberación de ácidos grasos y glicerol, causando un incremento rápido de ácidos grasos circulantes y de la oxidación de los mismos en el hígado (5,8,59)

Bajo condiciones de deficiencia de insulina puede haber cetogénesis incrementada. Es probable que estos efectos y los del metabolismo de carbohidratos no sean mediados por IGF-I (59).

En el caso de los minerales, la GH mediada por la IGF-I, promueve un equilibrio positivo de calcio, magnesio y fosfato y causa retención de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ (59).

La tabla 1 resume los efectos fisiológicos más conocidos de la GH humana (hGH) a nivel metabólico, organoespecífico y anatómico o somático.

TABLA 1
PRINCIPALES EFECTOS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO

EFECTOS METABOLICOS

- Estimulación del transporte de aminoácidos.
- Estimulación de la síntesis de proteínas.
- Estimulación de la síntesis de ADN y ARN.
- Estimulación de la lipólisis.
- Incremento de la tasa metabólica basal.
- Actividad diabotogénica.

EFECTO ORGANO-ESPECIFICO

- Incremento del flujo sanguíneo renal.
- Incremento de la tasa de filtración glomerular y la absorción tubular de fosfatos.
- Estimulación de la eritropoyesis.

EFECTOS ANATOMICO-SOMATICOS

- Acelera el crecimiento lineal.
 - Reduce la masa de tejido graso y aumenta la masa de diferentes tejidos: músculo, hígado, riñón, corazón, páncreas, esqueleto y tejido conjuntivo.
-

Tabla 1.- Resumen de los efectos fisiológicos más conocidos que la GH ejerce en el organismo de los mamíferos (13).

B) La Hormona de Crecimiento y la Lactación.

Alrededor del año de 1937, G.J. Asimov y N.K. Krouze observaron que los extractos crudos derivados de la glándula hipofisiaria de los rumiantes, (en particular los derivados de las vacas lecheras), al administrarse en bovinos, aumentaban de manera sensible la producción diaria de leche (8).

Durante la década de 1940, científicos británicos refinaron estos extractos crudos, al grado de lograr establecer que la especie química involucrada en el efecto lactacional observado, era la hormona del crecimiento (GH) (8).

Posteriormente, en un trabajo ya clásico, Brumby y Handcock publican los primeros resultados en donde la GH es administrada por un periodo de 12 semanas, diariamente al ganado productor de leche, logrando así una sobreproducción de hasta el 50% con respecto a sus testigos (8).

En el año de 1970, un grupo dirigido por L.J. Machlin auspiciados por la compañía Monsanto Inc. estudiaron tanto el incremento en la producción de leche como la mejoría en la eficiencia alimenticia de los cerdos durante la administración exógena de GH bovina y porcina respectivamente (51,52).

Más recientemente, estudios a corto plazo realizados en la Universidad de Cornell y en el Instituto Nacional de Ciencias de la Leche en Inglaterra, con GH derivada directamente de la glándula hipofisiaria, mostraron que tanto la producción de leche como la eficiencia alimenticia se veían sensiblemente mejoradas bajo el efecto de la GH y se aportaron los primeros indicios de su modo de acción (7,34).

A finales del año de 1981, se montó el primer trabajo utilizando GH recombinante (biosintética), justificando que es tanto o más efectiva que los antiguos purificados hipofisiarios (4).

En un aspecto comparativo, la introducción de programas de inseminación artificial y selección de toros mejorarían la producción de leche en no más de 100 kg por año por vaca y que junto con programas de transferencia de embriones y sexado de semen significarían una mejoría no mayor a 130 kg de leche adicionales; en tanto que el uso de la GH incrementaría la producción en cerca de los 2000 kg de leche en una sola lactancia (2,8). Así, la gran cantidad de información que se fue acumulando con relación al efecto lactogénico de la GH en el ganado lechero, obligó a los investigadores a despejar el escenario fisiológico dentro del cual se desempeña la GH (2,3,8), con lo que se hizo evidente el papel que ésta desempeña en la regulación homeorrética.

1.- Homeostasis y Homeorresis.

El control del metabolismo durante los periodos de preñez y de lactación en el rumiante involucran dos tipos fundamentales de regulación, uno a nivel homeostático y otro a nivel homeorrético.

La homeostasis en su forma más general se considera como el conjunto de mecanismos que conllevan hacia el mantenimiento del equilibrio fisiológico, promoviendo así las condiciones estables en el medio interno; en tanto que la homeorresis consiste en una regulación metabólica de largo plazo en donde los cambios se orquestan de tal forma que privilegian un determinado estado fisiológico dado, como sería la coordinación metabólica de un determinado grupo de tejidos para mantener el estadio fisiológico de la lactación. (3,5,7).

De esta manera, el control homeorrético comprende la reorientación del flujo de los nutrimentos para dar soporte a procesos de desarrollo tales como el crecimiento y la lactación a pesar de la actividad de otros procesos que tienden a desviar estos nutrimentos (3,5,7).

Se debe enfatizar que los mecanismos homeorréticos comprenden regulaciones de larga duración, en tanto que los homeostáticos prevalecen por un periodo corto de tiempo y sólo en situaciones de riesgo para la vida, en cuyo caso, estos mecanismos dominarían sobre los mismos de la homeorresis para así preservar las funciones vitales (3,5).

Las figuras 2 y 3, ilustran de modo esquemático los conceptos anteriores.

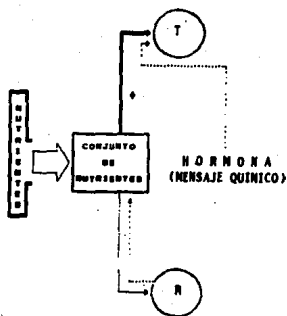


Figura 2. Esquema que muestra la remoción de nutrientes hacia diferentes tejidos (T) del organismo durante la regulación homeostática, bajo la influencia de un mensaje químico específico (hormona). Nótese que los tejidos de reserva (R) son capaces de amortiguar la demanda de nutrientes hacia los tejidos que los demandan (5).

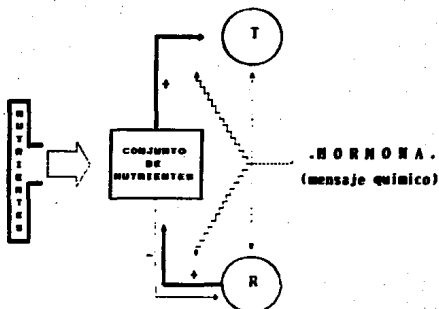


Figura 3. Muestra el modelo de control hormonal de tipo homeorrético. Nótese que el mensaje químico (hormona) actúa simultáneamente en diferentes sitios favoreciendo la remoción de los nutrientes para ser reorientados hacia los tejidos favorecidos por la regulación homeorrética (T) (5).

De esta manera podemos ver que los nutrimentos llevados hacia un centro de almacenamiento son sujetos de ser aprovechados por el tejido (T) en actividad (músculo durante el crecimiento, glándula mamaria en lactación, desarrollo fetal, etc.) o removidos desde y hacia tejidos de depósito, almacén o reserva (R). En el caso concreto de la figura 2, el mensajero químico (hormona) estimula y afecta un solo tejido para regular sus funciones de secreción, absorción o desarrollo y el uso de estos nutrimentos se encuentra en franca competencia con los demás tejidos del organismo (R) (5).

Así, las demandas excesivas de nutrimentos por parte de "T" son compensadas por los mecanismos homeostáticos en tres niveles fundamentales: 1) permitiendo una movilización de los metabolitos desde los tejidos de reserva "R" hacia algún centro de almacenamiento o reserva; 2) promoviendo un ambiente de estabilidad dinámica en el sitio de almacenamiento de nutrimentos y 3) satisfaciendo la demanda de metabolitos por parte de los tejidos de reserva "R" a partir del mismo sitio de almacenamiento de nutrimentos (5).

Nótese, que la diferencia principal en la figura 3, radica en los múltiples sitios en donde ejerce efecto el mensaje químico.

Es aquí, en el ejemplo de control homeorrético, donde el flujo de nutrimentos desde y hacia los tejidos de reserva "R" es el resultado de una respuesta coordinada a una señal de naturaleza homeorrética, en donde la regulación homeostática pasa a desempeñar un papel secundario dentro de la orquestación metabólica (5).

Particularmente, durante el periodo lactacional en el ganado, es el tejido adiposo el que mayor evidencia ofrece sobre los cambios homeorréticos que modifican la reorientación del flujo de los nutrimentos (3,4,6,7,8).

Los cambios a este nivel, ofrecen el panorama más preciso de lo que la homeorresis implica. Como se sabe, parte de las reservas energéticas del organismo se encuentra almacenada en forma de lípidos en el tejido adiposo, en donde el adipocito desempeña dos funciones fundamentales: la síntesis y la movilización de los lípidos (3).

En la figura 4 se esquematizan ambos ciclos tanto la síntesis de los lípidos como su movilización: (3,5).

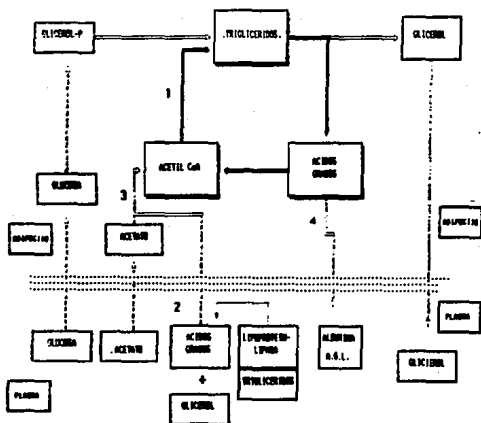


Figura 4. Esquema representativo del ciclo de la síntesis y movilización de lípidos en el rumiante. 1) Síntesis *de novo* de los ácidos grasos. 2) Incorporación de ácidos grasos preformados a partir del plasma. 3) Esterificación de ácidos grasos. 4) Movilización de ácidos grasos hacia el torrente circulatorio (3).

Estudios realizados en ratas, indican que alrededor del día 19 de gestación, la actividad enzimática de la lipoproteín lipasa decrece (3,5,33,) y la actividad de las enzimas clave involucradas en la síntesis lipídica se ve disminuida rápidamente (3, 27, 43, 55). A su vez, las rutas lipolíticas se incrementan marcadamente durante este periodo, como se hace evidente por las concentraciones elevadas de ácidos grasos libres en la sangre (43,55).

Así, durante esta etapa de transición del estadio fisiológico del animal, el metabolismo del tejido adiposo se modifica de tal forma que reorienta el flujo de nutrientes hacia la glándula mamaria para la síntesis de leche (3).

En apoyo a los datos anteriores, Chilliard y colaboradores (3,16), trabajando con cabras justifican que tanto la lipoproteín lipasa (necesaria para la incorporación de ácidos grasos) como la acetil CoA carboxilasa (enzima reguladora de la síntesis de novo de ácidos grasos) disminuyeron su actividad en el tejido adiposo durante la gestación tardía y todo el periodo lactacional (3).

Datos similares se han obtenido tanto en ganado vacuno (17,57), como en ovejas-(61), y humanos (39).

En un excelente estudio conducido por Mertz y van der Berg (57), se ilustra la relación que puede llegar a existir entre la homeostasis y la homeorresis. La glucosa y la insulina son reguladores homeostáticos del metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo. De manera consistente con la necesidad continua de movilizar las grasas durante la lactación temprana en la vaca lechera, las adaptaciones se dan de tal forma en el tejido adiposo que las rutas lipolíticas no se ven afectadas por la glucosa durante este periodo (57).

La insulina estimula las rutas lipogénicas en el tejido adiposo, pero los recientes avances sobre lactación en ratas han demostrado que durante la preñez tardía el tejido adiposo disminuye su sensibilidad al estímulo de la insulina (42,61,72).

De esta manera la regulación del metabolismo energético, junto con la reorientación del flujo de los nutrientes, establece una importante interacción entre los controles homeorréticos y homeostáticos que posibilita la perpetuación de las especies (3).

La tabla que a continuación se muestra, resume la serie de cambios metabólicos que ocurren en el rumiante cuyo control es de naturaleza homeorrética.

FUNCION FISIOLOGICA	CAMBIO METABOLICO	TEJIDO INVOLUCRADO
Síntesis de leche.	Aumento en el uso de nutrientes	Glándula mamaria.
Metabolismo de lípidos.	Disminución en la lipogénesis.	Tejido adiposo.
	Aumento en la lipólisis.	Tejido adiposo.
Metabolismo de proteínas.	Movilización de proteína de reserva.	Músculo y otros tejidos corporales.
Metabolismo de los minerales.	Aumento en la absorción y movilización del calcio.	Riñones, hígado, intestinos y huesos.

Tabla 2: Principales cambios en el metabolismo al momento de la lactación en los ruminantes debido a los ajustes de naturaleza homeorrética (3).

En el año de 1947, en su ya famosa publicación, F.G. Young sugería que el crecimiento, incluyendo el fetal y la producción de leche, son procesos que requieren un tipo especial de control metabólico... y que no sería sorprendente que en un futuro se descubriera la relación de los mecanismos hormonales concernientes con el control y balance de estos fenómenos (3,79).

Es precisamente dentro de este concepto en donde se ubica el papel fundamental que juega la GH al participar en la orquestación homeorrética favoreciendo la reorientación del flujo de nutrientes hacia tejidos privilegiados por un momento fisiológico dado, en este caso la lactogénesis (2,3,5).

Los estudios realizados a este respecto en ganado lechero han arrojado las primeras señales dentro de los procesos metabólicos afectados por la administración exógena de GH (27).

En estos mismos estudios se mostró que el tratamiento a corto plazo con GH exógena en ganado de alta producción resultó en un 10 a 15% de aumento en el rendimiento de leche, además de un aumento en el contenido energético de la misma de alrededor del 18%, sin presentarse cambios en la cantidad de alimento o energía consumida o en la digestibilidad de la proteína; estos datos nos sugieren que el mecanismo de respuesta al tratamiento ocurre a un nivel de postabsorción de los nutrientes, lo que puede explicarse por dos posibles mecanismos (3,5,27):

Primero, la GH exógena, de forma indirecta, aumenta la habilidad de la glándula mamaria para la síntesis de los componentes de la leche; así los notables incrementos en secreción de lactosa (15-25%), proteína (5-13%) y grasa en la leche (17-23%) no pueden ser sólo el resultado de una mera alteración en el aporte de nutrientes hacia el tejido mamario pues el aporte postruminal de nutrientes limitantes a vacas de alta producción no ha mostrado ser comparable en respuesta al aumento en la producción de leche y de sus componentes, con la aplicación única de bGH (3,5).

Segundo, la GH debe de alterar otros tejidos de tal forma que los nutrientes sean captados de manera preferente por la glándula mamaria (3).

De acuerdo con los mecanismos que preservan el equilibrio energético en el organismo, la movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo debe de estar incrementada bajo la acción de la GH de tal manera que el aumento en contenido energético de la leche podría deberse a los ácidos grasos provenientes de la lipólisis en el tejido adiposo (27).

2) La hormona de crecimiento y su mecanismo de acción.

Las investigaciones realizadas desde la década de 1980, comprenden tanto estudios a largo como a corto plazo con el fin de evaluar el impacto de la GH sobre el incremento en la producción de leche (8).

En los estudios realizados a corto plazo (entre 7 días y 3 meses), el ganado invariablemente ha mostrado respuestas positivas (8).

En ganado Holstein de alta producción, se obtuvieron incrementos de entre los 2 y 5 kg/d de leche durante la lactación temprana, media o tardía (8,12,37,70). Además el patrón de administración de la GH no parece afectar la respuesta en la producción de leche, siempre y cuando se encuentre cerca de las dosis óptimas (30,54).

A pesar de los incrementos de producción, la ingestión de alimento no aumentó en el corto plazo. Por lo tanto el aumento podría explicarse por una mayor eficiencia en la digestión del alimento, en la bioenergética del animal para mantenimiento y en la síntesis de leche y la reorientación de la utilización de los nutrientes por la glándula mamaria (8).

En los estudios a corto plazo se demostró que no ocurrieron cambios en la digestibilidad del alimento por lo cual, el mecanismo más probable fue la redistribución de los nutrientes para la síntesis de la leche (8).

En estudios conducidos a largo plazo, la administración de GH tanto biosintética como la derivada directamente de hipófisis bovinas, se obtuvieron aumentos en producción diaria de leche entre el 16 y 41% sobre la de los testigos: 27.9 kg/d. (4,8,23,24).

Los estudios establecieron que el incremento de la producción de leche se acompañó de un aumento paulatino en la ingestión de alimento, adecuándose a la producción de leche adicional y sin existir diferencias significativas en el peso vivo de los animales (6). Durante los experimentos a largo plazo con la GH, se hizo evidente un ligero cambio en la eficiencia de la digestibilidad del alimento (8,65), sin embargo, se argumenta que la supuesta eficiencia en el uso del alimento durante el tratamiento se encuentra relacionada con la reducción de los costos por alimento con respecto al aumento de la producción de la leche (2,8).

2.1) Efectos en Glándula Mamaria.

Aun cuando la GH tiene un efecto indirecto sobre este órgano y se ha postulado que el efecto es ejercido de manera indirecta por las somatomedinas tipo I y II (1,8,25,38,66), no hay indicios de alteraciones en las tasas de transcripción de DNA o de cambios en la síntesis de grupos enzimáticos. Eppard et al. (22) logró medir un desproporcionado aumento de la alfa-lactoalbúmina en relación con la dosis creciente de GH administrada que a su vez se relaciona con el incremento en la síntesis de lactosa que se observa durante la administración de GH (1,22,23,24).

2.2) Efectos en el metabolismo de los lípidos.

Como ya se revisó, durante la regulación homeorrética de la lactancia, es el tejido adiposo el que más modificaciones suele presentar (3).

Concretamente, aunque la GH no origina un incremento agudo de ácidos grasos, sí altera el metabolismo general de los lípidos y dicha alteración dependerá del balance energético de la vaca tratada. Cuando la respuesta al tratamiento con GH provoca que el animal entre en un balance energético negativo, el aumento de grasa en la leche sobrepasa, en proporción, a la respuesta en producción de leche y bajo estas condiciones, las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados se encuentran también elevadas, (figura 5) (23,54,63).

La composición de la grasa en la leche bajo esta misma situación está en su mayor parte formada por ácidos grasos de cadena larga, que son característicos de los que conforman las reservas grasas corporales (9,22).

Los resultados serán por completo diferentes si el animal a lo largo de todo el tratamiento se mantiene en balance energético positivo (ver fig. 5). En éstas condiciones el contenido de grasa aumenta en proporción al aumento de la producción de leche (6,8,22,30).

De cualquier forma, si los nutrientes no se encuentran en cantidad y calidad suficientes para cubrir las necesidades del animal (balance energético negativo) las reservas lípidas son movilizadas y aumenta la tasa de oxidación de los ácidos grasos movilizadas, protegiendo otras rutas como la gluconeogénesis y nutrientes clave como la misma glucosa y los aminoácidos que provienen de la dieta y de los tejidos del organismo (8,9,16,18).

Además, la GH antagoniza la respuesta del tejido adiposo a los efectos homeostáticos de la insulina y ante un desafío con adrenalina produce un marcado aumento en la concentración de ácidos grasos en el plasma, comparado con animales controles (8,9).

Así, el efecto global de la GH sobre el metabolismo lipídico, consiste en provocar una reducción neta de la síntesis de grasa en el tejido adiposo (3,5,8,59).

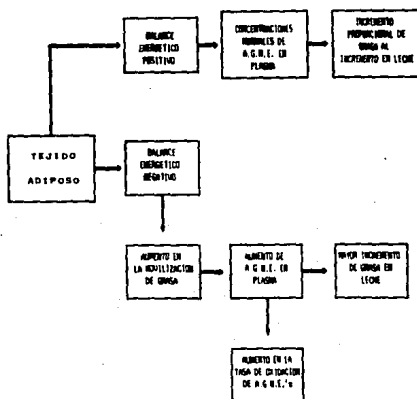


Figura 5. Cambios en el flujo metabólico de los lípidos y ácidos grasos bajo el efecto de la GH (8).

2.3) Efecto en el metabolismo de los glúcidos.

Los requerimientos adicionales de glucosa como precursor único para la síntesis de lactosa representa un gran compromiso metabólico para el animal que recibe el tratamiento con GH, sobre todo durante las primeras semanas del mismo y antes de que la ingestión de alimento se ajuste a las demandas de producción impuestas por el tratamiento (2,34).

La forma de proveer una mayor cantidad del nutriente bajo el efecto de la aplicación de GH se establece a dos niveles:

Primero, las tasas de oxidación de la glucosa se reducen sensiblemente (fig. 6) y se utilizan como combustible alternativo ácidos grasos movilizados desde el tejido adiposo. Esta reducción en su oxidación provee el 30% de la glucosa adicional necesaria para la síntesis de lactosa en el tejido mamario (2,8,34).

Segundo, ocurre una movilización de las reservas glúcidas a partir del glucógeno hepático y aumenta el uso de las rutas gluconeogénicas a partir del propionato (67), los aminoácidos y el glicerol derivado de la lipólisis (8,67). Se calcula que un 27% de la glucosa adicional es proporcionada por la ruta del glicerol (8,67).

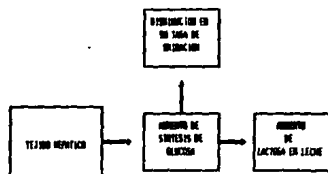


Figura 6. Cambio en el flujo metabólico de los azúcares hepáticos bajo el efecto de la GH (8).

2.4) Efecto en el metabolismo de las proteínas.

De la misma manera que en los casos anteriores, durante el período de tratamiento con GH, la producción de proteínas de la leche invariablemente aumenta (6,63); sin embargo, el contenido de proteína de la leche es muy sensible a los cambios de consumo de la dieta y del contenido proteico de la misma, de tal manera que cuando el ganado se encuentra en balance de nitrógeno positivo no existen cambios en el porcentaje de proteínas de la leche, de modo que la producción de proteína, se incrementa en proporción al aumento del volumen de leche (6,64).

En contraste, cuando el animal se halla en balance de nitrógeno negativo (fig. 7) y bajo el tratamiento con GH exógena el porcentaje de proteína en la leche tiende a declinar, sin embargo la cantidad absoluta de proteína producida aumenta (63), lo que nos indica que las vacas en balance de nitrógeno negativo son en apariencia incapaces de proveer un adecuado suministro de aminoácidos hacia la glándula mamaria para mantener la producción de proteína de la leche en relación con el aumento en el volumen de la misma (2,8).

Tampoco se ha observado ningún cambio en la pérdida irreversible de los aminoácidos durante el tratamiento con GH, sin embargo, se reduce sensiblemente la tasa de oxidación de la leucina. En este sentido, este desvío de aminoácidos de las rutas de oxidación, provee una fuente adicional para la síntesis de proteínas de la leche; no obstante, la fuente primaria de aminoácidos adicionales, antes del ajuste en el consumo del alimento, proviene de la movilización de las reservas de proteína del cuerpo (2,8).

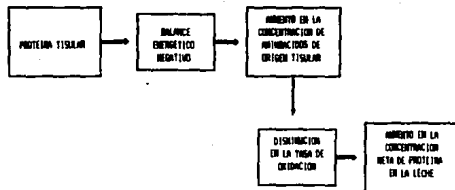


Figura 7. Cambios en el flujo metabólico de las proteínas y aminoácidos tisulares bajo el efecto de la GH (8).

2.5) Efecto sobre el metabolismo mineral.

La redistribución de los minerales hacia la glándula mamaria también se debe de alterar ante el tratamiento con GH.

El calcio y el fósforo no se incrementan en la leche en los tratamientos a corto plazo (10 días) como tampoco en los de largo plazo (188 días); sin embargo, al verse aumentada la producción de leche, la economía del animal debe de ajustar de alguna manera el flujo de la materia mineral desde el intestino y reservas óseas para así mantener constante la proporción entre el volumen de leche y el contenido mineral (22). Ver figura 8.

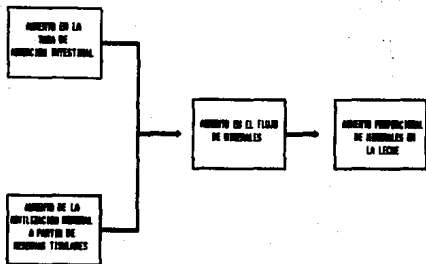


Figura 8. Cambios en el flujo metabólico de los minerales bajo el efecto de la GH (8).

2.6) Consideraciones finales.

Es de esta manera como finalmente la economía orgánica del animal responde ante la administración de la GH sin comprometer su balance bioenergético y por consiguiente su salud (2); no obstante, se ha comunicado que los tratamientos a largo y mediano plazos con GH purificada o recombinante inducen un estado crónico de cetosis metabólica en el animal (45,46) lo que pondría en peligro la salud del hato lechero.

Por otra parte, la composición de la leche producida por animales bajo efecto de la GH no se ve alterada ya que los cambios antes mencionados ocurren sólo mientras el animal adecúa su ingestión a la demanda de producción de leche impuesta bajo el mismo tratamiento (2,3,8).

Es muy importante destacar el fuerte impacto que la GH podría generar sobre la eficiencia en la producción de leche. La ganancia en eficiencia productiva por medio de la suplementación con la GH ocurre gracias a que la proporción de nutrientes utilizados para el mantenimiento del animal se reduce. (2,11).

Respecto de la regulación energética previamente discutida, se ha establecido que los requerimientos para el mantenimiento por unidad de leche no se alteran bajo la administración de GH; de tal modo que el animal que recibe el tratamiento tendrá un requerimiento nutricional mayor, pues se encuentra produciendo una mayor cantidad de leche; sin embargo, aumentará también su eficiencia productiva, ya que la energía requerida para el mantenimiento del animal representa ahora una proporción más pequeña del total de energía necesaria (2,11).

El aumento en eficiencia productiva mediante la reducción en la proporción de nutrientes necesarios para el mantenimiento del animal es la base de las ganancias esperadas de otras biotecnologías anteriores como lo son la selección genética, la inseminación artificial, la transferencia de embriones, la reformulación de dietas, el manejo nutricional y los programas reproductivos. La magnitud del incremento en la producción de leche producida por la administración de GH es mayor que la obtenida con los otros procedimientos. Una sola tecnología podría rivalizar con el incremento productivo generado por la GH y se trata de la referente al control de la mastitis, ya que si ésta pudiera de alguna manera ser erradicada, la producción de leche por animal y su eficiencia productiva sería mayor que la alcanzada con el puro uso de la GH (2).

De cualquier forma, la respuesta en cantidad de leche ante la GH en una granja o industria particular estará directamente comprometida con la calidad del manejo que ahí se practique, de

manera que una expectativa razonable ante un manejo zootécnico y sanitario promedio sería la de un incremento de alrededor del 12% en ganancias totales (2).

Asumiendo la adopción de la GH en un 100% por parte de los productores y tomando en cuenta la cantidad de leche producida en los Estados Unidos de América en el año de 1988, el ahorro en energía por alimento, bajo suplementación con GH, sería equivalente a 2.5×10^9 kilos de maíz en grano y el ahorro en proteína sería del orden de 5.6×10^7 kilogramos de soya (2).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha no se han publicado resultados consistentes y homogéneos con relación a un aumento en la producción de leche en cabras tratadas con GH purificada a partir de hipófisis caprinas, pues la concepción biotecnológica sobre el uso de la GH en la producción de leche no ha permeado otras áreas de la producción animal, como la referente al aumento en la eficiencia productiva de la especie caprina, considerando el impacto que sus productos procesados generan en el mercado de los alimentos.

A este respecto, se han llevado a cabo diversos ensayos experimentales en cabras haciendo uso de GH bovina (bGH) (19,40,41,68,69,) y ovina (oGH), (56) y con frecuencia se reportan resultados muy heterogéneos e inconsistentes ante desafíos con bGH referentes a un aumento sostenido de leche (19,56,60). Distintos grupos han intentado develar el papel que juegan las somatomedinas en aquellas cabras que han respondido de manera más consistente ante la aplicación exógena con bGH (19,68,69), en tanto que otros investigadores han publicado informes aún poco concluyentes de posibles efectos aditivos y sinérgicos entre el aumento en la frecuencia de ordeño y la administración de bGH con el incremento en la síntesis de leche (40,41).

Por lo tanto, este trabajo es un primer intento en obtener y caracterizar la hormona de crecimiento caprina (gGH) de su fuente original y evaluar su efecto durante el periodo lactacional temprano de la cabra productora de leche en el altiplano de la ciudad de México, con la finalidad, además, de sembrar la inquietud para el desarrollo de una nueva infraestructura biotecnológica que busque el progreso en el mejoramiento de la producción de leche del ganado caprino.

De esta forma, la hipótesis del trabajo está basada en la suposición de que la hormona del crecimiento caprina aplicada en un ensayo homólogo generará resultados mas específicos y consistentes en comparación a los reportados con hormona de crecimiento bovina aplicada en cabras y similares a los reportados en gnado bovino. Por lo tanto, la administración exógena de gGH favorecerá la producción de leche en cabras mestizas modificando el contenido de grasa.

Para lograr tales metas, se propusieron los siguientes objetivos:

- 1.- Obtener la gGH de su fuente natural.
- 2.- Caracterizar la proteína desde su punto de vista fisicoquímico, inmunológico y biológico.
- 3.- Aplicarla en cabras mestizas durante la lactancia y evaluar su posible efecto tanto en la producción diaria de leche y en el contenido de grasa butírica de la misma.

4. MATERIAL Y METODOS

A) EXTRACCIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH):

La obtención de la proteína se inició a partir de 530 hipófisis caprinas, colectadas en la Isla de Guadalupe, México, las que se conservaron en acetona durante un periodo de 3 años a 4°C hasta su procesamiento. El trabajo se inició con la separación de las glicoproteínas (TSH, LH, FSH) (58) a partir de las hipófisis caprinas, como se ejemplifica en la figura 9.

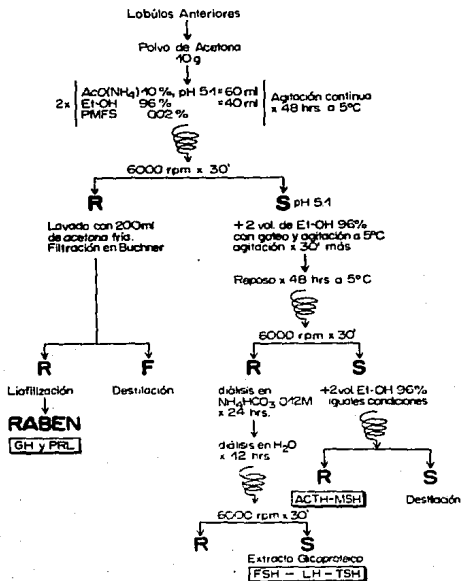


Figura 9.- Esquema de extracción de glicoproteínas.

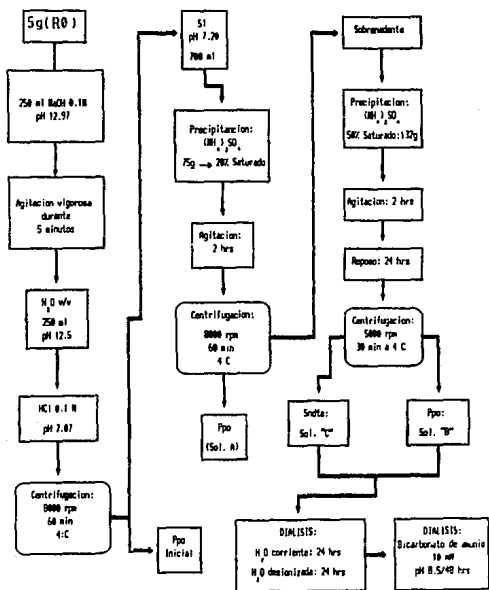


Figura 10.- Esquema de extracción de la gGH.

Con el propósito de facilitar el proceso de extracción con base en precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio, se procedió a dividir el producto inicial (RO) en 3 lotes, dos de 5g y uno más de 3.5 g. En el caso concreto del primer lote (5g) se omitió la precipitación al 20 % por lo cual no se obtuvo la solución A (Sol. A).

B) CARACTERIZACION FISICOQUIMICA:

Con el propósito de conocer las características fisicoquímicas de la proteína se procedió con la siguiente metodología:

1) Electroforesis en TRIS-PAGE pH 8.3 al 7%.

Todos los reactivos de la electroforesis son de grado analítico, y el agua grado millipore.

SOLUCIONES:

Solución A1 pH 9.4

- TEMED-----	0.23 ml
- HCl 1N.-----	48.00 ml
- TRIS -----	36.30 g
- c.b.p. -----	100.00 ml

Solución A2:

- Acrilamida---	28.00 g
- Bisacrilamida	0.74 g
- c.b.p. -----	100.00 ml

Solución B pH 7.4

- HCl 1N-----	48.00 ml
- TEMED -----	0.46 ml
- TRIS -----	5.99 g
- c.b.p.-----	100.00 ml

Solución C:

- Persulfato de Amonio.-----	140.00 g
- c.b.p. -----	100.00 ml

Solución D:

- Acrilamida -	10.00 g
- Bisacrilamida	2.50 g
- c.b.p. -----	100.00 ml

Solución E:

- Riboflavina-	0.004 g (Filtrar)
- c.b.p.-----	100.000 ml

Amortiguador de Corrida (10x) pH 8.3:

- TRIS. -----	6.000 g/l
- Glycina. ---	28.800 g/l

Solución para destefir:

- Acido Acético al 5%	
- 2-Propanol al 10%	

Amortiguador de Muestra:

- Solución C: ---	0.63 ml.
- S.D.S 10% -----	0.05 ml.
- Glicerol -----	0.50 ml.
- Azul de bromofenol	
al 0.5% -----	0.20 ml.
- c.b.p. -----	5.00 ml.

METODO:

Gel Resolvedor.-

Solución A1:	Tomar 1 parte:	9.00 ml
Solución A2:	Tomar 1 parte:	9.00 ml
Solución C:	Tomar 2 partes:	18.00 ml

Gel Concentrador.-

Solución B:	Tomar 1 parte:	1.50 ml
Solución D:	Tomar 2 partes:	3.00 ml
Solución E:	Tomar 1 parte:	1.50 ml

- Antes de preparar el gel concentrador y el gel resolvedor:

- 1.- Siliconizar los tubos con solución de silicón 1:200.
- 2.- Dejar secar. Sellar el fondo del tubo en su parte inferior con papel "parafilm".
- 3.- Se marcan a 6.5 cm a partir de su parte inferior para limitar el gel resolvedor y luego a 7.5 cm para el gel concentrador.
- 4.- Servir el gel resolvedor inmediatamente con ayuda de una pipeta Pasteur e inmediatamente agregar 100 ml de agua para evitar la deformación de las orillas del gel. Dejar polimerizar.
- 5.- Extraer el agua, secar y preparar la Solución E (Rivoflavina).
- 6.- Preparar el gel concentrador y servir inmediatamente con ayuda de una pipeta Pasteur.
- 7.- Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder a 1.5 miliamperios por cada tubo para el gel concentrador y el doble para cuando la muestra alcance el gel resolvedor.
- 8.- Una vez finalizada la corrida, apagar la fuente. Medir el tamaño del gel y el tamaño del frente de cada tubo conforme van saliendo, para la determinación del "Rf".

2) Electroforesis en SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras.

SOLUCIONES:

Solución A:

- Acrilamida al 30.0% --- 30.00 g
- Bisacrilamida al 0.8% --- 0.80 g
- c.b.p.----- 100.00 ml
- Nota: Filtrar la solución y protegerla de la luz directa.

Solución B (amortiguador del gel resolventor) pH 8.8:

- TRIS 1.5 M ----- 18.20 g
- SDS 0.4 % ----- 0.40 g
- c.b.p. ----- 100.00 ml.

Solución C (amortiguador del gel concentrador) pH 6.8.

- TRIS 0.5 M ----- 6.10 g
- SDS 0.4 % ----- 0.40 g

Solución D (amortiguador de corrida) pH 8.3:

- TRIS a 0.025 M ----- 3.03 g
- Glicina a 0.19 M ----- 14.26 g
- SDS a 0.1 % ----- 1.00 g
- c.b.p. ----- 1 litro.

Nota: Se recomienda prepararlo 5x concentrado.

Solución E (amortiguador de muestra en condiciones no reductoras):

- 0.650 ml de Solución C.
- 0.050 ml de SDS 10 %
- 0.500 ml de Glicerol
- 0.200 ml de Azul de Bromofenol 0.05%
- Aforar a 5 ml
- Nota: Para transformarlo a condiciones REDUCTORAS se adicionan 0.010 ml de Beta-Mercaptoetanol por cada mililitro de solución E.

Solución F:

- Persulfato de Amonio al 10% ---- 10.0 g
- c.b.p.----- 100.0 ml

- Nota: Esta solución se debe preparar el mismo día de la corrida de las muestras en la cámara electroforética.

Solución para Teñir:

- Azul brillante de Coomassie al 0.1%
- Alcohol Metílico al 40%
- Acido Acético al 10%

Solución para destefir:

- Alcohol Metílico al 40%
- Acido Acético al 10%

Marcadores de peso molecular (condiciones no reductoras):

- 0.005 ml del reactivo comercial (marcadores).
- Aforar a 0.100 ml con Solución E
- Nota: Para transformarlo a condiciones REDUCTORAS se afora a 0.100 ml con solución E REDUCTORA.

METODO:

Gel Resolvedor:

- Solución B: 1.50 ml
- Solución A: 2.50 ml
- Agua: 2.00 ml
- TEMED: 0.005 ml
- Solución F: 0.020 ml

Gel Concentrador:

- Solución C: 0.63 ml
- Solución A: 0.33 ml
- Agua: 3.08 ml
- TEMED: 0.0025 ml
- Solución F: 0.0125 ml

- 1.- Realizar el montaje de la cámara con el material limpio previo a la preparación del gel resolvedor.
- 2.- Preparar el gel resolvedor y vertirlo a la cámara inmediatamente.
- 3.- Agregar agua para evitar deformidades en el gel y dejar polimerizar.
- 4.- Una vez polimerizado, preparar el gel concentrador.
- 5.- Secar completamente la cámara y llenar con el gel concentrador y dejar polimerizar.
- 6.- Depositar las muestras en cada carril con el amortiguador servido y conectar a la fuente a 70 voltios durante la corrida en el gel concentrador y a 140 voltios durante la corrida en el gel resolvedor.
- 7.- Una vez terminada la electroforesis, sacar las placas y medir el frente y el tamaño del gel para la determinación de pesos moleculares.

C1 IDENTIFICACION INMUNOLOGICA:

Con el propósito de conocer la inmunorreactividad de la proteína, se procedió al montaje de la técnica de inmunotransferencia (Westernblot) con anticuerpos específicos para GH, así como contra prolactina (PRL). La técnica se describe a continuación:

1) Inmunotransferencia: electroforesis SDS-PAGE, transferencia, tinción y revelado con fosfatasa alcalina.

APARATOS:

- Sistema "Electroblotting". (Bio-Rad)
- Fuente de poder mayor a 200 voltios
- Papel filtro Wathmann de 3 mm
- Papel de nitrocelulosa de 0.2 ó 0.4 μ m de diámetro
- NOTA: DEBE DE ALMACENARSE EN FRIO PROTEGIDO DE LA LUZ.
DEBE DE MANIPULARSE CON GUANTES O PINZAS.
- Agitador magnético
- Cámara Fría
- Recipientes de contención

SOLUCIONES:

Amortiguador de Transferencia.

- TRIS 25 mM ----- 3.03 g
- Glicina 192 mM ----- 14.40 g
- Metanol. 20 % ----- 200.00 ml
- Agua ----- c.b.p. 1 litro
- NOTA: NO SE AJUSTA EL pH. El amortiguador variará el pH entre 8.1 y 8.4 dependiendo de la calidad de los reactivos

Solución de PBS:

- NaCl ----- 2.000 g
- KCl ----- 0.045 g
- MgCl ----- 0.090 g
- Na₂HPO₄ ----- 0.280 g

Solución amortiguadora de TRIS:

- TRIS-HCl 2M ----- 5.00 ml
- NaCl 4M ----- 37.50 ml
- Agua ----- c.b.p. 1 litro

2) Transferencia:

- 1.- Realizar la electroforesis SDS-PAGE para separar la gGH.
Se recomienda hacer dos geles, uno para el Immunobloting y otro para ser teñido.
- 2.- Preparar entre tanto el amortiguador de transferencia.
- 3.- Preparar la matriz de transferencia.
- 4.- Empapar la hoja de nitrocelulosa en el amortiguador de transferencia de 15 a 20 minutos.
- 5.- Enjuagar la cámara con agua destilada.
- 6.- Colocar los electrodos y el agitador magnético agregando amortiguador de transferencia, a la mitad del volumen (400 ml).
- 7.- Colocar la unidad de enfriamiento.
- 8.- Armar el "sandwich" de transferencia:
 - a) En un recipiente limpio, abrir el cassette para transferencia y colocar una hoja de papel filtro sobre el cojín de fibra del cassette.
 - b) Con cuidado se coloca el gel SDS-PAGE sobre el papel filtro sin dejar burbujas.
NOTA: USAR GUANTES Y AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA.
 - c) Colocar la hoja de nitrocelulosa.
NOTA: USAR GUANTES.
 - d) Colocar otra hoja de papel filtro y pasar a manera de rodillo sobre el "sandwich" un tubo de ensayo para eliminar las burbujas.
 - e) Colocar el siguiente cojín de fibra y cerrar el cassette y colocarlo en el tanque con amortiguador montado en sus electrodos.
- 9.- Colocar la cámara armada en el agitador magnético.
- 10.- Colocar los electrodos.
- 11.- Conectar la fuente de poder a 100 voltios para transferir en una hora. Para transferir a partir de 12 horas correr 30 voltios.

3) Revelado con fosfatasa alcalina.

1.- Después de la transferencia se secan los papeles de nitrocelulosa durante 30 minutos en el horno a 40 °C.

NOTA: USAR GUANTES.

2.- Ya secos los papeles, colocarlos en la solución bloqueadora durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, en la solución de PBS-BSA 2%. Para cada hoja de papel de nitrocelulosa, se usan 20 ml de PBS + 0.5 g de BSA.

3.- Decantar la solución de bloqueo y agregar el primer anticuerpo disuelto en PBS-BSA 2% (25 ml de PBS + 0.25 g de BSA). Se deja a temperatura ambiente durante 2 horas.

4.- Lavar los papeles de nitrocelulosa (dos o tres veces rápido con solución de NaCl 0.9% ó 0.15M) y agregar el segundo anticuerpo: 10ul del 2o. anticuerpo llevados a 25 ml de PBS-BSA 2%.

Dejar reposar durante 2 horas, incubando a temperatura ambiente.

5.- Lavar con NaCl 0.15 M 3 ó 4 veces rápidamente.

6.- El proceso de revelado se realizó con el Kit-BioRad con el siguiente procedimiento: La solución de fosfatasa alcalina se preparó con: 15 ml de solución TRIS para el desarrollo del color mas 150 ul de NBT (p-nitroazul clorato de tetrazolio) más 150 ul de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato).

NOTA: LAS SOLUCIONES NBT Y BCIP SE PREPARAN EL MISMO DIA DEL REVELADO.

7.- Decantar la solución reveladora y lavar con agua desionizada.

4) Tinción de Plata para los geles SDS-PAGE (Bio-Rad):

Con el objeto de evaluar la eficiencia de transferencia de la proteína del gel al papel de nitrocelulosa se recomienda teñir con plata, como sigue:

- 1.- Preparar el Oxidante: Diluir fresco 5 ml + 45 ml de agua destilada.
- 2.- Reactivo de Plata: Disolver el Reactivo 5 ml fresco + 45 ml de agua destilada.
- 3.- Revelador: Disolver 3.2 g en 100 ml de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- 4.- Fijador 1: 40% metanol + 10% de ácido acético.
- 5.- Fijador 2: 10% etanol + 5% de ácido acético.

a) Método:

Solución	Volumen	Tiempo
1) Fijador 1 -----	100 ml	30'
2) Fijador 2 -----	100 "	15'
3) Fijador 2 -----	100 "	15'
4) Oxidante -----	50 "	05'
5) H ₂ O desionizada -----	100 "	05'
6) H ₂ O desionizada -----	100 "	05'
7) Reactivo de plata -----	50 "	20'
8) H ₂ O desionizada -----	100 "	20'
9) Revelador -----	50 "	15'

Nota: NO AGITAR EL GEL DURANTE EL REVELADO.

D) CARACTERIZACION BIOLOGICA.

La actividad biológica del extracto hipofisiario obtenido se valoró por medio de la prueba biológica de la tibia de la rata hipofisectomizada. En esta prueba se mide el aumento de grosor de la línea epifisiaria del cartilago tibial en respuesta a la aplicación de GH (32).

La valoración del producto final se desarrolló en un bioensayo 3+3 balanceado (esto es: tres dosis del estándar v.s. tres dosis del problema), utilizando para ello 4 animales por punto, los cuales fueron previamente hipofisectomizados. Los animales se inyectaron durante 4 días con dos inyecciones diarias (07.00 h y 17.00 h); al quinto día de iniciado el bioensayo, se sacrificaron para la obtención de las tibias, las cuales se disecaron y posteriormente se tificaron con nitrato de plata al 2%. La medición del cartilago epifisiario se realizó bajo microscopio previamente calibrado con una rejilla micrométrica.

Los resultados se analizaron con un análisis estadístico de varianza 3+3 balanceado, obteniéndose los parámetros de cuantificación del bioensayo como son la l y la g, así como sus límites de confianza al 95%.

A continuación se presenta el protocolo de trabajo utilizado:

BIOENSAYO DE GH

(Greenspan 1949)

Aumento de la altura del cartilago de la epifisis de la tibia en ratas hipofisectomizadas bajo acción de la GH.

Rata: Wistar macho hipofisectomizado.

Edad: 120 a 130 días.

4 animales por punto.

Observación: 4 días de inyección, al quinto sacrificio.

Blanco: Albúmina 0.1% en solución salina

Estándar: 30 ug/animal

60 ug/animal

120 ug/animal

Problema: 60 ug/animal

120 ug/animal

240 ug/animal

Vía de administración: Subcutánea.

Horario Lunes Martes Miercoles Jueves

11:00

0.5ml

0.5ml

0.5ml

0.5ml

Viernes
Peso Corporal.
Sacrificio.
Obtención hígado.
Corte de tibia.
Medir la altura
del cartilago.
Cálculos.

A continuación se presenta el formato para la elaboración de los cálculos estadísticos de un bioensayo del tipo 2+2 balanceado, de donde se evalúan los intervalos de confianza λ y "g" para la obtención final de la potencia biológica del producto ensayado.

CONTROL		ESTÁNDAR PROBLEMA			
		S ₁	S ₂	U ₁	U ₂
	Dosis				
	TOTAL				
C	F	W	X	Y	Z
Efecto en % $\frac{W-F}{C}$					

BIOENSAYO 2+2 BALANCEADO		
tipo: <input type="text"/>	fecha: <input type="text"/>	n° sec: <input type="text"/>
n° de animales/grupo n = <input type="text"/>	I = $\log (s_1/s_2)$ = <input type="text"/>	
actividad del estándar A = $\frac{m_1}{g}$	B = $\sqrt{s_1 s_2} / (u_1 u_2)$ = <input type="text"/>	
D = $W+X-Y-Z$ = <input type="text"/>	O = $(\sum T)^2 / 4n$ = <input type="text"/>	
E = $W+Y-X-Z$ = <input type="text"/>	H = $\sum T^2 / n$ = <input type="text"/>	
F = $W+Z-X-Y$ = <input type="text"/>	K = $\sum X^2$ = <input type="text"/>	

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Fuente de Variedad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P
Tratamiento	3	N = H - O = <input type="text"/>	N/3 = <input type="text"/>		
Preparaciones	1	D ² = D ² /4n = <input type="text"/>	D ² = <input type="text"/>		
Regresión	1	E ² = E ² /4n = <input type="text"/>	E ² = <input type="text"/>		
Paralelismo	1	F ² = F ² /4n = <input type="text"/>	F ² = <input type="text"/>		
Error	4(n-1) = 16	R = Q - N = <input type="text"/>	R/4 = <input type="text"/>		
Total	4n-1 = 19	Q = K - G = <input type="text"/>		F(3, 16) = 3.24	

$t = (0.05, 4(n-1)) =$ <input type="text"/>	Pendiente combinada, $(-E)/2nI =$ <input type="text"/>	b = <input type="text"/>
$L = \left(\frac{1}{b} (1-t) \right) \sqrt{\frac{S^2}{n} \left[\left(\frac{D}{E} \right)^2 + (1-B) \right]}$	Varianza de la pendiente: $S^2/nI^2 = v(b)_x$	<input type="text"/>
M = D/E = <input type="text"/>	Criterios de validez: $S/b =$ <input type="text"/>	$\lambda =$ <input type="text"/>
M ₁ = M - L = <input type="text"/>	Potencia relativa del problema: $AB \times 10^M =$ <input type="text"/>	$g =$ <input type="text"/>
M ₂ = M + L = <input type="text"/>	Intervalo de confianza: $AB \times 10^M =$ <input type="text"/>	$F_1 =$ <input type="text"/>
		$F_2 =$ <input type="text"/>

Figura 11. Esquema que muestra el arreglo para el cálculo del análisis de varianza de un bioensayo 3+3 balanceado.

El ENSAYO EN CABRAS.

Con la finalidad de conocer la respuesta lactacional de la cabra frente a la administración exógena de la gGH se diseñó el siguiente protocolo experimental:

1.- La investigación se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Ruminantes (C.E.P.I.E.R.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Este se ubica en el Km 29 de la carretera federal México-Cuernavaca en la delegación Tlalpan, D.F., a 2760 m sobre el nivel del mar, con una latitud de 19°13' y una longitud oeste de 99°1'. Su precipitación pluvial es de 800 a 1200 mm en promedio al año y una temperatura anual de 13.7 C con un clima CW (semifrío subhúmedo con lluvias en verano), el experimento se realizó durante el mes de febrero.

2.- Se trabajaron un total de 12 cabras mestizas que promediaron 3 meses posparto de lactación, las cuales se dividieron al azar en dos lotes experimentales (6 cabras cada uno) bajo las condiciones controladas de alimento, estabulación y manejo establecidas en el C.E.P.I.E.R. Al grupo control se le administró únicamente solución salina fisiológica (NaCl 0.14 M) a razón de 1 ml/día por vía intramuscular; en tanto que al grupo experimental se le aplicó el producto final de purificación (gGH) a dosis de 9 mg de proteína diariamente (actividad biológica de 0.5 UI/mg) durante un periodo de 15 días. La proteína se reconstituyó en 1 ml de NaCl 0.14 M la que se aplicó por vía intramuscular diariamente, durante 15 días posterior al ordeño a las 10:00 h en todos los casos.

3.- Se midió el volumen de leche de ambos grupos dos días antes de la primera aplicación del producto, 15 días durante el periodo experimental y dos días después de la última aplicación de hormona y al 6o. y 7o. día posteriores al tratamiento.

4.- Simultáneamente se tomaron muestras representativas de 25 ml de leche por cada cabra, tanto del grupo tratado como del control a las cuales se les determinó el porcentaje de grasa butírica por el método de Gerber.

E) DETERMINACION DE GRASA BUTIRICA.

Método de Gerber. Indirecto - Cuantitativo.

Este método se basa en la disolución de todos los componentes de la leche, excepto la grasa, en ácido sulfúrico. Emplea alcohol isoamílico para ayudar a romper la emulsión de la leche y evitar que se quemé la capa de grasa. El alcohol isoamílico reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en dicho ácido.

Material:

- Butirómetro de Gerber, con una sola abertura, graduado de modo que cada marca corresponda al 1% de grasa en la leche
- Centrífuga para Butirómetro de Gerber
- Tapones para Butirómetro
- Pipeta volumétrica de 11 ml
- Pipeta volumétrica de 10 ml
- Pipeta volumétrica de 01 ml

Reactivos:

- Acido Sulfúrico concentrado, de densidad 1.820 a 20 C (aproximadamente al 90%).
- Alcohol Isoamílico libre de grasa y densidad 0.812 a 20 C.

Método:

- 1.- Medir 10 ml de ácido sulfúrico en el butirómetro evitando bañar las paredes internas del cuello.
- 2.- Añadir lentamente resbalando por las paredes y sin mezclar. 11 ml de leche de modo que se forme un estrato de leche sobre el ácido.
- 3.- Inmediatamente agregar 1 ml de alcohol isoamílico.
- 4.- Cerrar con el tapón y agitar enérgicamente con lo que se produce un fuerte calentamiento y la disolución, en el ácido, de los albuminoides de la leche.
- 5.- Centrifugar 2 minutos a 1100 rpm.
- 6.- Leer el espesor de la capa de grasa acumulada en la parte superior; como el tapón queda hacia abajo, éste debe moverse cuidadosamente hasta colocar los límites de la capa de grasa dentro de la escala, la cual expresa directamente la cantidad porcentual de la grasa contenida en la leche.

5. RESULTADOS

A) PROCESO DE PURIFICACION:

La tabla 3 muestra el rendimiento en mg del proceso de extracción y purificación ejemplificado en la sección de Material y Métodos.

Producto	Tabla de rendimiento			Recuperación (%)
	Poivo (mg)	Proteina (ug/mg)	Prot.totol (mg)	
----- LOTE 1 -----				
Ro	5000	10	50	100
PPol	3390	63	214	68
A	---	---	---	---
B	483	375	181	10
C	287	65	19	6
----- LOTE 2 -----				
Ro	5000	10	50	100
PPol	3620	63	228	72
A	94	54	5	2
B	285	305	87	6
C	449	69	31	9
----- LOTE 3 -----				
Ro	3500	10	35	100
PPol	3360	63	212	98
A	108	212	23	3
B	184	424	78	5
C	153	200	31	4
----- LOTE-Reextraccion -----				
PPol	10000	63	630	100
PPol?	8404	118	991	84
A	185	58	13	2
B	266	278	74	3
C	608	75	46	6

Tabla 3.- Presenta el rendimiento estimado de los diferentes lotes, en términos de ug de proteina/mg de poivo, así como el porcentaje de recuperación final de cada lote.

B) CARACTERIZACION FISICOQUIMICA.

La figura 12 presenta el patrón electroforético en SDS-PAGE en condiciones no reductoras de las diferentes etapas de purificación de los lotes 1, 2 y 3. El peso molecular relativo se determinó con base en el corrimiento de los siguientes marcadores de peso molecular: fosforilasa b 97,400 D, albúmina bovina 66,200 D, Ovoalbúmina 45,000 D, anhidrasa carbónica 31,000 D, inhibidor de tripsina 21.500 D y lisosima 14,400 daltones (Bio-rad). Los resultados muestran que la banda de mayor intensidad presenta un peso molecular de 18,430 daltones, haciéndose más presente en las fracciones a+b del lote 1 y en la fracción b de los lotes 2 y 3. Sin embargo, las bandas presentan poca intensidad en las fracciones C de los lotes 1,2 y 3, destacando además el caso particular de la fracción A del tercer lote por su intensidad.

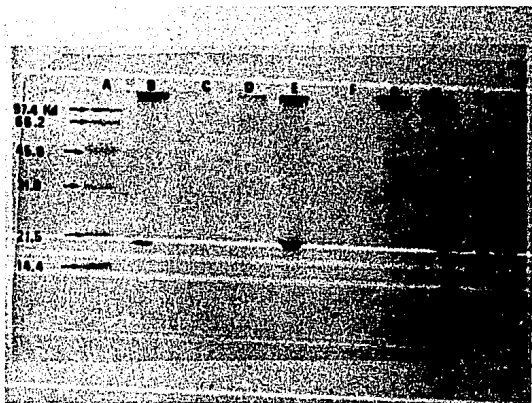


Figura 12.- Electroforesis en SDS-PAGE (12.5%), en condiciones no reductoras. A) Presenta los marcadores de peso molecular (PM). B) lote 1 (A+B); C) Solución C1. D) Solución A2. E) Solución B2. F) Solución C2. G) Solución A3. H) Solución B3. I) Solución C3.

La figura 13 presenta las condiciones reductoras de los productos antes señalados, observándose tres bandas mayoritarias con pesos de alrededor de 26,000, 21,000, y 16,000 daltones siendo la más intensa la de 26,000 sugiriendo que la molécula de 18,340 daltones obtenida en condiciones no reductoras incrementa su "radio stock" (diámetro molecular) con las condiciones de reducción. Es interesante señalar que con estas condiciones los agregados moleculares se separan dando origen a un patrón de bandas múltiples. Se aprecia también que este patrón se reproduce en todos los lotes trabajados.

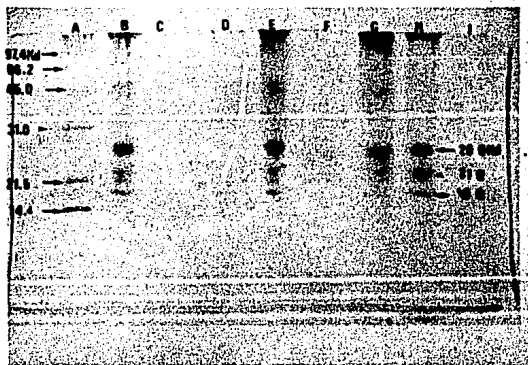


Figura 13.- Electroforesis en SDS-PAGE (12.5%) en condiciones reductoras. A) PM. B) Lote 1 (A+B). C) Solución C1. D) Solución A2. E) Solución B2. F) Solución C2) G) Solución A3. H) Solución B3. I) Solución C3.

La figura 14 representa el corrimiento electroforético en condiciones no reductoras del producto final obtenido y ensayado en las cabras, que comprende la mezcla de los lotes 1, 2 y 3 con excepción de la fracción C de cada uno de estos.

Esta figura muestra los marcadores de peso molecular, el estándar de referencia de GH (NIH-GH-B18) con una primera banda de 18,470 daltones (18.5 Kd) y una segunda de 35.14 Kd que corresponde a la forma dimérica de la proteína; el carril siguiente presenta la prolactina ovina (NIH-PRL-S8), cuya banda mayoritaria correspondió a 23.30 Kd, una siguiente de 26.00 Kd y una más de 50.65 Kd. Los siguientes carriles corresponden al producto final en concentraciones crecientes de proteína. Nótese que la banda mayoritaria en cualquiera de las concentraciones presenta un peso molecular relativo de 18.00 Kd sugiriendo que corresponde en peso molecular a la GH. Es importante señalar que conforme se incrementa la concentración de proteína se revela una segunda banda de 16.00 Kd, con una mancha difusa en los carriles correspondientes.

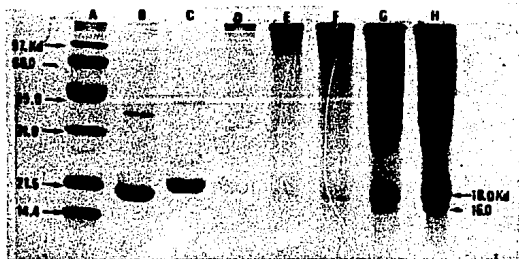


Figura 14.- Electroforesis en SDS-PAGE (12.5%) en condiciones no reductoras. A) PM. B) Estándar de hormona de crecimiento bovina (NIH-GH-B18). C) Estándar de prolactina ovina (NIH-PRL-S12). D-H) corresponden a diferentes concentraciones del lote final ensayado en las cabras: 5.5, 13.7, 27.5, 55 y 82.5 ug de proteína respectivamente.

La figura 15 nos muestra las condiciones reductoras del producto final. En el carril A, se presentan los marcadores de peso molecular, el siguiente carril muestra la concentración de 5 ug del producto ensayado en cabras, el carril C muestra el estándar de GH bovina, con una banda de 20.0 Kd y una de 18.0 Kd, nótese que la banda de agregado de peso molecular disminuye en intensidad mostrando así que la reducción intensifica la forma monomérica de la proteína, desagregando las formas agrupadas. El carril D presenta el estándar de prolactina ovina, cuya banda mayoritaria es de 24.0 Kd con una segunda banda de 21.5 Kd que corresponde a GH por peso molecular. Finalmente, los carriles siguientes presentan el producto ensayado en las cabras, en donde la banda de mayor intensidad es semejante al estándar de GH, sin embargo se observa que el producto tiene una importante cantidad de contaminación por prolactina.

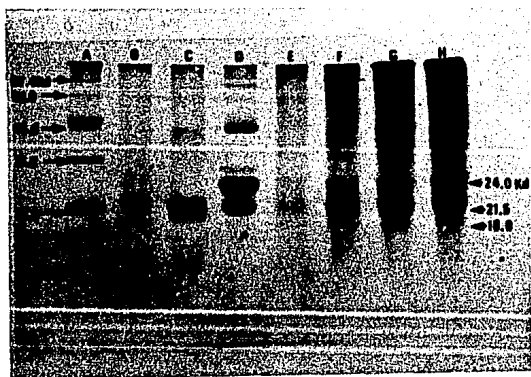


Figura 15.- Electroforesis en SDS-PAGE (12.5%) en condiciones reductoras. A) PM; B) Estándar de hormona de crecimiento bovina (NIH-GH-B18). C) Estándar de prolactina ovina (NIH-PRL-S12). D-H) corresponden a diferentes concentraciones del lote final ensayado en las cabras: 5.5, 13.7, 27.5, 55 y 82.5 ug de proteína respectivamente.

C) CARACTERIZACION INMUNOLOGICA.

Con la finalidad de identificar inmunológicamente el producto y constatar su inmunorreactividad, se procedió al ensayo de la técnica de inmunotransferencia con anticuerpos antiprolactina y antiGH.

La técnica se ensayó en los lotes 1,2 y 3 (Figura 16) obteniéndose bandas inmunorreactivas a prolactina en donde el estándar de GH no aparece, indicando la contaminación por prolactina del preparado final. De derecha a izquierda encontramos el carril de los pesos moleculares, el estándar de prolactina ovina, el estándar de hormona de crecimiento bovina, el lote 1 (A+B), A2, B2, A3, B3, respectivamente.

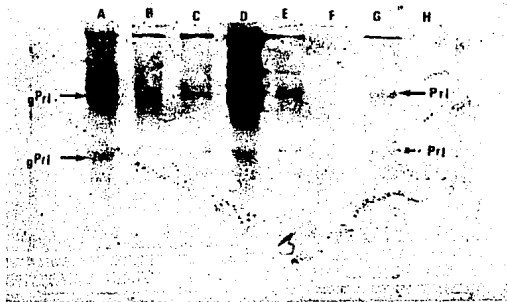


Figura 16.- Bandas inmunorreactivas obtenidas con la técnica de Inmunotransferencia (Western-Blot) a partir de una electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se incubó en presencia de anticuerpo anti-Prl ovino (1:500), con un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (1:1500). Los estándares hormona de crecimiento y de prolactina corresponden a los carriles F y G respectivamente y de A a E corresponden a los diferentes lotes de hormona a saber: lote 1 A+B, A2, B2, A3 y B3, respectivamente. La cantidad de proteína en cada carril correspondió a 1 ug. El carril H corresponde a PM.

La figura 17 muestra bandas inmunorreactivas a hormona de crecimiento, reveladas con fosfatasa alcalina acoplada a un segundo anticuerpo, donde ahora el estándar de prolactina no aparece, constatando la presencia de la hormona de crecimiento caprina (gGH) en las fracciones finales en cada uno de los lotes. De derecha a izquierda se observa: carril de pesos moleculares, el estándar de hormona de crecimiento bovina y los productos A+B, A2, B2, A3, B3.

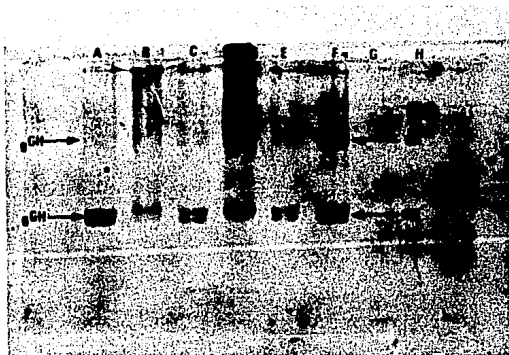
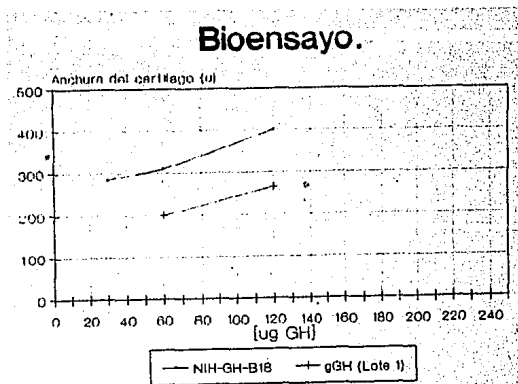


Figura 17.- Bandas inmunorreactivas obtenidas con la técnica de Inmunotransferencia (Western-Blot) a partir de una electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se incubó en presencia de anticuerpo anti-GH de bovino (1:500), con un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (1:1500). Los estándares hormona de crecimiento y de prolactina corresponden a los carriles F y G y de A a E corresponden a los diferentes lotes de gGH a saber: A) lote 1 A+B, B) A2, C) B2 D) A3 y E) B3, respectivamente. La cantidad de proteína en cada carril correspondió a 1 μ g.

D) CARACTERIZACION BIOLOGICA:

La gráfica 1 presenta el patrón de respuesta de los animales previamente hipofisectomizados bajo la acción de la hormona del crecimiento de origen bovino (NIH-GH-B18) así como del producto final inyectado a las cabras (gGH).

Se observa que el estándar muestra una respuesta dependiente de la dosis siendo el mayor incremento de 400 μ m a la dosis de 120 μ g, sin embargo, el lote experimental sólo mostró dependencia a las dosis de 60 a 120 μ g estableciéndose una meseta a los 240 μ g. El grupo control mostró 186.4 \pm 18.8 μ m como incremento real. El análisis de varianza indicó una potencia de 0.5 UI/mg con límites de confianza del 95% .



Gráfica 1.- Efecto de la hormona de crecimiento estándar (NIH-GH-B18) a dosis de 30, 60 y 120 μ g de proteína total por animal vs lote 1 (A+B) a dosis de 60 y 120 μ g de proteína, en el ensayo de la altura del cartilago de la tibia en ratas hipofisectomizadas.

La fotografia 1 muestra el incremento del cartilago epifisario del grupo control así como del estándar y grupo problema. Cada división corresponde a 40 um.



Fotografía 1.- Efecto de la hormona de crecimiento bovina vs el lote 1 (A+B) en la altura del cartilago de la tibia en ratas hipofisectomizadas, a dosis progresivamente crecientes. A Control; B 30 ug; C 60 ug; D 120 ug de NIH-GH-B18, respectivamente. E 60 ug, F 120 ug y G 240 ug del lote 1 (A+B).

E) ENSAYO EN CABRAS.

A continuación se presentan los gráficos resultantes de las cuantificaciones realizadas para grasa butírica en términos de porcentaje y de la producción de leche medida en mililitros de los grupos controles y experimentales.

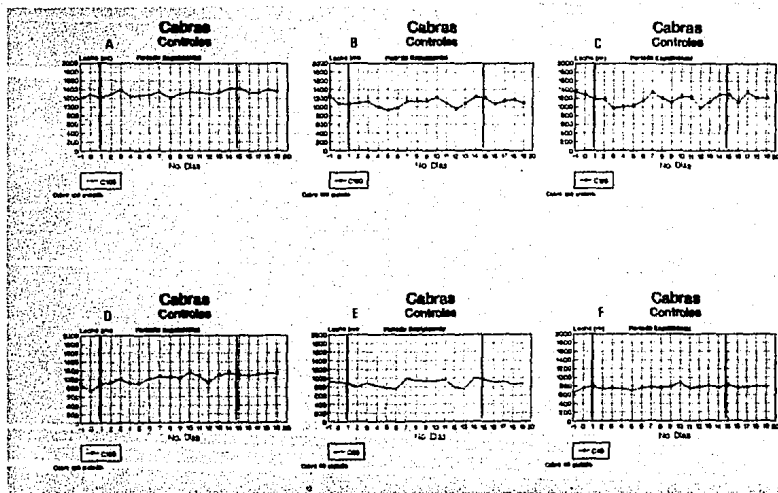
Durante la fase de tratamientos, la cabra No.81, presentó signología sugestiva de matitis por lo que se decidió retirarla del grupo experimental, eliminando sus datos de los gráficos.

Los registros de grasa butírica y de leche duraron un lapso de 21 días, de los cuales 15 correspondieron al periodo de aplicación de la hormona y la SSF al lote experimental y control, respectivamente. De esta forma, se realizaron dos registros antes del tratamiento y cuatro más después de la última aplicación, obteniendo las dos últimas cuantificaciones los días sexto y séptimo a partir de la aplicación final, con la intención de observar el comportamiento lactacional una vez retirado el estímulo hormonal.

Los datos obtenidos a lo largo de los 21 días de registros, tanto para el volumen de leche como para el porcentaje de grasa butírica muestran claramente que la hormona no alteró ninguno de los parámetros medidos.

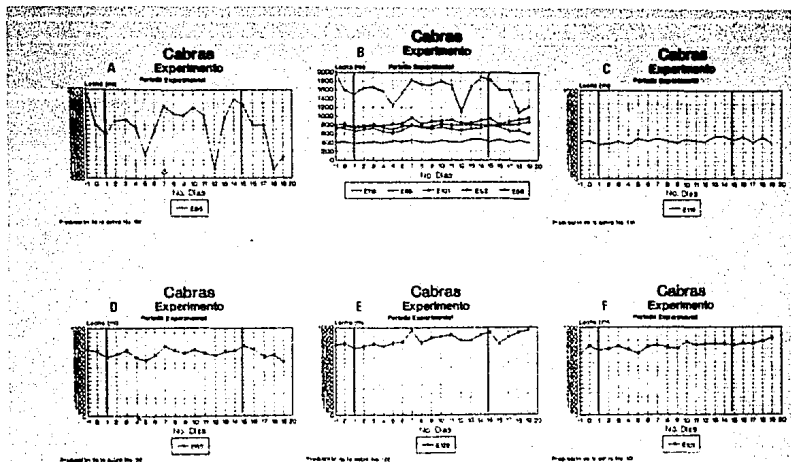
Cabe mencionar que el análisis de varianza en un arreglo completamente aleatorizado de los resultados obtenidos, apoya el resultado mencionado, indicando de esta manera que la gGH, aplicada a las cabras no modificó la producción de leche y que la variabilidad dentro de los grupos es mayor que la variabilidad entre grupos.

La gráfica 2 muestra el registro del volumen de leche producido por cada cabra del grupo control, el cual a lo largo del tratamiento mantuvo una discreta tendencia a aumentar su volumen de leche. Cabe destacar que la tendencia de cada una de las cabras controles no se ve modificada de manera alguna, ni durante ni después de la aplicación de la SSF.



Gráfica 2.- Representación del volumen de leche de cada cabra del grupo testigo. El periodo de aplicación de solución salina fisiológica (SSF) está indicado entre las líneas de color más intenso. Nótese la variabilidad en la producción de leche dentro del grupo. A) cabra 105; B) Cabra 120; C) Cabra 125; D) Cabra 128; E) Cabra 90; F) Cabra 45.

La gráfica 3 representa el registro del volumen de leche producido por cada miembro del grupo experimental. Cabe destacar el caso particular de la cabra No.68, que muestra una gran variabilidad en su producción de leche; en tanto que las restantes mantienen una tendencia más estable a lo largo del tratamiento. No se observan modificaciones importantes en el volumen de leche producido por cada uno de los animales.

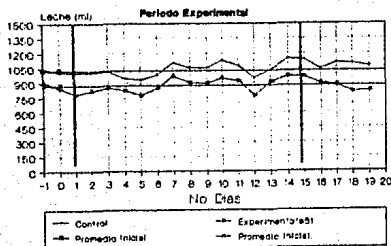


Gráfica 3.- Muestra el volumen de leche (ml) producido por cada cabra del grupo experimental. A) Cabra No. 68; B) Grupo experimental junto; C) Cabra 118; D) Cabra 35; E) Cabra 122; F) Cabra 101.

La gráfica 4 muestra: A) La producción promedio del grupo testigo y el experimental comparados. Se destaca que una es la imagen especular de la otra. Nótese que la producción de leche del grupo experimental, disminuye por debajo de su promedio, (señalado por la línea horizontal continua) una vez suspendido el tratamiento, en tanto que el grupo testigo mantiene su ritmo de producción normal aún después del periodo de aplicación de SSF.

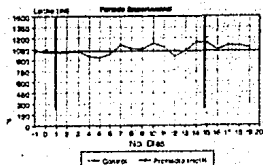
B) y C) muestran el promedio de cada grupo en forma aislada.

A. Producción Promedio.



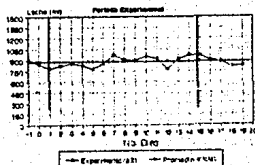
Promedio diario de cada grupo

B. Promedio Controles.



Promedio diario de cada grupo

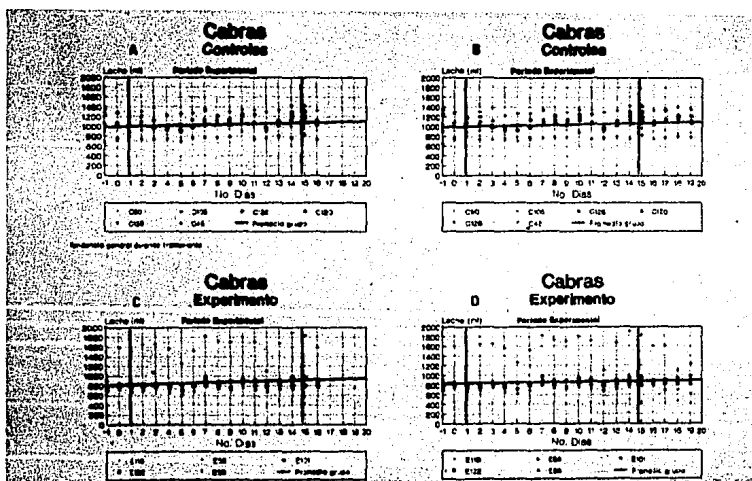
C. Promedio Experimentos



Promedio diario de cada grupo

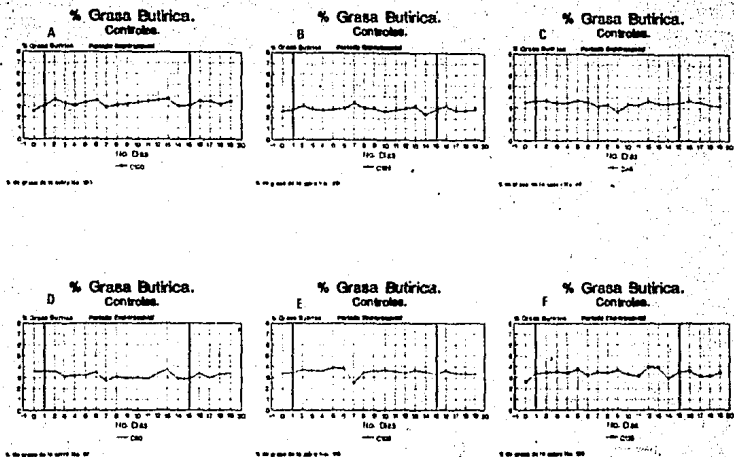
Gráfica 4.- Representación del volumen de producción promedio para cada grupo. A) Gráfica comparativa del grupo testigo y el grupo experimental. B) Grupo testigo. C) Grupo experimental. Se destaca con una línea horizontal más intensa el promedio de producción de leche obtenido a partir de los dos primeros registros previos al tratamiento para cada grupo.

La gráfica 5, representa la tendencia de producción de leche en promedio, tanto del grupo experimental como del control durante el periodo de aplicación de SSF y hormona (A y C) y las tendencias de estos mismos después de haber suspendido el tratamiento (B y D). La línea horizontal de mayor intensidad en cada gráfico representa la tendencia promedio en cada caso. Nótese que la línea que marca la tendencia promedio antes y después de la fase de aplicación de SSF en el grupo control, no modifica su inclinación, en tanto que para el grupo experimental se puede apreciar un cambio en la inclinación, al comparar la tendencia durante la aplicación de la gGH y posterior a ésta.



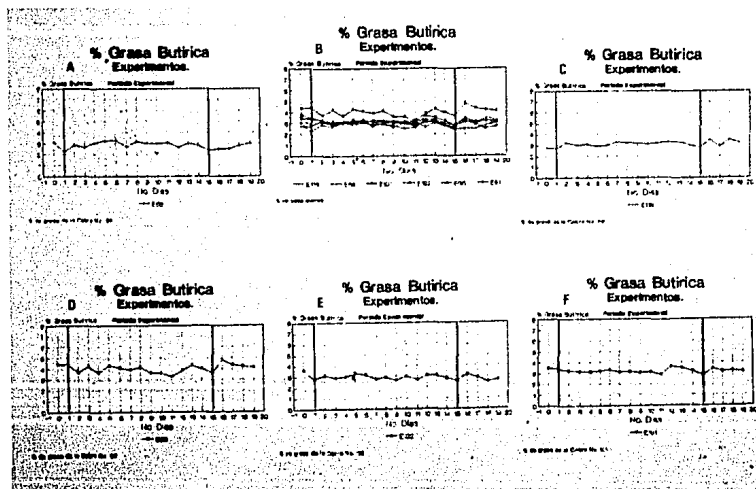
Gráfica 5.- Muestra las tendencias promedio de producción de leche de ambos grupos, durante el tratamiento y posterior a éste destacadas con una línea negra de mayor intensidad. A) Grupo control durante el tratamiento con SSF; B) Grupo control después del tratamiento con SSF; C) Grupo experimental durante la aplicación de la gGH; D) Grupo experimental después del tratamiento con gGH.

La gráfica 6 muestra el porcentaje de grasa butírica de cada cabra del grupo control, la cual no presentó variaciones significativas a lo largo de la fase de aplicación de la SSF. De igual manera, el periodo de aplicación de la SSF se destaca resaltando más intensamente el par de líneas verticales que cada gráfico muestra. No existe para ninguno de los casos tendencia a aumentar o disminuir el porcentaje de grasa registrado.



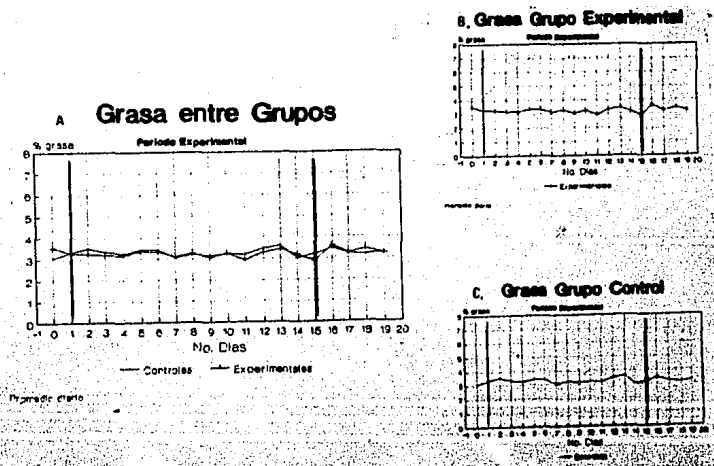
Gráfica 3.- Representación del porcentaje de grasa registrado a lo largo del periodo experimental para cada una de las cabras del grupo testigo: A) Cabra 120; B) Cabra 128; C) Cabra 45, D) Cabra 90; E) Cabra 105; F) Cabra 125. Nótese que no se presentan modificaciones en los porcentajes registrados durante el periodo experimental así como tampoco las hay inmediatamente después del mismo.

La gráfica 7, representa el porcentaje de grasa butírica registrado para el grupo tratado con gGH a lo largo de los 21 días del desarrollo experimental. Se observa que, al igual que en el grupo testigo, el experimental no muestra haber modificado el porcentaje de grasa durante el periodo de tratamiento con la gGH; sin embargo, la característica que más destaca para todos los casos es un incremento súbito del porcentaje de grasa seguido de una declinación paulatina justo después de haber sido retirado el tratamiento.



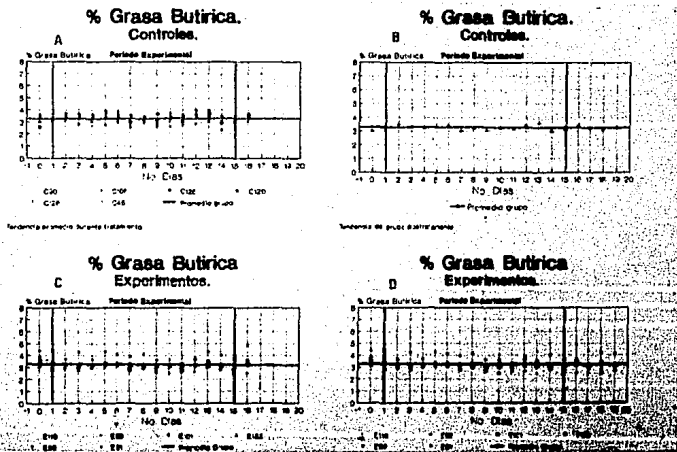
Gráfica 7.- La gráfica representa el registro individual del porcentaje de grasa butírica para cada una de las cabras del grupo experimental. Se indica el periodo de tratamiento con las dos líneas verticales de mayor intensidad. A) Cabra 68; B) Grupo experimental; C) Cabra 118; D) Cabra 36; E) Cabra 122; F) Cabra 101.

La gráfica 8, compara el porcentaje promedio de grasa registrado durante los 21 días del periodo experimental, tanto del grupo control como el del experimental. Este gráfico destaca el hecho de que ambos registros resultaron ser iguales, sin registrar modificación alguna durante el periodo de aplicación de SSF y gGH y posterior al mismo. Del lado derecho (B y C) se muestran los registros separados para cada caso.



Gráfica 7.- Representación de los porcentajes de grasa butírica promedio producida por los grupos control y experimental a lo largo de los 21 días que duró dicho experimento. El periodo de aplicación de SSF y gGH para cada caso se encuentra destacado por el espacio entre las líneas verticales de mayor intensidad. A) Gráfico comparativo de los promedios del Grupo control y el experimental; B) Grupo control aislado; C) Grupo experimental aislado.

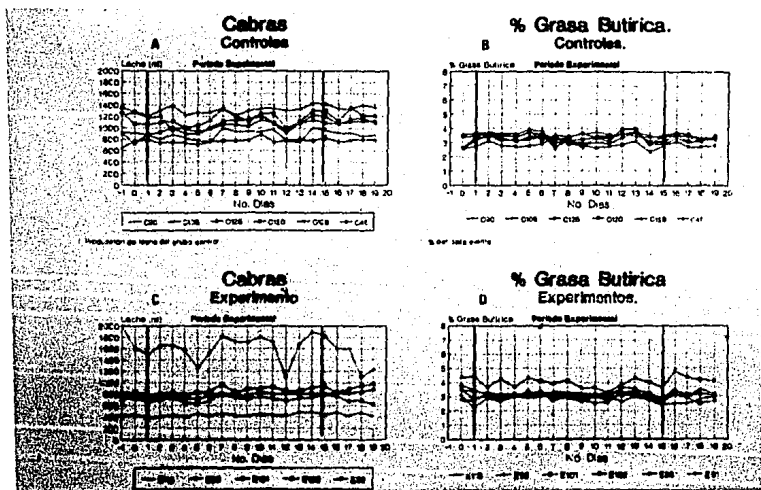
La gráfica 9, representa las tendencias promedio del porcentaje de grasa butírica de cada uno de los grupos durante el periodo de aplicación de SSF y gGH, así como la tendencia después de la aplicación de la SSF y la gGH. En el lado izquierdo del gráfico se muestra la tendencia de los grupos control y experimental (A y C) durante el periodo de aplicación de SSF y gGH respectivamente, representada por la línea horizontal de mayor intensidad en cada caso. Asimismo, el lado derecho, muestra la tendencia promedio de cada grupo posterior al periodo de aplicación de SSF y gGH. Nótese que en ningún caso se muestran variaciones en la inclinación de las líneas de tendencia.



Gráfica 9.- Representa la tendencia promedio del porcentaje de grasa butírica de ambos grupos durante y después del periodo experimental. A) Tendencia promedio del grupo control durante el periodo de aplicación de SSF; B) Tendencia promedio del grupo control después del tratamiento; C) Tendencia promedio del grupo experimental durante la aplicación de gGH; D) Tendencia promedio del grupo experimental posterior al tratamiento con gGH.

La gráfica 10 hace una comparación general tanto de producción de leche (ml) como del porcentaje de grasa butírica, registrados a lo largo de los 21 días que duró el diseño experimental. Así, del lado izquierdo (A y C) se hace la comparación de la producción de leche entre el grupo experimental y el grupo control.

Resalta en este gráfico la gran dispersión de datos de la cabra No. 6B del grupo experimental, la cual mostró una alta susceptibilidad a las variaciones ambientales a las cuales se vio expuesta. Del lado derecho (B y D) se compara el porcentaje de grasa registrado para cada grupo. Esta variable arrojó resultados más homogéneos.



Gráfica 10.- Representa una comparación global de los dos grupos y sus registros para volumen de leche y porcentaje de grasa. A) Registro del volumen de leche del grupo control; B) Registro del porcentaje de grasa del grupo control; C) Registro del volumen de leche del grupo experimental; D) Registro del volumen de grasa del grupo experimental.

B. DISCUSION

A partir del año de 1981 y con los beneficios que ha aportado la tecnología del DNA recombinante, se dispuso de GH biosintética de origen bovino (4) en grandes cantidades para llevar a cabo ensayos clínicos concernientes al aumento de la producción de leche en los hatos ganaderos; a partir de entonces se dejó claro que la GH participa activamente durante el estadio lactacional, mejorando el aporte de nutrientes hacia la glándula mamaria y alterando los contenidos de la misma de acuerdo al balance enérgico del animal (24).

Esto provocó la reorientación del estudio del modo de acción de la GH en diversas especies domésticas tales como cabras (19,40,41,60,68,69), ovejas (56) y su efecto durante la lactación en estos animales, haciendo uso de bGH o bien oGH, sin tener en cuenta la importancia de un sistema homólogo.

Este trabajo, como se menciona en el capítulo introductorio, pretendió, a partir de la obtención, purificación y caracterización de la gGH, evaluar las modificaciones durante la lactación en la cabra ante un desafío exógeno con GH de su misma especie.

Dado que el efecto esperado no se presentó, es evidente la necesidad de clarificar el motivo por el cual la hormona preparada no indujo las modificaciones esperadas durante la lactación del animal.

El análisis del trabajo partirá desde los aspectos metodológicos sobre la obtención y purificación de la hormona hasta la evaluación del modo como las variables ambientales pudieron afectar de alguna manera la expresión clara del efecto endocrino del producto purificado sobre los animales experimentales.

A) PREPARACION DE LA gGH.

Los ensayos clínicos llevados a cabo por Brumby y Hancock y subsecuentemente por Machlin y colaboradores, con GH purificada a partir de hipófisis bovinas (52), utilizaron extractos que se caracterizaron por tener un alto grado de pureza, debido al uso de las técnicas empleadas por Mills y Ellis (21,58), con lo cual el efecto galactopoyético atribuido a esta hormona resultó ser más claro y potente, sugiriendo que, posiblemente, los contaminantes que solían encontrarse de ACTH, Prl, y TRH en cantidad importante evitaban la claridad del efecto galactopoyético propio de la GH. Así, el mejoramiento a los métodos de Wilhelmi (75) y Raben (71) ideados por Mills (58) aseguraron un grado de pureza tal que se permitió el estudio más claro y preciso del papel real que la GH tiene durante la lactogénesis y la lactación, el cual resultó ser muy diferente al atribuido a hormonas lactopoyéticas tales como la Prl, estrógenos y los glucocorticoides (1,18,20, 35,74).

En el presente trabajo, se pretendió hacer uso del método ideado por Mills (58) modificando algunos de sus detalles con base en la técnica recomendada por Erlick (26) que resultaron ser de gran importancia, dado que el producto final en este trabajo resultó estar contaminado por una gran cantidad de PRL y posiblemente de ACTH, pues se omitió el uso de ácido acético glacial y oxixelulosa para separar la GH de la ACTH (58) y no se llevó la fracción R0 a pH de 10.5, con NaOH 0.1N, en agitación constante durante toda la noche; dado que se consideró que con una agitación vigorosa durante 10 minutos a pH de 12.9 se obtendría una mayor cantidad de proteína en solución. Se arribó a esta consideración, con base en la observación de que la intensidad de las bandas de un corrimiento electroforético anterior del mismo R0, fue mayor con el método corto a pH 12.9 (26) que con el tratamiento sugerido por Mills (58) a pH de 10.5 con agitación toda la noche.

Cabe mencionar que la comparación del método de Mills (58) a pH 10.5 con el método a pH 12.9 de Erlick (26) no puede ser del todo válida pues los pasos subsecuentes no se llevaron a cabo conforme al procedimiento citado por Mills (58).

Es importante destacar que, el producto final obtenido, pudo haber sido purificado en una columna de DEAE celulosa (Whatman DE-32) y de esta manera tener un producto biológico mas potente (52,58).

Dado que el contaminante que con mayor frecuencia se encuentra en los extractos hipofisarios de GH es la prolactina (Prl), (21,58,71,75) se decidió hacer la detección inmunológica de ésta con ayuda de la técnica de inmunotransferencia, como se muestra en la figura 5 de la sección de resultados, donde cabe resaltar que la banda inmunorreactiva de mayor intensidad a prolactina, corresponde a la fracción A2. En esta fracción, al igual que en la A3, se esperaba sólo la presencia de prolactina, dado que deriva de las precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio al 20% (26,58); sin embargo, es igualmente inmunorreactiva al anticuerpo anti-GH, sugiriendo que tanto las fracciones A como B, están compuestas tanto de gGH como de gPrl; además, los corrimientos electroforéticos de las fracciones A como las B en condiciones reductoras y no reductoras son idénticos, tanto para las bandas características de gGH como para las mismas de gPrl.

En consecuencia, el producto aplicado a las cabras presentaba una importante contaminación de prolactina, con la posibilidad de contener también ACTH, debido a la omisión del procedimiento con oxixelulosa (58).

Con estos antecedentes, se podría esperar que este grado de impureza obstaculizara el efecto galactopoyético de la GH en las cabras tratadas; sin embargo, no es posible esperar algún efecto antagónico lactacional por parte de la gPrl hacia la GH, pues ambas hormonas junto con los glucocorticoides, estrógenos, progesterona y ACTH son indispensables para los procesos de mamogénesis, lactogénesis y lactación (1,18,20,35,74).

Los datos que dan soporte al importante papel galactopoyético que desempeña la Prl son que esta hormona participa primeramente en el desarrollo y crecimiento mamario, junto con los estrógenos, la GH, progesterona y el lactógeno placentario (1,10).

Además, las concentraciones de prolactina durante la gestación, en el ganado bovino, mantienen sus niveles basales para luego, dos días antes del parto, se eleve su concentración plasmática y se mantenga un par de días después del mismo (25,74). Asimismo, la PRL también promoverá el desarrollo continuo de la glándula y la síntesis de leche durante todo el periodo lactacional (53,74). Se ha comprobado que con la aplicación de inhibidores de la secreción de PRL, justo dos días antes del parto, la producción subsecuente de leche disminuye, durante el periodo lactacional completo (1).

En trabajos ya clásicos y concluyentes (1), se ha restablecido la producción total de leche en cabras hipofisectomizadas, al agregarse la prolactina en un compuesto constituido por glucocorticoides, triyodotironina y GH, mientras que este compuesto, en ausencia de prolactina, sólo restituía la producción en un 28%. Este dato confirmó finalmente el concepto de que la Prl es esencial para una lactogénesis completa en el ganado. Sin embargo, la administración de prolactina durante la lactancia ya establecida en el ganado, no es capaz de aumentar la producción de leche (1) y, paradójicamente la supresión de la secreción de Prl no afecta la producción de leche durante la lactancia media o tardía (74).

A un nivel molecular, la prolactina favorece el cambio de un estadio basal a uno secretorio de las células alveolares de la glándula mamaria justo antes del parto (1); y en el tejido hepático de ratas tratadas con dosis farmacológicas de GH, ocurre un aumento de los sitios de unión a prolactina en el mismo tejido (1,62) y la Prl a su vez induce un aumento en la síntesis de ácido ribonucleico (1) y estimula la producción de somatomedinas (28).

En consecuencia, la presencia de prolactina como contaminante del producto final utilizado en el presente trabajo no permite explicar la ausencia de efecto galactopoyético que se registró al aplicarlo en los animales experimentales ya que su presencia, en todo caso, habría ejercido un efecto sinérgico con el de la gGH sobre dicho parámetro. Por otra parte, los primeros extractos hipofisarios utilizados para demostrar el efecto galactopoyético de la GH estaban contaminados con Prl, ACTH y derivados glicoprotéicos como la TSH; sin embargo, tales extractos ejercieron un marcado aumento en la galactopoyesis (1,52,79).

B) CARACTERIZACION BIOLOGICA.

La evaluación de laboratorio de la actividad biológica de la gGH se realizó por medio de la prueba del cartilago de la epifisis de la tibia (32). El producto con el cual se realizó el bioensayo, consistió en un primer lote, que contenía el producto final obtenido del lote 1 original (A+B), que tuvo la particularidad de no haberse precipitado en las dos fracciones, una al 20 y la otra 50% de saturación, resultantes del método de Mills (58) y un segundo lote, formado sólo por la solución B del lote 2 original (B2), pues se asumió que todos los precipitados obtenidos (A+B, A2, B2, A3, y B3) contenían las mismas especies químicas, de acuerdo a los corrimientos electroforéticos que se muestran en el capítulo de resultados.

Además, el producto final se encontraba parcialmente purificado y al momento de disolver el producto para preparar las dosis del bioensayo, éste no se solubilizó de manera completa quedando un residuo insoluble en el fondo de los viales; de tal modo que en lugar de diseñar un ensayo tipo 3+3, se elaboró uno tipo 2+2, con dos muestras representativas de cada precipitado final.

El lote 1 del bioensayo (A+B), resultó tener muy poca actividad biológica con un total de 0.5 U.I/mg en tanto que el lote 2, aparentemente no presentó bioactividad alguna; sin embargo, en este caso particular, se aplicaron solamente las dosis de 60 y 240 mg y se omitió aplicar la dosis intermedia de 120 mg a la cual, hay que subrayar, el lote 1 presentó bioactividad de 0.5 U.I/mg, de tal manera que es de suponer que de haberse ensayado esta dosis intermedia con el lote 2, posiblemente hubiese mostrado cierta bioactividad, como la mostró a esa dosis el lote 1.

Queda la duda de si realmente existió o no actividad de GH en este lote 2 (Solución B2), o si la bioactividad en el lote 1 (A+B), se debió a la Pr1 o a una acción sinérgica entre la Pr1 y la gGH pues ambas hormonas son inductoras de la liberación de somatomedinas hepáticas (28) y el extracto que se utilizó resultó estar contaminado con una cantidad considerable de Pr1.

Hay que destacar que una bioactividad tan baja en el lote 1 de producto final y la supuesta ausencia de actividad biológica de la fracción B2, pudo haber sido el origen de la falta del efecto galactopoyético esperado en las cabras tratadas.

Debido a que los procesos de extracción y purificación de hormonas hipofisarias tienen rendimientos extremadamente bajos (8), lo que dificulta la elaboración de diseños experimentales a largo plazo y con un gran número de animales, como lo indican los trabajos anteriores a Machlin (51,52), se decidió dejar parcialmente purificado el extracto y así poder aplicarlo durante un periodo de 15 días.

Esta purificación parcial tuvo como consecuencia la baja actividad de la hormona, la cual se aplicó a razón de 4.5 U.I/mg.

Por otra parte, no se dispuso con oportunidad de los resultados del bioensayo, por lo cual no se pudo calcular la dosis farmacológica más adecuada para producir el efecto endócrino esperado. De cualquier manera, la dosis mínima con la cual se puede modificar la producción de leche en el ganado vacuno es de 5 U.I/mg (23) con lo que se registran incrementos promedio de 1.6 Kg. de leche al día.

Para el caso particular de las cabras, no se han realizado a la fecha, trabajos consistentes en evaluar la dosis mínima farmacológica, y en este sentido era posible esperar un aumento en la producción de leche durante el tratamiento, menor, tal vez, al reportado en ganado vacuno a la dosis de 5 U.I/mg. Sin embargo, el hecho importante es que la dosis aplicada fue insuficiente para desarrollar un estímulo lactopoyético, debido a la baja bioactividad del producto parcialmente purificado y haberlo aplicado sin antes realizar la valoración detallada del bioensayo de Greenspan (32).

C) ENSAYO EN CARRAS.

Como se describe en el capítulo de material y métodos, el diseño experimental consistió en probar y evaluar el producto final de la extracción y purificación a nivel de campo, valorando los efectos que la gGH pudiera tener durante la lactación de la cabra lechera. Para esto, se diseñó un lote control y uno bajo tratamiento quienes recibirían solución salina fisiológica (SSF) y gGH, respectivamente. Cada lote se constituyó por seis cabras seleccionadas al azar, todas en el mismo periodo lactacional pero con diferente número de parto.

Todos los animales estuvieron bajo un mismo manejo zootécnico y nutricional, es decir, fueron alimentados tanto las cabras control como las experimentales con la misma dieta. De esta manera tuvimos la certeza de mantener bajo control tales variables; sin embargo, aquellas variables propias del animal, como la constitución genética y el número de parto fue imposible someterlas a control, de tal modo que, posiblemente, por esta situación, las respuestas obtenidas tanto de las cabras testigos como de aquellas que recibieron el tratamiento con la gGH, presentaron, de acuerdo a los datos estadísticos, una mayor desviación estándar dentro de cada grupo que la esperada entre grupos.

El tratamiento con la gGH duró un periodo de 15 días, a lo largo de los cuales se midió diariamente el volumen de leche y se tomaron muestras de la leche para la obtención del porcentaje de grasa. De este modo, los resultados registrados a lo largo del tratamiento se utilizaron para elaborar las gráficas que aparecen en el capítulo de resultados. Se elaboraron gráficas para cada uno de los grupos.

Así, al final se obtuvo el volumen de leche y el porcentaje de grasa de ambos grupos el cual se mantuvo constante, sin modificaciones como respuesta a la hormona utilizada.

Dado que los datos estadísticos son definitivos al indicar una ausencia total del efecto endocrino, al igual que el mostrado por la evolución de los gráficos, cabe destacar algunos puntos importantes al respecto:

1) Como ya se discutió anteriormente, la dosis y la potencia de la hormona fueron en extremo bajas, siendo la potencia biológica del producto final de 4.5 U.I y puesto que la literatura reporta que a una dosis de 5 U.I/mg es posible alcanzar un incremento promedio de 1.5 kg diarios de leche en el ganado vacuno (8,23), se podría esperar que con 4.5 U.I en 9 mg de hormona total se obtuvieran por lo menos diferencias significativas en la producción de leche de las cabras sometidas a tratamiento con respecto a las testigos; además, ninguno de los trabajos realizados en cabras lecheras con bGH (19,40,41,68,69) reportan la bioactividad del producto empleado, lo cual dificulta la estimación de una dosis mínima promedio para conseguir la expresión del efecto endocrino, pues, como se mencionó anteriormente, los rendimientos en este trabajo fueron muy bajos con respecto a los rendimientos obtenidos por otros autores (47). No hay que pasar por alto que además de no reportar la bioactividad de sus hormonas, los resultados que se publican son muy variables (56,60), obteniendo inclusive rangos de -12 hasta 12.5% de aumento en producción de leche, en los cuales tampoco se reporta la bioactividad de sus productos.

2) Las variables tales como la constitución genética y el número de parto de cada cabra dificultan la evaluación precisa de lo que pudo haber ocurrido realmente. Esto se hace evidente al observar las gráficas 1 y 2, donde se aprecia la variabilidad de los resultados; además hay que hacer hincapié en el hecho de que a lo largo del periodo experimental, durante los fines de semana, el alimento se sirvió en menor cantidad que en los días anteriores, ocurriendo que esos días coinciden con las caídas en la

producción de leche, como lo hace evidente la gráfica de la cabra No. 81 (Gráfica 2, letra A), que es un animal de raza Toggenburg alto productor. Las cabras restantes de ese mismo grupo no lo son, reflejándose esta condición en sus gráficos. La evaluación estadística realizada, que nos indica una mayor variabilidad dentro de este mismo grupo que entre los grupos control y experimental. Sin embargo, al hacer el promedio de producción de cada uno y graficarse comparativamente, se puede apreciar que la evolución del gráfico del grupo control y el experimental son muy semejantes y difieren tan sólo en el volumen de leche producido (Gráfica 3).

La gráfica 5, resulta interesante por los siguientes aspectos; primero, se hace la comparación del promedio de producción de ambos grupos durante el tratamiento y posterior a éste. Segundo, esta estrategia se tomó para evaluar si se presentaba algún efecto metabólico al momento de ser retirado el estímulo endocrino y tercero, el promedio obtenido para ambos grupos después del tratamiento, incluye los datos de todo el periodo experimental.

De este modo se observa que dicho promedio no varió para el grupo control, en tanto que para el grupo experimental, la variación en el promedio es evidente (Gráfica 4, letra D); sin embargo, hay que hacer notar que la variación del grupo experimental, es debida, simplemente, a la poca uniformidad que registró la cabra No. 81, lo que hace totalmente inválida cualquier hipótesis acerca de un posible efecto endocrino del producto utilizado.

3) Del análisis de las gráficas sobre el porcentaje de grasa, se desprende la conclusión de que ésta se mantuvo sin variación alguna a lo largo de los 21 días del muestreo de la leche; así, la gráfica más representativa a este respecto es la que establece la comparación del promedio del grupo control con respecto al experimental (Gráfica 8) en donde incluso ambos gráficos coinciden en algunos puntos, corroborando el hecho de que el promedio del porcentaje de grasa entre el grupo tratado y el control, es el mismo, sugiriendo a su vez que no ocurrieron las alteraciones metabólicas esperadas (2,3,5,6,7,8,11,22,23,24,52,54).

Como ya se indicó, el aumento del porcentaje de grasa en la leche ocurriría sólo si el animal se encontrara en balance energético negativo (2,3,5,8), pues si se está en un balance energético positivo, el aumento en grasa ocurre conforme aumenta el volumen de leche, sin variar por lo tanto su porcentaje (2,3,5,8).

Se asume entonces, que como los animales fueron tratados de la semana 13 a 16 de lactación, estos aún se mantenían dentro de un balance energético negativo, dado que el animal durante la lactancia, inicia su recuperación energética a partir de la semana 16 (3), por lo cual, era de esperarse un aumento del porcentaje de grasa en la leche del grupo experimental.

4) La última consideración, pero la más importante, es la concerniente al aspecto del contenido y calidad de la dieta ofrecida a las cabras. La mayor parte de los trabajos relacionados con la evaluación de los efectos de la GH en la producción de leche en el ganado bovino (2,3,5,8,24), destacan en sus conclusiones (2,8,11) que el aporte energético de la dieta es vital para la clara expresión del efecto endocrino de la GH, sobre todo en el sentido de lograr un aumento sostenido de la producción de leche.

Chalupa y colaboradores (11), en el año de 1988 hacen un minucioso análisis de las implicaciones nutricionales en el animal tratado con GH. En su ya clásico trabajo, Bauman (8) es muy preciso al concluir que para lograr la mejor manifestación del efecto endocrino sobre la síntesis y producción de leche, las dietas deben de ser ricas en energía (2,3,5,11,24) en tanto que otros trabajos concluyentemente advierten que el aporte energético se debe ajustar al aumento de leche esperado bajo el tratamiento exógeno con GH (11).

Además, se aclara que este suplemento dietético adicional es debido a que el animal tratado necesita un aporte energético igual al que debe de recibir un alto productor genético (2,8,11,24); es por esto, que la dieta que se ha de suministrar debe cubrir los requerimientos del alto productor y en este sentido, la dieta ofrecida a los animales para este trabajo experimental de ninguna manera cumplió con este importante requisito, pues el análisis de la dieta en términos de aporte energético determinó que sólo se cubrían los requerimientos para el mantenimiento con un mínimo de actividad de acuerdo con el NRC.

Ante tales circunstancias, deja de ser sorprendente que en este caso el producto final, parcialmente purificado, con una potencia de 4.5 U.I y ensayado en cabras con potenciales genéticos y número de parto diferentes y sin el aporte dietético necesario, para conseguir un efecto metabólico cuantificable, no lograra la modificación, en ninguna forma, del desempeño lactacional de las cabras sometidas al tratamiento.

7. CONCLUSIONES.

De la anterior discusión se desprenden la siguientes conclusiones:

1.- Se logró la obtención y la parcial purificación de la hormona de crecimiento caprina (gGH) por medio de la combinación de los métodos de Erlick y Mills (26,58), con un bajo rendimiento, una considerable contaminación con prolactina (Prl) y una posible contaminación con hormona adrenocorticotrópica (ACTH).

2.- Con la finalidad de obtener un producto final con una menor contaminación se debe de modificar el protocolo de purificación empleado:

a) Permitir que el extracto libre de glicoproteínas (Ro) permanezca durante dos horas en agitación a pH de 12.5 en un volumen final de 50 ml de NaOH 0.1N para cada 5 g de RO, con la finalidad de aumentar el rendimiento en cantidad de proteína del RO inicial.

b) Luego de la agitación, llevarlo a pH de 7.0 y centrifugar. El precipitado resultante deberá mantenerse en agitación durante 2 horas a pH de 10.5 y luego ajustar a pH de 7.0 y proceder a centrifugar nuevamente. El sobrenadante obtenido será mantenido a pH de 7.0 para realizar las precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio al 20 y 50% como se describió en la sección de material y métodos.

c) Con la finalidad de obtener un producto con mayor potencia, la fracción B se debe tratar con ácido acético glacial y oxixelulosa (58) para eliminar el contaminante con ACTH. Posteriormente los filtrados tratados con oxixelulosa se ajustan al pH del

punto isoelectrico de la gGH, centrifugando y desechando el precipitado resultante y precipitando con sal sólida de sulfato de amonio al 31.25% a pH de 4.0 (58).

- 3.- Con las modificaciones anteriores, la potencia biológica deberá resultar de 1.0 U.I/mg aproximadamente (58), lo cual aumentará el rendimiento de la proteína para su aplicación clínica a nivel de campo, en cabras productoras de leche.
- 4.- El producto final, debe aplicarse sólo después de haber realizado la caracterización biológica completa y de este modo calcular una dosis con la potencia suficiente para conseguir las modificaciones galactopoyéticas esperadas, bajo el tratamiento con una gGH menos contaminada, a nivel de campo.
- 5.- Asegurar, asimismo, un mejor control de las variables de manejo tales como la cantidad y contenido del alimento, procurar tener el mismo número de parto entre los animales de cada grupo y entre los grupos control y experimental y uniformar la habilidad lechera de los animales.
- 6.- La ración debe ser calculada conforme al aumento de leche esperado bajo el tratamiento endocrino, aumentando sus niveles en contenido energético y ajustando la cantidad y la densidad de la misma de acuerdo con los requerimientos alimenticios de una cabra de alta producción.
- 7.- Debido a que con la presente metodología experimental no se logró conseguir ningún tipo de modificación metabólica durante el periodo lactacional de la cabra, es probable que con una hormona menos contaminada y con una dosis más potente, ocurran las modificaciones metabólicas características de un tratamiento exógeno con gGH en la cabra, siem-

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

pre y cuando, la dieta se ajuste para cubrir el compromiso metabólico que éste tratamiento implica y bajo un sistema en donde las variables tanto externas como internas se encuentren mejor controladas.

B. LITERATURA CITADA.

1. Akers, R.M.: Lactogenic hormones: Binding sites, mammary growth, secretory cell differentiation and milk biosynthesis in ruminants. J. Dairy Sci. 68: 501-519 (1985).
2. Bauman, D.E.: Bovine somatotropin: Review of an emerging animal technology. J. Dairy Sci. 75: 3432-3451 (1992).
3. Bauman, D.E., and Currie, B.W.: Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J. Dairy Sci. 28: 1514-1529 (1980).
4. Bauman, D.E., DeGeeter, M.J., Peel, C.J., Lanza R.C., Gorewit, R.C., and Hamond, R.W.: Effects of recombinantly derived bovine growth hormone (bGH) on lactational performance of high yielding dairy cows. J. Dairy Sci. 65: 121 (Abstr.) (1982).
5. Bauman, D.E., Eisemann, J.H. and Currie, B.W.: Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of growth hormone and prolactin. Federation Proc. 41: 2538-2544 (1982).
6. Bauman, D.E., Eppard, P.J., DeGeeter, M.J., and Lanza, G.M.: Responses of high-producing dairy cows to long term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. J. Dairy Sci. 68: 1352-1360 (1985).
7. Bauman, D.E., and McCutcheon, S.N.: The effects of growth hormone and prolactin in metabolism. Ch. 23 in Proc. VI Int. Symp. Ruminant Physiol. Control of digestion and metabolism in ruminants. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. (1986).
8. Bauman, D.E., and Peel, C.J.: Somatotropin and lactation. J. Dairy Sci. 70: 474-486 (1987).

9. Bitman, J., Wood, D.L., Tyrrell, H.F., Bauman, D.E., Peel, C.J., Brown, A.C.G., and Reynolds, P.J.: Blood and milk lipid responses induced by growth hormone administration in lactating cows. J. Dairy Sci. **67**: 2873-2880 (1984).
10. Buttle, H.L., Cowie, A.T., Jones, A.E., Turvey, A.: Mammary growth during pregnancy in hypophysectomized or bromocriptin-treated goats. J. Endocrinol. **80**: 343-350 (1979).
11. Chalupa, W., and Galligan, D.T.: Nutritional implications of somatotropin for lactating cows. J. Dairy Sci. **72**: 2510-2524 (1989).
12. Chalupa, W., Galligan, D.T., and Kronfeld, D.S.: Responses of cows in early lactation to exogenous growth hormone and dietary sodium bicarbonate. J. Dairy Sci. **68**: 143 (abstr) (1985).
13. Chawla, R.K., Park, J.S. and Rudman, M.D.: Structural variants of human growth hormone: Biochemical, genetic, and clinical aspects. Ann. Rev. Med. **34**: 519-547 (1983).
14. Cheek, D.B., Hill, D.E.: Effect of human growth hormone and growth. Fed. Proc. **29**: 103-1509 (1974).
15. Cheever, E.V., Lewis, U.J.: Estimation of the molecular weights of the multiple components of growth hormone and prolactin. Endocrinology **85**: 465-473 (1969).
16. Chilliard, Y., Sauvant, D., Morand-Fehr, A. and Durand, G.: Lipoprotein lipase activity and composition of omental adipose tissue as related to lipid metabolism of the goat in late pregnancy and early lactation. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. **17**: 1021 (1977).
17. Chrambach, A., Yadley, R.A., Ben-David, M. and Rodbard, D.: Isohormones of human growth hormone. Endocrinology **93**: 858-857 (1973).

18. Collier, R.J., McNamara, J.P., Wallace, C.R., Dehoff, M.H.: A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. J. Anim. Sci. **59**: 498-510 (1984).
19. Davis, S.R., Gluckman, P.D., Hodgkinson, S.C., Farr, V.C., Breier, B.H., and Burleigh, B.D.: Comparison of the effects of administration of recombinant bovine growth hormone or N-Met insulin-like growth factor-I to lactating goats. J. Endocrinol. **123**: 33-39 (1989).
20. Delouis, C., Djiane, J., Houdebine, L.M., and Terqui, M.: Relation between hormones and mammary gland function. J. Dairy Sci. **63**: 1492-1513 (1980).
21. Ellis, S.: Studies on the serial extraction of proteins. Endocrinology **69**: 554-560 (1961).
22. Eppard, P.J., Bauman, D.E., Bitman, D., Wood, D., Akers, R.M., and House, W.A.: Effect of dose of bovine growth hormone on milk composition: alfa lactoalbumin, fatty acids and mineral elements. J. Dairy Sci. **68**: 3047-3054 (1985).
23. Eppard, P.J., Bauman, D.E., and McCutcheon, S.N.: Effect of dose of bovine growth hormone on lactation of dairy cows. J. Dairy Sci. **68**: 1109-1115 (1985).
24. Eppard, P.J., Hudson, S., Cole, W.J., Hintz, R.L., Hartnell, G.F., Hunter, T.W., Metzger, L.E., Torkelson, A.R., Hammond, B.G., Collier, R.J., and Lanza, G.M.: Response of dairy cows to high doses of sustained-release bovine somatotropin administered during two lactations. 1. Production response. J. Dairy Sci. **74**: 3807-3821 (1991).
25. Erb, R.E.: Hormonal control of mammogenesis and onset of lactation in cows - a review. J. Dairy Sci. **60**: 155-169 (1977).
26. Erlik, H., Yearawood-Drayton, V., Arai, Y., Leaver, F., and Morris, G.H.: J. Clin. Endocr. **23**: 694-698 (1963).

27. Fain, J.N., and Scow, R.O.: Fatty acid synthesis in vivo in maternal and fetal tissues in the rat. Am. J. Physiol. **210**: 19 (1966).
28. Francis, M.J., and Hill, D.J.: Prolactin stimulates production of somatomedin by rat liver. Nature. **255**: 167-169 (1975).
29. Froham, L.A., Buker, L., Stachura, M.E.: Characterization of growth hormone different molecular weights in rat, dogs, and human pituitaries. Endocrinology **91**: 262-269 (1972).
30. Fronk, T.J., Peel, C.J., Bauman, D.E., Gorewit, R.C.: Comparison of different patterns of exogenous growth hormone administration on milk production in Holstein cows. J. Anim. Sci. **57**: 699-707 (1983).
31. Glimm, D.R., Barcos, V.E. and Kennelly, J.J.: Molecular evidence for the presence of growth hormone receptors in the bovine mammary gland. J. Endocrinol. **126**: R5-R8 (1990).
32. Greenspan, F.S., Li, C.H., Simpson, M.E., and Evans, H.M.: The effect of different dose levels of growth hormone the tibia of young hypophysectomied female rats. Growth **5**: 437-447 (1941).
33. Hamosh, M., Clary, T.R., Chernick, S.S., and Scow, O.R.: Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. Biochim. Biophys. Acta. **210**: 473-489 (1970).
34. Hart, I.C.: Endocrine control of nutrient partition in lactating ruminants. Proc. Nutr. Soc. **42**: 181-185 (1983).

35. Hart, I.C., Bines, J.A., Morant, S.V.: Endocrine control of energy metabolism in the cow: Correlations of hormones and metabolites in high and low yielding cows for stages of lactation. J. Dairy Sci. **62**: 270-277 (1979).
36. Herington, A.C., Cornell, H.J., Kuffer, A.D.: Recent advances in the biochemistry and physiology of the insulin-like growth factor/somatomedin family. Int. J. Biochem. **15**: 1201-1210 (1983).
37. Hunter, W.M.: Homogeneity studies of human growth hormone. Biochem. J. **97**: 199-208 (1965).
38. Isaksson, O.G.P., Eden, S., Jansson, J.O.: Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. Ann. Rev. Physiol. **47**: 483-499 (1985).
39. Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M.: Effects of primate chorionic somatomammotropin on maternal and fetal metabolism. In Lactogenic Hormones, Fetal Nutrition and Lactation. John Wiley & Sons. New York, NY. (1974).
40. Knight, C.H.: Milk yield responses to sequential treatments with recombinant bovine somatotrophin and frequent milking in lactating goats. J. Dairy Res. **59**: 115-122 1992.
41. Knight, C.H., Fowler, P.A., and Wilde, C.J.: Galactopoietic and mammatogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. J. Endoc. **127**: 129-138 (1990).
42. Knopp, R.H., Boroush, M.A. and Sullivan, B.J.O.: Lipid metabolism in pregnancy. II. Post-heparin lipolytic activity and hypertriglyceridemia in the pregnant rat. Metabolism **24**: 481-499 (1975).

43. Knopp,R.H., Saudek,C.D., Arky,R.A. and Sullivan,O.J.: Two phases of adipose tissue metabolism in pregnancy: Maternal adaptations for fetal growth. Endocrinology **92**: 984 (1973).
44. Kostyo,L.Jl, Isaksson,O.: Growth hormone and regulation of somatic growth. In Int.Rev.Physiol. Reproductive physiology II, **13**: 255-274 (1977).
45. Kronfeld,D.S.: Growth hormone induced ketosis in the cow. J.Dairy.Sci. **48**:342-346 (1965).
46. Kronfeld,D.S.: Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency and spontaneous Ketosis in dairy cows. J.Dairy.Sci. **65**: 2204-2212 (1982).
47. Leung,F.C., Jones,B., Steelman,S.L., Rosenblun,C.J., Kopchick,J.J.: Purification and Physicochemical properties of a recombinant bovine growth hormone produced by cultured murine fibroblast. Endocrinology **119**: 1489-1496 (1986).
48. Lewis, U.J., Donn,J.T., Bonewald,L.F., Seacey,B.K. and Vanderlaan,W.P.: A naturally occurring structural variant of human growth hormone. J.Biol.Chem. **253**:2679-2687 (1978)
49. Lewis,U.J., Peterson,S.M., Bonewald,L.F., Seavey,B.K., and Vanderlaan,W.P.: An interchain disulfide dimer of human growth hormone. J.Biol.Chem. **252**: 3697-3702 (1977).
50. Li,C.H., Human growth hormone 1974-1981. Mol.Cell.Biochem. **46**: 31 (1982).
51. Machlin,L.J.: Effect of porcine growth hormone on carcass composition of the pig. J.Anim.Sci. **35**:749-756 (1972).
52. Machlin,L.J.: Effect of growth hormone on milk production and feed utilization in dairy cows. J.Dairy.Sci. **63**: 575-580 (1973).

53. Malven, P.V.: Prolactin and other protein hormones in milk. J. Anim. Sci. **54**: 609-617 (1977).
54. McCutcheon, S.N., and Bauman, D.E.: Effect of patern administration of bovine growth hormone on lactational performance of dairy cows. J. Dairy Sci. **69**: 39-50 (1984).
55. McNamara, J.P., and Bauman, D.E.: Partitioning of nutrients between mammary and adipose tissue of the rat during lactogenesis. J. Dairy Sci. **61**: 156 (abstr) (1978).
56. Mepham, T.B., Lawrence, S.E., Peters, A.R., and Hart, I.C.: Effects of growth hormone on mammary function in lactating goats. Horm. Metabol. Res. **16**: 248-253 (1984).
57. Metz, S.H.M., and van der Berg, S.G.: Regulation of fat mobilization on adipose tissue of dairy cows on the period around. Netherlands J. Agric. Sci. **55**: 198 (1977).
58. Mills, J.B., Ashworth, R.B., Wilhelmi, A.E., and Hartree, A.S.: Improved method for the extraction and purification of human growth hormone. J. Clin. Endocr. **29**: 1456-1459 (1969).
59. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. y Rodwell, V.W.: Bioquímica de Harper. 11a. ed. Manual moderno. México, (1988).
60. Nielsen, O.M.: Effects of recombinantly derived bovine somatotropin on mammary gland synthetic capacity in lactating goats. J. Anim. Phys. Anim. Nut. **59**: 263-272 (1988).
61. Noble, R.C., Steele, W., and Moore, J.H.: The plasma lipids of the ewe during pregnancy and lactation. Res. Vet. Sci. **12**: 47 (1971).
62. Norstedt, G., Mode, A., Eneroth, P., and Gustafsson, J.: Induction of prolactin receptors in rat liver after administration of growth hormone. Endocrinology, **108**: 1855-1862 (1981).

63. Peel, C.J., Bauman, D.E., Gorewit, R.C., and Sniffen, C.J.: Effect of exogenous growth hormone on lactational performance in high-yielding dairy cows. J. Nutr. **111**: 1662-1668 (1981).
64. Peel, C.J., Fronck, T.J., Bauman, D.E., Gorewit, R.C.: Effect of exogenous growth hormone in early and late lactation on lactational performance of dairy cows. J. Dairy Sci. **66**: 776 (1983).
65. Peel, C.J., Sandles, D.L., Quelch, J.K., and Herington, A.C.: The effects of long term administration of bovine growth hormone on the lactational performance of identical twin dairy cows. Anim. Prod. **41**: 135-147 (1985).
66. Phillips, L.S., Vassilopoulou, S.R.: Somatomedins. New Engl. J. Med. **302**: 371-380 (1980).
67. Pocius, P.A., and Herbein, J.H.: Effects of in vivo administration of growth hormone on milk production and in vitro hepatic metabolism in dairy cows. J. Dairy Sci. **69**: 713-721 (1986).
68. Prosser, C.G., Fleet, I.R., Davis, A.J., and Heap, R.B.: Mechanism of secretion of plasma insulin-like growth factor-I into milk of lactating goats. J. Endocrinol. **131**: 459-466 (1991).
69. Prosser, C.G., Royle, C., Fleet, I.R., and Mepham, T.B.: The galactopoietic effect of growth hormone in goats associated with increased concentrations of insulin-like growth factor-I in milk and mammary tissue. J. Endocrinol. **128**: 457-463 (1991).

70. Richard, A.L., McCutcheon, S.N., and Bauman, D.E.: Responses of dairy cows to exogenous bovine growth hormone administered during early lactation. J. Dairy Sci. **68**: 2385-2394 (1985).
71. Raben, M.S.: Recent Progr. Hormone Res. **15**: 71-72 (1959).
72. Sidhu, K.S., and Emery, R.S.: Regulation of blood fatty acids and glycerol in lactating cows. J. Dairy Sci. **55**: 926 (1972).
73. Soman, V., Goodman, A.D.: Studies of the composition and radioreceptor activity of "big" and "little" human growth hormone. J. Clin. Endocrinol. Metabol. **44**: 569-581 (1977).
74. Tucker, H.A.: Physiological control of mammary growth, lactogenesis, and lactation. J. Dairy Sci. **64**: 1403-1421 (1981).
75. Wilhelmi, A.E.: Canad. J. Biochem. **39**: 1659-1673 (1961).
76. Wilhelmi, A.E.: Chemistry of growth hormone. In handbook of physiology, Ed. E. Nobil, W.H., Sawyer, 2: 59-79. Physiol. Soc. Vol. 4 (1974).
77. Wright, D.R., Goodman, A.D., Trimble, K.D.: Studies on "big" growth hormone from human plasma and pituitary. J. Clin. Invest. **54**: 1064-1073 (1974).
78. Yamasaki, N., Nikutami, M., and Sonsberg, M.: Peptides of a biologically active trypsin digestion of bovine growth hormone. Biochemistry **9**: 1107 (1970).
79. Young, F.G., Cotes, P.M., Folley, S.J., Crichton, J.A.: Galactopoietic activity of purified anterior pituitary growth hormone. Nature **164**: 992-993 (1949).