

**OPTIMIZACION DEL PROCESO DE OBTENCION DE LA HORMONA PMSG CRUDA  
PARA LA REPRODUCCION ANIMAL**

**SEMINARIO INTER-REGIONAL**



**CONFERENCIAS**

CIUDAD DE LA HABANA DEL 4 AL 9 DE OCTUBRE DE 1999  
LABIOFAM CUBA

## **ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>PROGRAMA</b>	<b>2</b>
<b>Empleo del ELISA como medio de diagnóstico en la producción de PMSG</b>	<b>9</b>
<b>Organización de la campaña nacional para la obtención, control de la calidad y conservación del plasma de yeguas gestantes para la producción de la PMSG en la República de Cuba.</b>	<b>25</b>
<b>Purificación de la PMSG en un equipo de cromatografía de avanzada</b>	<b>32</b>
<b>Aspectos teóricos y tecnológicos sobre liofilización de la Gonadotropina Sérica (PMSG)</b>	<b>38</b>
<b>Purificación de la PMSG/eCG por cromatografía de intercambio iónico con gradiente salino empleando SP Sepharose F.F.</b>	<b>44</b>
<b>Purificación de Glico Proteínas alternativas y apuntes para el escalado</b>	<b>51</b>
<b>Fraccionamiento del plasma empleado variante del método etanólico</b>	<b>54</b>
<b>Diagnóstico de la gestación en yeguas por un método indirecto de inhibición de la aglutinación, empleando el reactivo LÁTEX</b>	<b>60</b>
<b>Prototipo de un centro colector de plasma de yeguas gestantes para la obtención de la Gonadotropina Sérica equina (PMSG).</b>	<b>70</b>
<b>Especificaciones de calidad de la Gonadotropina Sérica equina</b>	<b>76</b>
<b>Optimización del proceso de obtención de la Gonadotropina Sérica (PMSG) en el período 1996-1999. LABIOFAM</b>	<b>94</b>
<b>Caracterización de la Gonadotropina Sérica equina (PMSG). Su uso en la reproducción animal.</b>	<b>103</b>
<b>Generación de un anticuerpo monoclonal contra la gonadotropina sérica de yeguas gestantes/ gonadotropina coriónica equina. Estudio preliminar.</b>	<b>113</b>
<b>Application of corionic gonadotrophin of pregnant mare (eCG) produce in Cuba in technologies of induction and oestrus sychronization programmes in cattle.</b>	<b>120</b>

## INTRODUCCION

A propuesta de la Empresa LABIOFAM el Fondo Fiduciario "Manuel Pérez Guerrero" del Grupo de los setenta y siete (G 77) a través del Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) aprobó el Proyecto " Optimización del Proceso de Obtención de la PMSG cruda para la Reproducción Animal".

Con el empleo de esta hormona en la explotación animal se mejoran sus índices reproductivos y se incrementa el rebaño. Su obtención y uso por los países del Tercer Mundo permitirá mejoras en sus economías sin gasto en importaciones, además de que puede constituir un fondo exportable pues la materia prima, el suero de yeguas gestantes está al alcance de todos.

El esfuerzo desarrollado por los investigadores y especialistas de LABIOFAM ha posibilitado la organización y ejecución de este Seminario Interregional en el que estamos seguros que los especialistas participantes de otros países asimilarán cabalmente los resultados obtenidos con la experiencia cubana y serán capaces de llevarlos a la práctica en sus respectivas naciones.

Si este objetivo se cumple nos sentiremos recompensados.

Comité Organizador.

SEMINARIO INTERREGIONAL " OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE  
OBTENCIÓN DE LA PMSG CRUDA PARA LA REPRODUCCIÓN  
ANIMAL".

FONDO FIDUCIARIO " PÉREZ GUERRERO"

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO (PNUD)

LABORATORIOS BIOLÓGICOS FARMACÉUTICOS, LABIOFAM.

CIUDAD DE LA HABANA.

4 al 8 de octubre de 1999

**PROGRAMA**

**LUNES 4:** Hotel Kohly

SESIÓN DE LA MAÑANA

9:30-10:00     **INAUGURACIÓN**  
10:00-10:30     RECESO

**Optimización del proceso de obtención del plasma de yeguas gestantes para la  
producción de la PMSG.**

**Moderador:** Ing. Miriam de la Cruz  
**Relator:**     Lic. Ana Emila Nápoles

10:30-11:00     **Conferencia:** Caracterización de la Gonadotropina Sérica Equina  
(PMSG). Su uso en la reproducción animal.

Dr. Rodolfo Pedroso  
Lic. Adiley Gómez

11:00-11:15     **Conferencia:** Prototipo de un centro colector de plasma de yeguas  
gestantes para la obtención de la Gonadotropina Sérica  
Equina (PMSG).

Dr. Arnaldo Capote y Técnico Raúl Barberá

11:15-11:30     **Conferencia:** Organización de la campaña nacional para la obtención,  
control de la calidad y conservación del plasma de yeguas  
gestantes para la producción de la PMSG en la República de  
Cuba.

Dr. Orbe Luis Leguen y colaboradores.

11:30-12:00 DEBATE  
12:00-12:15 RECESO

**Pruebas Inmunológicas para la determinación del nivel de PMSG en el plasma de yeguas gestantes.**

**Moderador:** Dra. Esther Argote  
**Relator:** Dr. Arnaldo Capote

12:15-12:45 **Conferencia:** Diagnóstico de la gestación en yeguas por un método indirecto de inhibición de la aglutinación, empleando al reactivo LATEX.

Lic. Francisca Aurora García y Humberto Carol

12:45- 1:15 **Conferencia:** Empleo del ELISA como medio de diagnóstico en la producción de PMSG

Lic. Olga Lidia López Suárez y colaboradores.

1:15-1:45 DEBATE  
1:45-3:00 ALMUERZO

SESIÓN DE LA TARDE

**Optimización del proceso de obtención de PMSG semipurificada a escala industrial.**

**Moderador:** Lic. Rosario Carrero  
**Relator:** Lic. Isabel Ruiz

3:00-3:45 **Conferencia:** Optimización del proceso de obtención de la Gonadotrofina Sérica (PMSG) en el período 1996-1998. LABIOFAM

Ing. Miriam de la Cruz y colaboradores.

3:45-4:00 RECESO

4:00-4:45 **Conferencia :** Especificaciones de calidad de la gonadotrofina sérica equina.

Lic. Milagros Abreu y Dra. Leyda la Guardia

4:45-5:15 DEBATE

5:30 COCTEL DE BIENVENIDA

**MARTES 5:** Unidad de Producción de Hemoderivados (Up-3).

SESIÓN DE LA MAÑANA

**Inicio de la producción de un lote a escala industrial y control de la calidad en el proceso de producción.**

**Coordinador :** Dr. Arnaldo Capote

9:30-10:30      **Práctica:** Visita al centro colector de plasma. Extracción y control de la calidad.

Dr. Arnaldo Capote

10:30-11:00    RECESO

11:00-12:00    **Práctica:** Determinación de la gestación en muestras de suero de yeguas con el juego de reactivos de LATEX.

Lic. Francisca Aurora García y Humberto Carol.

12:00-1:15     **Práctica:** Inicio de la producción de un lote. Mezcla de plasma. Toma de muestra para la prueba biológica, ajuste del PH y precipitación con etanol al 50%.

Lic. Adiley Gómez y colaboradores.

1:15-2:30      ALMUERZO

SESIÓN DE LA TARDE

2:30-4:30      **Práctica:** Determinación de la actividad de la PMSG con el Juego de Reactivos de ELISA.

Lic. Olga Lidia López Suárez y colaboradores.

4:30-4:45      RECESO

4:45-5:15      DEBATE

## MIÉRCOLES 6: Unidad de Producción de Hemoderivados (Up-3)

### SESIÓN DE LA MAÑANA

**Continuación de la producción de un lote a escala industrial y control de la calidad durante el proceso de producción y del producto terminado.**

**Coordinador:** Ing. Miriam de la Cruz

9:30-10:45      **Práctica:** Centrifugación y precipitación con etanol al 80%. Decantación, diálisis, centrifugación, clarificación y filtración.

Lic. Adiley Gómez, Raúl Rosabal y Dario Pérez.

10:45-11:15    RECESO

11:15-12:00    **Práctica:** Determinación de la actividad biológica de un lote a escala industrial antes de la elaboración.

Dra. Elvira Maturell y Esther Dubois.

12:00-12:30    **Práctica:** Elaboración del lote a escala industrial para su envase y liofilización.

Lic. Adiley Gómez y colaboradores.

12:30-1:30     **Práctica:** Control de la calidad del lote de PMSG como producto terminado.

Lic. Elvira Maturell, Esther Dubois y Margarita Alvarez.

1:30-2:45    ALMUERZO

### SESIÓN DE LA TARDE : . LABIOFAM (Nivel Central)

**Liofilización. Técnicas de purificación de Glico Proteínas e Inmunoglobulina.**

**Moderador:** Lic. Anselmo Otero

**Relator:**      Lic. José A. Gómez

- 3:00-3:30 **Conferencia:** Aspectos teóricos y tecnológicos sobre Liofilización de la Gonadotrofina Sérica (PMSG).  
Ing. Antonio Casas
- 3:30-4:15 **Conferencia:** Purificación de Glico Proteínas, alternativas y apuntes para el escalado.  
Lic. Pavel Mustelier  
Fraccionamiento del plasma empleado variante del método etanólico.  
Lic. Armando Cádiz.
- 4:15-4:30 RECESO
- 4:30-4:45 **Conferencia:** Purificación de la PMSG /eCG por cromatografía de intercambio iónico con gradiente salino empleando SP Sepharose F.F.  
Lic. Claudia Mondéjar y colaboradores.
- 4:45-5:00 **Conferencia:** Purificación de la PMSG en un equipo de cromatografía de avanzada (AKTA explorer).  
Lic. Adiley Gómez y colaboradores.

5:00-5:30 DEBATE

5:30-5:45 Caracterización de los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos. LABIOFAM  
Representante del Consejo de Dirección

**JUEVES 7 :** Unidad de Producción de Hemoderivados (Up-3)

SESIÓN DE LA MAÑANA

**Empleo del AKTA explorer en la purificación de la PMSG**

**Coordinador:** Lic. Adiley Gómez

9:30-10:30 **Práctica:** Demostración del funcionamiento del AKTA explorer

Lic. Cristina Maruca, Lic. Adiley Gómez y Lic. Claudia Mondéjar



10:30-11:00 RECESO

11:00-1:30 **Práctica:** Purificación de la PMSG en el AKTA explorer . Análisis de los resultados.

Lic. Cristina Maruca, Lic. Adiley Gómez y Lic. Claudia Mondéjar.

1:30-2:45 ALMUERZO

SESIÓN DE LA TARDE:

**Control de la Calidad de la PMSG purificada en el AKTA explorer**

**Coordinador:** Lic. Claudia Mondéjar

2:45-4:45 **Práctica:** Determinación de la concentración de proteínas y de la pureza mediante SPS-PAGE.

Lic. Elvira Gutiérrez y colaboradores

4:45-5:00 RECESO

5:00-5:30 DEBATE

**VIERNES 8:** Hotel Kohly

SESIÓN DE LA MAÑANA

**Moderador:** Lic. Anselmo Otero

**Relator:** Lic. Onaidy T. Torres

9:30- 11:00 **Conferencia:** Versatilidad del empleo del AKTA explorer en la purificación a escala industrial.

Lic. Cristina Maruca

11:00-11:30 RECESO

11:30-12:00 **Conferencia:** Generación del anticuerpo monoclonal

Lic. Rosa María Rodríguez y Angel Mauro Alfonso

12:00-1:00 **Conferencia:** Resultados Obtenidos con la aplicación con diferente esquemas de tratamiento con PMSG.

Rodolfo Pedroso

1:00-1:30 DEBATE  
1:30-3:00 ALMUERZO

SESIÓN DE LA TARDE

**Importancia de la aplicación del PMSG elaborada en LABIOFAM en la reproducción animal.**

**Moderador:** Dr. Rafael Polanco  
**Relator :** Dr. Arnaldo Capote

3:00-4:30 **Análisis de los resultados del Seminario Interregional y posibilidad de aplicación de los conocimientos adquiridos.**

4:30-4:45 RECESO

4:45 **CLAUSURA**

**SÁBADO 9 :**

10:00 Recorrido por CIMA

(Participantes extranjeros y personal designado)

# EMPLEO DEL ELISA COMO MEDIO DE DIAGNÓSTICO EN LA PRODUCCIÓN DE PMSG.

Olga Lydia López Suárez\*, Aimé Posada García\*\*, Rodolfo Alés Pacheco\*\*\*

\*Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM)

e-mail: labiofam@ceniai.inf.cu

\*\* CIBIOMED

\*\*\*LABIOFAM Matanzas

## INTRODUCCIÓN

En los campos de la medicina y la veterinaria actual cada día especialistas e investigadores trabajan arduamente en la búsqueda de métodos sencillos, rápidos y confiables para la determinación de sustancias biológicamente activas de interés, que por encontrarse en concentraciones bajas necesitan el empleo de técnicas modernas que permiten alcanzar un límite inferior de comprobación de unos 5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Algunos de los métodos más difundidos con este propósito son aquellos que se apoyan en las propiedades inmunológicas de los componentes del suero y que nos sirven como base para la elaboración de herramientas de diagnóstico. Entre estos métodos se encuentran los **ELISA** (Enzyme linked immunosorbent assay) que son técnicas rápidas, de gran sensibilidad, especificidad y bajo costo que superan a muchas técnicas de diagnóstico empleadas, por lo que su uso se ha extendido rápidamente a diferentes campos del diagnóstico médico y veterinario (*Peralta y Frías 1987*).

En **LABIOFAM** se está investigando desde hace varios años en la elaboración de medios de diagnósticos para la detección de **PMSG** que en estos momentos se encuentran en fase de escalado y estandarización.

La **PMSG** es una de las hormonas más explotadas en el campo de la medicina veterinaria para el desarrollo de los planes ganaderos por su gran utilidad en el tratamiento de la infertilidad, la inducción de la ovulación y la superovulación, así como la regulación del ciclo estral en diferentes especies de interés económico. Esta hormona constituye uno de los renglones de producción más importantes de **LABIOFAM**.

La **PMSG** alcanza su máximo de concentración en el período comprendido entre los 60 a 80 días de gestación (*Allen 1969 y Stewart 1976*), es secretada por la cápsula endometrial entre los 40 a 150 días, presentando un peso molecular de 61 000 Daltons con dos subunidades designadas Alfa y Beta que son biológicamente inactivas por separado (*Gaspardowicz 1972*).

El contenido de carbohidratos alcanza un 45 % del peso molecular. Es una hormona que se une tanto a receptores FSH como LH en diferentes especies de interés para el hombre, debido a esto se usa ampliamente en el mundo para incrementar la capacidad reproductora de las mismas (Stewart, Allen y Moor 1976). Es una glicoproteína estable a pH 7.5

En nuestro país se procesan cantidades importantes de plasma equino para la elaboración de **PMSG**, por lo que contar con métodos sensibles, rápidos y confiables para detectar la presencia de esta hormona nos garantiza la colecta de plasma con altas concentraciones de la hormona. Tradicionalmente y antes del empleo de los medios de diagnóstico la colecta del plasma se realizaba por control de monta de los animales lo que se traducía en que un gran porcentaje es de los mismos que al ser testados antes de su uso en la producción resultaban negativos.

Durante una campaña de **PMSG** se realizan alrededor de 13 000 a 15 000 sangrías que valoradas utilizando un test biológico se incrementa el costo de esta producción a cifras 5 ó 6 veces mayores al costo de producción actual empleando los métodos de diagnóstico elaborados en nuestro laboratorio ( **ELISA y LATEX** ). Además con el empleo de estas técnicas se ha reducido considerablemente el porcentaje de plasma negativos y la calidad del plasma que llega a la producción es superior.

## **OBJETIVOS**

- Obtención y escalado de un **ELISA** cuantitativo competitivo indirecto para determinar la presencia de **PMSG** en plasma de animales empleados como materia prima, en la producción nacional de la hormona.
- Aumento del rendimiento y la productividad de la producción de la **PMSG** obtenida en **LABIOFAM**.
- Mejorar la calidad de la materia prima que llega a la producción.

## **MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS :**

**Grupo 1 : Ensayos Homogéneos :** Se emplean para detectar sustancias de bajo peso molecular y se caracterizan por no necesitar para su realización de la separación de fases. Su principio consiste en la variación de la actividad de la enzima unida al hapteno al formarse el complejo antígeno - anticuerpo.

**Grupo 2 : Ensayos Heterogéneos :** Se emplean generalmente para detectar macromoléculas y requieren de la separación en fases. La separación se realiza mediante un inmunoabsorbente de fase sólida, este método se conoce como **ELISA** y tiene diferentes variantes.

## CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ELISA :

### I - Análisis competitivo empleando :

- 1- Conjugado antígeno - enzima.
- 2- Análisis de anticuerpo marcado con enzima.

### II - Análisis no competitivo :

- 1- Análisis inmunoenzimométrico sandwich de dos sitios.
- 2- Análisis indirecto para medir el anticuerpo.

Nuestro **ELISA** es de tipo competitivo mediante conjugado de enzima - anticuerpo : En esta técnica el antígeno está unido a una fase sólida. La unión del anticuerpo marcado enzimáticamente y el antígeno en fase sólida disminuye competitivamente si se añade antígeno estándar o desconocido de prueba. El producto medido de reacción enzimática es inversamente proporcional a la concentración del antígeno estándar o de prueba.

La técnica de **ELISA** consiste en la inmovilización del antígeno, o el anticuerpo sobre una fase sólida y luego se añaden de forma secuencial los otros componentes de la reacción. Entre cada paso se realizan lavados para eliminar lo no fijado o en exceso. El fundamento de esta técnica se basa en la reacción antígeno - anticuerpo y se revela con la adición del sustrato específico de la enzima.

## **FACTORES IMPORTANTES DEL MÉTODO :**

La **FASE SÓLIDA** es un inmunoabsorbente donde se inmoviliza el antígeno o el anticuerpo en una cantidad que pueda ser reproducible. En la actualidad se emplean placas de polivinilo o poliestireno.

Los **ANTISUEROS** se producen generalmente en conejos y su purificación, así como el esquema de inmunización dependen del tipo de antígeno empleado. Se toma el suero cuando la producción de IgG es elevada y se realiza una absorción del suero para evitar reacciones no específicas cuando sea necesario.

El **CONJUGADO** es uno de los factores más importantes del método de **ELISA**. La enzima que forma el conjugado debe mantener su actividad y el anticuerpo sus propiedades inmunológicas. La enzima debe ser altamente reactiva, estable, pura económica y con gran actividad específica.

El **SUSTRATO** debe permitir la detección de la enzima que está formando el conjugado, debe ser específico y reproducible, ser fácil de preparar, poco nocivo, los productos de la hidrólisis deben ser solubles y con un coeficiente de extinción alto. El tiempo de reacción enzima - sustrato se determina experimentalmente.

Los **LAVADOS** se realizan después de los períodos de incubación para eliminar lo no fijado y lo que está en exceso. Para ello se emplea agua destilada, solución salina o PBS, todo conteniendo tween 20 que es un detergente biológico no iónico que elimina también lipopolisacáridos bacterianos (Briuns 1978).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MÉTODOS DE PURIFICACIÓN EMPLEADOS**

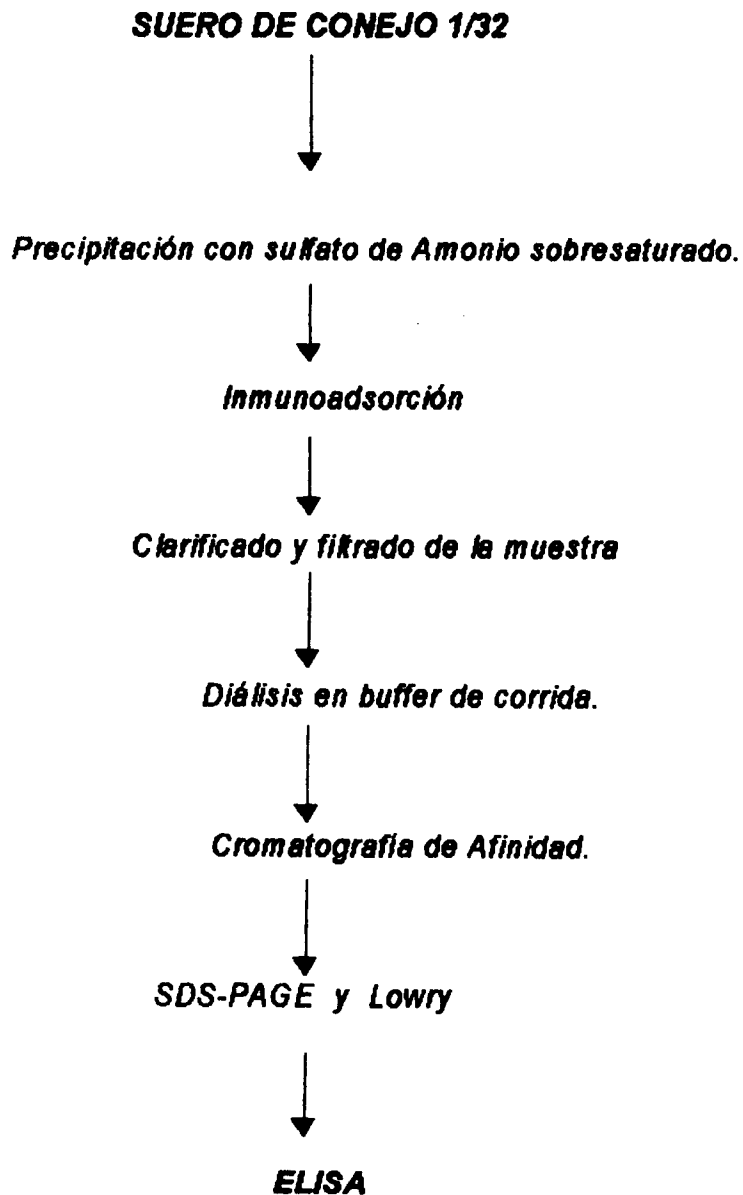
Para purificar la anti-**PMSG** partimos de sueros de conejos inmunizados con **PMSG** purificada en nuestro laboratorio, y empleamos los siguientes métodos cromatográficos:

**Método I :** Purificación de anti - **PMSG** por cromatografía de afinidad utilizando como matriz Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno y conteniendo **PMSG** comercial como ligando.

**Método II :** Purificación de anti - **PMSG** por cromatografía de afinidad utilizando como matriz Sepharosa proteína G.

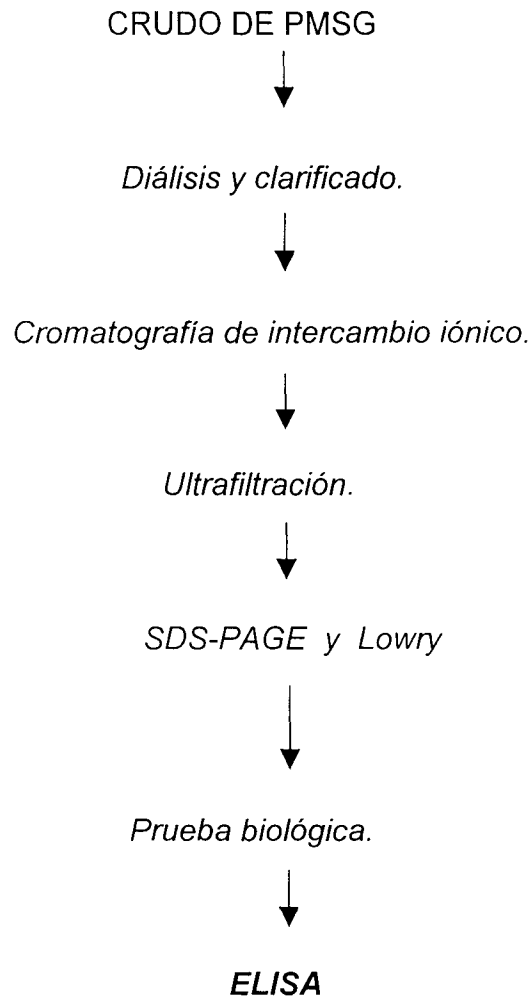
**Método III:** Purificación de anti - **PMSG** por inmunoadsorción con suero control negativo polimerizado y luego por cromatografía de afinidad utilizando como matriz Sepharosa proteína G.

**DIAGRAMA DE FLUJO DE PURIFICACION (III).**



Para purificar la **PMSG** empleada como recubrimiento en el **ELISA** se utilizó la cromatografía de intercambio iónico con CM y SP Sephadex C-50 como intercambiador a partir de crudo de **PMSG** obtenido por precipitaciones alcohólicas en la planta de hemoderivado de **LABIOFAM**.

DIAGRAMA DE FLUJO DE PURIFICACION.



**ELABORACION DE UN KIT DE ELISA DE PMSG :**

El **ELISA** de **PMSG** es de tipo competitivo indirecto donde compete el antígeno que está recubriendo la fase sólida y el de la muestra analizada por unirse a un

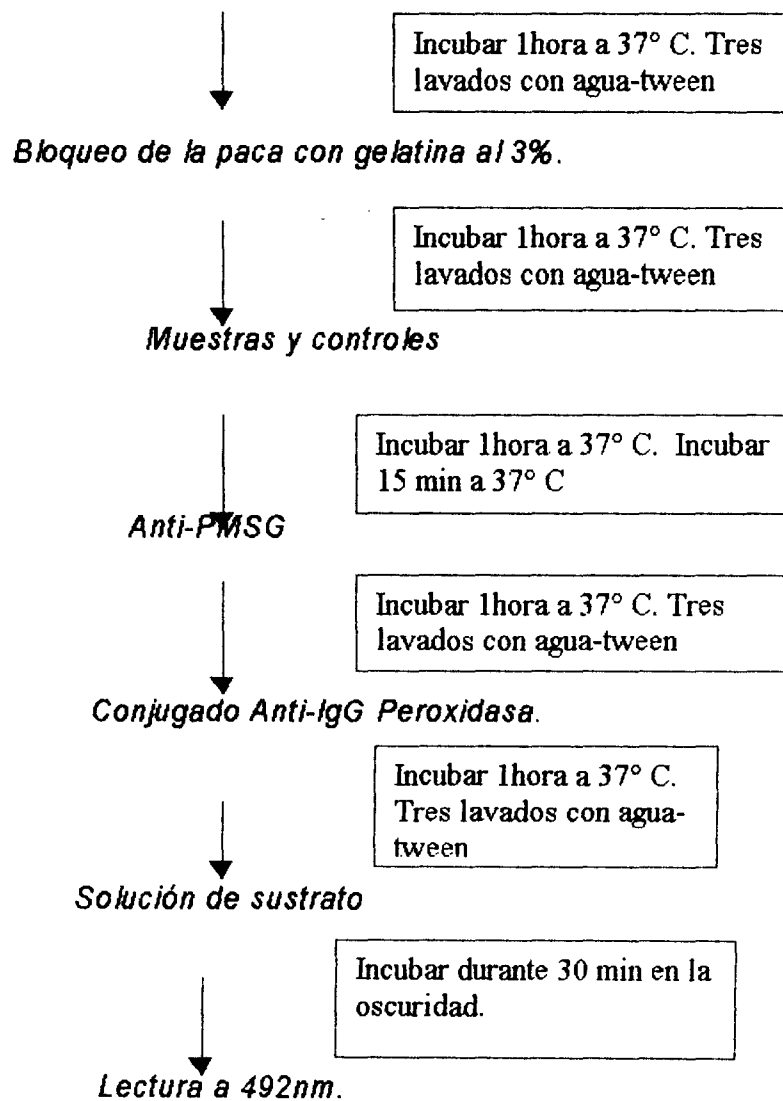


## ELABORACION DE UN KIT DE ELISA DE PMSG :

El ELISA de PMSG es de tipo competitivo indirecto donde compite el antígeno que está recubriendo la fase sólida y el de la muestra analizada por unirse a un rimer anticuerpo, que dependiendo de las concentraciones de PMSG de la muestra se unirá o no al anticuerpo marcado con la enzima.

### DIAGRAMA DE FLUJO DE ELISA.

*Recubrimiento con antígeno ( PMSG )*



## MATERIALES :

*PLACAS* : Tipo NUNK - F comerciales de poliestireno de 96 pocillos.

*RECUBRIMIENTO CON ANTIGENO*: **PMSG** (Gonadotropina sérica de suero de yeguas gestantes) purificada en nuestro laboratorio por cromatografía de intercambio iónico con Carboximetil Sephadex C -50 como intercambiador a partir de crudo de PMSG seco con acetona.

*CONTROLES* : plasma de yegua gestante de 25 UI como control positivo y plasma normal de caballo como control negativo.

*ANTICUERPO* : IgG anti **PMSG** purificada por cromatografía de afinidad con Proteína G como matriz y obtenida en conejo mediante un esquema de inmunización con **PMSG** purificada.

*CONJUGADO* : Anti IgG de conejo obtenida en carnero conjugada a la enzima peroxidasa de rábano picante por el método del perhidrato (Nakane and Kawaoi ).

*SUSTRATO* : Solución de buffer fosfato - citrato, OPD como cromógeno y peróxido de hidrógeno al 30 %.

## PASOS DEL ELISA :

1- Se recubre la placa con 100  $\mu$ l de **PMSG** purificada diluida en el buffer de recubrimiento según la dilución de trabajo. Incubamos durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda y luego realizamos 3 lavados con una solución de agua/Tween.

2- Bloqueamos la placa con 200  $\mu$ l por pocillos de Gelatina al 3 %. Incubamos durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda y luego realizamos 3 pasos de lavados como los anteriores.

3- Añadimos 50  $\mu$ l de muestras y/o controles por pocillos y luego de 15 minutos de incubación igual a los pasos anteriores, adicionamos el anticuerpo anti - PMSG, 50  $\mu$ l por pocillos diluido en suero de caballo al 5 % y luego de una hora de incubación como las anteriores lavamos nuevamente la placa 3 veces.

4- El conjugado se añade según la dilución de trabajo 100 $\mu$ l por pocillo, disuelto en suero de caballo al 5% y se incuba una hora a 37 °C en cámara húmeda. Luego se lava la placa según procedimiento anterior.

5- Adicionamos 100µl por pocillos de solución de sustrato a la placa e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Luego detenemos la reacción con una solución ácida preparada al 12 por ciento con sulfúrico.

6- Realizamos la lectura de la placa en un lector de micro **ELISA** a una longitud de onda de 492 nm.

Se prepararon unos estándares de **PMSG** a partir de una hormona comercial que se emplea como patrón en nuestra empresa para la liberación de los lotes comerciales. Los estándares se prepararon a partir de 25 UI/ml diluido en suero de caballo al 10% en PBS. Se trabajó también con un grupo de 20 muestras de concentraciones altas, medias y bajas de **PMSG** a las que se les había realizado prueba biológica con anterioridad.

Los estándares y las muestra se añadieron a las placas repetidas 10 veces para observar las variaciones dentro del ensayo y entre las diferentes placas. Con los resultados obtenidos se analizaron algunos parámetros estadísticos para medir la variabilidad de las muestras y los puntos de la curva tanto desde el punto de vista de la repetibilidad como de la detectabilidad del método.

## **ESCALADO NACIONAL DEL ELISA DE PMSG**

Hasta el momento se han concluido dos escalados nacionales de los métodos de diagnóstico en siete provincias del país para ver el comportamiento de esta técnica aplicada a un gran número de muestras con vista a tener criterios que sirvan de apoyo para el proceso de validación de la técnica. Los escalados fueron realizados en los períodos de las campañas de 1997 y 1998; con anterioridad se realizaron investigaciones que fueron el punto de partida para el trabajo realizado durante las campañas de 1997 y 1998.

En la campaña de 1997 se titularon por el método de **ELISA** 440 tanques de entre 20 y 25 litros de plasma cada uno provenientes de las provincias: Pinar del Río, Matanzas, St. Spiritud, Camaguey, Guantánamo, Las Tunas y Granma. Durante la campaña de 1998 hubo un aumento de la productividad en todas las provincias antes mencionadas y se titularon por el método de **ELISA** un total de 660 tanques

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Por ser este un **ELISA** indirecto y de competencia, mientras mayor concentración de **PMSG** tenga la muestra de interés, la coloración del pocillo de la muestra positiva, luego del revelado con el sustrato será más tendiente a transparente. Por tanto la lectura de los negativos será entre 1 y 1.5 mientras que las lecturas de los positivos se acercarán lo más próximas a cero dependiendo de la calidad del plasma en cuanto a concentración de **PMSG**.

Al plotear los resultados de una curva patrón de **PMSG** el gráfico presenta una pendiente negativa como se muestra en la gráfica de asociación de valores de D.O. vs Fracciones y que se originó del estudio de los niveles de PMSG en standars preparados lo que corrobora lo anteriormente expuesto.

**ESTUDIO DE LOS NIVELES DE PMSG EN STANDARS PREPARADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA HORMONA.**

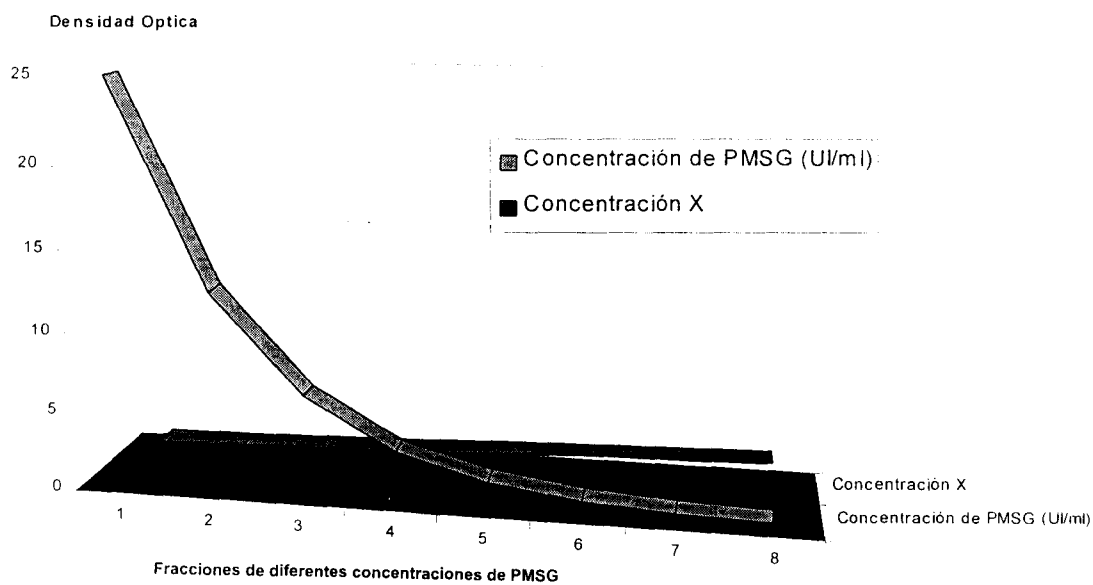
Concentración de PMSG (UI/ml)	X	M	C.V. %
25	0.847	0.015	5.117
12.5	0.935	0.008	2.717
6.25	1.085	0.019	3.994
3.12	1.163	0.020	5.359
1.56	1.369	0.016	3.785
0.78	1.577	0.013	2.718
0.39	1.656	0.022	4.338
0.18	1.822	0.015	2.750
0	1.995	0.023	3.679

Leyenda: X = Media    M = Error de la Media.    C.V. = Coeficiente de variación.

NIVELES DE PMSG EN MUESTRAS DE CONCENTRACIONES ALTAS, MEDIAS Y BAJAS DE LA HORMONA.

Concentración de PMSG (UI/ml)	X	M	C.V. %
Alta	0.858	0.012	4.534
Media	1.070	0.022	6.571
Baja	1.560	0.013	2.697

Leyenda: X = Media. M = Error de la media. C.V = Coeficiente de variación



**Asociación entre los valores de Densidad óptica (D.O.) y Fracciones de diferentes concentraciones de PMSG según el método de microELISA.**

SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.

Concentración de PMSG (UI/ml)	X	M
0.18	1.822	0.02
0.00	1.995	0.02

Leyenda: M = ERROR STANDARD DE LA MEDIA; X = MEDIA.

T = - 6.142

PROBABILIDAD =  $4.221 \times 10^{-6}$

### **ESCALADOS NACIONALES DEL ELISA.**

Hasta este momento se han realizado dos escalados nacionales para ver el comportamiento de estas técnicas aplicadas a un número grande de muestras, estos escalados se han realizado en diferentes provincias del país y en este trabajo presentamos los resultados de las campañas de 1997 y 1998.

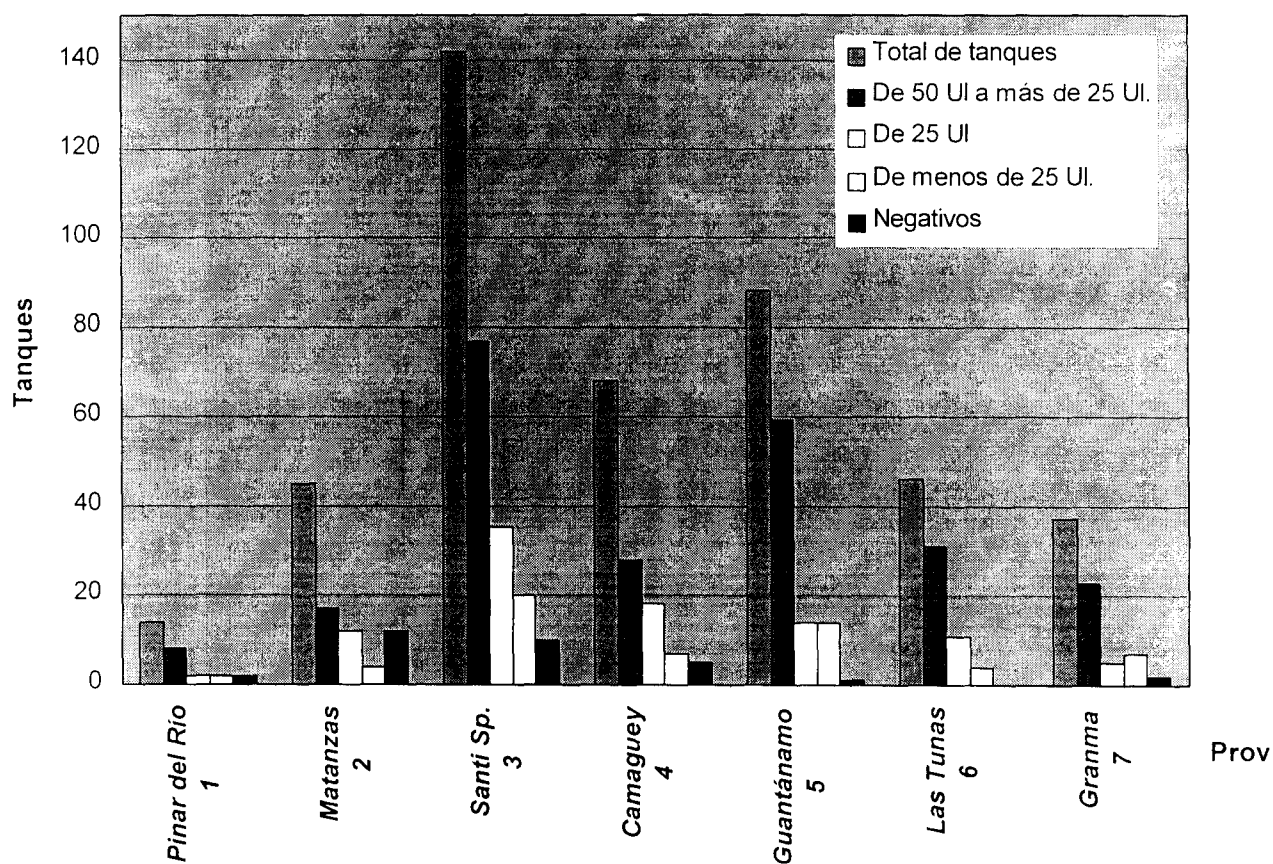
### COMPORTAMIENTO DEL ESCALADO DE **ELISA** DURANTE LA CAMPAÑA DE 1997.

Nº	Provincia	Total de Tanques	De 50 UI a más de 25 UI.	De 25 UI	De menos de 25 UI.	Negativos
1	Pinar del Río	14	8	2	2	2
2	Matanzas	45	17	12	4	12
3	Santi Sp.	142	77	35	20	10
4	Camaguey	68	28	18	7	5
5	Guantánamo	88	59	14	14	1
6	Las Tunas	46	31	11	4	0
7	Granma	37	23	5	7	2
	<b>Total</b>	<b>440</b>	<b>253</b>	<b>97</b>	<b>58</b>	<b>32</b>
	<b>Por ciento</b>		<b>57.5 %</b>	<b>22.1 %</b>	<b>13.2 %</b>	<b>7.3 %</b>

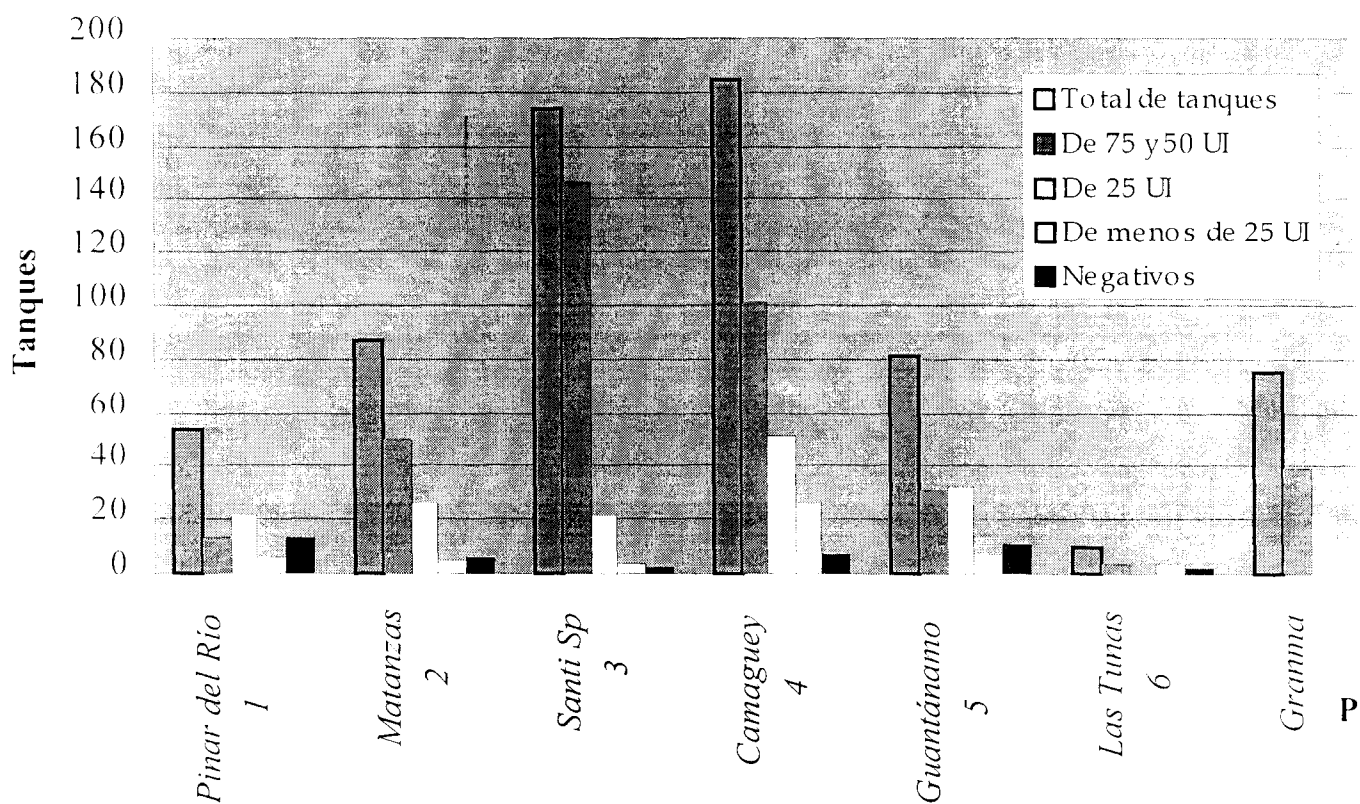
COMPORTAMIENTO DEL ESCALADO DE **ELISA** DURANTE LA CAMPAÑA DE 1998.

Nº	Provincia	Total de Tanques	De 50 UI a más de 25 UI.	De 25 UI	De menos de 25 UI.	Negativos
1	Pinar del Río	54	13	22	6	13
2	Matanzas	87	50	26	5	6
3	Santi Sp.	174	146	22	4	2
4	Camaguey	185	101	51	26	7
5	Guantánamo	81	31	32	7	11
6	Las Tunas	10	4	0	4	2

Comportamiento del escalado del **ELISA** año 1997.



N°	Provincia	Total de Tanques	De 50 UI a más de 25 UI.	De 25 UI	De menos de 25 UI.	Negativos
7	Granma	75	39	21	13	2
	<b>Total</b>	<b>666</b>	<b>384</b>	<b>174</b>	<b>65</b>	<b>43</b>
	<b>Por ciento</b>		<b>57.7 %</b>	<b>26.1 %</b>	<b>9.8 %</b>	<b>6.4 %</b>





Al comparar los resultados de las campañas podemos apreciar un aumento de la productividad considerable ya que de un total de 440 tanques de plasma colectados en 1997 pudimos superar esta cifra y en 1998 el total de tanques resultó ser de 666. También logramos disminuir la incidencia de tanques negativos en 1998 de 7.3% a 6.4% y la calidad del plasma obtenido en 1998 superó la de 1997, lo que se traduce en productividad y calidad del producto final.

En 1998 obtuvimos 22 tanques que se encuentran agrupados en la categoría de 75 y 50 UI, lo que corrobora lo anteriormente planteado.

Como podemos comprobar la disminución de la incidencia de tanques negativos resulta significativa, resultado que nos permite un mejor aprovechamiento de la materia prima que llega a la producción y a su vez esta técnica cuantitativa nos permite agrupar los tanques de acuerdo a su calidad para su mejor uso.

Para la purificación de la anti **PMSG** el método III resultó ser el más apropiado ya que este anticuerpo presentó mayor grado de pureza y al ser empleado en el ELISA se logró una mayor discriminación entre positivos y negativos con una considerable eliminación de uniones no específicas. En estudios anteriores se pudo determinar que la detectabilidad del método es de 0.18 UI por lo que debemos tener presente que el grado de pureza de los anticuerpos es fundamental dada la especificidad del método.

El método de purificación empleado para la **PMSG** resultó ser adecuado para obtener una hormona pura que cumpliera con los requerimientos de los métodos de diagnóstico.

## CONCLUSIONES

- \* Podemos concluir que con el empleo del **ELISA** en la producción de la **PMSG** garantizamos que la incidencia de tanques negativos se reduzca a un 7.3% en 1997 y a un 6.4% en 1998.
- \* Se logra un aumento del rendimiento y la productividad de la **PMSG** cubana con un mejoramiento de la calidad de la materia prima que llega a la producción que se nota por el incremento de estos parámetros al comparar el año 1998 con los resultados de 1997.
- \* El uso de este método nos permite separar el plasma de acuerdo a su calidad y así podemos garantizar la calidad de los lotes de producción.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cole H. H. y Hart G. H. 48 Hour assay test for equine gonadotropin with results expressed in international units. *Endocrinol.*, 29 (1941) 514.
2. Gaspardowicz D. Purification and physicochemical properties of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG). *Endocrinol.*, 91 (1972) 101.
3. Allen W. R. A quantitative immunological assay for pregnant mare serum gonadotrophin. *J. Endocrinol.*, 43 (1969) 581.
4. Stewart F., Allen W. R. y Moor R. M. *J. Endocrinol.*, 71 (1976) 371.
5. Peralta E. L. y Frías M. T. "Manual sobre Técnicas Inmunoenzimáticas ELISA", CENSA, EMPES, La Habana (1987).
6. Lecompte F. and Combarous Y. *J. of immunoassay*, 13 (1992) 483
7. Jacobsson K. European Committee for clinical laboratory standar guidelines for the evaluation of kits. Part 2 (1987).
8. Nakane P.K and Kawaoi A. *J. Histochem. Cytochem.* 22,1084,1974.
9. Lecompte F, Roy F, Combarous Y. International collaborative calibration of a preparation of equine chorionic gonadotrophin (PMSG NZY-01) proposed as a new standard. *J Reprod Fertil* 1998 May;113(1):145-50
10. Soumano K, Lussier JG, Price CA. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus F. *J Endocrinol* 1998 Feb;156(2):373-8
11. Butney VY, Gotschall et al . Hormone-specific inhibitory influence of alpha-subunit Asn56 oligosaccharide on in vitro subunit association and follicle-stimulating hormone receptor binding of equine gonadotropins. *Biol Reprod* 1998 Feb;58(2):458-69.
12. Lecompte F and Combarous Y., "Enzyme immunoassay (EIA) for equine chorionic gonadotropin/pregnant mare serum gonadotropin (PMSG/PMSG)". *J. of Immuoassay*, 13(1992)483.

## **ORGANIZACIÓN DE LA CAMPAÑA NACIONAL PARA LA OBTENCIÓN, CONTROL DE LA CALIDAD Y CONSERVACIÓN DEL PLASMA DE YEGUAS GESTANTES PARA PRODUCCIÓN DE PMSG/PMSG EN LA REPÚBLICA DE CUBA**

Orbe Luis Leguén Rodríguez, Arnaldo Capote Milanés, Jorge Luis Hernández, Juan E. Pérez, Mario Bello

LABIOFAM e-mail: labiofam@cenia.inf.cu

### **INTRODUCCIÓN**

La República de Cuba tiene una extensión de 114000 kms cuadrados. Tiene una división político administrativa de 14 provincias, además de un municipio especial. El país cuenta con un potencial equino de 20700 yeguas en el sector estatal, de ellas el 24 % está vinculada a la campaña nacional de sangría para la PMSG que se efectúa cada año entre los meses de Mayo a Diciembre debido a que las hembras equinas tienen su ciclo reproductor solamente durante cierto período del año. Estas se encuentran clasificadas dentro del grupo de los policíclicos estacionarios.

La recolección del plasma de yeguas gestantes en grandes volúmenes ha ido aparejado a la producción de esta hormona a escala industrial.

En Cuba se dieron los primeros pasos para organizar una campaña nacional para la obtención de plasma como materia prima para la producción de PMSG a partir del 16 de Octubre de 1978 en el centro equino "La Belén" municipio de Najasa, provincia de Camagüey (*Capote, A y col. 1978*). En esta fecha se inició una producción a escala semindustrial. Camagüey como la provincia más ganadera de Cuba se escogió para acopiar una cantidad apreciable de materia prima, fundamentalmente para impulsar el desarrollo del trabajo investigativo que se venía realizando con vistas al desarrollo de la tecnología para la obtención de gonadotropina sérica. En esta provincia se escogieron los centros que epizootiológicamente permitían tal tarea y presentaban un gran potencial equino.

En estudios realizados en la República de Cuba sobre la actividad de la PMSG en yeguas gestantes se comprobó que existe un período óptimo de actividad hormonal, reportado por otros autores como Rawland, IW1969 y otros. En Cuba este trabajo fue realizado en yeguas de la raza mestiza criolla y ponies (Welsh Mountain y Shetlon) ratificando que entre los 40 y 120 días de gestación se encuentra cierta concentración de PMSG y entre los días 60 a 80 de gestación es cuando alcanzan su nivel máximo de 6mg/ml (*Papkof, 1981*). También se comprobó que existe una estrecha relación entre la medida de los animales y la concentración de PMSG en el suero. Los animales ponies tienen mayor concentración de hormona en sangre que la mestiza criolla durante el mismo período de gestación. (*Barreto y col. 1974*).

Entre las razas equinas en Cuba la mestiza criolla es la de mayor representatividad numérica, por tanto es la que mayor cantidad de plasma aporta para la campaña nacional de PMSG. También existen zonas del país donde se utiliza el Burro como

semental en la reproducción con yeguas para la obtención de mulos que son muy utilizados para el trabajo en las zonas montañosas.

La concentración de PMSG/PMSG en la sangre de los animales donantes no solo depende del tiempo de gestación sino también de la raza, edad, factores medioambientales, raza, estatura, gestación al primer celo, cantidad de gestaciones, alimentación y otros. Los niveles de concentración de gonadotropina en sangre puede ser detectada a los 32 días de gestación (*Nett y cols, 1975*), pudiendo encontrarse hasta los 200 días de gestación (*Roser y Lofstedt, 1989*), la mayoría de los autores coinciden en que este tiempo oscila alrededor de los 40 a 130 días de gestación, y sus niveles máximos entre los 60 y 80 días de gestación. Esto es muy importante para la utilización más racional de los donantes y su máximo rendimiento de la gonadotropina en el suero.

## **OBJETIVOS**

Garantizar el plasma de yeguas gestantes en grandes volúmenes y con la calidad requerida que es la materia prima fundamental para la producción de PMSG a escala industrial.

## **DESARROLLO**

### **Epoca de campaña**

La campaña nacional que se efectúa cada año en la República de Cuba para la obtención de plasma de yeguas gestantes se desarrolla entre los meses de Mayo a Diciembre. Esta campaña se efectúa específicamente en esta época del año porque está directamente relacionada con la fisiología de la reproducción de la yegua, que es quien aporta la materia prima fundamental para la producción de PMSG.

La reproducción en el ganado equino es un proceso estacional. El período más fértil va de Abril a Octubre. Los potros nacen normalmente en primavera y verano, época en que el suministro de alimentos y las condiciones medioambientales son óptimas para las yeguas y sus crías.

### **Estacionalidad**

Los equinos son reproductores estacionarios. O sea alternan períodos de actividad sexual (la estación sexual) con períodos de inactividad sexual (la estación de anestro). En los equinos la actividad sexual se inicia cuando la duración de los días crece (reproductores de días largos) (*Ginther, OJ 1979*)

La glándula pial es el órgano más importante de regulación de la estacionalidad. La duración de los días se regula en la glándula pial a través de los ojos y de complejas conexiones neuronales.

En los equinos, que son reproductores de días largos el aumento de la exposición a la melatonina durante las largas noches (días cortos) inhibe la descarga de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias) . De esta manera se reconocen

las diferencias en la duración de los días y se traducen en señales que activan o anulan la actividad sexual. Allen WR 1990.

La campaña nacional de sangrías para la PMSG se comienza en el año 1981 colectando plasma de las provincias de La Habana, Matanzas, Villa Clara y Camagüey, pero se contaba con una sola brigada que se movía indistintamente obteniéndose volúmenes que oscilaban entre los 7 000 y 8 000 l de plasma por campaña. De este plasma se desechaba entre el 30 y el 40 % para la producción de PMSG por no tener actividad biológica. Para esta fecha aún no se contaba con una prueba que permitiera detectar rápidamente la presencia de PMSG en sangre, sólo se contaba con la prueba biológica en ratones según Larwine y Brown, 1954 que su lectura demora 72 horas. También se desechaba plasma por problemas de calidad debido a que no se contaba con los recipientes adecuados, ni existían las neveras suficientes para su conservación.

A finales de la década del 80 se crearon todas las condiciones materiales optimizándose en la década del noventa y se confeccionaron normativas para la obtención del plasma equino para la producción de PMSG, debido a lo cual se crearon varias brigadas de sangría en distintas provincias que abarcan todo el territorio nacional. Estas brigadas están constituidas por tres integrantes, un médico veterinario y dos técnicos que es un personal capacitado y con experiencia en la actividad. Cada brigada cuenta con un transporte y tiene los medios y materiales necesarios para garantizar el trabajo.

La brigada No 1 incluye el territorio de Pinar del Río y La Habana. La brigada No 2 la provincia de Matanzas, parte de Villa Clara y parte de Cienfuegos. La brigada No 3 la provincia de Santi Spiritus, Ciego de Avila, parte de Villa Clara y Cienfuegos. La brigada No 4 la provincia de Camagüey que es la mayor ganadera del país. La brigada No 5 la provincia de Guantánamo y Santiago de Cuba. La brigada No 6 la provincia de Las tunas y Holguín y la brigada No 7 la provincia Granma.

Generalmente los centros equinos en la república de Cuba se encuentran en lugares apartados, en zonas de difícil acceso durante la época de lluvia y otras se encuentran en zonas donde es imposible llegar con vehículos que no posean doble tracción, por ser zonas montañosas con pendientes muy altas (Yateras e Imías en Guantánamo, la Sierra Maestra en Granma, el Escambray en Santi Spiritus y la Sierra de los Organos en Pinar del Río).

#### **PARÁMETROS A TENER EN CUENTA PARA LA OBTENCIÓN DEL PLASMA EQUINO CON LA CALIDAD REQUERIDA.**

- 1- Selección de las unidades equinas.
- 2- Muestreos.
- 3- Sangría.
- 4- Decantación.

- 5- Almacenamiento.
- 6- Transportación.
- 7- Recepción para la producción industrial.

### **Selección de las unidades equinas**

Antes y durante la campaña cada brigada recibe un certificado médico emitido por el Instituto Nacional de Medicina Veterinaria del Ministerio de Agricultura de la República de Cuba que avala el estado epizotológico de las unidades libres de enfermedades infectocontagiosas.

Las hembras donantes deben oscilar entre los 3 y 10 años de edad, tener buen estado físico y de salud y estar entre los 45 y 120 días de gestación.

### **Muestreo**

Se toma una muestra de 5 a 8 ml de sangre a las hembras gestantes, con el suero de estas muestras se le hace un test diagnóstico por el método indirecto de inhibición de la aglutinación empleando reactivo de Latex para seleccionar los animales positivos como gestantes para realizar la sangría.

### **Sangría**

Antes de realizar la sangría se preparan las soluciones anticoagulantes, en estas se usa como reactivo el Oxalato de potasio y Oxalato de sodio.

Se preparan los materiales y útiles necesarios (frascos plásticos por 20 y 25 l, inyector, sifones, algodón y solución desinfectantes).

Se le oprime la yugular a la donante para realizar la punción previa desinfección del área.

A cada donante se le extraen aproximadamente de 4 a 6 litros de sangre teniendo en cuenta su estado físico. Durante la extracción es necesario mover el recipiente para evitar la coagulación y cerciorarse además de que la sangre corra por las paredes del recipiente para evitar hemólisis.

Al terminar la sangría se toman todas las medidas higiénicas sanitarias para proteger al donante.

A cada donante se le realizan de tres a cinco sangrías con intervalos de 15 días, teniendo en cuenta los resultados del primer muestreo solamente.

### **Decantación**

La sangre colectada es conservada en refrigeración entre 2 a 8°C durante 48 a 72 horas para que sedimenten los hematíes, obteniendo un rendimiento entre 50 y 60 % de plasma.

Se realiza en un área aséptica. Se decanta el plasma en tanques por 20 o 25 litros identificando el mismo, según la brigada.

## Almacenamiento

El plasma es almacenado en refrigeración a - 20°C, posteriormente es trasladado en un transporte refrigerado para ser utilizado en la producción.

## Recepción para la producción industrial

El plasma enviado al centro recolector nacional es recibido acompañado de un protocolo donde se describen los datos de la sangría (fecha, lugar, hora de sangría, donantes y otros datos del control de la sangría). A cada tanque se le realiza una titulación mediante el test de ELISA como contrapartida del test de Látex realizado a los donantes directamente.

Posteriormente al pool del plasma de varios tanques para la producción de un lote a escala industrial se le realiza una prueba en ratones para determinar actividad biológica.

Cantidad y calidad del plasma en tres campañas nacionales.

Campaña	Litros de plasma recolectado	Litros de Plasma con título positivo	Litros de Plasma sin título	% de litros de plasma con título positivo	% de litros de plasma sin título
1996	8555	6099	2456	71,3	28,7
1997	12384	10796	1588	87,2	12,8
1998	15288	14273	1015	93,4	6,6

Este trabajo primario de todo el proceso de producción de la PMSG a escala industrial tiene gran importancia ya que del resultado que se obtenga en la recolección de mayor cantidad de materia prima, esto repercute directamente en un aumento de la producción del producto final, que a la vez se traduce en tratar de satisfacer la demanda nacional de esta hormona y a la vez recuperar y mejorar nuestra masa ganadera. Un ejemplo de esto se refleja en los datos que a continuación relacionamos

Plasma colectado y producción de PMSG en el trienio 1996-1998.

Año	Plasma colectado (litros)	Producción de PMSG (dosis x 1000 UI)
1996	8555	40913
1997	12384	109169
1998	15288	134994
TOTAL	36227	277964

## Resultados de los tratamientos hormonales con PMSG cubana en el ganado bovino

	Tratamientos	Celos presentados	%	Gestaciones primer celo	% gestaciones contra celos	% gestaciones contra ttos
1997	41812	35609	85,2	16546	46,5	39,6
1998	64797	57583	88,8	39072	67,8	60,2

En el transcurso de una campaña pueden presentarse obstáculos que dificultan y repercuten negativamente en la obtención de mayor cantidad y mejor calidad del plasma colectado, entre los cuales señalamos los siguientes:

- La sequía disminuye la posibilidad de un buen pastoreo a los equinos, lo cual influye negativamente en el estado físico del rebaño, causando que haya desnutrición y un menor porcentaje de presentación de celo y además a los donantes se les puede extraer poca o ninguna cantidad de sangre durante los 45 a 120 días de gestación cuando el estado físico no lo permite.
- Los centros equinos con burros y yeguas representan un 11 % del total de la masa equina de nuestro país. En estos centros donde se realiza el cruzamiento la efectividad de la reproducción es muy baja, llegando solamente hasta un 40 %, la concentración de PMSG/PMSG en sangre es menor y desaparece alrededor de los 90 días.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Allen, W. R. Journal endocrinology, 1969. 43: 595-598.

Allen, W. R. Exogenous hormonal control of the mare's oestrus cycle. Simposium Reproduction Horse. Gent. Belgium. 1990.

Allen, W. R. y Morr, R. M. The origin of the equine endometrial cups. I. Reduction of PMSG by fetal trophoblast cells. J. Rep. Fert. 29: 313-316. 1972.

Allen, W. R; Lauria, Gandolfi. Inter-and extraspecies pregnancies in equids. Embryonic development and manipulation in animal production. 1992

Autin, C. R. Short R V Editores. Reproduction in mammals. 2<sup>da</sup> Edicion. Libro 3: Hormonal control of reproduction. Cambridge University Press, 1984.



Barreto, G. Estudio de la actividad de la Gonadotropina PMSG durante la gestación en Cuba. 1974.

Barreto, G. Estudio de la actividad de la Gonadotropina sérica (PMSG) durante la gestación en Cuba. 1975.

Bruin G, Fontijne P, Colenbrander B, Creemers J, van der Spek M. Fertility management and pregnancy rates on a studfarm. Symposium fertility and Reproduction in Horse. NRLO report nr. 92/21 1992: 16-7.

Capote, A . Comunicación personal. 1999.

De la Cruz, M. Comunicación personal. 1999.

Ginther, O. J. Reproductive Biology of the Mare. Ann Arbor, Michigan: Mc Naughton and Gunn Inc. 1979.

Hughes JP, Stabenfeldt GH, Evans JW. Clinical and endocrine aspects of the oestrous cycle of the mare. Proceedings of the Annual Convention of the American Association of the Equine Practitioner. 1972: 119-51.

Holy, L. Biología de la Reproducción. 1974.

Kasper, K. C; Fashandi, S.Le, T. y Marr, G. Dipstick test for pregnancy (PMSG) and oestrus (LH) in mares. J. Rep Fert. (suppl)35: 498-504. 1987.

Kindahl, H.,Knudsen,O; Madej, A. y Edqvist, L. E. Progesterone, Prostaglandin F2 $\alpha$ , PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. J. Rep.Fert. (suppl). 32:353-359.1982.

Peters Ar Ball P. J. Reproduction in cattle. Butterworth Ltd. 1987.

Papkoff, H., Variations in the properties of equine chorionic gonadotropin. Theriogenology 15: 1-11. 1981.

Roser, J. y Lofstedt, R. M. Urinary PMSG patterns in the mare during pregnancy. 1989.

Thibau HC, Levasseur MC. La reproduction chez les mamiferes et l'home. INRA ellipses. 1991.



Potencial equino estatal  
20700 yeguas

Vinculadas a la campaña de PMSG  
24%

# Brigadas de PMSG



1978- Inicia de la campaña nacional (4 provincias)

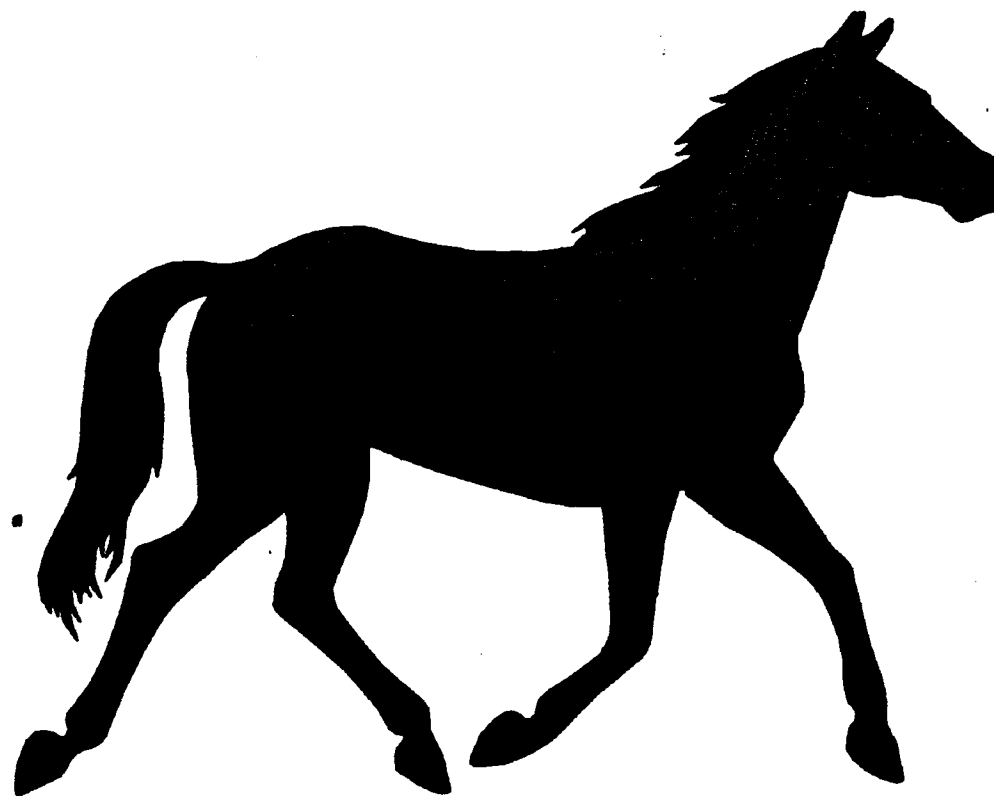
1981- Inicio de la producción semi-industrial (10 provincias).

1986- Creación de dos brigadas (Occidental y Oriental).

1991- Se crearon 5 brigadas.

1994- Se crean las 7 brigadas actuales.

# Epoca de campaña nacional para la obtención de plasma



E F M A M J J A S O N D

Meses del año

# Factores que influyen en la concentración de PMSG/eCG en sangre de la yegua gestante

Tiempo de gestación

Respuesta inmunológica

Raza

Estatura

Factores climáticos

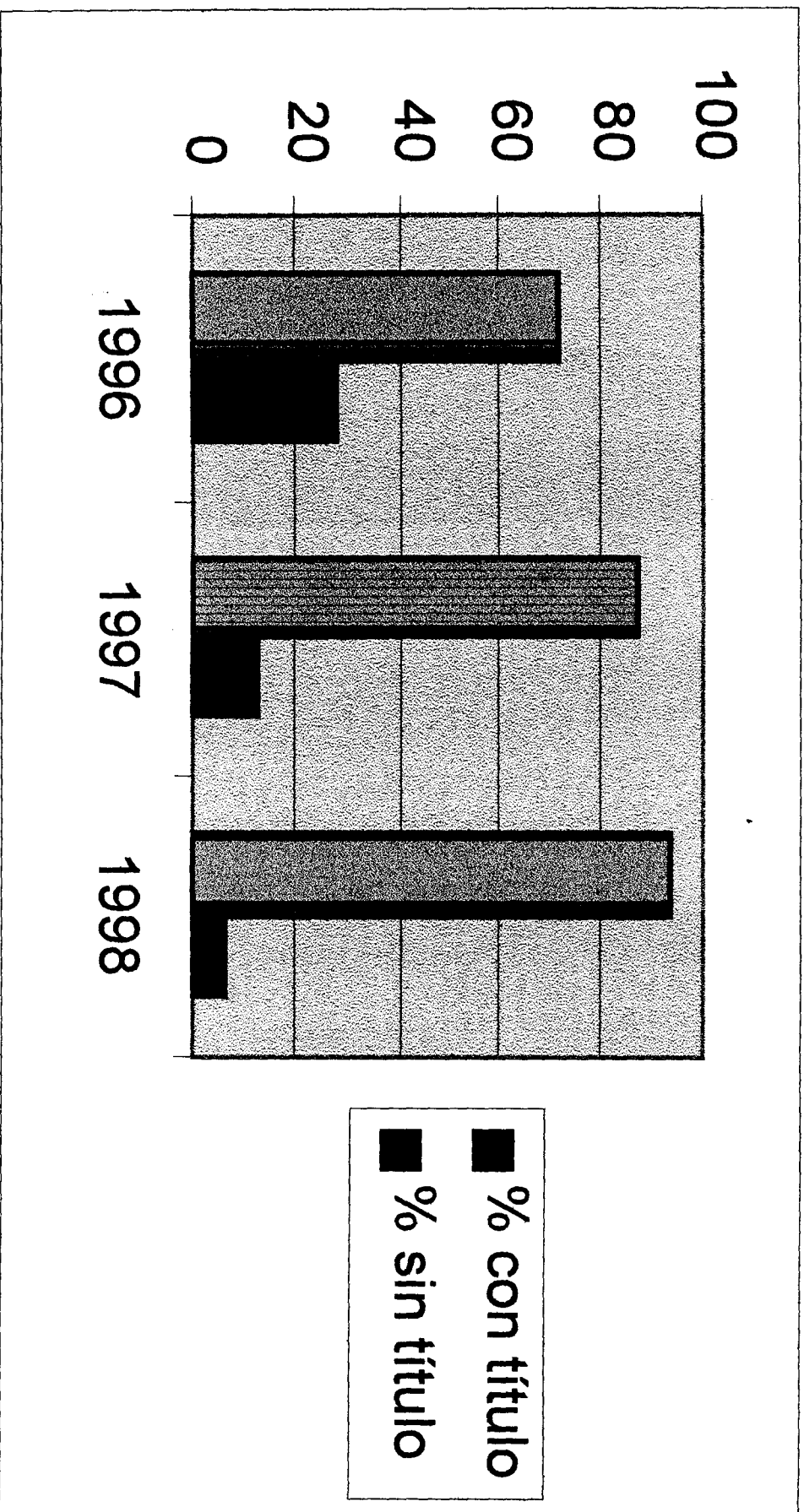
Cantidad de Gestaciones

Gestación en el primer celo

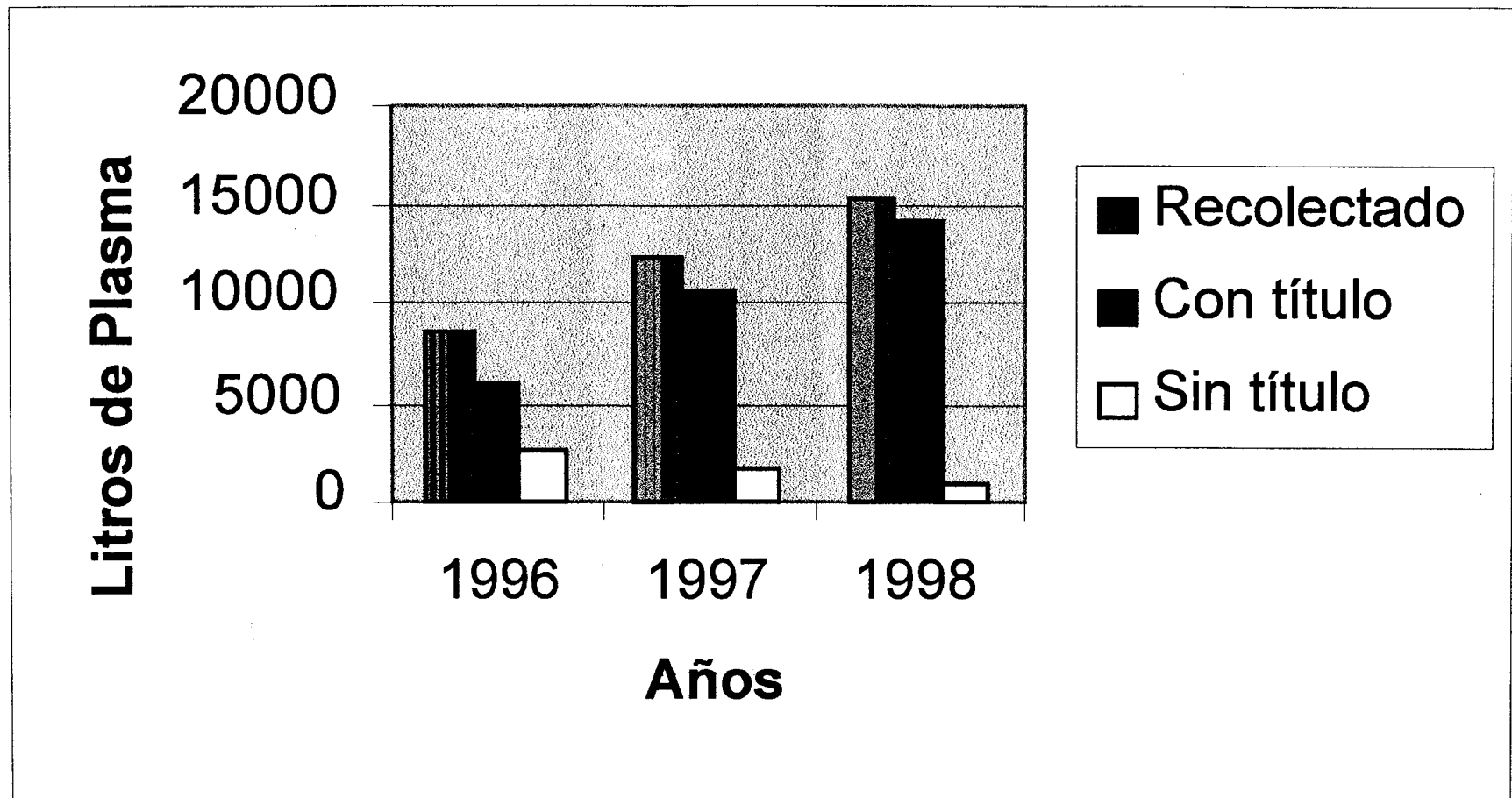
Alimentación



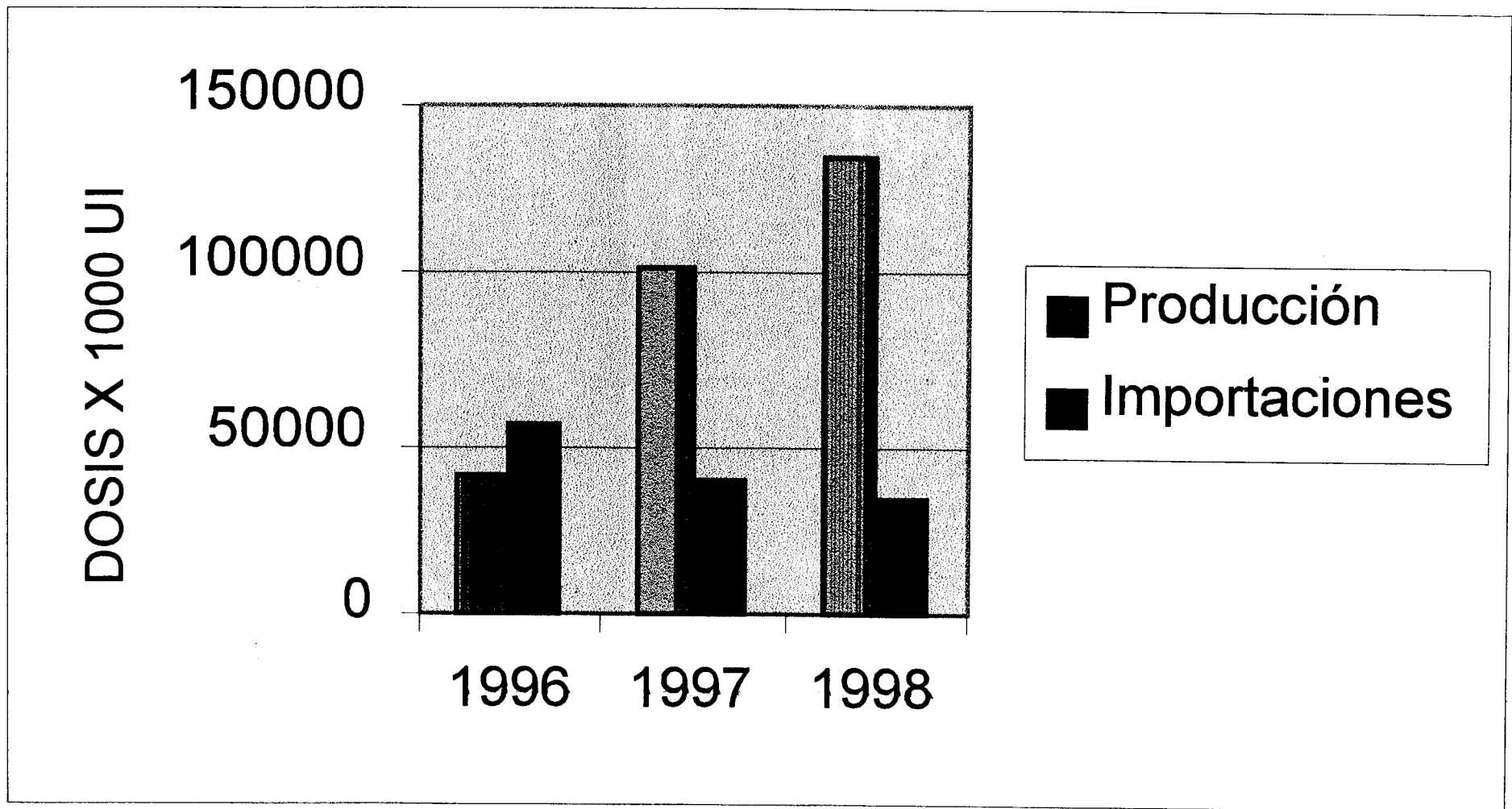
# *Calidad del plasma colectado en tres campañas nacionales*



# Cantidad y calidad del plasma colectado en tres campañas nacionales



# *Producción nacional e importaciones de PMSG/eCG*





## PURIFICACION DE LA PMSG EN UN EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE AVANZADA (AKTA explorer)

Adiley Gómez Oller \*, Claudia Mondéjar Noa\*, Olga Lydia López Suárez\*, Francisca A. García\*, Pavel Mustelier Zamora\*\*

\* Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) mail:labiofam@ceniai.inf.cu

\*\*Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBIOMED)

### RESUMEN

Con el objetivo de obtener una PMSG purificada de buena calidad, se probaron en el equipo AKTA explorer, 3 métodos de purificación en los que se venía trabajando con anterioridad y se logró llegar a uno novedoso partiendo de los resultados obtenidos en los anteriores (Método 4) que resume los parámetros empleados en los 3 iniciales, a cada uno de los métodos se le diseñaron 3 protocolos diferentes y de cada diseño se hicieron 6 réplicas aproximadamente resultando un total de 76 corridas experimentales, obteniéndose repetibilidad y calidad en los resultados de cada una de las corridas siendo muy alentadores en el método 4, por lo que se decidió estandarizar el mismo para el trabajo futuro a escala semindustrial.

### INTRODUCCION

Desde finales de la década del 70 especialistas e investigadores de los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) y de otros centros dedicados a las investigaciones para la mejora animal han trabajado en el desarrollo y perfeccionamiento de la tecnología de producción de la Gonadotropina Sérica Equina (eCG o PMSG) cubana, con el objetivo de obtener un producto cada vez de mejor calidad que satisfaga la demanda de la ganadería en nuestro país (*Cruz de la y col, 1975*).

Esta hormona es uno de los principales renglones de producción de nuestra empresa, por su gran demanda en la ganadería debido a su capacidad de incrementar la productividad en animales de interés económico para el país (*Cruz de la y col, 1980*).

.La PMSG es una hormona glicoproteica tiene un peso molecular de 61000 daltons (*Humphrey y col, 1979*), está formada por dos subunidades a y b de 44000 y 17000 daltons respectivamente (*Moore Jr y cols, 1980*) unidas por enlaces no covalentes, presenta receptores FSH y LH por lo que influye en la superovulación y regulación del ciclo estral siendo ampliamente empleada en el mundo entero para el tratamiento de los problemas de fertilidad (*Ungerfeld, 1998*).

Una de las líneas de trabajo en el perfeccionamiento de la tecnología de producción de la PMSG desde sus inicios ha sido aumentar el grado de pureza de la hormona lo cual está encaminado a tres fines fundamentales:

- Obtener un producto de calidad suficiente que pueda competir en el mercado internacional.
- Empleo en los medios de diagnóstico.
- Obtención de un patrón nacional purificado que se empleará para liberar nuestros lotes comerciales.

En este sentido se ha venido trabajando desde hace algún tiempo por especialistas nuestros y de otros centros en el desarrollo de diferentes protocolos de purificación de la PMSG, dentro de los cuales debemos mencionar el apoyo brindado por el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBIOMED) y el Centro de Inmunología Molecular (CIM), donde se han obtenido resultados muy alentadores en vista de lo cual se decidió extrapolar estos métodos y estandarizarlos en el equipo de purificación AKTA explorer. De los resultados ofrecidos por estos dos métodos se logró diseñar uno novedoso con muy buenos resultados que es el que se utilizará para hacer el escalado a nivel seminidustrial e industrial que es el objetivo final de nuestro trabajo.

## OBJETIVOS

- Estandarizar el método de purificación adecuado que brinde los mejores resultados para la obtención de una PMSG de alta calidad.
- Evaluar los resultados obtenidos con las diferentes técnicas, empleando como herramientas los métodos de diagnóstico y electroforéticos .

## MATERIALES Y METODOS

Los métodos de purificación de PMSG que utilizaron fueron:

1. El método de purificación de PMSG desarrollado y estandarizado en CIBIOMED, como parte de la colaboración que existe entre este centro y el nuestro (*Mustelier y colaboradores, 1990*), que utiliza cambio de pH en columnas de CM Sephadex.
2. Un método de gradiente de concentración de sales con matriz de SP Sepharose Fast Flow que es el método en el que se ha venido trabajando en el CIM.
3. El método 1 con cambio de pH pero con utilizando el intercambiador SP Sepharose Fast Flow que fué la empleada en el método 2.
4. Un método de cambio de pH y de los valores de concentración de sales con columnas de SP Sepharose Fast Flow (Método novedoso).

Todos estos métodos se estandarizaron en el equipo de purificación de alta tecnología AKTA explorer.

Se diseñaron 3 protocolos de purificación para cada uno de ellos, donde se cambiaron algunos parámetros de trabajo en el equipo tratando de optimizarlos y de cada protocolo se hicieron alrededor de 6 réplicas.

A continuación se describen cada uno de los métodos

#### Método 1

Empleamos una columna CM Sephadex 1 ml de Pharmacia (Columna de la firma y de poca capacidad que solo permite su uso para pequeños volúmenes de muestra).

Volumen de muestra empleado de 500 ml.

Tipo de muestra: Crudo de PMSG filtrada y clarificada. Lote semanal #4.

Buffer de corrida Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.5.

Buffer de elución Acetato de Sodio 0.1 M pH 8.5.

#### Método 2

Empleamos una columna Hi Trap SP 1 ml de Pharmacia (Columna muestra de la firma y de poca capacidad que solo permite su uso para pequeños volúmenes de muestra).

Volumen de muestra empleado de 500 ml.

Tipo de muestra: Crudo de PMSG filtrada y clarificada. Lote semanal #4.

Buffer de corrida: Acetato de Amonio 0.1 M pH 4.5.

Buffer de lavado: Acetato de Amonio 0.1 M pH 4.5.

Cloruro de Sodio 0.13 M

Buffer de elución: Acetato de Amonio 0.2 M pH 8.0.

#### Método 3

Empleamos una columna Hi Trap SP 1 ml de Pharmacia (Columna muestra de la firma y de poca capacidad que solo permite su uso para pequeños volúmenes de muestra).

Volumen de muestra empleado de 500 ml.

Tipo de muestra: Crudo de PMSG filtrada y clarificada. Lote semanal #4.

Buffer de corrida Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.5.

Buffer de elución Acetato de Sodio 0.1 M pH 8.5.

#### Método 4

Empleamos una columna Hi Trap SP 1 ml de Pharmacia (Columna muestra de la firma y de poca capacidad que solo permite su uso para pequeños volúmenes de muestra).

Volumen de muestra empleado de 500 ml.

Tipo de muestra: Crudo de PMSG filtrada y clarificada. Lote semanal #4.

Buffer de corrida Acetato de Sodio 0.1 M pH 4.5.

Buffer de elución Acetato de Sodio 6 M pH 6.5.

Se cambió la columna por una Hi Trap SP de 5ml también preempaquetada por la firma Pharmacia con el objetivo de aumentar el volumen de muestra a 2ml, bajo estas

condiciones se realizaron alrededor de 4 corridas y posteriormente se procedió a cambiar la columna por una de mayor tamaño que aceptara volúmenes de muestra de hasta 20ml para lo cual se empaquetó una columna XK 26/20 con 70 ml de gel prehinchado de SP Sepharose FF a un flujo de 10 ml/min, el volumen de muestra aplicado fue de 20 ml del mismo LS#4 usado para el resto de los métodos. Este escalado implicó un cambio completo de todas las conexiones del AKTA explorer para ponerlo listo para trabajos futuros a escala semindustrial e industrial.

Cada uno de los picos obtenidos en los diferentes métodos de purificaciones se analizaron empleando :

- \_ Electroforesis SDS PAGE.
- \_ ELISA.
- \_ Prueba biológica en ratones (*Loraine y Brown, 1954*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso de los métodos 1 y 3 los resultados fueron muy similares en todas las réplicas que se hicieron de los mismos solo se diferenciaron en el tiempo de elución de la hormona que fue menor cuando se usó el CM, lo cual se explica porque esta matriz es más débil que la SP y por tanto la hormona se desprende con mucha mayor facilidad ante cualquier cambio de fuerza iónica o de pH que sufra la matriz, pero el rendimiento y comportamiento electroforético de ambos picos de elución fue muy similar en ambos métodos, lo cual nos permite concluir que cualquiera de las dos matrices se pueden utilizar para aplicar el método de purificación propuesto y que se basa en un cambio de pH.

En el caso del método 2 se pudo apreciar que en el cromatograma de corrida aparecía un nuevo pico cuando se aplicaba el buffer de lavado pero el pass era en este caso de menor tamaño que en los métodos 1 y 3 mientras el pico de elución de la hormona era muy semejante al obtenido en los dos métodos anteriores en cuanto a su comportamiento en las pruebas de control aplicadas, lo cual nos llevó a concluir que con este método no se lograba quitar más contaminantes sino dividirlos en dos fracciones, aunque nos mostró algo muy importante y es que al aplicar un cambio de fuerza iónica a la columna acompañada de una variación de pH, la hormona se desprende más rápidamente por lo que es posible disminuirle el tiempo de aplicación del buffer de elución y de esta forma disminuir el tiempo de corrida lográndose además un mayor rendimiento, esto es muy importante pues si el método es para un escalado industrial las cantidades de muestra que se van a aplicar son muy grandes y el método no debe ser tan extraordinariamente largo pues hace muy engorroso el trabajo.

Por otro lado al analizar el comportamiento de los cromatogramas en todos los métodos se vió que no era necesario un cambio tan brusco de pH pues con solo uno ligero la hormona se desprendía de una y otra matriz de ahí que se decidiera cambiar el pH del buffer de elución de 8.5 a 6.5.

Todo esto nos llevó a crear una nueva metodología que fué la que denominamos método 4 donde se logran combinar los parámetros de cambio de pH con el cambio de molaridad así como reducir el tiempo de aplicación del buffer de elución a la columna. Este método se aplicó tanto para CM como para SP y los resultados cromatográficos, al igual que el comportamiento electroforético y la actividad biológica de los picos de elución fueron muy similares, lo cual nos abre el espectro de trabajo con respecto a las matrices a utilizar pues nos da la posibilidad de tener dos alternativas con resultados muy similares, la CM que es un intercambiador débil y el SP que es un intercambiador fuerte.

Una vez elaborado el método 4 y obtenido resultados tan alentadores con él con pequeños volúmenes de muestra, se decidió aumentar los volúmenes de la misma para obtener mayor cantidad de hormona purificada, lo cual constituyó el punto de partida para poner el equipo en condiciones para trabajos futuros en el escalado semindustrial e industrial de la hormona. Los cromatogramas obtenidos en estas corridas fueron muy similares a los del resto de las experiencias realizadas por lo que consideramos que estos resultados son muy alentadores para lograr nuestros propósitos.

Al analizar las electroforesis realizadas a los diferentes picos de elución obtuvimos tres resultados interesantes para nuestro estudio:

- 1) Los picos de contaminantes prácticamente no presentaron bandas correspondientes a las bandas de PMSG que presentaba la muestra de PMSG de importación que se utilizó como patrón y en casos que se presentara alguna banda de PMSG esta se encontraba a una concentración despreciable.
- 2) Las muestras purificadas presentaron un grado de pureza muy superior al crudo comercial y se acercaba bastante a la muestra de PMSG comercial.

Las valoraciones biológicas de los picos de elución de los diferentes métodos resultaron muy similares y coincidió que el título bajó de 3000UR que tenía el lote a un rango entre 2300-2480 UR para un rendimiento entre el 83.2 y el 84% aproximadamente.

## **CONCLUSIONES** \_\_

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que:

1. Se logró estandarizar un método de purificación para la PMSG.
2. Los parámetros de valoración empleados han presentado correspondencia por lo que pueden servir como herramientas para controlar la calidad el proceso de purificación.

## BIBLIOGRAFÍA

Cruz de la, M., Capote, A y Barreto,G., 1975. Producción de Gonadotropina Sérica. Sustitución de importación. . 12:17-19.

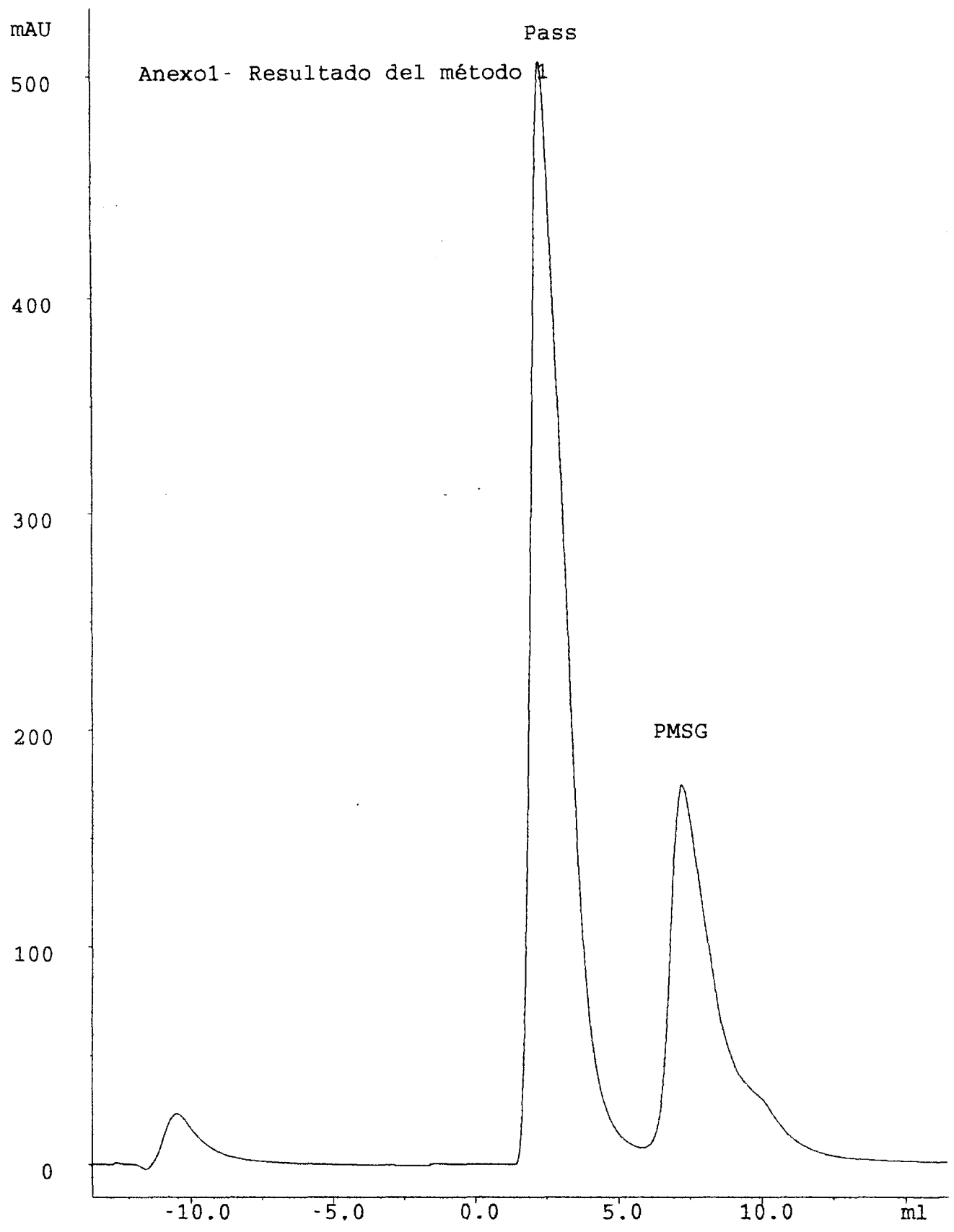
Cruz de la, M. y Capote,A., 1980. Estudio preliminar del efecto de la PMSG cubana en la ganadería en Cuba. Rev Reproducción Animal. Cuba 30:43-50.

Humphrey, W. D., Murphy, B. D., Rieger, D., Mapletoft,R.J, Manns, J. G. y Fretz, P. B., 1979. Effects of FSH >>LH ratio of PMSG on ovulatory responses. Theriogenocology. 11:101.

Loraine, L. A.y Browm, L. B., 1954. Determinación de actividad biológica en ratones. Acta End. Kbh. 172-179.

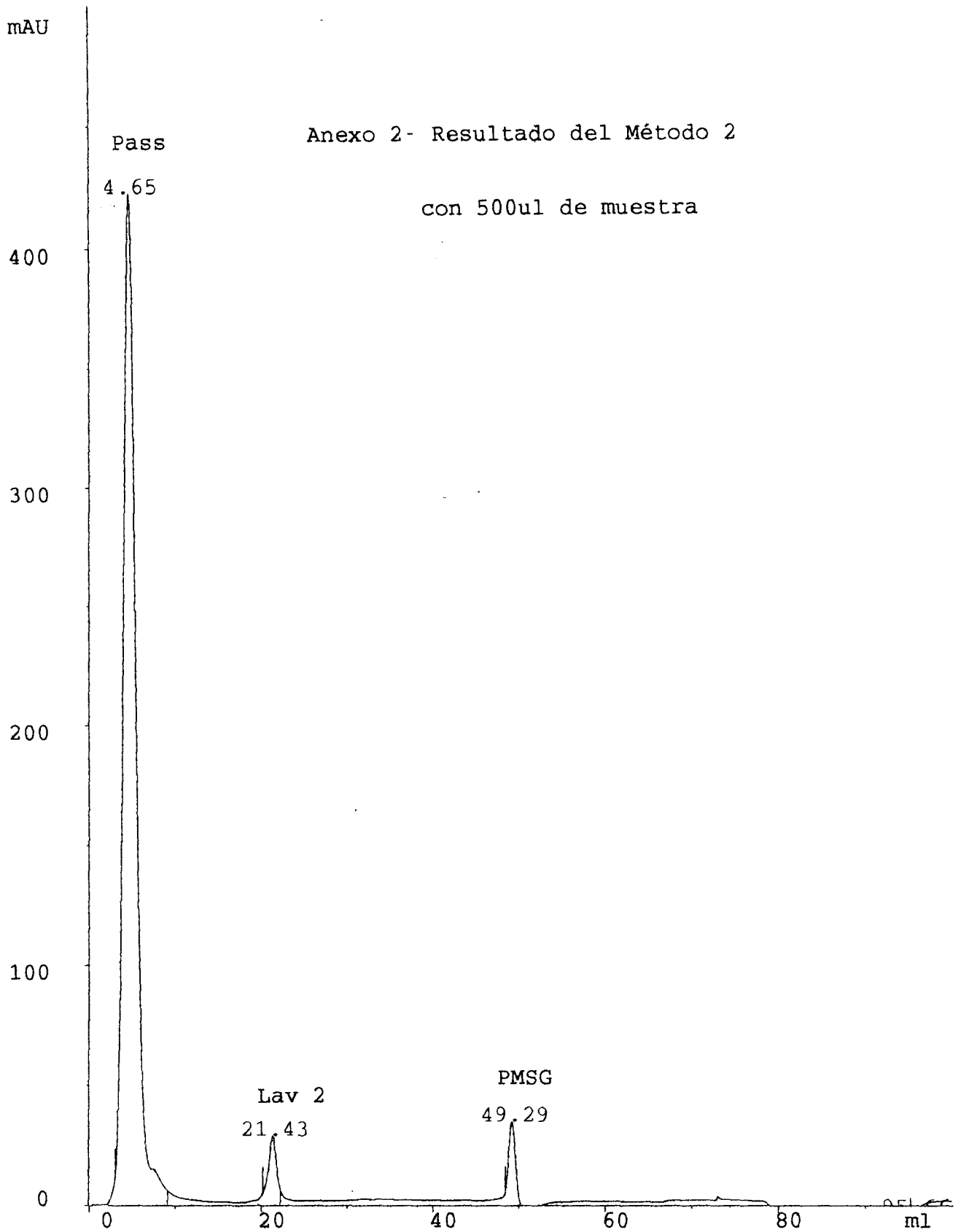
Moore Jr. W. y Ward, D., 1980. Pregnant Mare serum Gonadotrophin: an in vitro biological characterization of the lutropin-follitropin dual activity. J. Biol. Chem. 255:6930-6939.

testcm06:1\_UV1\_280nm



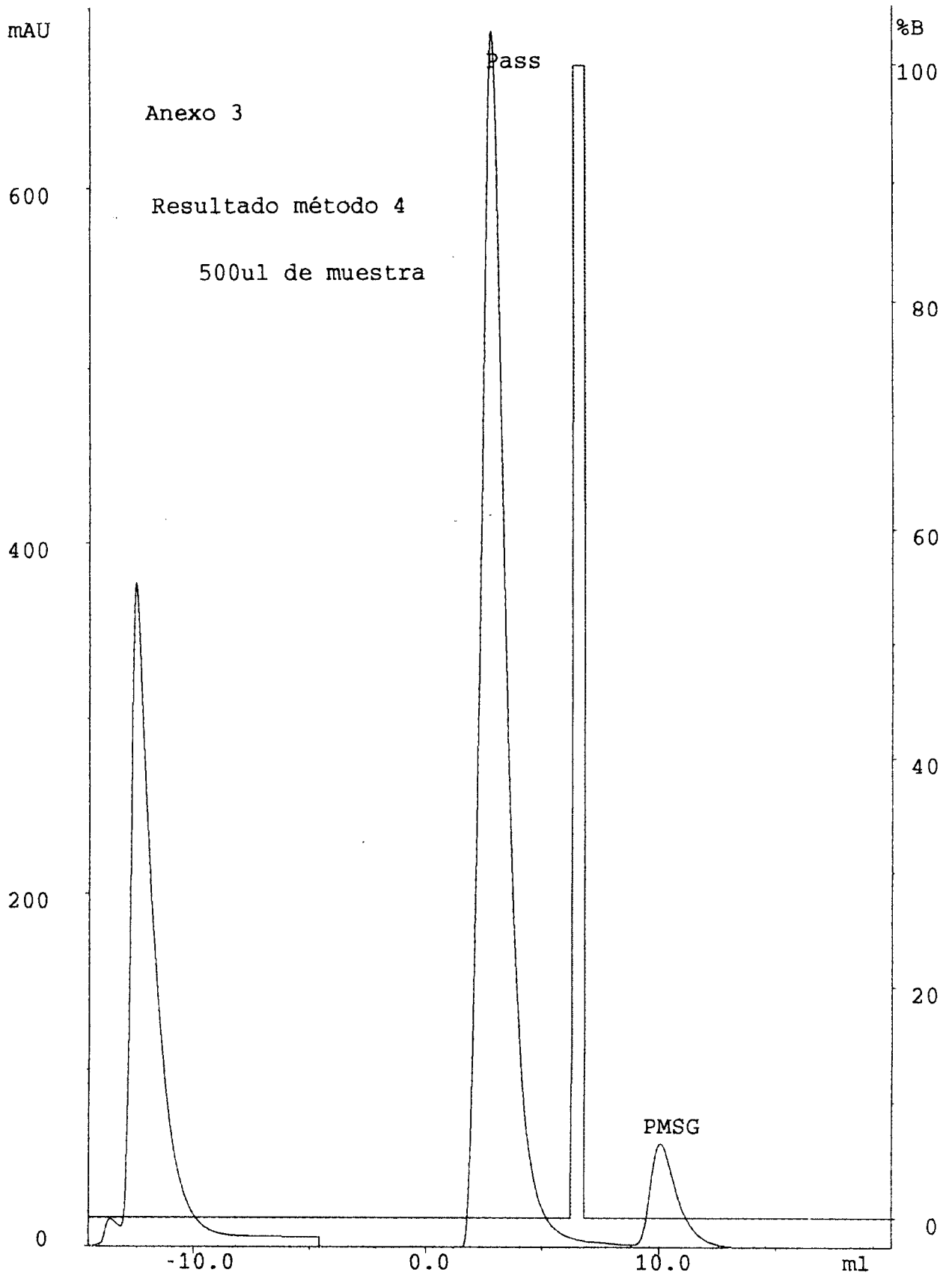
Anexo1- Resultado del método 1

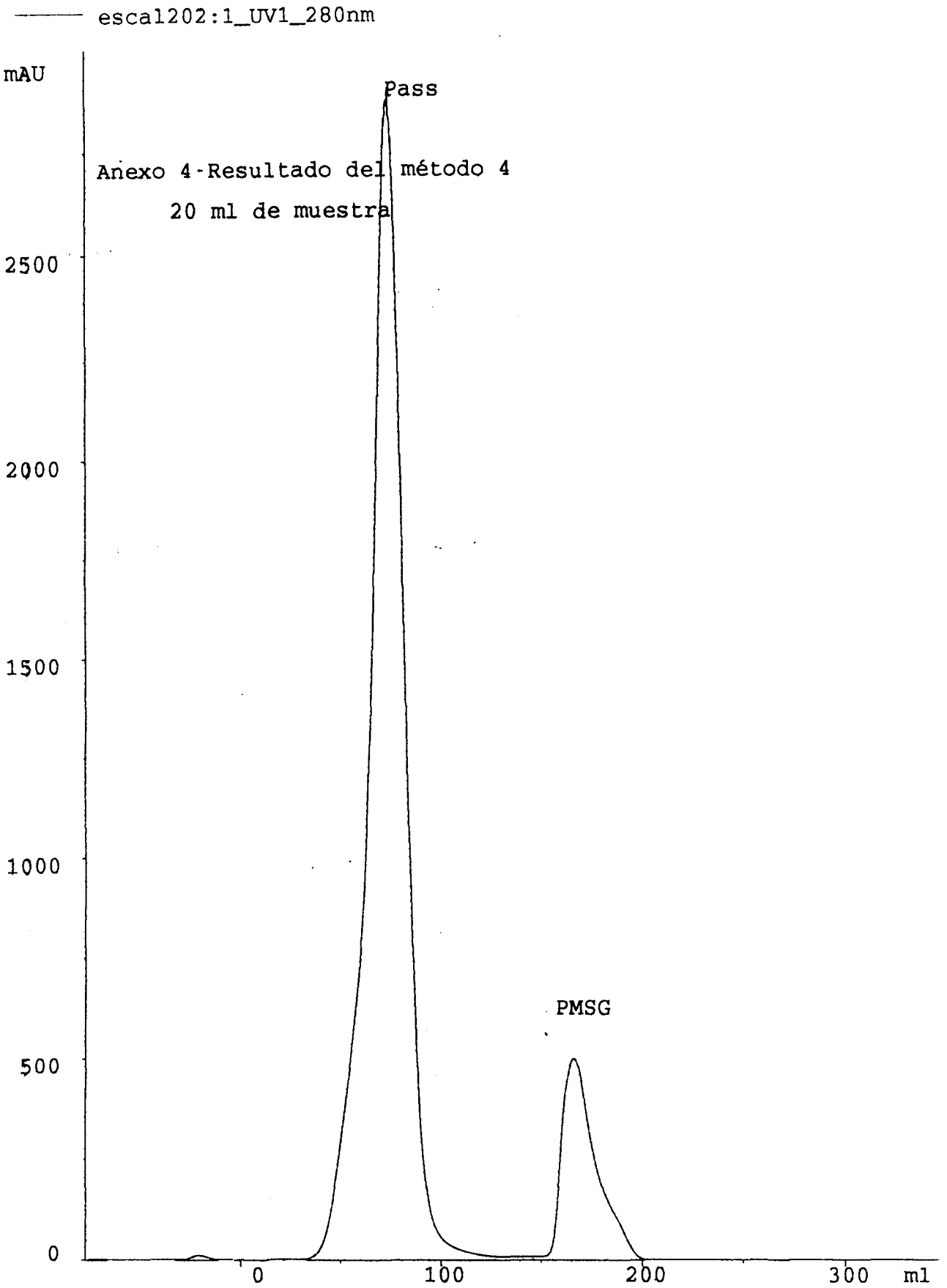
exper101:1\_UV1\_280nm



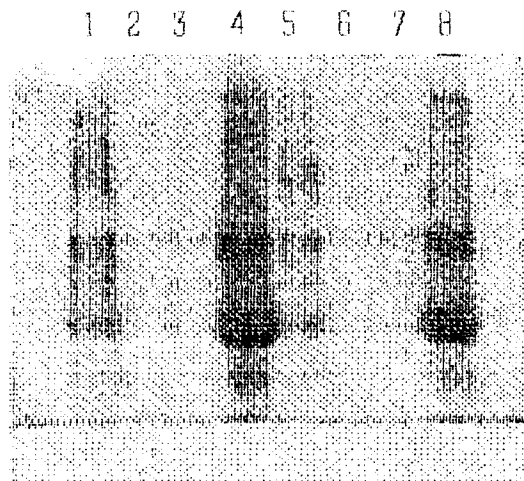


sptes309:1\_UV1\_280nm sptes309:1\_Conc





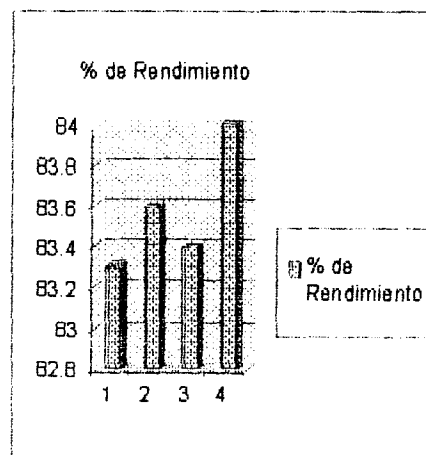
## Anexo. 5



- 1 y 5 - Lote comercial de PMSG      6 - Elución método 3.  
2 - Elución método 1                      7 - Elución método 4  
3 - Elución método 2.  
4 y 8 - PMSG importación.

## Anexo. 6

% de Rendimiento de los 4 métodos de purificación  
empleados basados en la actividad biológica



# ASPECTOS TEÓRICOS Y TECNOLÓGICOS SOBRE LA LIOFILIZACIÓN DE LA GONADOTROPINA SÉRICA (PMSG)

Antonio Casas

Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) mail:labiofam@ceniai.inf.cu

## INTRODUCCIÓN

### Liofilización

Uno de los problemas fundamentales abordados por los científicos, ha sido la conservación de los productos biológicos, químicos y alimenticios que son fácilmente desnaturalizables por la acción del agua, los microorganismos, las enzimas, el oxígeno y la temperatura, lo que limita la conservación de sus cualidades iniciales en el tiempo. Entre las modernas técnicas aplicadas para resolver el problema de la conservación de los productos lábiles; es la liofilización la que más ventajas aporta.

Las principales ventajas que presenta la liofilización son:

- La temperatura a la que es sometido el producto, está por debajo de la temperatura a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.
- Debido a la baja temperatura en que se opera, la pérdida de constituyentes volátiles es mínima
- El producto liofilizado es un sólido sumamente poroso, ocupando el mismo espacio total que ocupaba la solución original. La solubilidad es extremadamente rápida y completa.
- No hay desarrollo bacteriano ni cambio enzimático durante el proceso de liofilización, ni cuando el producto está seco.
- El producto puede ser conservado al vacío, lo que provoca que la cantidad de oxígeno presente sea nula y que los constituyentes fácilmente oxidables queden protegidos.
- El producto final obtenido posee un contenido muy bajo de humedad, pudiendo llegar a ser este inferior al 5 %. Por ello se logra un grado de estabilidad del producto difícilmente alcanzable por otro método de desecación.

### Procesos de liofilización

Por liofilización se entiende la desecación efectuada, a baja temperatura, de un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Es por lo tanto, el paso directo del hielo (estado sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en estado líquido.

El término liofilización se refiere a una de las propiedades más específicas de los productos secados por esta vía, la gran avidez por el agua o los solventes (lyo= líquido, phylos = amigos), que posee el producto seco y su estructura sumamente porosa, permiten la rehidratación rápidamente.

Etapas del proceso de liofilización:

- Congelación
- Sublimación (Desecación primaria)
- Desorción (Secado secundario)

### **Preparación del material.**

La liofilización de un producto puede realizarse a granel o por dosis. Para la liofilización de productos biológicos se emplean el ampolla o el vial, la elección de un tipo u otro de envase debe ser analizada de acuerdo a la utilización y dosificación del producto, la conservación del material y el precio del envase.

El empleo del vial está más generalizado debido a su facilidad de llenado y taponado, permite además el cierre de los frascos al vacío o en atmósfera de gas inerte, en el interior de la cámara de la liofilizadora al final del proceso, lo cual reporta la ventaja de no tener que emplear ambiente seco en la sala estéril, al retirar de la cámara los frascos herméticamente cerrados.

### **Congelación**

La congelación es un paso crítico del proceso de liofilización, ya que la microestructura formada durante la congelación determina la calidad del producto final y sus características de procesamiento, así como las velocidades de secado primario y secundario

#### **Secado primario. Sublimación del hielo**

La sublimación de un sólido es la transformación directa de este cuerpo al estado de vapor, sin pasar por el estado líquido.

El proceso de sublimación del hielo, es una reacción endotérmica, que requiere calorías para que el hielo sea sublimado en forma de vapor y para que este sea depositado en la pared fría del condensador, por lo que existen dos procesos simultáneos en el curso de la liofilización:

- Transferencia de calor: Es una transferencia de calorías desde las placas calefactoras hasta la superficie del producto.
- Transferencia de masa: Es la transferencia de vapor de agua desprendido del producto congelado, que debe alcanzar la superficie del condensador, atravesando el producto ya seco.

En la práctica el producto se congela y se comienza la sublimación, manteniéndose el suministro de calor de forma tal que la temperatura del producto no se incremente marcadamente y se asegure que la sustancia intersticial no disminuya su viscosidad y mantenga así la rigidez, para que no se manifieste el fenómeno de hundimiento de estructura durante la liofilización.

## **Fenómeno de hundimiento de estructura**

Este fenómeno consiste en la deformación de la estructura del sistema, durante la liofilización. Puede estar provocado por la fusión del hielo y dilución de la sustancia intersticial con pérdida de la viscosidad o por la pérdida de la viscosidad de la sustancia intersticial, debido a un incremento de la temperatura aunque no existiera fusión del hielo (24). Este fenómeno puede producirse aún después de que toda el agua congelada se haya sublimado.

Método para determinar la temperatura de hundimiento de estructura:

- Observación Microscópica.
- Análisis Térmico Diferencial (ATD).
- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).
- Termogravimetría.
- Conductividad Eléctrica.
- Observación durante la liofilización.

En general las sustancias que incrementan la temperatura de hundimiento de estructura poseen alto peso molecular, lo que implica un incremento de la viscosidad de la solución.

## **Calorimetría diferencial de barrido (dsc).**

La Calorimetría Diferencial de Barrido consiste en registrar durante el calentamiento, los eventos térmicos que ocurren en la muestra estudiada y que pueden provocar en ella cambios en su estructura. Dicho estudio se efectúa por comparación con una referencia inerte en el rango de trabajo. Es una técnica muy empleada mundialmente en el campo de la Criobiología, la liofilización y en general aquellas ramas de la ciencia en que se ha hecho necesario determinar las temperaturas críticas para la congelación.

Lo más importante es definir a que temperatura se inicia la fusión ya sea de las venas intersticiales o del propio hielo, por lo que la temperatura de fusión incipiente se convierte en el aspecto más importante del análisis y por encima de esta temperatura el producto comienza a perder rigidez mientras que por debajo de la misma se asegura que no haya indicio de fusión.

Recientemente mediante las determinaciones de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de los productos ya liofilizados con la ayuda de la Calorimetría Diferencial de Barrido, se ha demostrado que en función del grado de humedad residual, dichos productos pueden presentar una cinética de degradación muy superior a la esperada por la ecuación de Arrhenius.

Si durante el almacenamiento el producto queda expuesto a una temperatura ligeramente superior a  $T_g$ , se alcanzará un estado gomoso donde es la cinética de Williams-Landel-Ferry la que impera. La misma está regida por la ecuación:

$$K = C_1 ( T - T_g ) / C_2 + ( T - T_g )$$

donde:

$C_1$  y  $C_2$  : Constantes

T: Temperatura de almacenamiento

Cuando  $T \gg T_g$  o  $T \ll T_g$  el producto estará muy blando o muy rígido y en tales casos si se cumple la ecuación de Arrhenius.

### **Secado secundario. Desorción del agua residual.**

Al final de la fase de sublimación todo el hielo desaparece y la temperatura del producto tiende a igualar las temperaturas de las placas calefactoras. La humedad residual en este momento se encuentra entre el 1 y el 5 %. Aquí se inicia la desecación secundaria que elimina las últimas trazas de vapor de agua, evaporando la mayor parte del agua no congelada en el producto.

### **Caracterización termofísica de la formulación y establecimiento del ciclo de liofilización. Caracterización termofísica.**

Para ello se empleó la Calorimetría Diferencial de Barrido utilizando un equipo DSC-2 Perkin-Elmer.

Con el fin de determinar la temperatura de fusión incipiente (TFI), las soluciones se congelaron hasta  $-60^{\circ}\text{C}$  y se sometieron a un calentamiento progresivo de  $4.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , detectándose la temperatura a partir de la cual comienza el pico de fusión del hielo presente.

Para caracterizar los productos liofilizados una vez concluido el proceso de liofilización los mismos se enfriaron hasta  $0^{\circ}\text{C}$  y su temperatura se incrementó paulatinamente a razón de  $9^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta aproximadamente  $136^{\circ}\text{C}$ , observándose el valor de temperatura para el cual corresponde el punto medio de la inflexión de la curva ( valor de  $T_g$ ).

Luego de efectuar las determinaciones correspondientes mediante Calorimetría Diferencial de Barrido, la temperatura de fusión incipiente de la formulación ( TFI ) resulto ser:

Formulación	TFI ( $^{\circ}\text{C}$ )
1	- 20.1

La curva obtenida se muestra en el Anexo 1.

Teniendo en cuenta dichos valores se establecieron los parámetros de liofilización que se relacionan a continuación empleando un equipo con las siguientes características:

Tipo de máquina: USIFROID SMH-80

Tamaño de placa:

Número de placas: 6 + 1

Area total:

Espacio entre placa:

Número de bandejas para viales: 48

Capacidad en Kg de hielo: 80

Capacidad en viales ( 10 mL): 12 000

Sistema de enfriamiento: Expansión directa del líquido refrigerante (R-502) en las placas.

Sistema de calentamiento: Resistencias eléctricas en las placas

*a)- Preparación del equipo.*

Se pone en funcionamiento el equipo enfriando las placas a  $-50^{\circ}\text{C}$  antes de realizar la colocación del producto en las mismas.

*b)- Congelación.*

El producto es recibido dispensado en bulbos de vidrio para liofilización de 10 mL con calidad hidrolítica II suministrado por Saint-Gobain Desjonquieres (SGD) y con tapones de liofilización de 20 mm del tipo V 9032 suministrado por Helvoet Pharma, el producto debe ser enfriado hasta una temperatura de  $-45^{\circ}\text{C}$ , sin ser sometido a tratamientos térmicos durante la congelación y el tiempo aproximado de esta operación es de 3 horas.

*c)- Régimen de calentamiento y presión de vacío para realizar el secado primario y secundario.*

Una vez que el producto alcanzó los  $-45^{\circ}\text{C}$  se procede a realizar el vacío en el interior de la cámara, realizándose previamente el enfriamiento del condensador o trampa de hielo a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Cuando se alcanza en el interior de la cámara una presión de vacío inferior a 0.05 torr, se procede al calentamiento de las placas según el régimen siguiente:

Pasos	Temperatura de la placa ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (horas)
a	+5	10
b	+30	10

Los ciclos se consideraron concluidos cuando las temperaturas de los productos y las platinas se mantuvieron igualadas por al menos 4 horas. El tiempo de duración aproximado del proceso es de 23 horas.

*d)- Sellado del producto y ruptura de vacío.*



El producto es sellado bajo vacío en el interior de la cámara de liofilización empleando un sistema de sellado hidráulico, posteriormente a esta operación se rompe el vacío en el equipo utilizando aire filtrado estéril.

*e)- Descarga y retape del producto.*

El producto se extrae del equipo y se procede a la colocación de los agrafes (sellos de aluminio), empleando para esto una máquina retapadora Autopack (5000 bulbos/horas) y sellos de 20 mm.

Posterior a esta operación el producto es almacenado en neveras de conservación a la temperatura de 4° C y permanece en la misma durante todo el período de tiempo en el cual se realizan los controles de calidad para la liberación del mismo.

El producto obtenido con esta tecnología de liofilización es estable desde el punto de vista físico obteniéndose valores de humedad residual en el rango del 1 al 5 % determinados por el método Karl - Fischer.

La estabilidad física del producto liofilizado fue corroborada por los resultados obtenidos empleando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), obteniéndose como valor de temperatura de transición vítrea (Tg) 51,7 °C.

## **PURIFICACION DE LA PMSG/eCG POR CROMATOGRAFIA DE I.I CON GRADIENTE SALINO EMPLEANDO SP SEPHAROSE FF**

Mondéjar Noa, C\*, Polanco Pérez, R\*, Rodríguez Calle, R.M\*.  
Gómez Pérez, J-A\*\*, Fernández Mallo, M\*\*.

\*Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM)

\*\*Centro de Inmunología Molecular (CIM)

### **INTRODUCCION**

Cole y Hart en 1930 (1) descubrieron la Gonadotropina Sérica de yeguas Gestantes (**PMSG**) al inocular ratas y ratones inmaduros con sueros de yeguas en diferentes estadios de gestación, observando inflamación en el ovario (2).

Posteriormente se demostró que la hormona era sintetizada por los cuerpos endometriales que se forman sobre el día 36 de gestación a partir de la invasión y fagocitosis del epitelio maternal por las células trofoblásticas especializadas. Debido a su origen trofoblástico se consideró más apropiado el término de Gonadotropina Coriónica equina (**eCG**) (3).

La **eCG** pertenece a la familia de las hormonas glicoproteicas las cuales comprenden las hormonas pituitarias: hormona luteinizante (**LH**), hormona estimulante del folículo (**FSH**) y hormona estimulante del Tiroide (**TSH**). Estas hormonas son heterodímeros compuestos de dos subunidades unidas por enlace no covalente. La secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  es idéntica para las diferentes hormonas glicoproteicas aunque difieren en sus cadenas de oligosacáridos, mientras que la subunidad  $\beta$  de cada hormona posee secuencias únicas que confieren la especificidad hormonal. Las dos subunidades son producidas por genes separados con una única copia para la subunidad  $\alpha$  y una ó múltiples copias para la subunidad  $\beta$  (4).

La **eCG** tiene únicas e interesantes características que la distinguen del resto de otras glicoproteínas, como es su alto contenido en carbohidratos y actividad dual **FSH/LH** usada ampliamente en la producción animal y en la Medicina Veterinaria en la sincronización del estro en ganado (5) ovejas, y cerdos, para la inducción de la superovulación (6) y transferencia de embriones (7). También como antígeno para la producción de anti-**PMSG** empleada en el diagnóstico de infertilidad en cabras que han sufrido programas de reproducción (8) y en el mejoramiento de la fertilidad del estro inducido con **PMSG** en cerdos (9).

Por todo lo antes expuesto la **eCG** tiene valor comercial por su fácil colección y su bajo ritmo de inactivación en sangre periférica comparado con preparaciones de **FSH** y **LH**.

La obtención de la hormona purificada ha sido necesaria para el estudio de las características físico-químicas y biológicas. Además se ha utilizado para la producción de anticuerpos monoclonales liberados contra la **PMSG**, los cuales se emplean en los Kits diagnósticos, prevención y tratamiento de infecciones virales, eliminación de toxinas y

compuestos farmacológicos, manipulación de procesos fisiológicos tales como la regulación del crecimiento y la reproducción y su uso elimina diferentes inconvenientes que ocasiona el uso de antisuero policlonal como los relacionados a la estandarización, especificidad, contaminación viral y disponibilidad del producto (10).

Un método simple de obtención de **eCG** altamente purificada ha sido reportado por Gospadorawicz y Papkoff (11) empleando ácido metáfosfórico y alcohol al 50 % para precipitar las proteínas del suero unido a variaciones de pH y centrifugaciones del plasma en diferentes etapas del proceso, no observando diferencias en cuanto a la actividad de la hormona.

Además realizaron Gel Filtración en Sephadex G-100 y un paso final de Cromatografía de Intercambio Iónico en Sulfoethyl- Sephadex C-50 (12).

Posteriormente Schams y Papkoff (13) realizaron el mismo método pero emplearon primero la Cromatografía en Sulfoethyl- Sephadex y Gel Filtración sobre G-100 obteniendo mejores resultados.

Cinco años más tarde Papkoff, 1978 (14) obtuvo las subunidades de **PMSG** por disociación en 10 M de urea seguida de la separación sobre DEAE-Sephadex A-25 y Sephadex G-100.

El presente trabajo utiliza la Cromatografía de Intercambio Iónico y la Cromatografía de Filtración en Gel para purificar la **eCG**.

## **OBJETIVOS**

- Lograr una estrategia de purificación de la PMSG/eCG para la producción a gran escala y su comercialización.
- Obtener un producto homogéneo y pureza adecuada para su empleo en la Estandarización del Sistema de Testaje de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la PMSG.

## **MATERIALES Y METODOS**

El proceso de obtención de la hormona y la purificación se realizaron a temperatura ambiente.

### **Materia prima.**

Suero de plasma equino colectado de yeguas gestantes semipurificado por precipitaciones alcohólicas.

### **Proceso de purificación.**

Todos los equipos, geles y columnas empleadas pertenecen a la firma Pharmacia en caso que no se especifique lo contrario. Los reactivos empleados corresponden a la firma Merck.a menos que se especifique otra cosa.

### **Clarificación.**

El suero semipurificado se clarificó por filtro Sartorius SM 142 mm. En este proceso se emplearon las siguientes membranas:

Membranas	Cantidad
PF	1
1-2	1
0.8	1
0.45	1
0.2	1

La actividad biológica del suero se determinó antes y después de clarificar.

### **Proceso de Purificación de la Hormona.**

Se siguieron dos estrategias diferentes para la purificación de la hormona:

Se empleo la Cromatografía de Intercambio Iónico por ser una técnica de alto poder resolutivo y mayor capacidad de muestra .

El gradiente lineal fue realizado en un equipo FPLC y los gradientes por pasos en un sistema de baja presión y en un Akta explorer.

La columna empleada fue Hitrap SP 5ml.

El gradiente lineal salino utilizó como buffer A: Acetato de Sodio 0.1M, pH 4.5 y como buffer B: Acetato de Sodio 0.1M con Cloruro de Sodio 1M, pH 4.5.

Se aplicó 1ml de suero semipurificado, clarificado, ultrafiltrado, filtrado por Amicon 0.45 $\mu$ m y dializado contra el buffer Acetato de Sodio 0.1M pH 4.5. La velocidad del flujo

empleado en la corrida fue 0.5 ml/min y la sensibilidad fue de 0.1 UFC. El gradiente lineal se obtuvo ha aproximadamente 17 volúmenes de columna.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el gradiente lineal se fue ajustando la concentración de sal de lavado de contaminantes y elución de la hormona mediante gradiente por pasos hasta lograr las siguientes características ( Estrategia No. 1):

- Acetato de Sodio 0.1 M, pH 4,5 como buffer de aplicación.
- Acetato de sodio 0.1 M + Cloruro de Sodio 0.13 M, pH 4,5 como buffer de lavado.
- Acetato de sodio 0.1 M + Cloruro de Sodio 0.56 M pH 4,5 como buffer de elución.

Con éste método se obtuvo una PMSG parcialmente purificada, la cual fue sometida a Cromatografía por filtración en Gel empleando una columna XK 26/100 de Sephacryl S-200. Se utilizó buffer Fosfato 0,05M, pH 6,9. La velocidad de flujo empleada en la corrida fue 1mL/min y la sensibilidad 0,01 UFC. El pico obtenido de PMSG/eCG fue analizado por HPLC en una columna TSK 3000 SWxl (TosoHaas) y buffer PBS.

Posteriormente se decidió comparar los resultados de la Cromatografía de Intercambio Iónico de la Estrategia No. 1 con el método descrito por Gospodarowicz, D y Papkoff, H; 1976, empleando los mismos buffers pero cambiando la matriz de Sulfoethyl Sephadex C-50 por Hitrap SP 5 mL. El método se describe a continuación.

- Acetato de Amonio 0.01 M, pH 4,5 como buffer de aplicación.
- Fosfato 0.01 M, pH 5,9 como buffer de lavado.
- Acetato de Amonio 0.2 M, pH 8,5 como buffer de elución

Al comparar los resultados de los dos métodos se decidió realizar una combinación de ambos para lograr una pureza y actividad biológica más adecuada.

El método obtenido al realizar diferentes combinaciones fue el siguiente:

- Acetato de Amonio 0.01 M, pH 4,5 como buffer de aplicación.
- Acetato de Amonio 0.01 M + Cloruro de Sodio 0.13 M, pH 4,5 como buffer de lavado.
- Acetato de Amonio 0.2 M pH 8,0 como buffer de elución.

### **Técnicas analíticas.**

Para el testaje y análisis de las muestras obtenidas durante el proceso de purificación se realizaron las siguientes técnicas:

- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio (**SDS-PAGE**).
- Determinación de actividad biológica.
- Determinación de la densidad óptica.
- Determinación de la concentración de proteínas (**Lowry**).

### **SDS-PAGE.**

Se empleó un sistema de electroforesis vertical. Cada corrida tuvo una duración de 90 minutos a 80V. Los geles se realizaron de 12.5% de acrilamida y para la tinción se empleó Comassie blue R-250. Las muestras que lo requerían fueron concentradas por secado en un equipo de vacío (**LABCONCO CENTRIVAP CONSOLE**). Se utilizó como referencia un comercial de PMSG/eCG

### **Determinación de actividad biológica.**

Se empleó el método de ensayo del útero descrito por Loraine–Brown, 1954, para determinar las unidades ratón (UR) y para determinar las unidades internacionales (UI) por la BP 1980.

### **Determinación de la concentración de proteínas.**

Se realizó por el método de Lowry modificado (15), en placa de **ELISA**.

### **Determinación de la densidad óptica.**

Se determinó la densidad óptica por el método espectrofotométrico (16,17) en un equipo **ULTRO-PEC** a todas las fracciones obtenidas en el proceso de purificación.

## **DISCUSION**

En las condiciones seleccionadas para el Intercambio Iónico, la muestra a purificar se adsorbió al gel eliminándose en la fracción que no se adsorbe al gel, algunos contaminantes mayoritarios como la albúmina, Fig. 1.

Con el objetivo de ajustar la molaridad en el lavado se realizaron varias corridas y se determinó que a una concentración de 0.13 M de Cloruro de Sodio en el buffer Acetato se eliminaban otros contaminantes sin pérdida apreciable de la hormona, Fig. 2.

La elución de la hormona se logró a 0.56 M de Cloruro de Sodio sin observar pérdidas en la regeneración, Fig. 2.

El proceso de Filtración en Gel permitió separar la hormona de un contaminante minoritario de alto peso molecular, Fig. 3. El análisis por HPLC mostró la ausencia de fragmentos y agregados en la muestra de la hormona, Fig. 4.

Los resultados obtenidos con buffer acetato de sodio y gradiente salino fueron satisfactorios en cuanto a la pureza del producto, pero la actividad se vió afectada. Buscando una explicación a éste resultado se encontró un reporte en la literatura que plantea que la PMSG/eCG en soluciones no buferadas es estable por 2 días a 37°C,

mientras que en soluciones buferadas con acetato de sodio a pH 4,5 pierde el 50 % de su actividad (16).

El empleo del buffer de elución Acetato de Amonio 0.2 M pH 8.0 permitió la separación de la hormona de la matriz en condiciones más favorables para la estabilidad de la misma y con una mayor actividad biológica.

## **CONCLUSIONES**

1-Se logró un método de Purificación de la Hormona el cual podrá utilizarse en los Kits diagnósticos de detección de la PMSG/eCG.

2-Se obtuvo una eCG altamente purificada, la cual se está empleando en el sistema de testaje para la producción de un anticuerpo monoclonal contra la eCG con muy buenos resultados.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Walker Farmer S. and Papkoff H. 1979. Immunochemical Studies with Pregnant Mare Serum Gonadotropin. *Biology of Reproduction*. 21, 425-431.
2. Maurel M-C., Ban E, Bidart J-M and Combarous Y. 1992. Immunolochemical study of equine chorionic gonadotropin (eCG/PMSG): antigenic determinants on L and B subunits. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1159, 74-80.
3. Murphy B. D and Martinuk S. D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*. 12, No. 1.
- 4- Lecompte F. and Combarous Y. 1992. Enzyme Immunoassay (EIA) for Equine Chorionic Gonadotropin (eCG/PMSG). *Journal of Immunoassay*., 13(4), 483-493.
5. Schams D, Menzer Ch, Schallenberger E, Hoffman B, Hahn R. 1977. Some studies on Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) and endocrine responses after application for Superovulation in Cattle. Sreenan J. M., CEC Semin. Control of Reproduction in the Cow. Galway, 122-143.
6. Perez E., Dora J., Pedroso R., y Achong Q. 1994. Efecto de la aplicación del antisuero policlonal PMSG producido en Cuba sobre el mejoramiento de la fertilidad del estro inducido con PMSG en cerdos. *Rev. Cub. Rep. Animal* (20.2), 49-51.
7. Caral J., Solano R., Armas R. 1985. Superovulacion en novillas Holstein con Gonadotropina Serica y Prostaglandina F2 $\alpha$ . *Rev. Cub. Rep. Animal* (11.1), 15-23.
8. Butt W. R. 1975. *Hormone Chemistry*, 2<sup>nd</sup> Edit, vol 1. Ellis Harwood Limited Publishes, John Wiley and Sous, INC. New York, chapter 6.
9. Nell. T, Gielen J. 1995. The development of a monoclonal antibody against PMSG for veterinary application. *Livestock Production Science* 42, 223-228.
10. Cole H. H., Hart G. H. 1930. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Am J Physiol* 93:57.
15. Markwell, M. A. K., Hoss S. M., Bieben, L. L., Tolbert, N. E. *Anal. Biochem.* 87,206 (1978).
16. Merck Index eleventh edition. Centennial Edition.
17. *Methods Enzymology*. (1990) 182, 50-68.
18. Harrys E. L. V. and Angel S. (1989). *Protein Purification Methods. A Practical Approach* Oxford.



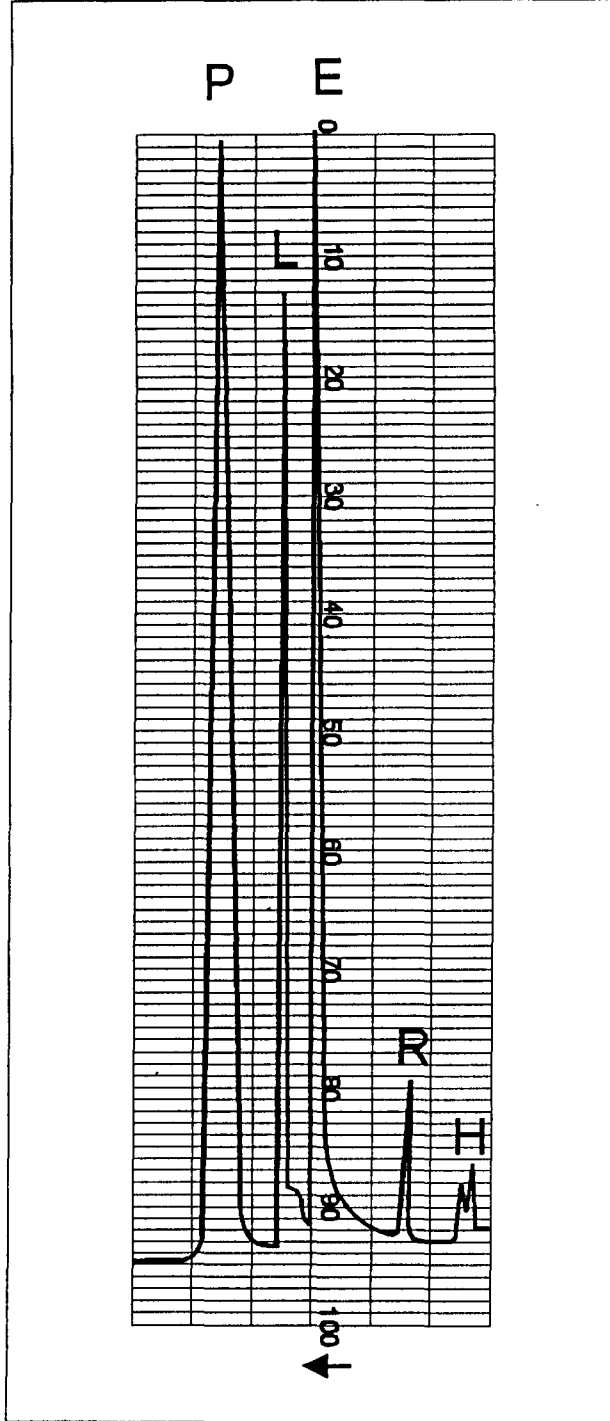


Figura 1 Purificación de PMSG (Estrategia No. 1)

P: Pass, L: Lavado, E: Elusión, R: Regeneración, H: Higienización



**Figura 2: SDS- PAGE (Estrategia No.1)**

**1: PMSG Comercial**

**2: Fracción que no se adsorbe al gel**

**3: Lavado**

**4: Elución**

**5: Regeneración**

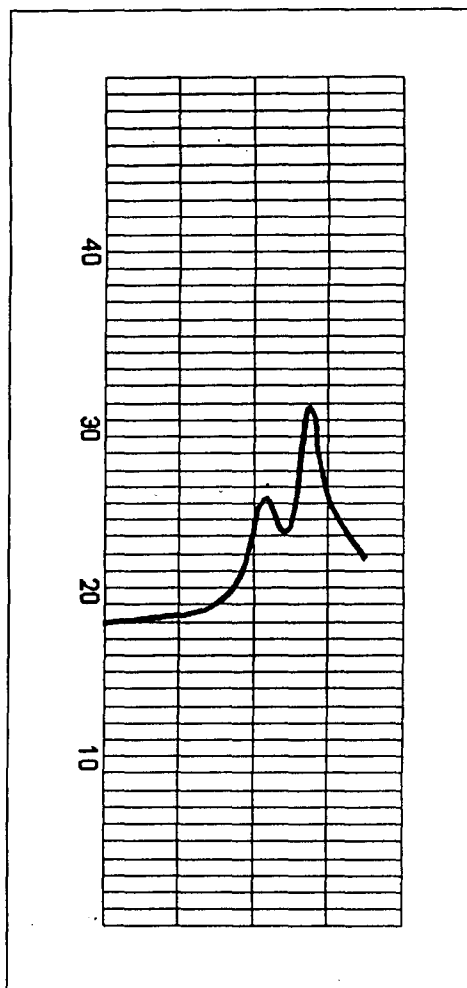


Figura 3 Cromatografía por Filtración en Gel

Pico 1: Contaminante, Pico 2: PMSG

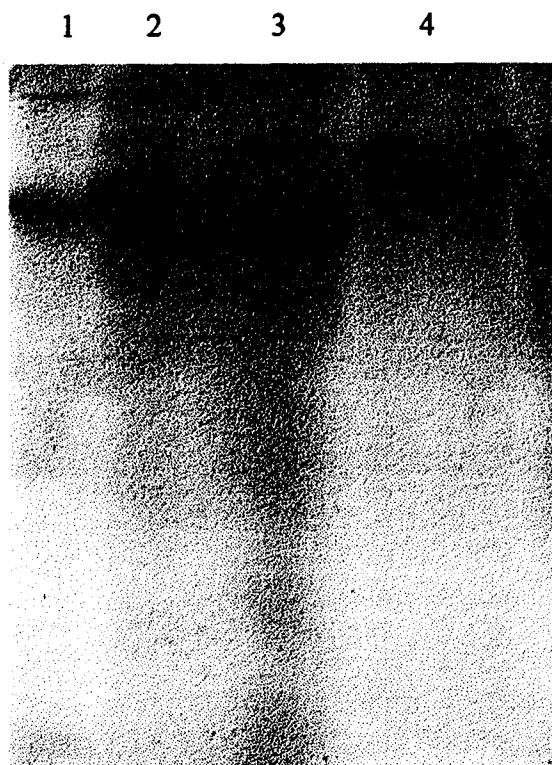


Figura 4: SDS-PAGE. Cromatografía por filtración en gel  
1: PMSG comercial  
2,3,4: Fracciones del pico de PMSG

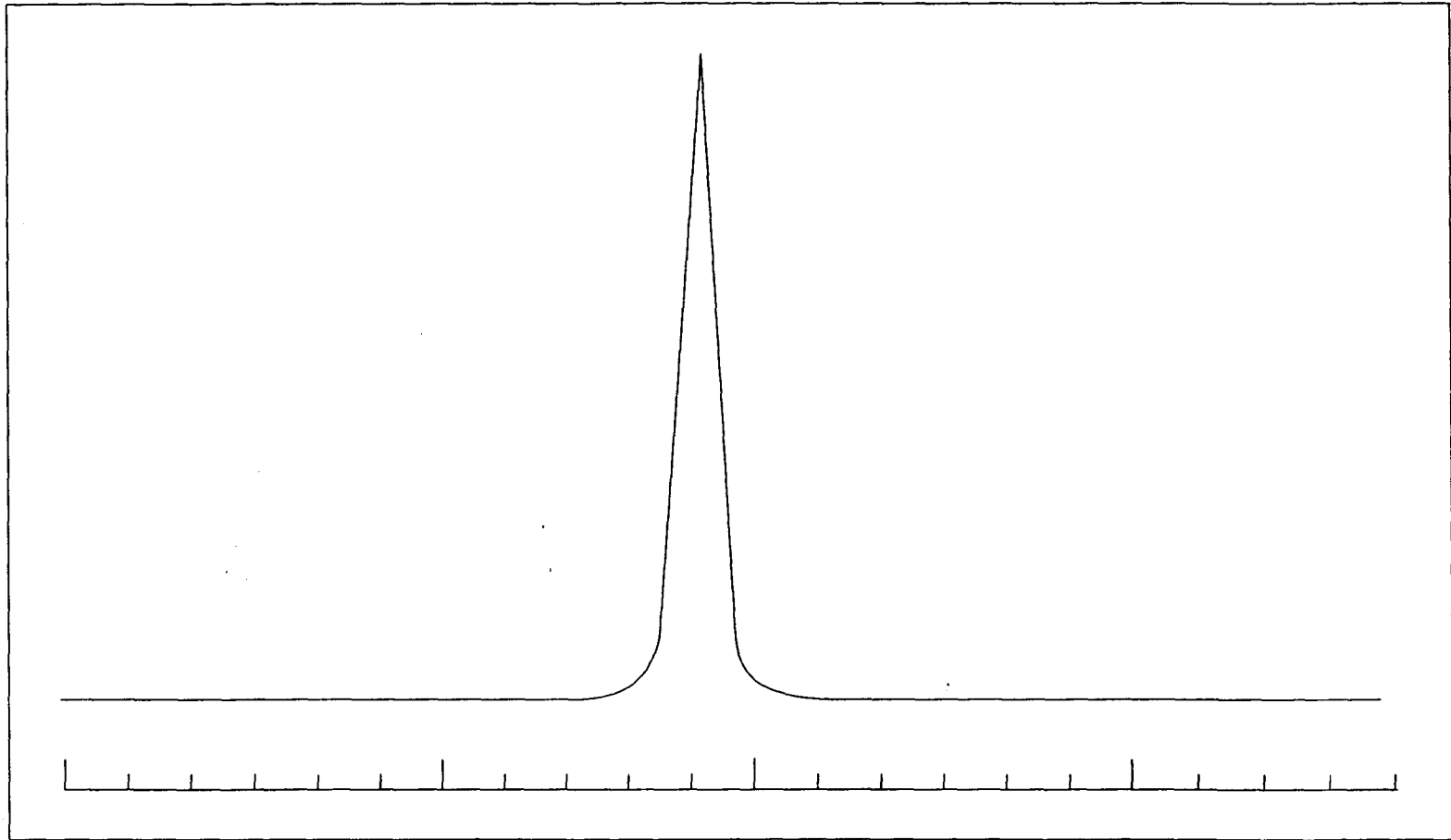


Figura 5 Cromatografía por Filtración en Gel en HPLC

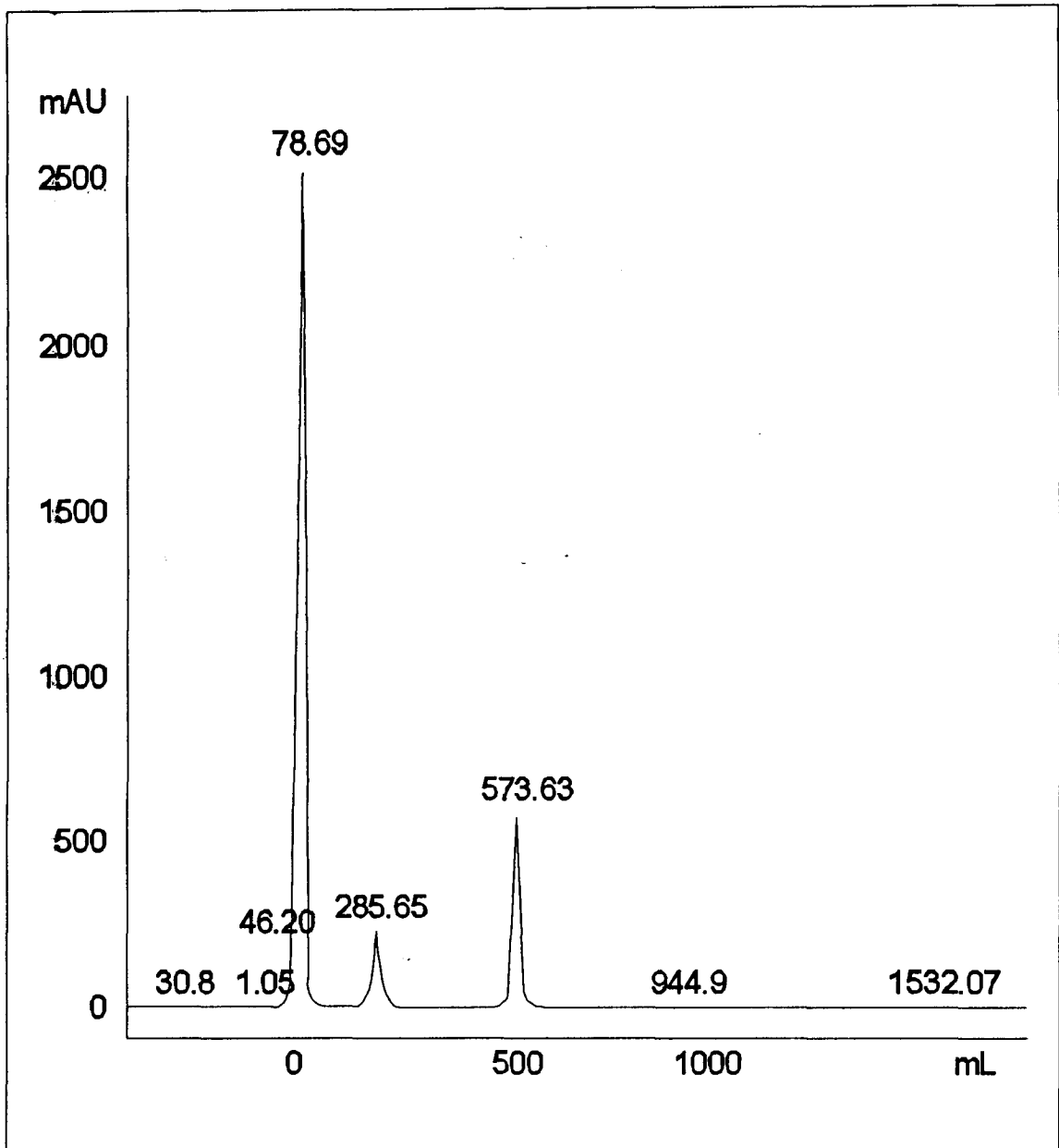
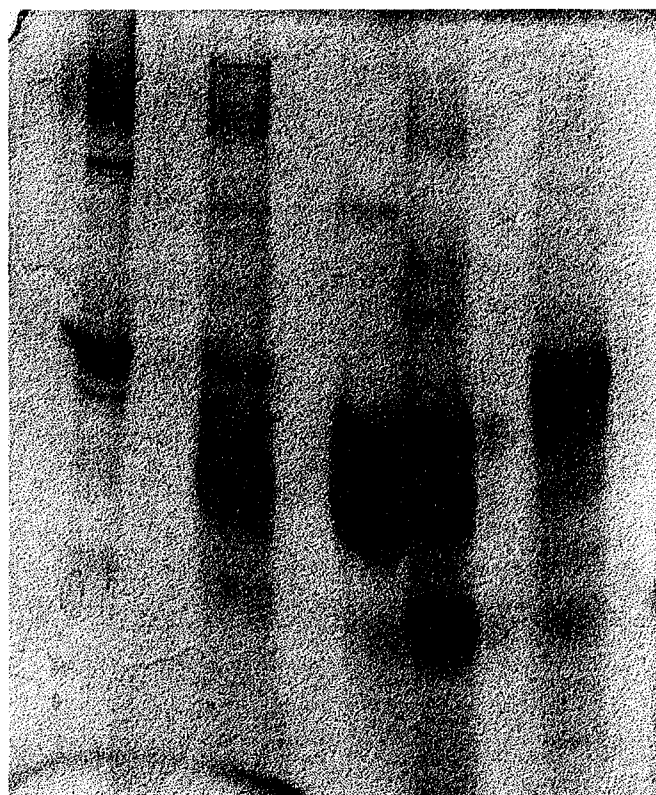


Figura 6 Purificación de PMSG (Estrategia No. 2)

Pico 1: Pass, Pico 2: Lavado, Pico 3: Elución

1 2 3 4 5



**Figura 7: SDS- PAGE (Estrategia No.2)**

**1: PMSG Comercial**

**2: PMSG sin purificar**

**3: Fracción que no se adsorbe al gel**

**4: Lavado**

**5: Elución**

## **PURIFICACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS. ALTERNATIVAS. APUNTES PARA EL ESCALADO.**

Pavel Mustelier Zamora

Centro de Investigaciones Biomédicas

La extracción de biomoléculas (proteínas, glicoproteínas, enzimas, etc.) de un material biológico puede ser dividida en dos pasos fundamentales: Aislamiento y Purificación. En el paso de aislamiento un producto crudo es obtenido por técnicas tales como: Digestión celular, Microfiltración, Ultrafiltración, Precipitación y Adsorción. El objetivo es obtener un material lo suficientemente clarificado del cual se puede purificar el o los componentes deseados.

Las técnicas empleadas en el proceso de aislamiento son de elevada capacidad de procesamiento de muestra pero de escaso poder resolutivo, es por eso que generalmente se aplican al inicio de un proceso de purificación. Por el contrario, las técnicas de purificación donde predominan los métodos cromatográficos muestran una menor capacidad de procesamiento de muestra y un elevado poder resolutivo.

Un plan de purificación se estructura de modo tal que combine adecuadamente técnicas cuyos principios sean diferentes, lo que permite distinguir un componente del resto de la mezcla biológica atendiendo a sus propiedades físicas, químicas y biológicas específicas.

Los métodos y técnicas destinados al aislamiento y purificación de proteínas se hacen extensivos al trabajo con glicoproteínas. Se aprovecha además el carácter distintivo que le confiere la fracción de carbohidratos presente en las glicoproteínas.

Los principales métodos cromatográficos empleados en la purificación de Glicoproteínas son: Cromatografía de Filtración en Gel (CFG), Cromatografía de Intercambio Iónico (CII), C. de Afinidad (CA) y C. de Interacciones Hidrofóbicas (CIH). La CII es usada en el 75% de todos los protocolos de purificación, seguida por la CA que es empleada en un 60%. La CFG y la CIH se utilizan en un 50% y 30% respectivamente, aunque la última cobra cada día mayor importancia en su aplicación. La Cromatografía de Fase Reversa virtualmente es de interés para péptidos y pequeñas moléculas orgánicas.

Es poco frecuente encontrar una técnica cromatográfica que permita la purificación de una proteína en un solo paso y que a la vez presente una alta capacidad, por lo que se hace necesario utilizar una combinación de varias técnicas para alcanzar un grado de pureza aceptable.

El proceso de purificación a escala de laboratorio desde su montaje debe estar diseñado con vistas al escalado, si este es el objetivo final. Es importante tener en cuenta que el número de pasos preparativos incrementa el tiempo de producción y el costo, por lo tanto el número de pasos debe ser lo más discreto posible en



dependencia de la complejidad de la muestra biológica. Lo mismo ocurre para el empleo de los métodos cromatográficos donde un producto casi siempre se purifica en un proceso de varios pasos manteniendo su actividad biológica. Es necesario que el proceso cromatográfico se diseñe de modo tal que la muestra no sufra acondicionamientos intermedios innecesarios de un paso de purificación a otro, tales como: Concentración, ultrafiltración o cambio de buffer por Filtración en gel. En este sentido las condiciones iniciales apropiadas para el paso siguiente deben ser simples de lograr (dilución, adición de sales, ajuste de pH).

La selección del paso inicial (Starting step) tiene un efecto decisivo en la economía del proceso porque la pérdida de producto es crítica en esta etapa.

Siendo la CII el método más empleado como paso inicial justifica comentar sobre la preparación de la muestra. Existen dos maneras de preparar el producto crudo que será sometido a CII y otras técnicas que requieren baja conductividad (incluyendo CA). Si la muestra se presenta a muy baja concentración ( $\leq 10$  mg/ml) puede simplemente ser diluida después, más si el producto tiene una concentración elevada (hasta 1g/L) debe usarse una CFG en su modo de "desalting". Esto es ventajoso porque no sólo se disminuye la fuerza iónica ( $\mu$ ), sino que pequeñas moléculas cargadas que luego pudieran disminuir la capacidad del intercambiador son así eliminadas.

En el proceso analítico la optimización se logra aumentando el número de análisis o corridas por unidad de tiempo y reduciendo la cantidad de muestra requerida. La tendencia es hacer las columnas más eficientes con tamaños de partículas más pequeños que dan el máximo número de picos. En contraste el principal propósito de optimización en cromatografía preparativa viene dado por el aumento de la productividad en cada paso, es decir, optimizar la cantidad de producto obtenido por unidad de tiempo con la pureza y actividad biológica deseada. Se aumenta la cantidad de producto procesado por corrida y la cantidad de recobrado.

La secuencia de pasos cromatográficos es importante para lograr separaciones adecuadas sin costos excesivos. En el paso inicial el producto es concentrado, prepurificado y liberado de impurezas de bajo peso molecular. Entonces la secuencia de purificación depende más de las características del producto intermedio que del material de partida.

Escoger la secuencia lógica es simple si la purificación comienza con una CFG en su modalidad de desalting. El producto intermedio tendrá un factor de dilución de 1.4 lo que requiere concentración. La CFG permite crear condiciones para el siguiente paso de modo automático (ajuste de pH,  $\mu$ ). Si en el paso inicial el volumen es notablemente reducido por CII, el segundo paso puede ser también una CII. Se da el caso que el mismo intercambiador sea adecuado si se varían las condiciones para aumentar selectividad.

Luego de un paso inicial por CII el producto intermedio tendrá una elevada  $\mu$  lo que hace factible el empleo de una CIH. En todos estos ejemplos un paso final altamente selectivo con CA puede ser incluido, generalmente después de la dilución que reduce

la fuerza iónica. Se debe tener en cuenta la presencia de proteasas, lípidos y otros constituyentes que puedan interferir, que necesiten de drásticas condiciones para su eliminación a la hora de usar una CA, es por ello que se prefiere en el paso final del proceso.

La Gonadotropina sérica equina (PMSG) es una glicoproteína de 53 Kd que se obtiene a partir de suero de yegua. Las características químicas, físicas y biológicas de la hormona permiten el empleo de diversos diseños de purificación por métodos cromatográficos. Tanto si el objetivo de la purificación es a nivel analítico o rebasa los límites del laboratorio es sin dudas la CII una herramienta indispensable. Teniendo en cuenta el número de pasos cromatográficos y el objetivo en cuanto a pureza final puede emplearse esta técnica en su modalidad de concentración donde la muestra es unida fuertemente permitiendo el empleo de elevados flujos (200 – 400 cm/ h) siendo el producto concentrado a un pequeño volumen. En el modo fraccionamiento una purificación significativa se logra en el paso inicial donde la mejor selectividad posible se alcanza mediante ajustes finos de pH y fuerza iónica.

Los intercambiadores catiónicos han sido los más empleados para purificar PMSG y su fortaleza depende del proceso y del objetivo del paso cromatográfico.

La CII puede estar seguida de una CFG para obtener un producto de elevada pureza. Una alternativa para purificación de PMSG lo constituye la CA. Esta técnica ofrece una selectividad máxima y elevada capacidad para la muestra.

Existen matrices para la separación específica de grupos de biomoléculas, que reaccionan reversiblemente con residuos de azúcares presentes en las glicoproteínas.

Así la Concanavalina A (Con A) una molécula que contienen residuos alfa D manopiranosil a alfa D glucopiranosil. Es por esto que la Con A se usa con éxito en la purificación de hormonas glicoprotéicas y otras glicoproteínas.

Una variante interesante, válida sobre todo en dependencia de las cantidades de hormona que se deseen obtener y de la disponibilidad de la hormona en su forma pura es el empleo del método de Bromuro de Cianógeno para inmovilizar Ligandos a matrices cromatográficas. Se obtendría un suero hiperinmune anti PMSG a partir de inmunización con la hormona pura. La fracción de anticuerpos se purifica por una técnica de elevado poder resolutivo (CA usando Proteína G o Proteína A Sepharose, CII con DEAE Sphacel, etc.) El anticuerpo se inmoviliza a una matriz de Sepharose mediante el método de I CnBr y se empaqueta en una columna donde la PMSG es purificada a partir de un extracto. La ventaja de este método resulta del empleo de un solo paso cromatográfico.

## PLASMA FRACTIONATION BY ETHANOL METHODS.

---

Lic. Armando Cádiz Lahens.  
Instituto Finlay, C. Habana, Cuba.

### INTRODUCTION

The fractional separation of the numerous species of proteins occurring in human plasma or serum has for a century been the concern of a large number of investigators with interests in medical or physico-chemical fields. In either instance, it is obvious that the separation should be made in such a way that the constituent, upon isolation, will retain as nearly as possible the characteristics it possessed when a part of the plasma mixture.

The proteins from human plasma were scarcely considered objects of therapeutical interest before the Second World War, apart from the occasional use of whole serum from convalescent individuals in the treatment of some of the infectious diseases.

During and after that short period great technical advances were made, with the result that the physician could make use of three human plasma proteins of major biological interest: fibrinogen, the main component of the blood clotting system; the immunoglobulins, carriers of antibody activity; and albumin, the main regulator of the colloid osmotic pressure of plasma. Nowadays all three proteins species are harvested on an industrial scale and with a degree of purity reaching 98 - 100 %. Considering that fibrinogen represents about 4 % of the total plasma proteins, immunoglobulins about 11 %, and albumin about 52 %, it is fair to say that nearly 67 % of the total plasma protein mass is available in the groups above mentioned. The remaining 33 % consist of well over a hundred different minor proteins species, most of which are known to be carriers of important biological activities.

The isolation and characterization of some of these minor components has proven to be a task of awesome complexity for which the use of refined methods of analysis is of no less importance than is the fractionation process itself.

## **ETHANOL PRECIPITATION.**

As an alternative to salt precipitation, ethanol has been used for several decades as an organic precipitant for proteins. The preparation of pure proteins from complex mixtures is facilitated by the influence of several factors on the precipitating action of alcohol.

Separations can be carried out in two different ways :

- conditions are chosen to maximize solubility of the desired protein and minimized solubility of all others. The desired protein stays in solution, while all others precipitate.
- The converse conditions are chosen ; the desired protein will then be selectively precipitated.

In the first case, the solubility of the protein sought for should exceed 10 g. / liter; in the second case, its solubility should be below 0.1 - 0.01 g. / liter.

By changing the parameters of precipitation, the solubility of the proteins to be separated can be made to differ by several orders of magnitude. Only large differences in solubility will ensure good yields.

It has to be kept in mind, however, that ethanol may influence protein - protein interactions.

## **PARAMETERS WHICH INFLUENCE PROTEIN SOLUBILITY.**

In comparison with other methods of separation, fractional precipitation has the advantages of simplicity and applicability to the demands of mass production. It does however, require the proper control of the following factors, which were first outlined by Cohn et al : temperature; pH; concentration of protein; ionic strength; and the dielectric constant of the medium.

Apart from its interaction with other variables, ethanol causes precipitation of proteins mainly because it significantly lowers the dielectric constant of the aqueous solution. Its prominent use becomes clear when the chemical and physico - chemical properties of the substances listed in table 1 are considered. Of the other solvents only methanol, diethyl ether and acetone have gained any practical importance. The high solubility of lipids in ether and acetone and the limited miscibility of ether with water as well as its tendency to

generate explosive mixtures have, however, severely limited the use of these two solvents.

**TABLE 1**  
**Dielectric constants of some solvents.**

<b>Solvent</b>	<b>Dielectric constant</b>
H <sub>2</sub> O	78
CH <sub>3</sub> OH	31
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	26
CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	21
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	4.4
CCl <sub>3</sub> COOH	4.6
CH <sub>3</sub> COOH	6.3
CH <sub>2</sub> OHCHOHCH <sub>2</sub> OH	56.2

Ethanol has a considerable number of advantages as a protein precipitant. It is therefore still the most used precipitant agent in large-scale production of plasma proteins.

In addition to the already mentioned low dielectric constant the following favorable properties of ethanol should be mentioned:

- Miscibility with water.
- Melting point depression to - 22 °C at a concentration 32 % (W/ W)
- No generation of explosive gas mixtures under normal ambient and working conditions.
- Low molecular weight of only 46 daltons.
- Highly volatile.
- Chemically relatively inert.
- Low toxicity.
- Inexpensive and easily available.
- Inhibition of bacterial growth and thus of pyrogen formation.

As mentioned above plasma fractionation is carried out in the " five parameter system" ( pH, ionic strength, temperature, protein and alcohol concentration ). Evidently a certain solubility of a particular protein can be obtained by many different sets of variables. For practical purposes, shifts in ethanol concentration and pH are of utmost importance. Ionic

strength is important in certain steps, e.g. the separation of globulin's, and has to be reproduced as exactly as possible.

The ionic strength of a solution is a parameter introduced by Lewis and Randall in 1921 which is defined as the half sum of the molar concentration ( $c_1$ ) of all the different ions present, each being multiplied by the square of its own valence ( $n_1$ )

$$I = \frac{1}{2} \sum c_1 \cdot n_1^2$$

The principle is best demonstrated with the aid of a few examples:

0.01M NaCl .....	$I = \frac{1}{2} [(0.01 \times 1^2) + (0.01 \times 1^2)] = 0.01$
0.01M $(\text{NSO}_4)_2 \text{SO}_4$ .....	$I = \frac{1}{2} [(2 \times 0.01 \times 1^2) + (0.01 \times 2^2)] = 0.03$
0.01M $\text{MgSO}_4$ .....	$I = \frac{1}{2} [(0.01 \times 2^2) + (0.01 \times 2^2)] = 0.04$
0.1M KCl + 0.01M $\text{MgCl}_2$ .....	$I = \frac{1}{2} [(0.1 \times 1^2) + (0.01 \times 2^2) + (0.12 \times 1^2)] = 0.13$

It will be observed that there is no direct method of calculating the ionic strength of a solution containing incompletely ionized salts or salts of polybasic acids such as  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Indeed, any phosphate buffer solution ( e.g. The well Known Sorensen buffer ) will contain a mixture of three anions with different valences :  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , and  $\text{PO}_4^{3-}$  whose relative proportions vary with the pH of the medium.

### THE PRACTICE OF FRACTIONATION WITH ETHANOL.

More than 50 years after the pioneering work of E. J. Cohn and his numerous collaborators most of the plasma processed throughout the world is still fractionated following the basic alcohol methods that have undergone many modifications by researchers all over the world. The aim of most of the modifications was the economical production, in good yields, of the few proteins that are used in large quantities in clinical practice. For clinical use, absolute purity of the proteins is not a requirement.

The fractionation schemes that are most often followed today - sometimes with minor modifications are presented in figs. 1 .

The simplified method was devised in Cuba which involved both shortening of the time and lowering of the volumes required per unit plasma. This shortened procedure was

shown to produce albumin and intravenous immunoglobulins, which would meet the quality control test for these products.

The modifications consist of :

- Using 95 % ethanol, precooled to - 15 °C or lower instead of 53.3 % as the reagent for the precipitation of fractions.
- Changing the ethanol concentration for the precipitation of fraction II + III from 25 % to 20 %.
- Precipitation and removal of fraction IV as a single fraction (fractions IV-1 and IV-4 together)
- Elimination of fraction II + III w.
- Changing the dilute buffers solutions by NaOH 1N and ClH 1N solutions.
- Changing liophylization by dia - ultrafiltration.

#### **GONADOTROPIN FROM PREGNANT MARE'S SERUM.**

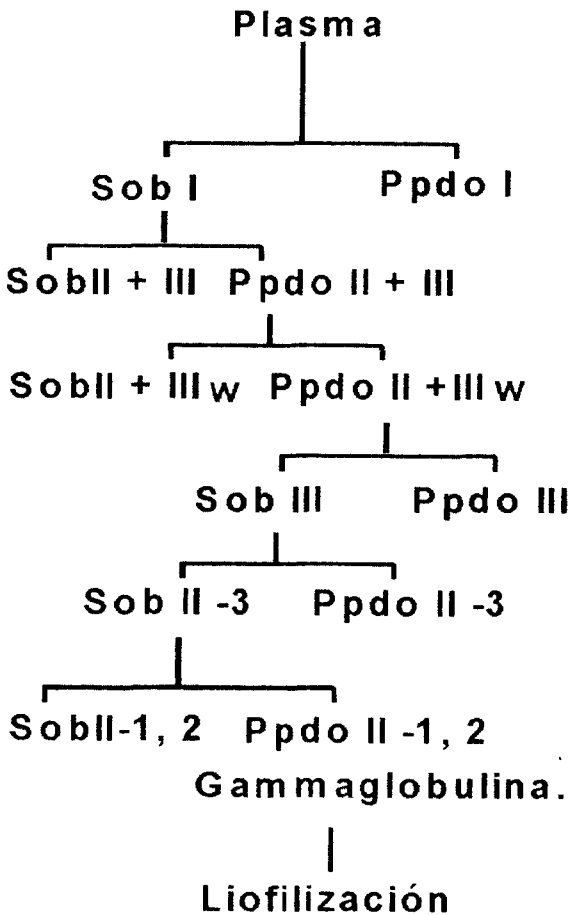
The hormone richest in carbohydrate is the gonadotropin from pregnant mare's serum. It contains 18.6 % hexose, 13.8 % hexosamine, 10.4 % sialic acid and 2.2 % fucose.

This protein is stable to precipitating agents such as perchloric acid and ethanol. It is necessary more than 70 % ethanol w / w to obtain good yields of gonadotropin.

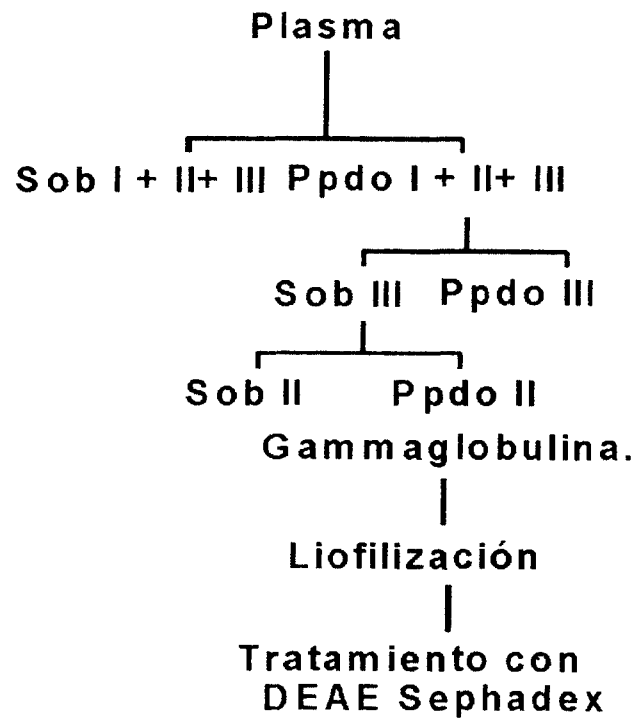
The isoelectric point is extremely acid ; 2.1 and traveled with the  $\alpha_2$  globulins by electrophoresis at pH 8.6

It can be obtained by the ethanol method described above in good yields.

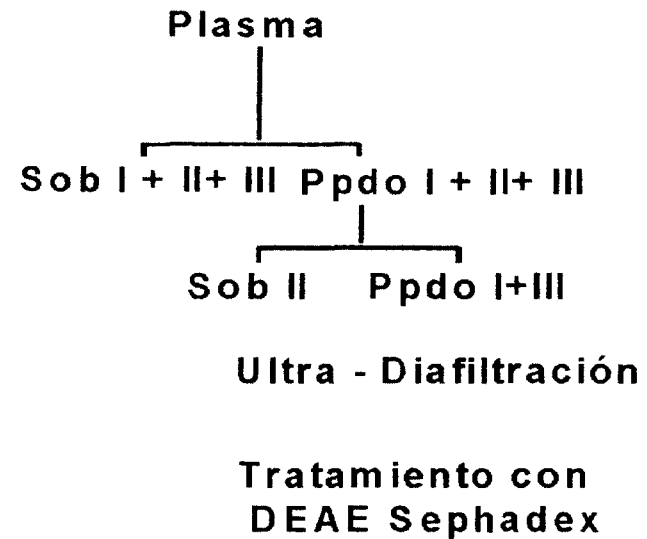
### Método Cohn - Oncley



### Método Cádiz 1989



### Modificación Actual.





# DIAGNÓSTICO DE LA GESTACIÓN EN YEGUAS POR UN MÉTODO INDIRECTO DE INHIBICIÓN DE LA AGLUTINACIÓN EMPLEANDO EL REACTIVO LÁTEX.

Francisca Aurora García Quiñones\*, O. García\*, A. Capote \*, R. Barberá \*, H. Carol  
\*\* A. Alonso \*\*\*

\* Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) mail:labiofam@ceniai.inf.cu

\*\* EPB "Carlos J. Finlay"

\*\*\* Centro de Biomateriales U.H.

## INTRODUCCIÓN

El incontrolable crecimiento demográfico que enfrenta actualmente la humanidad trae aparejado un incremento substancial de la explotación, no sólo de los recursos naturales sino también de las fuentes y vías tradicionales de obtención de alimentos. A diferencia de nuestros antecesores el hombre contemporáneo se ve obligado a trazar nuevas estrategias que permitan dar respuesta a sus necesidades alimentarias. Aumentar la masa ganadera constituye una opción para solucionar esta polémica, pues ofrece vías seguras de obtener alimentos.

En estudios encaminados a tales propósitos (*Cole y Hart, 1930*) logran aislar y caracterizar una glicoproteína de peso molecular aproximado a los 53 000 Da. Por su parte (*Humphery y col. 1979*) reportaron para esta proteína un PM de 68 000 DA constituida por dos subunidades idénticas e inactivas por separadas y Moore y cols 1980 reportan pesos moleculares de 44000y 17000 Da para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Esta hormona es secretada por las cápsulas endometriales de las hembras equinas en estado de preñez y es capaz de estimular la actividad ovárica en las hembras adultas y de propiciar además el desarrollo sexual de las inmaduras. Se ha comprobado que esta hormona ejerce similares efectos sobre la actividad sexual de otras especies de mamíferos.

La hormona PMSG se puede detectar en sangre en el período comprendido entre los cuarenta y los ciento treinta días de gestación, alcanzando los máximos valores de concentración alrededor de los sesenta días (*Allen y col., 1969*); (*Stewart y col., 1976*). Según lo planteado por (*Barreto y col. 1974*) los niveles de concentración de la misma circulantes en sangre están relacionados con la raza, la edad y el tamaño del animal, además de las condiciones ambientales y de alimentación a las que esté sometido el mismo.

En 1947 en la Universidad de Michigan se observó, por primera vez, al microscopio electrónico las partículas uniformes del Látex de Polietileno(ULP) describiéndolas como pequeñas esferas con diámetros idénticos que pueden oscilar desde diámetros menores de 0.1 $\mu$ m hasta aproximadamente los 100 $\mu$ m. Es empleando el término de Látex para su denominación, por su producción a partir de goma sintética y la apariencia lechosa de la emulsión. Las ULP poseen sobre su superficie grupos funcionales que permiten que se establezcan enlaces covalentes entre antígenos(Ag.)

o anticuerpos(Ac) y dichas partículas. Se producen además Látex modificados con grupos Carboxilos y Aminos sobre la superficie que le confieren mayor estabilidad al material. Esta característica hace que las ULP sean ampliamente utilizadas en la medicina e inmunología para la elaboración de tests de diagnóstico por aglutinación con Látex.

En la actualidad, el empleo del reactivo de Látex en técnicas de diagnóstico clínico o ensayos biológicos ha ganado la preferencia de muchos investigadores por ser un método sencillo, de fácil manipulación y bajo costo de producción, que ofrece resultados muy confiables en substancial brevedad de tiempo y no requiere de equipamiento ni condiciones especiales para su desarrollo y empleo. De esta forma se convierte en una alternativa muy factible para el trabajo de campo, al ser comparado con otros métodos que aunque más sensibles necesitan determinadas condiciones para su empleo y resultan menos económicos.

Apoyándonos en la experiencia desarrollada por (*Kawuaguchi y col.*,1989) en la obtención de un test de diagnóstico, por el método de inhibición de la aglutinación con Látex, para detectar embarazo en la mujer y los ensayos desarrollados por (*Yamamoto y col.* 1992) sobre la sensibilización de las partículas de Látex con inmunoglobulina de tipo G (IgG), hemos dirigido nuestros estudios hacia la obtención de un test de diagnóstico para determinar la preñez de las yeguas por un método indirecto de aglutinación con Látex, teniendo en cuenta además, algunas características específicas de la hormona PMSG.

La especificidad de nuestro método esta sustentada de acuerdo a lo descrito por (*González y col.*(1978), sobre el reconocimiento de la subunidad  $\beta$  de la PMSG por los receptores de las hormonas FSH y LH respectivamente, cuyos valores de concentración en sangre comienzan a disminuir entre los cuarenta y cinco y los ochenta y cinco días de gestación hasta alcanzar niveles mínimos, coincidiendo con el momento en que los valores de la PMSG en plasma se hacen máximos, lo que hace descartar la posibilidad de existencia de reacciones cruzadas con estas hormonas plasmáticas

El desarrollo de un método indirecto para la detección de la gonadotrófina en suero, empleando el reactivo de Látex, garantiza seleccionar los animales que posean las cantidades requeridas de la hormona para ser sometidos posteriormente a las sangrías, esto se traduce en la obtención de sueros con mayores concentraciones de hormona y por ende en la obtención de gonadotrófina sérica purificada de mejor calidad; producto muy cotizado en el mercado por su empleo en la reproducción ganadera.

## OBJETIVOS

1. Obtención de un juego de reactivos que constituya un método de diagnóstico rápido, eficiente, confiable y económico, que permita determinar la preñez de las yeguas a través de la detección de la hormona PMSG en suero.

2. Establecer una estrategia que permita obtener hormona PMSG con un alto grado de pureza que cumpla con los requisitos necesarios para ser empleada en la sensibilización de las partículas de Látex.
3. Obtención de un anti-suero de PMSG para ser empleados en la elaboración del juego de reactivos para el diagnóstico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento y purificación de la hormona PMSG.

De acuerdo a las características de la PMSG, la estrategia de purificación propuesta para la hormona consta de cuatro pasos fundamentales: Precipitación alcohólica y diálisis, Cromatografía de Intercambio Iónico(C.I.I.), Cromatografía de Afinidad y Filtración en Gel. Nosotros teniendo en cuenta lo sensible que resultan las hormonas para la manipulación, elaboramos un protocolo de purificación para la PMSG donde se combinan varios principios de separación usando el mínimo de etapas posibles.

Primeramente se procede a obtener el plasma de las yeguas donantes, que fue conservado a  $-4^{\circ}\text{C}$  para evitar la pérdida de la actividad biológica de las proteínas del suero. Se realizaron dos pasos de precipitaciones alcohólicas a los sueros y en cada caso se centrifugó y se tomaron los sobrenadantes para conformar la muestra a purificar.

Posteriormente se realizó una Cromatografía de intercambio Iónico (C.I.I.), utilizando una matriz con un intercambiador catiónico (CM-SEPHADEX C-50) por donde se pasaron volúmenes constantes de muestra, previamente dializada en el buffer de corrida Acetato de Sodio con una fuerza iónica de 0,1 M a pH 4,5. Una vez aplicada la muestra se mantuvo la velocidad de flujo del buffer de corrida para facilitar el acoplamiento de la hormona a la matriz, estas condiciones se mantuvieron hasta tanto no terminó de eluir el pico de contaminantes (fracción 1), seguidamente se cambió el pH del medio añadiendo buffer Acetato de sodio 0,1 M a pH 8,2 y se colectó la fracción eluida (fracción 2) la cual fue sometida a una ultrafiltración con una membrana de 30000 de diámetro de poro para concentrar la muestra y eliminar algunos contaminantes que aún persistían.

Se determinó la concentración de proteínas a las muestras de las fracciones colectadas después del proceso de purificación mediante la técnica descrita por *Lowry y col.* (1951). Para tener un criterio sobre la pureza de la hormona obtenida se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida según la técnica de *Work y col.* (1969), donde se hizo correr la muestra de las fracciones conjuntamente con patrones de peso molecular y estructura.

Para determinar la potencia biológica y verificar la presencia de la gonadotropina en la fracciones eluidas se realizó una prueba biológica.

### Obtención de Anticuerpos.

Una vez obtenida la hormona purificada fue empleada como Ag. para llevar a cabo los esquemas de inmunización propuestos para la obtención de anticuerpo (Acs.) en carneros para ello fueron probados dos esquemas de inmunización.

#### Esquema # 1:

1. Se inocularon los animales con 1mL tomado de una mezcla que contiene 1mL de adyuvante completo de Freund y 1mL de Ag. en las caras internas de las patas posteriores.

2. Al cabo de los siete días se repite la inoculación con dosis de 0.5mL de una mezcla que contiene 1mL de adyuvante incompleto de Freund y 1mL de Ag. en cuatro puntos a lo largo de la columna vertebral.
3. Se repite a los siguientes siete días una inoculación similar a la primera empleando adyuvante incompleto de Freund.
4. En los próximos seis a diez días de la última inoculación se extraen pequeñas muestras de sangre para determinar el título de Ac en el suero.

### **Esquema # 2:**

1. Se concentra el Ag. hasta 10 mg/mL, se toma 1mL y se mezcla con 1mL de adyuvante completo de Freund. Se inocula 1mL de esta mezcla en las caras internas de las patas posteriores del animal.
2. A los siete días de la primera inoculación, se suministran dosis de 0.5mL de una mezcla que contiene 1mL de adyuvante incompleto de Freund y 1mL de Ag.; en cuatro puntos a lo largo de la columna vertebral.
3. Se repite una inmunización igual a la primera pero empleando adyuvante incompleto de Freund, a los siguientes siete días.
4. A cabo de los próximos 6 a 10 días toman pequeñas muestras de sangre y se titulan los Ac presentes en el suero.

En ambos casos el título de Ac fue determinado mediante la técnica de inmunodifusión doble descrita por (*Ouchterlony, 1949*).

### **Elaboración del Juego Diagnóstico.**

Una vez obtenido el Ag. y el Ac respectivamente, procedimos a la sensibilización de las partículas de Látex siguiendo la metodología propuesta por los especialistas de Empresa de Producción de Biológicos (EPB) "Carlos J. Finlay" empleando las ULP producidas por el Centro de Biomateriales de la Universidad de la Habana (UH).

Fueron ensayadas diferentes concentraciones de hormona como ligando para determinar la capacidad óptima de acoplamiento del Látex empleado. El ligando Ag. fue disuelto en buffer GBS a pH 8,2 para facilitar el acoplamiento pasivo (adsorción) de las moléculas proteicas a la superficie de las ULP. Una vez añadido el ligando a la suspensión de Látex se mantiene en agitación constante posteriormente se centrifuga para eliminar algunas moléculas de ligando no absorbidas.

Se añade seguidamente Albúmina de suero bovino (BSA) para bloquear los espacios no ocupados por las moléculas del Ag. e impedir interacciones inespecíficas no deseadas.

En esta etapa se determinaron y establecieron los parámetros que garantizan la repetibilidad del ensayo como son la temperatura y la concentración idónea de proteína a acoplar al Látex, así como las diluciones de trabajo para el Ac. Paralelamente se procedió de igual manera empleando ULP procedente de una firma comercial establecida (SIGMA).

Otro de los componentes del juego es el suero equino liofilizado empleado como control negativo y como control positivo un patrón de hormona calibrado por el Segundo Estándar Internacional, definido por (*Bangham y Woodward, 1966*).

El principio de funcionamiento del juego de reactivos para el diagnóstico esta basado en la inhibición de la aglutinación empleando el reactivo de Látex, *figura 1*. El mismo esta ajustado para la detección en suero de 15 UI.

Para el control de mi reactivo coloco 10  $\mu$ L de antisuero ( Anti- PMSG) y 10  $\mu$ L de Látex en un campo de la placa de microtitulación son mezclados y se observa si ocurre reacción . En este caso no debe ocurrir aglutinación ya que no existen Ac libres. El ensayo se realiza en placas de microtitulación, colocando en todos los campos de la placa 10 $\mu$ L de antisuero (Anti-PMSG), se añaden posteriormente en el primer campo de la placa 10 $\mu$ L de suero control negativo(Sc. neg.) y en el resto de los campos se procede de forma similar pero sustituyendo la gota de Sc. neg. por 10 $\mu$ L del suero de la muestra a testar. Seguidamente se procede a mezclar los sueros en cada campo para facilitar la interacción Ag./Ac. Finalmente se añadirá el reactivo de Látex

Se agita la placa en forma giratoria hasta visualizar la aparición de grumos o aglutinación en el primer campo donde fue añadido el Sc. neg., esta reacción se produce debido a la ausencia del Ag. en el Sc. neg por lo que los Ac añadidos quedan libres, uniéndose a las moléculas de Ag. acopladas a las ULP y aglutinan. Cuando las muestras no poseen hormona o cuando las concentraciones de esta no alcanzan los niveles establecidos para neutralizar el Ac; se observan reacciones similares a la que tiene lugar en el primer campo con el Sc Neg. En estos casos se recomienda repetir la prueba entre los próximos diez a quince días.

Cuando el comportamiento de las muestras difiere al del Sc Neg ocurre la inhibición de la aglutinación producida por la presencia de hormona en el suero de la yegua que neutraliza los Ac, no quedando libres estos para interactuar con el Ag. acoplado a las ULP. Estas muestras de suero nos permitirán seleccionar las yeguas donantes *figura 2*

### **Comparación de la actividad biológica de la hormona mediante los métodos serológico y biológico.**

Se realizaron ensayos serológico utilizando el reactivo de Látex y paralelamente el ensayo biológico empleando animales de laboratorio para esos fines.

### **Ensayos realizados con el juego diagnóstico en la campana de 1998 y hasta Septiembre de 1999.**

Se realizaron ensayos al nivel de laboratorio con muestras de suero de animales posibles gestantes con diferentes tiempos de gestación donde se comprobó la sensibilidad del juego y su ajuste para la detección de 15 UI. Posteriormente fue distribuido para su utilización en los centros equinos a escala nacional.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de la hormona purificada.

El valor de concentración de proteínas obtenido después del proceso de purificación fue de 2mg/mL y de acuerdo a los resultados de la Electroforesis en Gel, La PMSG purificada siguiendo la estrategia diseñada, posee bandas correspondientes a las proteínas definidas de peso molecular y estructura a los que fue enfrentada. Las muestras de la fracción 1 no presentaron las bandas correspondientes a la PMSG lo que corrobora la ausencia de la misma en esta fracción, en cambio la fracción 2 presentó bandas similares al patrón de PMSG utilizado y se localizaron en un punto cercano al peso molecular correspondiente. Por lo que consideramos que el protocolo de purificación seguido es eficiente para la obtención de PMSG pura *figura 3*.

### Ensayo realizado con el Juego de Reactivos para el Diagnóstico de PMSG

En toda la bibliografía consultada hasta el momento no hemos hallado referencias por otros autores, sobre estudios realizados similares al nuestro, por esta razón decidimos realizar paralelamente a nuestro ensayo una prueba biológica con el objetivo de confrontar los resultados de ambos ensayos y poder establecer la veracidad de nuestro método. Se utilizaron ratas impúberes para determina UI (*D'Amour y D'Amour 1940*); (*Cole y Erway ,1941*) de experimentación y un patrón liofilizado de PMSG de una concentración conocida de 1000U/l

Se procedió a hacer paralelamente diferentes diluciones del patrón de hormona y la muestra, que son inoculados posteriormente a grupos de ratas respectivamente, a razón de cinco réplicas para cada dilución.

Al cabo de las setenta y dos horas se sacrifican los animales y se comparan los ovarios de ambos grupos. Este ensayo ofrece un estimado de potencia biológica, parámetro establecido

para determinar unidades internacionales (UI) en ratas impúberes (*D'Amour y D'Amour 1940*; (*Cole y Erway ,1941*))

### Obtención de Anticuerpos.

Al comparar los resultados de las inmunodifusiones realizadas para determinar el título de los anticuerpos obtenidos siguiendo los dos esquemas de inmunización propuestos, pudimos evidenciar que con el **Esquema # 2** se obtuvo mayor título de anticuerpos.

### Ensayos realizados con el test de diagnóstico de PMSG

En el año 1998 se adquiere un nuevo reactivo de Látex de producción nacional y se sustituye la metodología empleada hasta el momento con lo que se obtiene un notable

incremento del %E. al comprar nuestro método con la prueba biológica. Los resultados obtenidos por ambos ensayos realizados en el laboratorio son mostrados en la *Tabla 1*.

**Tabla 1: Ensayo comparativo para determinar el % de efectividad (% E) de nuestro Método de Diagnostico respecto a la Prueba Biológica**

ENSAYO	Num. Muestras	Total	Num. Muestras (+)	Num. Muestras (-)
Prueba Biológica	91		77	14
Reactivo de Látex	91		75	16

Considerando los resultados obtenidos a escala de laboratorio con el empleo del nuevo reactivo de Látex de producción nacional y la nueva metodología de producción se elaboró el juego de reactivos que esta siendo sometido a prueba de campo en las provincias de Pinar del Río, Matanzas, Sancti Espíritus y Camagüey, obteniéndose hasta el momento muy buenos resultados que se reflejan en la calidad del plasma colectado para el proceso industrial, titulado por la prueba de ELISA.

De las pruebas realizadas en el campo, en centros de monta controlada empleando el reactivo de Látex mediante el seguimiento de la gestación se obtuvo el 97% de efectividad estos resultados son mostrados en la *Tabla 2*.

**Tabla 2 Resultados de los diagnósticos realizados con el juego de reactivos a escala de campo y laboratorio.**

ENSAYO	Num. Muestras	Total	Num. Muestras (+)	Num. Muestras (-)
Prueba Laboratorio	500		487	13
Prueba de Campo	6767		6430	337

#### LEYENDA

- Num. Total Muestras - Número de muestras tomado aleatoriamente para cada ensayo
- Num. Muestras (+) - Número de muestras que resultaron positivas al test
- Num. Muestras (-) - Número de muestras que resultaron negativas al test

Este juego de diagnóstico elimina el uso de animales de laboratorio los cuales equivalen a cinco por cada muestra, locales, alimento y personal para su atención, además del traslado del plasma al laboratorio para el testaje. Su empleo al nivel de campo es rápido ya que arroja un diagnóstico inmediato y de fácil manipulación, no requiere de equipos para su lectura ni de personal altamente calificado.



## CONCLUSIONES

Se elaboro un juego de reactivos, mediante el método de inhibición de la aglutinación con LATEX para ser utilizado como juego diagnóstico para la determinación de la preñez de las yeguas de las que se obtiene la hormona Gonodatropina .

- Se comprobó la calidad del reactivo de LATEX de producción nacional, para su empleo en ensayos biológicos.
- Se probó una nueva estrategia de purificación para la hormona PMSG con buenos resultados.
- Se comprobó que el juego de reactivos a base de Látex constituye un medio de diagnóstico precoz de la gestación de yeguas al nivel de campo.

## RECOMENDACIONES

- Continuar los estudios encaminados a perfeccionar la elaboración del test de diagnóstico, por el método indirecto de inhibición de la aglutinación con LATEX, para determinar la preñez de las yeguas.
- Hacer extensiva la prueba de campo al resto de las provincias.
- Iniciar los estudios para la elaboración de un test de diagnóstico por un método directo con el mismo objetivo de determinar la preñez de las yeguas.
- Elaborar un estrategia de purificación para los Acs

## BIBLIOGRAFÍA

Asher, G.W. ; J.F.Smith." Induction of estrus and ovulation in farner fallow deer (Dama dama) by using progesterone and PMSG treatment. J. Reprod. Fertil 81(1) : 113-118. 1987.

Alexader S.K, Lukin Yuv. "Preparation of IgG diagnostioum on the bases of Stained polycrolein latexes for use in the latex agglutination test." Microbiology Epidemiol.Inmuobiol. (6): 84-88 1990.

Aoyagi Tochito et. al."Studies on superovulation with PMSG and FSH in cows. Hormone levels of plasma steroid and results of embryo recovery." JPN. Anim. Reprod. 33 (4): 167-172.

Allen W.R. "A quantitative immunological assay for pregnant mare serum gonadotropin." J. Economic. 43 581 1969.

Brindon B.M.; Piper L. R. " Induction of ovulation in sheep and cattle by injectins of PMSG and ovine anti-PMSG immune serum" Teriogenology 4 197 1977.

Brindon B.M.; Piper L. R. "Physiological basic of the ovarian response to PMSG in sheep and cattle IN: Embryon tranfer in cattle sheep and goats eda. J.M. Shelton A.O. Trouson N.W.

Moore and J.W. Janus Aust. Society Reproductive Biology publication 1-5. 1982.

Barstein N.; Maimet D. "Detection of flagella in 278 Legionella Strams by latex reagent sensitized with antFLAGELLUM immunoglobulins." J. Clin. Microbiology 29 (5) : 953-956. 1991.

Cameron A.W.N. et al. "Time of ovulation in goats (Capra hecus) induced to superovulate with PMSG. J. Reprod. Fertil.83 (2): 747-752.

Conway B.A. et al. Effect of dihydrotestosterone on the growth and function of ovarian follicles in intacts immature female rats primed with PMSG. J. Reprod. Fertil. 90 (1) : 267-278. 1990.

Chavez M.A. et al. "Temas de enzimología. " ENPES. 1990.

Chinonovang L. Karnchanachetauce C. "Diagnostic of snake venouns by reserve latex agglutination test. " Dep. Microb. Fac Sci Mabidol Univ Rama GRD Bangkok 10400 Thailandia.

Duvelier G. Raussel C. "Latex enzyme immunoassay for measuring IgG antibodies to rubella virus." J. Clin. Pathol. 43 (9) : 766-770. 1990.

Derivaux J.F. Ectors Fisiopatologia de la gestación y obstetricia veterinaria. Zaragoza. Ed. Acribia. 227.1987.

De Armas R. Bernal A. "Utilización de GnRh y anti-PMSG en la superovulación de vacas Holstein VI Reunión Asociación "Cubana de Reproducción Animal (ACPA).

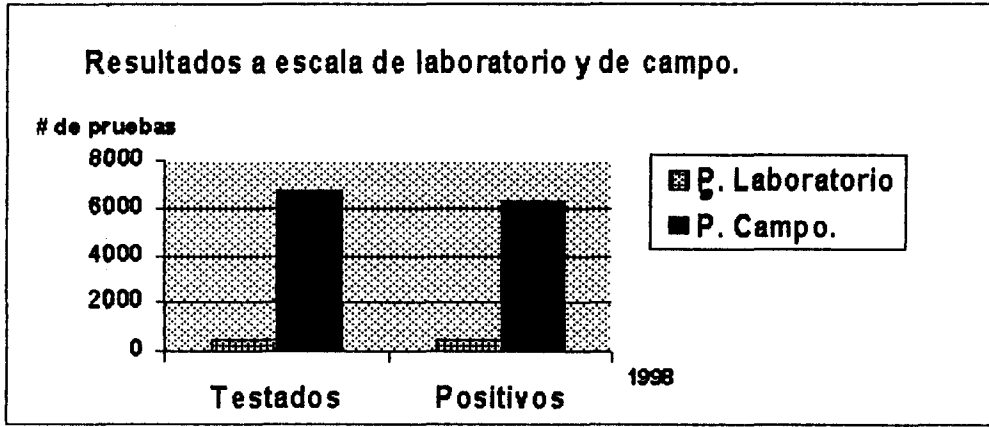
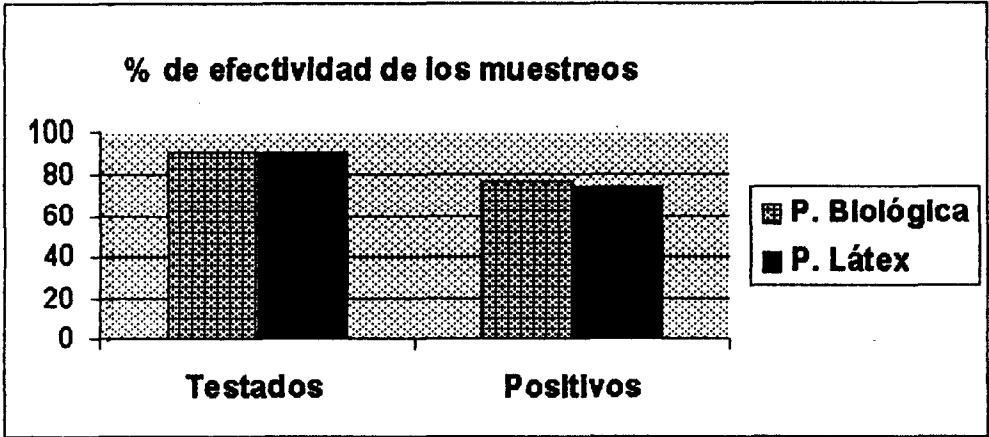
Hamra A.H.A.H.Al-Haboby "Extraction of PMSG from pregnant mares for improvement of reproductive performance of sheep. IPA. Journal of Agriculture Research". 2 (2) : 232-243.

Hoffer S. et al. "E quine gonadotropine: separation immunoassay and use in ovulation induction and superovulation in mares." Annals Zootechnie (France) 41 (3-4) : 279-286.1992.

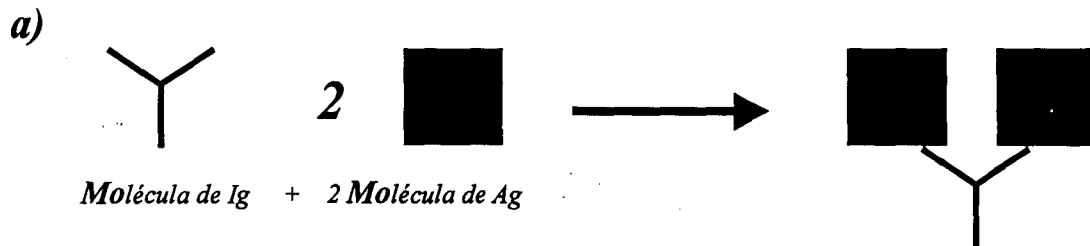
Jaiger N C J. Mombalin M J. "Immunoassay using colorable latex particles 1989.

Johson J R. Swanson J L "Avian P sub (1) antigen inhibiti agglutination mediate p fiambre of uriatogenic Echerichia Co-li."Infect. Immun. 60 (2) : 225-229. 1989.

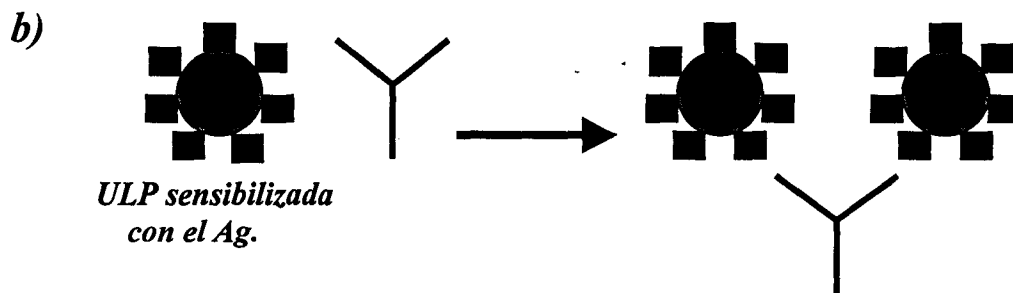
Kanaguchi H. Sakamoto K. "Fundamental study on latex for agglutination test Biomaterials." 10 (4) : 225-229. 1989.



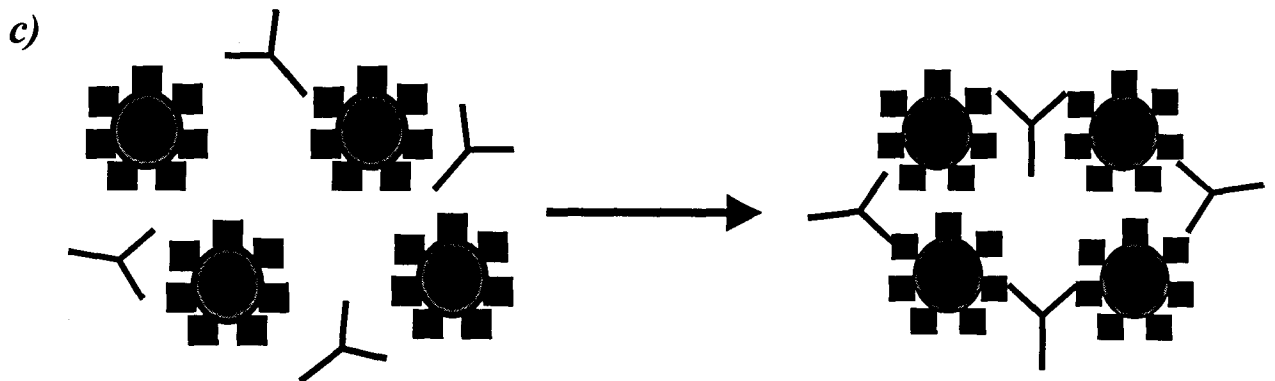
**Figura 1: Principio de funcionamiento del test de diagnóstico por el método de inhibición de la aglutinación con LATEX**



Las inmunoglobulinas (Igs) poseen, en su estructura, dos sitios de unión específicos al Ag, por lo que son capaces de combinarse con dos moléculas de Ag, reconociendo los epítomos de estas, contra los cuales se levanta la respuesta inmune.



Las ULP son utilizadas para visualizar y cuantificar la formación del complejo Ag/Ac. El Ag es empleado como ligando para ser acoplado a la superficie de las partículas por absorción pasiva. Cuando son añadidos los Acs, estos pueden unirse simultáneamente a los epítomos de moléculas diferentes de Ag que se encuentran acopladas a partículas adyacentes.



El entrelazamiento múltiple que tiene lugar por la unión de los Acs y los Ags acoplados sobre la superficie de las ULP, produce la aglutinación.

# PROTOTIPO DE UN CENTRO COLECTOR DE PLASMA DE YEGUA GESTANTE PARA LA OBTENCIÓN DE LA GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA (eCG) O (PMSG)

Arnaldo Capote Milanés, Raúl Barberá Morales

Laboratorios Biológicos farmacéuticos (LABIOFAM) e-mail: labiofam@ceniai.inf.cu

## INTRODUCCIÓN

A partir de 1974 se realizaron los trabajos iniciales para estudiar el perfil de la PMSG en el suero de las yeguas gestantes en nuestro país, (*Barreto y col., 1974 - 1975*),

describieron los niveles de concentración de la hormona, en la sangre de las yeguas

gestantes relacionadas con la raza, tamaño del animal, la alimentación y el medio, coincidiendo con otros autores (*Allen y col., 1969*).

A partir de los estudios anteriores a fines de la propia década, se realizaron los ensayos preliminares a escala de laboratorio, con vistas a adecuar una tecnología para la obtención de la hormona, utilizando varios solventes y evaluando distintos parámetros, considerando la disponibilidad de las materias primas, fundamentalmente el plasma de yeguas gestantes y por tanto, su factibilidad desde el punto de vista económico en nuestras condiciones.

## OBJETIVOS

Con la finalidad de incrementar y profundizar los estudios a escala de laboratorio, en cuanto a la recolección del plasma, se consideró la necesidad de organizar un centro

colector de plasma de yeguas gestantes, que permitiese continuar los ensayos con

vistas a la obtención de la gonadotrofina a escala semi-industrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de 1974, se efectuaron los ensayos iniciales a escala experimental, en nuestro centro utilizando yeguas gestantes como donantes. Posteriormente se realizó el trabajo a escala piloto, para continuar evaluando las posibilidades del mismo, en cuanto a la explotación, control y atención a los donantes, debido a la necesidad de

incrementar los volúmenes de plasma a colectar, con la calidad requerida según (*Loraine y col., 1954*).

Estos ensayos nos posibilitaron, la aplicación de un régimen de manejo acorde al propósito, que permitió realizar las sangrías a los donantes a distintos intervalos entre las mismas (10, 12, 15 y 20 días), el procesamiento de la sangre para obtener el plasma y su adecuada conservación en el propio centro. se establecieron los siguientes requisitos:

1. El centro disponía de áreas de pastoreo, se le suministró adicionalmente forraje y/o heno en dependencia de las circunstancias, sales minerales, una ración de concentrado de 3kg por donante y agua ad-libitum.
2. Sala de sangría con las condiciones para el manejo de los donantes y corrales aledaños.
3. Nave o cuadra para los sementales, convenientemente ubicada, con los recursos y el personal que garantizaron su adecuada atención.
4. Área de trabajo con las condiciones necesarias, tales como, cuarto con condiciones de asepsia, cuarto de trabajo, neveras para la conservación de la sangre y el plasma, área de fregado, preparación de materiales y un equipo pequeño de esterilización.
5. Personal  
Médico veterinario ----- 1  
Técnico Medio en Veterinaria – 1  
Cuadrero ----- 1  
Montero celador ----- 2  
Obrero Agrícola ----- 2

Este personal garantizó la elaboración de toda la información necesaria, desde el punto de vista económico, productivo y técnico, que permitieron el control de todas las

actividades, así como la atención y cuidado de los donantes, la limpieza y mantenimiento del centro.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El centro nos permitió:

1. Desarrollar una historia clínica específica y actualizada para este propósito a los donantes.
2. Estricto control de monta.
3. Facilitó el control y la atención a los donantes, así como obtener una cantidad adecuada de materia prima para garantizar la continuidad de los estudios.

La tabla 1 (Anexos) nos muestra el modelo de historia clínica, utilizada en los donantes del Centro Colector Equino; y refleja los controles aplicados en cuanto al comportamiento epizootológico, clínico, control de monta y de la sangría.

La tabla 2 (Anexos) nos muestra los parámetros evaluados a los donantes, en cuanto al estado físico, incidencia de la gestación, no presentándose alteraciones. La situación zoonosanitaria y los principales parámetros hematológicos obtenidos a partir de los controles, realizados por el Centro Nacional de Investigaciones y Diagnóstico Veterinario, observando que estos parámetros, se comportaron Dentro de los valores normales establecidos para la especie y la categoría en nuestro país, (*Salabarría ,1981*), (*Pino, 1985*).

En la tabla 3 se aprecian los resultados, de las sangrías realizadas a los donantes del centro colector, en la cual se observa el número de sangrías, cantidad y calidad del plasma, así como el rendimiento por donante.

El trabajo desarrollado, nos permitió controlar el estado sanitario del rebaño, y fundamentalmente el comportamiento físico, la incidencia en la gestación y los principales parámetros hematológicos, los cuales no se afectaron y se mantuvieron dentro de los valores normales establecidos en nuestro país. Lo que nos permitió, incrementar el número de sangrías por donante, obtener mayor volumen de plasma, con mejor calidad, al no tener necesidad de trasladar la sangre ni el plasma, logrando una explotación más eficiente del rebaño.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El centro nos permitió, obtener una cantidad apreciable de plasma con óptima calidad, así como la adecuada atención, preservación de los donantes y la gestación. El análisis de los resultados nos permitió concluir, que a partir de este centro resultaba imposible, enfrentar la recolección de los volúmenes de plasma requeridos, para la producción de la PMSG a nivel nacional, por lo que se procedió paralelamente, a organizar la campaña de recolección de plasma de yeguas gestantes a nivel de las provincias con mayor potencial de animales, para tratar de resolver la creciente demanda de la hormona que necesitaba el país.

## BIBLIOGRAFÍA

Allen, W. R. y col.: Journal Endocrinology, 1969-43:595-598

Barreto, G. y col.: Estudio de la Actividad de la Gonadotropina Sérica ( PMSG) durante la gestación en Cuba, 1974

Barreto, G. y col.: Estudio de la actividad de la Gonadotropina sérica (PMSG) durante la gestación en Cuba. 1975.

Loraine, J. A. y col.: Método para Determinar la Actividad Biológica en Ratones. Acta Endocrinología, 1954; 50:172-179

Pino, R.: Comunicación Personal, 1985

Salabarría, F.: Comunicación Personal, 1981

## ANEXOS

Tabla #1

Historia Clínica #

Marca de la yegua

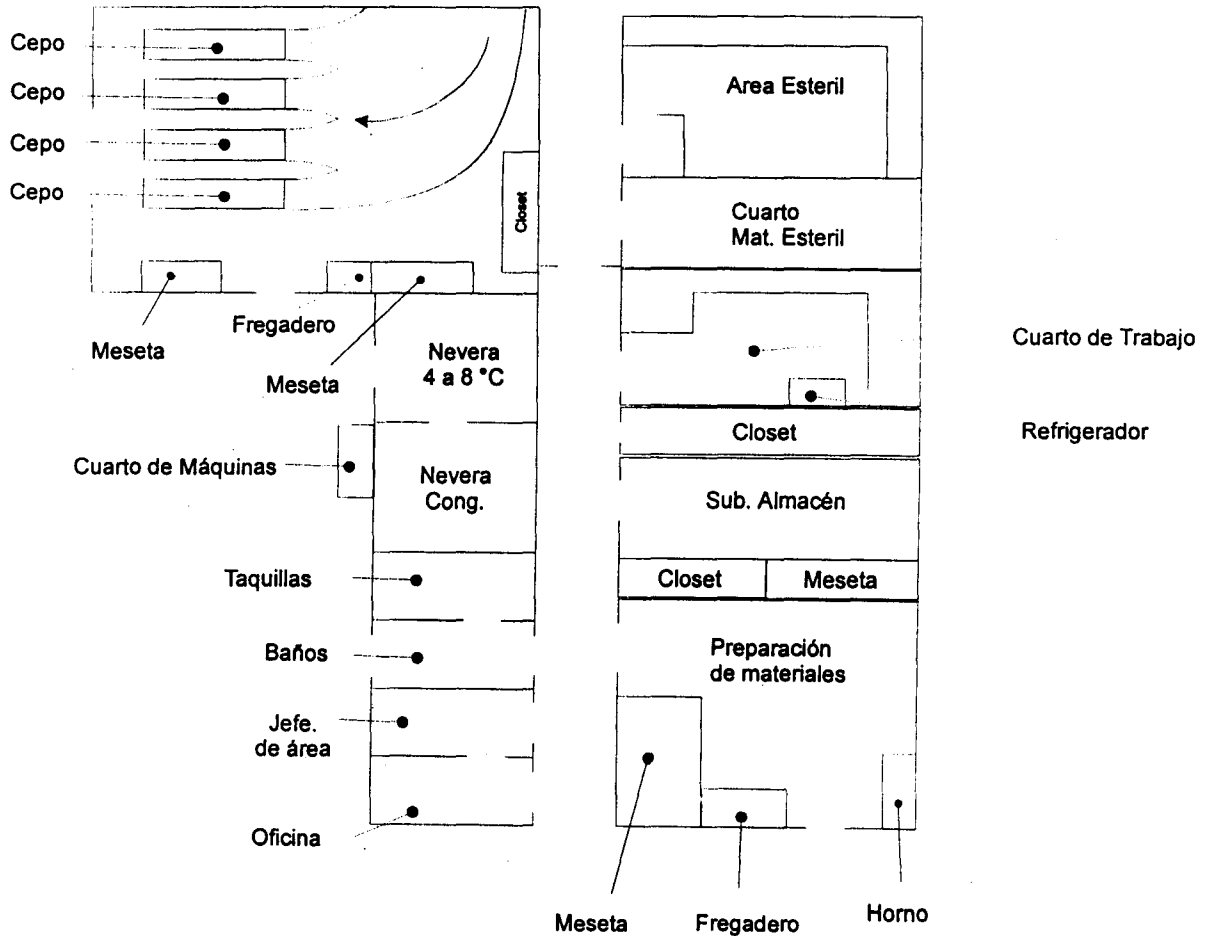
Edad	Color de la Capa	Otras Características
------	------------------	-----------------------



Parto Fecha Cría	Parto Fecha Cría	Parto Fecha Cría	Parto Fecha Cría	Observaciones
Vacunas				
Fechas Entidades	Fechas Entidades	Fechas Entidades	Fechas Entidades	Observaciones
Lote Vacuna	de Lote Vacuna	de Lote Vacuna	de Lote Vacuna	de
Control Epizootiológico				Observaciones
	Resultados	Fecha	Resultados	Fecha
Brucelosis				
AIE				
Leptospirosis				
Hemoparásitos				
Control de Parásitos Internos				
Fecha	Resultados	Tratamiento Aplicado	Dosis	Fecha Técnico /

Control contra Parásitos Externos					
Fecha	Producto Utilizado	Concentración	Resultados	Observaciones	Técnico

Comportamiento Clínico							
Síntomas	Diagnóstico Clínico	Tratamiento	Evolución Clínica	Muestra de Materiales	Resultados de Lab.	Fecha	Médico Veterinario



## ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DE LA GONADOTROPINA SÉRICA EQUINA

Milagros Abreu, Leyda Laguardia

Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM)

e-mail: labiofam@ceniai.inf.cu

### INTRODUCCIÓN

Desde época bien temprana en nuestro país ya se planteaba la necesidad de ingresar en los trabajos internacionales de normalización como premisa para lograr la calidad de la producción y los servicios.

Hoy en día los conceptos acerca de la calidad se universalizan de forma tal que resulta imposible permanecer en el mercado sin cumplir con las actuales exigencias internacionales en materia de calidad.

La adopción de las normas de la familia ISO 9000 creadas por la organización internacional (ISO) establecen las formas de aplicar la Gestión y el Aseguramiento de la calidad.

Estas normas fueron revisadas en 1994 y se le hicieron modificaciones menores que ayudan a su mejor comprensión.

De ahí que en medio de esta búsqueda de entendimiento a que se dirige la comunidad internacional en materia técnica, nuestro país se proyecta hacia la inserción de estos mecanismos y asume los nuevos enfoques relacionados con la calidad.

De esta forma se situaría en un mercado cada vez más exigente y competitivo, aún en medio de las actuales limitaciones económicas que atraviesa.

La certificación de los sistemas de la calidad, la acreditación de los laboratorios de ensayo y la gestión ambiental devienen imperativos de estos tiempos y cuestión esencial de productores y consumidores de suministradores y clientes.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expresado, desde 1994 nuestra empresa se dio a la tarea de revisar el sistema de calidad implantado realizando determinadas actividades para la aplicación de la Gestión y el Aseguramiento de la Calidad en su organización, lo que posibilitará lograr la calidad de los productos de forma más eficiente, disminuyendo los gastos e incrementando las ganancias.

Conociendo entonces que controlar la calidad significa aplicar técnicas y actividades operativas que se emplean para satisfacer los requisitos de la calidad. En la producción de esta hormona se trabaja para que en todo el proceso hasta el producto final se asegure que durante la elaboración se cumpla con las especificaciones de aceptación correctamente ejecutadas en cada lote, evitando posible omisión, contaminación, error o confusión en la producción.

La Gonadotropina sérica es una glicoproteína de peso molecular entre 28 000 daltons según por (*Bourrillon y Got, 1959*) y de 53 000 según (*Papkoff, 1974*), obtenida a partir del plasma de yeguas gestadas y que consiste en dos subunidades designadas como Alfa y Beta, las cuales de forma separadas son biológicamente inactivadas; (*Papkoff, 1974*) ambas subunidades tienen comportamientos cromatográficos

diferentes entre sí y la hormona intacta. Sus pesos son de 44000 y 17000 respectivamente (Moore Jr y cols 1980)

La subunidad  $\alpha$  tiene una secuencia de aminoácidos igual a la de la e-LH-  $\alpha$  (Hoppen, 1994).

Se señala además por (Schams, D. y H. Papkoff, 1972) la importancia del ácido siálico en su estructura.

Esta hormona estimula el crecimiento de las células intersticiales del ovario, así como el crecimiento y maduración de los folículos en la hembra, en el macho produce el desarrollo del tejido intersticial de los testis y las glándulas sexuales accesorias.

Para garantizar la calidad de este medicamento, es necesario realizar todos los ensayos acorde a requerimientos de calidad, que exigen las normas internacionales que refieren las Pharmacopeas y en especial la Pharmacopea Británica.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se emplean técnicas bien definidas y validadas para que los resultados permitan una valoración correcta, y se cumpla con los requisitos de calidad que están establecidos.

El proceso de producción de la PMSG se divide en dos partes, primero la producción de lotes semanales y posteriormente la producción de lotes comerciales. El control de la materia prima es un factor importante para el inicio del proceso

### **Inspección de aceptación de las materias primas**

- ◆ Plasma equino —————> Actividad biológica —————> Test de Elisa  
de yeguas gestantes
- ◆ Alcohol etílico —————> Según USP XXIII
- ◆ Agua destilada —————> Según USP XXIII

## Plasma equino

Determinación de las características organolépticas del plasma.

Control visual para detectar la presencia de hemólisis, partículas extrañas de fibrinógeno o mal olor

Se toma 5 ml de cada tanque de plasma previamente agitado con ayuda de pipetas y se observa el color, si presenta hemólisis y el olor correspondiente al suero.

- ◆  $\text{pH}=5\pm 0.2$
- ◆ Alcohol menor que el 3%
- ◆ Actividad biológica: Debe estar en el rango de 80-125% de la potencia propuesta, el valor de  $\lambda \leq 0.3$  y  $g < 1$  para cada ensayo realizado

## Agua destilada

Aspecto	Norma
Presencia de cloruro	No se producirá opalescencia
Presencia de calcio	No se producirá turbidez
Presencia de sulfato	No se producirá turbidez
Presencia de amonio	Algún color amarillo producido no debe ser mayor que el que contiene 30mg de amonio en agua especialmente destilada 0.3 ppm
Presencia de dióxido de carbono	La mezcla debe permanecer clara
Presencia de metales pesados	El agua no se oscurece
Presencia de sustancias oxidables	El color rosado no desaparece completamente
Presencia de sólidos to-	No debe ser más de 1 mg de residuo

tales	(0.001%)
pH	5-7
Conductividad	Debe ser menor o igual que 4 microsiens
Conteo de microorganismos	Se admite presencia de mesófilos aerobios: no más de 5 UFC/ml No se admite la presencia de hongos, levaduras, enterobacterias y patógenos.

**Alcohol etílico:**

**Descripción:**

Líquido volátil, claro, inodoro y móvil, tiene un olor característico y produce una sensación de quemadura en la lengua, volatiliza rápidamente a bajas temperaturas y hierve a 78°C aproximadamente. Es inflamable.

**Solubilidad:** Soluble en agua y con prácticamente todos los solventes orgánicos.

**Acidez:** Añada 50 mL en un frasco con tapa ; a esto añada 50 mL de agua recientemente hervida y fría . Adicione 2 ó 3 gotas de fenolftaleína SR y valore con hidróxido de sodio 0.2 N hasta color rosado tenue persistente (muy claro) por 30 segundos ,no más de 0.9 mL de hidróxido de sodio se requiere para la neutralización.

**Sustancias insolubles en agua:** La mezcla es clara y permanece clara durante 30 min, después del enfriamiento a 10 °C.

**Residuo no volátil:** Evapore 40 mL en una cápsula tarada sobre baño de agua y secar a 105 °C Por una hora. El peso del residuo no debe exceder de 1 mg.

**Aldehidos y otras sustancias extrañas orgánicas:** Coloque 20 mL en una probeta con tapa que ha sido lavada completamente con ácido clorhídrico ,enjuagada con agua y finalmente con alcohol analizado .Enfríe el contenido a 15°C. aproximadamente y añada Por medio de una probeta cuidadosamente lavada 0.1 ml de permanganato de potasio 0.1 N anotando exactamente el tiempo de la

administración. Mezcle al instante invirtiendo la probeta y deje en reposo a 15 °C. Por 5 min. El color rosado no desaparece completamente.

**Alcohol amílico y sustancias carbonizables no volátiles:** Deje evaporar espontáneamente 25 mL en una cápsula de porcelana cuidadosamente protegida del polvo, hasta que la superficie de la cápsula este solo ligeramente humedecida. Ningún color rojo o carmelita se produce inmediatamente después de la adición de una gota de ácido sulfúrico concentrado,

**Constituyente de fuel-oil:** Humedezca una pieza de papel absorbente, limpio e inodoro, con una mezcla de 10 mL de alcohol, 5 mL de agua, 1 mL de glicerina y deje evaporar espontáneamente, no se produce ningún olor extraño perceptible después que los últimos trazos de alcohol han evaporado.

**Metil cetonas , alcohol isopropílico y alcohol butílico terciario:** Tome 0.5 mL de la muestra, 3 mL de agua y 5 ml de sulfato de mercurio SR caliente en un baño de agua hirviente. No se forma ningún precipitado dentro de 3 min .

:Tome una gota y añada una gota de agua, una gota de ácido fosfórico (1:20) y una gota de permanganato de potasio (1:20) mezcle agite y deje en reposo por un min y añada solución de bisulfito de sodio (1:20) goteando hasta que el color del permanganato desaparezca. Si permanece un color carmelita añadir 5 ml de ácido cromatográfico. Sr. inicialmente preparada y calentar sobre baño de agua a 60°C Por 10 min. no se debe producir color violeta.

**Gravedad específica:** Se tara el pignómetro a 105°C . durante una hora se enfría 30 min en una desecadora y pesamos los pignómetros cuidadosamente cuidando que no se derrame la sustancia y se pesa. Se vuelve a tomar el pignómetro vacío a 105°C aproximadamente una hora, enfriamos 30 min y añadimos a los pignómetros a 15.56°C y pesamos

$$\text{Gravedad específica} = \frac{\text{peso del alcohol}}{\text{peso del agua}}$$

Tabla de contenido alcohólico.

Gravedad específica	conc.Alcohólica p/p
0.812	93.72% 95.95%
0.813	93.43% 95.75%
0.814	93.07% 95.46%
0.815	92.7% 95.2%
0.817	92.2.% 94.7%
0.819	91.24% 94.15%
0.820	90.87% 93.88%

**Soluciones:**

**Fenolftaleina** :\_Solución reactivo.

Pesar 0.1g del reactivo y disolverlo en 100 mL de alcohol etílico y disolverlo en un matraz de 100 mL.

**Hidróxido de sodio 0.2 N:**\_ Pese 8 g de hidróxido de sodio y disuelva en 100 mL de agua hervida

**Permanganato de potasio 0.1 N:**\_ Se disuelven 3.3 g de  $KMNO_4$  en 100 mL de agua destilada, se calienta la solución hasta ebullición y se mantiene en esa temperatura durante 1 hora o de lo contrario se disuelve el permanganato sin calentar la solución dejándola en reposo durante varios días , la solución se filtra a través de un gooch o de un crisol de vidrio de placa porosa fina desechando los primeros 25 mL del filtrado

**Sulfato de mercurio SR** : Mezcle 5g de oxido de mercurio amarillo con 40 mL de agua destilada y mientras se agita despacio añadir 20 mL de ácido sulfúrico lentamente. Entonces añada 40 mL de agua y agite hasta disolver completamente.

**Acido fosfórico 1:20**\_ Pese 1 g de ácido fosfórico y disuelva en 20 mL de agua .



**Permanganato de potasio 1:20\_** Pese 1 g de permanganato de potasio y disuelva en 20 mL de agua.

**Acido cromatrópico 1:20\_** Pese 50 g de ácido cromatrópico\_ en 100 mL de ácido sulfúrico 75%

### **Inspección de aceptación durante el proceso de producción**

En el proceso productivo se lleva a cabo la inspección en los puntos críticos de control fijado durante el proceso productivo.

### **Inspección de lotes en proceso**

1. Determinación de las características organolépticas

2. Determinación de pH Según BP - 98

El pH debe oscilar  $6.9 \pm 0.6$

3. Determinación de alcohol Según USP- 98.

### **Determinación de la Lactosa**

Se realiza después de su adición y proceso de clarificación.

Tamaño de la muestra: 1 mL

Según el método de fenol sulfúrico. Anal. Chem. 28, 350, 1956.

Reactivos:

Acido sulfúrico conc.5 mL.

Fenol 5% 1 ml

Lactosa CR

Se toma 0,5 ml de la muestra y se completa a 1mL con agua destilada, se añade 1 mL de solución de fenol al 15 %, se agita y se añade 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Después de 30 minutos de reposo se lee a 488 nm, esperar 30 min.

Curva Patrón: Se pesan 0,525 g de glucosa y se disuelven en una solución al 0,25 % de ácido benzoico (en caso de lactosa con agua) completándose con ésta solución hasta 500 mL en un matraz. De ésta solución diluyendo 1/10 se obtiene una concentración de 100 mg/mL.

Tabla de valores.

Tubos

Patrón(mL)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0
Agua(mL)	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Fenol5%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ac.sulf.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Conc.en      10      20      30      40      50      60      70      80      90      -

Solución de fenol 5%: Se calienta a 100°C en el horno un frasco de fenol hasta que comience a licuarse, de aquí se toma 5 mL y se pesan completando a 100 mL con agua destilada en un matraz.

Cálculos: % (conc.ug/mL) = D.O x cot x dilución.

Nota: PMSG preparada al 5% se realiza una dilución de 1:1250 siendo el cálculo el siguiente:

$$\% = \frac{D.O \times cot \times 2000 \times 100}{1000000} = \frac{D.O \times cot}{5}$$

Los resultados deben encontrarse en el rango de 0,5 % de lactosa.

### **Determinación de la potencia biológica**

Se realiza en 3 etapas de la producción de la PMSG.

- 1.-Al terminar el Lote Semanal.
- 2.-Antes de envasar el Lote Comercial.
- 3.-Después del envase del Lote Comercial.

Fundamento del método: Se basa en la capacidad de la Gonadotropina Sérica de estimular el crecimiento y desarrollo de los ovarios de ratas impúberes, lo cual se traduce en un incremento proporcional de la masa del ovario en función de la dosis utilizada.

La actividad biológica se determina mediante 2 ensayos.

- 1-Ensayo de 4 puntos (Lote Semanal).
- 2-Ensayo de 6 puntos (Lote Comercial).

### **Descripción del Ensayo de 4 puntos.(después de diálisis).**

Preparación de las diluciones de ensayo y de referencia.

Se toma 1 mL de la muestra de ensayo y se diluye con cloruro de sodio 0.9 w/v según las unidades propuestas, en 20 y 40 UI (T1 y T2). Con la muestra de referencia se procede de igual forma, diluyendo la pastilla hasta 20 y 40 UI (S1 y S2).

Ej: muestra de referencia (1000 UI)

Con cloruro de sodio 0.9 w/v llevamos hasta 25 ml en una probeta teniendo así S2(40 UI), de ahí tomamos 5 ml y lo diluimos en 5 ml de solución salina para obtener S1 (20 UI).

Ej: muestra de ensayo (2000 UI).

Llevar 1 ml de la muestra hasta 20 ml con cloruro de sodio 0.9 w/v, luego tomar 10 ml y llevarlo hasta 25 ml T2 (40 UI), de ahí tomamos 5 ml y diluimos en 5 ml para T1 (20 UI).

Inoculación de los animales.

Se utilizan 40 ratas impúberes de 21-28 días de nacidas, de forma tal que la masa corporal de la mayor no sobrepase un 30% la masa de la menor. Se pesan las ratas y se distribuyen uniformemente por peso en cuatro grupos de 10 ratas cada uno. Durante el ensayo se proporcionan las condiciones de tendencia que posibiliten la mayor estabilidad de los animales

A dos grupos de animales se le administra 0.5 mL de las diluciones de la muestra de ensayo para una dosis de T1 para un grupo y T2 para el otro. De igual forma se procede con los grupos restantes pero con las diluciones de referencia S1 y S2. Transcurridos 5 días después de la inoculación los animales de cada grupo se sacrifican para extraer los ovarios, los cuales se limpian cuidadosamente, se secan con papel de filtro y se determina la masa de cada uno en una balanza de torsión con una desviación estándar de 0.2 mg. Los resultados de la masa de los ovarios son procesados estadísticamente para determinar la potencia biológica de la muestra de ensayo y definir su validez mediante las siguientes formulas.

$$E = \frac{(T2-T1) + (S2-S1)}{2}$$

$$F = \frac{(T2-S2) + (T1-S1)}{2}$$

$$h = \frac{(T2-S2) - (T1-S1)}{2}$$

Donde: T1 y T2- media de la masa de los ovarios de las ratas que recibieron 10 y 20 U de la muestra de ensayo.

S1 y S2- media de las masas de los ovarios de las ratas que recibieron 10 y 20 U de la muestra de referencia.

2: numero de grupos.

Se calcula la relación logarítmica (I) de las dosis utilizadas.

$$I = \log \frac{\text{dosis mayor (20)}}{\text{dosis menor (10)}}$$

Se calcula la pendiente (b):

$$b = \frac{E}{I}$$

Se determina la potencia y la potencia relativa.

$$M = \frac{F}{b} \quad R = \text{antilog}(2+M)$$

R: por ciento de la muestra de ensayo con respecto a la preparación de referencia que permite determinar la potencia estimada.

$$R\% = R \times 100$$

$$\text{Potencia} = \frac{R\% \times \text{Potencia Propuesta}}{100}$$

La potencia estimada debe estar en el rango de 80 a 125% de la Potencia Propuesta.

Calculo de la Varianza y del Intervalo de Confianza para determinar la validez del resultado del ensayo.

- Estimación de la varianza. Se determina la varianza mediante la siguiente expresión:

$$S^2 = \frac{\sum Q^2}{(n-1)L}$$

Donde:  $\sum Q$  - sumatoria de los valores individuales de las masas de los ovarios de los cuatro

grupos tratados.

n - numero de animales utilizados por grupo.

L - numero de grupos.

Se determina la variación de la media y de la pendiente.

$$V = \frac{S^2}{n} \quad B = \frac{V}{l}$$

Prueba de Significancia del experimento.

$$th = \frac{h}{\sqrt{V}}$$

Se debe cumplir que  $th < t$  (teórica de la tabla), lo que indicará que no hay diferencia significativa en la prueba realizada para un valor de  $P = 0,05$ .

$$g = \left(\frac{t}{n-1}\right)^2 \times B \quad t(n-1) < (0,05)$$

Si  $g < 0,1$ , los límites de confianza se determinan por la siguiente expresión

$$f1f2 = \text{antilog} + \frac{t}{b} \sqrt{V + B \times M}$$

Si  $g \geq 0,1$  la expresión para determinar los límites de confianza es la siguiente:

$$f1f2 = \text{antilog} \left[ 2 + \frac{M \times g}{1-g} + \frac{t}{b(1-g)} \times \sqrt{A \times (1-g) + B \times M} \right]$$

Índice de Validez del Ensayo.

$$\mu = \frac{S}{b}$$

En un ensayo válido el valor de  $\mu$  no debe exceder de 0.3.

Se expresan las unidades obtenidas y si corresponden o no con el rango establecido de 80 a 125 % de la Potencia Estimada. Potencia biológica, el valor de  $\lambda \leq 0.3$  y  $g < 1$  por cada ensayo realizado.

#### Determinación de la pureza electroforética

- ♦ Menor número de bandas contaminantes para una mayor pureza

#### Control de Esterilidad

- ♦ : No presenta crecimiento de microorganismo viable en los medios de cultivos.

#### Determinación de la toxicidad

- ♦ Los animales inoculados sobreviven sin presentar síntomas de toxicidad

Se realizan los siguientes ensayos a los lotes comerciales.

Determinaciones	Técnicas de Control
Determinación de lactosa 350, 1956	Método fenol sulfúrico. Anal Chem. 28,
Determinación de pH. Determinación de esterilidad	Según BP- 98 Según BP-98
Determinación de la potencia Biológica en ratas.	Según BP-98
Determinación de toxicidad Análisis electroforético en Gel de acrilamida.	Según BP- 98
Determinación de la humedad Residual	Método de Karl Fisher BP- 98
Solubilidad	Según BP- 98

Se refiere a continuación todas las técnicas de análisis que se le realizan al producto terminado y que tienen como objetivo determinar si el lote que evaluamos cumple con los requisitos de calidad para su posterior liberación y comercialización.

### Definición

La PMSG para uso veterinario es una preparación seca de una fracción de glicoproteína obtenida a partir del suero de yeguas gestantes.

Tiene actividad foliculo - estimulante y luteinisante  
Es obtenida por precipitación con alcohol

### **Características**

Es un polvo amorfo blanco ligeramente grisáceo, soluble en agua.

- Características organolépticas.

Se basa en la detección sensorial del color y la apariencia del producto.

Tamaño de la muestra: 5 frascos

Procedimiento:

A cinco muestras seleccionadas para el ensayo de esterilidad se le realizará la comprobación sensorial y se expresará si corresponde ó no con las especificaciones.

Interpretación: Será satisfactoria la prueba si la pastilla presenta un color blanco grisáceo y la mismo no se adhiere al frasco.

- Solubilidad.

Solubilidad. BP- 1998

Este método se establece para determinar el tiempo de solubilidad del producto.

Tamaño de la muestra: 2 frascos.

Procedimiento:

Dos unidades seleccionadas para el ensayo se disuelven con jeringuilla y aguja hipodérmica, con 1ml de una solución de cloruro de sodio al 0,9 %.

Se mide el tiempo que el producto requiere para pasar del estado liofilizado a una solución transparente que puede presentar algunas partículas una vez añadida la solución de cloruro de

Sodio al 0,9 %.

Interpretación.

Será satisfactorio si el tiempo transcurrido es menor de 2 minutos.

### **Identificación**

Cuando se administra\_ mediante un ensayo en ratas hembras inmaduras produce un incremento en la masa del ovario.

### **Determinación del ph**

El pH es un valor que representa la transformación de la concentración de hidrógeno en una solución acuosa.

El valor del pH en una solución es determinada midiendo la diferencia de potencial entre el electrodo indicador sensible al ion hidrogeno y un electrodo de referencia .

Se debe calibrar el equipo previamente utilizando los buffer de pH = 4 y pH = 7 antes de realizar la lectura de la muestra.

- Método

- Para la lectura de la muestra restituya el bulbo con 4 ml de agua destilada.
- Sumerja el electrodo en la solución a examinar y mida el pH.
- Controle en el registro el valor obtenido
- La norma será de  $6,9 \pm 0,6$

### **Humedad residual**

La muestra analizada debe tener un valor de Humedad > de 10 % determinada en 80 mg por el método de seme - micro determinación de agua.

Se utilizan 10 muestras para realizar este ensayo.

Transfiera 20 ml de metanol anhidro a un beaker y valore con el reactivo de Karl Fisher el punto final amperométricamente. Rápidamente añada una cantidad equivalente a 80 mg de suero de gonadotropina liofilizada, agite por 1 minuto y valore nuevamente por el reactivo de Karl Fischer determinando el punto final amperométricamente.

### **Esterilidad**

Este producto debe cumplir los requisitos de esterilidad de la BP -98.

Los medios utilizados se describen en la BP-98.

Para la detección de las bacterias los medios se incuban entre 30 °C y 35 °C y para la detección de los hongos se incuban entre 20 °C y 25 °C por no menos de 7 días. En ambos controles no debe existir crecimiento alguno.

### **Test de pirógenos**

Consiste en medir el aumento de la temperatura corporal del conejo por la inyección intravenosa de una solución estéril de la sustancia a examinar .

- Selección de los animales.

Use 3 conejos saludables y adultos de cualquier sexo y con un peso no menor de 1,5 kg, deben mantenerse con una dieta balanceada y que no contenga antibiótico, no deben tener pérdida de peso durante el tiempo que dure la prueba.



Los conejos que excedan la temperatura en 1.2 °C son excluidos y los que no suban la temperatura por encima de este rango pueden ser utilizados tres semanas posteriores a la utilización en un ensayo.

Los conejos seleccionados solo se podrán usar si mantienen un rango de temperatura entre 38,0 y 39,8.

- Tenencia de los animales.

Mantenga los animales individualmente en un área con una temperatura apropiada y uniforme .

Mantener los animales 18 horas antes del ensayo en las condiciones de temperatura expresados anteriormente para que nada pueda alterar el estado del animal .

- Equipamiento.

Se utiliza un equipo mediante el cual funciona un sistema de electrodos que se inserta en el recto del animal y que detecta la temperatura con una precisión de 0.1 °C.

La inserción del electrodo se mantiene de forma estable en el recto en el animal durante el transcurso de la prueba.

El electrodo se inserta en el recto del animal 90 min antes de la inyección de la solución a examinar.

Toda la cristalería a utilizar en el ensayo debe ser enjuagada con agua para inyección libre de pirogenos. Y esterilizada a 250 °C por 30 min ó 200 °C por 1 hora.

- Test preliminar .

Uno o dos días antes del test, inyecte intravenosamente al animal con 10 ml de solución salina 0.9 % w/v libre de pirogeno, seleccione los animales que no hayan sido tratados según los requisitos anteriormente referidos y que mantengan una temperatura de 38.5 °C

Lleve un record de la temperatura del animal empezando 90 min antes de la inyección y continuando por 3 horas después de que se haya Ningún animal debe presentar una variación de temperatura > de 0.6 °C, de lo contrario no podrá ser utilizado en el ensayo.

- Test Principal

Lleve a cabo la prueba con un grupo de 3 conejos .

- Preparación e inyección de la muestra .

La preparación se diluye con solución salina al 0.9 % w/v libre de pirogenos de forma tal que contenga 500UI de PMSG x mL .

Inyecte la solución lentamente en la vena marginal de la oreja en un tiempo que no exceda los 4 min.

Se inyectará 1 mL por kg de peso del animal el cual contendrá 500 UI /mL

Antes de inocular se controla la temperatura individual de cada uno de los animales con una frecuencia de 30 -40 min ( **temperatura inicial** )

**Máxima temperatura.** Es la temperatura que se controla después de la inyección con un intervalo no menor de 30 min empezando 90 min antes de la inyección. Examine y continúe por 3 horas después de la inyección La diferencia entre la temperatura inicial y la máxima temperatura de cada conejo es la que da la respuesta .

Cuando la diferencia es negativa el resultado es una respuesta "0"

Si los conejos muestran una diferencia de temperatura mayor de 0,2 °C entre cualquiera de 2 sucesivas lecturas tomadas durante los 90 min antes de la inyección no se podrá continuar la prueba.

- Interpretación de los resultados.

La prueba se realiza en 3 conejos en dependencia de como se obtengan los resultados .Si es necesario se repite la prueba hasta utilizar un total de 4 grupos de 3 conejos.

Tabla #1

Numero de Conejos	Muestra negativa si el valor obtenido es menor de :	Muestra positiva si el valor es mayor de:
3	1,15	2,65
6	2,80	4,30
9	4,45	5,95
12	6,60	6,60

Como se aprecia en la tabla #1 la muestra estará libre de pirogenos si el valor obtenido de temperatura es menor que el valor que se muestra en la columna # 2

Si el resultado es mayor que el de la columna #2 pero menor que el valor de la columna #3 se debe repetir la prueba o el ensayo.

Si el valor obtenido es mayor que el que se observa en la columna # 3 el ensayo no cumple los requisitos y se repite la prueba.

### Potencia biológica

Para el desarrollo del trabajo en la determinación de la Potencia Biológica se ajusta un lote de con el Segundo Standard Internacional (1966 )y es el que se utiliza de referencia en este ensayo

La Potencia Biológica de la PMSG se estima por comparación entre la masa del ovario de ratas inmaduras con similar efecto en el Standard utilizado

Se usan ratas hembras inmaduras de 21 a 28 días de edad ,diferiendo en edad no más de 3 días y con una diferencia en peso de no más de 10 g. Los grupos no deben de estar constituidos por menos de 5 ratas.

Las dosis a utilizar depende de la sensibilidad de las ratas de que dispongamos por lo que es aconsejable realizar inicialmente la curva Dosis - Respuesta donde se plotea el logaritmo de la dosis (x) contra el peso del ovario (y) partiendo de diferentes grupos de ratas que se constituyen con los mismos requisitos que se requieren para realizar la prueba . A cada grupo se le inocula una dosis determinada las cuales se definen previamente en una progresión geométrica hasta inocularlas todas de forma progresiva y que constituirán los diferentes puntos para el calculo dela recta de mejor ajuste y los valores de regresión y linealidad .Con estos elementos y la ecuación de la recta podremos determinar las dosis que usaremos en nuestro ensayo.

Una vez realizado este trabajo y tengamos las 3 dosis a utilizar tanto para el Patrón como para la muestra estaremos en disposición de preparar las muestras a inocular para ambos casos.

Una pequeña dosis es suficiente para producir una respuesta positiva y altas dosis no produce una máxima respuesta en todas las ratas..

Las muestras se preparan utilizando solución salina al 0,9 % conteniendo 1 mg de albúmina bovina por mL .Cada dosis administrada a cada rata será de un volumen total de 0,2 mL .Las muestras se mantendrán a una temperatura entre  $5 \pm 3$  °C

Inyecte subcutáneamente a cada rata la dosis determinada para el grupo .Repita la inyección 18 h, 21h, 24 h, 42 h, y 48 h después de la primera inyección .No menos de 40 horas y no más de 72 horas después de la última inyección, sacrifique las ratas y extraiga los ovarios, elimine los fluidos extraños y tejidos, pese los ovarios inmediatamente .Calcule los resultados con un método estadístico establecido l usando la masa obtenida de los 2 ovarios de cada animal acorde a la respuesta .Se podrá utilizar un Software que nos determinara la potencia Biológica y además referira si el ensayo tiene validez y precisión .Para el caso del producto terminado se deben obtener al menos 3 ensayos que cumplan con estos requisitos y posteriormente mediante un Software combinamos los resultados y obtenemos el resultado final de las muestras del lote analizado.

A continuación le mostramos estos Software.

La potencia estimada no es menor que 80% y no mayor de 125 %

La validez del ensayo debe ser menor de 1 ( $G < 1$ )

La precisión del ensayo debe ser menor de 0.25

### **Toxicidad**

En esta prueba se utilizan ratones de 8 a 10 g .

Se realiza un pool de 5 frascos utilizando para la restitución solución salina al 0,85 % de tal forma que se obtenga 200 UI por 0,5 mL

A cada uno de 5 los ratones se le inyecta 0,5 mL intravenosamente por la vena caudal. La inyección no debe durar más de 1 min.

Ninguno de los ratones puede morir antes de las 48 horas . Si uno de los ratones muere antes de las 48 horas repita la prueba con el doble del número de animales de la prueba realizada inicialmente. Ninguno de los ratones en la reprobación pueden morir

## REFERENCIAS

Anal. Chem. 28,350.1956. Método fenol sulfídrico

Bourrillon R. And Got 1959 .Constantes physico – Chemiques de la gonadotrofine du serum de jument grávide . Act Endocrin. 31- 59.

Farmacopea Británica. 1980.

Farmacopea Británica. 1993.

Farmacopea Británica 1998.

Farmacopea USP XXIII.

Hoppen , H. O., 1994. The equine placenta and equine chorionic gonadotropin-an overview. Exp. Clin. Endocr. 102: 235-243.

Moore Jr. W. Y Ward, D., 1980b. Pregnant Mare Serum Gonadotrophin an in vitro biological characterization of the lutoprotein-folltropin dual activity. J. Biol. Chem. 255: 6930-6936.

Tecnología de producción de la Gonadotropina Sérica de yeguas gestantes

Papkoff . H. (1974). Chemical and biological properties of the subunites of pregnant mare serun gonadotropin. Biochen, Biophys. Res. Commen.

Revista Normalización.No.2. 1997. La calidad y las normas de la familia ISO 9000. Unica vía para llegar al mercado.

## OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LA GONADOTROPINA SÉRICA (PMSG) EN EL PERÍODO DE 1996-1998 EN LABIOFAM.

Miriam de la Cruz González, Arnaldo Capote Milanés, Adiley Gómez Oller

Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) mail:labiofam@ceniai.inf.cu

### INTRODUCCIÓN

A partir de 1974 debido a la necesidad de sustituir la Gonadotropina Sérica (PMSG) de importación y a su amplia utilización en la práctica ginecológica, se comenzaron a escala experimental los ensayos tendientes a la obtención de PMSG; después de ser evaluados algunos aspectos relacionados con la materia prima fundamental, el plasma de yeguas gestantes, así como con el perfil dinámico de la actividad biológica del plasma de yegua gestante entre 40 y 120 días de gestación, en diferentes razas equinas: mestizas criollas y en la raza ponies, para obtener el período óptimo de sangría en los mismos (*Barreto y col, 1974, Barreto y col, 1975*).

En las experiencias de obtención en el laboratorio se ensayaron algunos métodos referidos en la literatura (*Gospodarowics y Papkoff, 1972, Remington y Rowlands, 1942 y Legault-Demare y col, 1958*) obteniéndose resultados satisfactorios según de la Cruz, 1974 y de la Cruz, 1975. Iniciándose la producción de pequeños volúmenes de PMSG a escala preparativa, así como también se realizaron pruebas para determinar los controles del proceso más adecuados, todo esto se realizó con asesoría soviética en colaboración con el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de Cuba (CENSA). De estos ensayos se obtuvieron lotes pequeños con muy buenos rendimientos.

A partir de 1977 con asesoría húngara (*Vezer 1977*) se reiniciaron los estudios para la producción de PMSG por una nueva tecnología, donde se valoraba como solvente el alcohol etílico, rendimiento del producto, rangos de pH, velocidad de adición de alcohol, velocidad de agitación así como el grado de purificación de la misma.

Paralelamente se trabajó en una mejor organización de la masa ganadera del país, rigurosidad en los controles de monta en cada finca o unidad pecuaria así como también en la creación de las brigadas de sangría por provincia.

En el año 1981 se reporta un aumento en organización y calidad en la producción de la hormona, así como en la calidad del plasma de las yeguas gestantes.

A medida que se aumentó el volumen de producción con esta técnica se profundiza en la preparación de soluciones y su valoración, los parámetros requeridos en el proceso de liofilización tanto en atmósfera de N<sub>2</sub> como en vacío y se sugiere la lactosa como estabilizador, además se compara el producto con otras preparaciones comerciales importadas en cuanto a actividad biológica, pureza así como a su comportamiento en la práctica ginecológica en los bovinos para la inducción del estro.

No es hasta este año que se crearon las premisas necesarias donde además se reporta un aumento en organización en la calidad del plasma de las yeguas gestantes y en la calidad de la producción de la hormona y se comienza a partir de esta década un nuevo avance en las formas organizativas de las sangrías teniendo la necesidad de establecer nuevos métodos de titulación de las muestras y plasmas obtenidos cuyos resultados fueran rápidos y eficaces.

Toda la experiencia acumulada en estas décadas nos coloca en condiciones de ofrecer un producto semipurificado, que satisface las necesidades actuales del país y que permite sustituir una importación lo cual tiene un gran significado económico.

## **OBJETIVOS**

El objetivo fundamental ha sido optimizar la producción de PMSG cruda de uso veterinario, para obtener un producto cada vez con mayor calidad que permita satisfacer la creciente demanda de la producción pecuaria nacional.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Método de obtención de la PMSG**

#### **Obtención del plasma**

El plasma equino de yeguas gestantes, se obtiene de las unidades equinas que se encuentran en las diferentes provincias de nuestro país, para esto se realiza un muestreo de los animales con controles reproductivos chequeados previamente, se procede a tomar muestras de sangre de aquellos que tengan de 45-100 días de gestación y se realiza el control por el test de Látex, los que resulten positivos se sangran, se decantan, obteniéndose el plasma que se recolecta en tanques y se mantienen almacenados en congelación.

Dichos tanques son transportados en carros refrigerados a la planta de hemoderivados de LABIOFAM, estos se muestrean para determinar su actividad biológica a través del test de ELISA para conocer las UI que tienen. Los tanques de plasma se guardan en congelación hasta que vayan a ser utilizados.

#### **Para producir el Sub-Lote de Producción (Ver Anexo 1)**

Se inicia la descongelación del plasma equino con 24-48h de antelación y previamente titulados por el test de ELISA, se toman los positivos en cantidad suficiente para completar un volumen de 400L depositándose en un tanque reactor, teniendo en cuenta sus características organolépticas, a ese pool de plasma se le sacan dos muestras, una para determinar su potencia a través de la prueba biológica en ratones hembras (*Lorraine y Brown, 1954*), donde se utilizan animales impúberes de 20-21 días de nacidas y libres de las principales enfermedades que afectan esa especie, la otra

muestra es para ajustar el pH del plasma con ácido clorhídrico normal sin dejar de agitar el mismo, inmediatamente después se procede a añadir el alcohol etílico (teniendo presente su contenido alcohólico) a temperatura ambiente hasta una concentración del 50%, agitándose continuamente a 60rpm, para efectuar la primera precipitación, dejándose en reposo entre 16 y 18 horas.

Posteriormente se procede a centrifugar a través de una centrifuga de canasta de 1600 rpm. El precipitado se desecha y el sobrenadante obtenido se le mide el volumen y se le calcula la cantidad de alcohol etílico a añadir (teniendo en cuenta que está al 50% de alcohol), para que alcance una concentración del 80%, agitando continuamente a 60rpm y posteriormente se deja en reposo hasta el día siguiente.

En ambas precipitaciones se comprueba el contenido alcohólico con un alcoholímetro de Gay Lussac.

Se decanta el sobrenadante cuidadosamente tratando de obtener la mayor cantidad de líquido, el precipitado se vierte en un botellón dejándose en reposo hasta el siguiente día donde se vuelve a decantar y el resto se centrifuga.

Posteriormente se realiza la diálisis en papel de celofán o membrana de diálisis cambiándose la solución dializante de 2 a 3 veces y se vuelve a centrifugar, quedando la hormona en el sobrenadante, del cual se toma una muestra para determinar actividad biológica (prueba biológica en ratas y ratones) y el resto se guarda en congelación convenientemente identificada hasta su preparación comercial y envase..

### **Preparación del Lote Comercial (Ver anexo 2)**

Para preparar un Lote Comercial se utilizan varios Sub-Lotes de producción teniendo en cuenta el volumen y título de los mismos, los cuales se descongelan previamente y se mezclan, posteriormente se le añade Lactosa calidad reactivo como estabilizador quedando con una concentración final de 50 mg/ml, se procede a sacar tres muestras del lote, dos para determinar la actividad biológica del lote (prueba biológica en ratones y ratas) y otra para realizar los controles físico-químicos, si estos últimos están en norma se clarifica y se filtra estéril por filtro de membrana, utilizando las distintas porosidades para lograr su esterilidad, haciéndosele el correspondiente control de calidad del producto.

Si los controles biológicos, físico-químicos y de esterilidad son satisfactorios se procede al llenado del lote de acuerdo al título y su presentación, el cual se realiza en un cuarto estéril. Posteriormente se liofiliza el producto y se sellan los frascos.

Se toman muestras según la metodología establecida para realizar los siguientes controles del producto terminado: esterilidad, pruebas biológicas en ratas, humedad residual y toxicidad (según BP 80).



Si los resultados son satisfactorios se procede al etiqueteo y embalaje de los frascos, los cuales se almacenan en cuartos refrigerados de 2-8 °C, evitando la congelación y la humedad.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En los trabajos preliminares realizados para determinar la raza equina idónea que nos permitiera obtener los mayores niveles de PMSG se observó que la raza ponies era la que mayores niveles de actividad de la hormona tenía (Ver anexo 3) en comparación con la mestiza criolla (Ver anexo 4). No obstante estos resultados se eligió esta última por presentar mayor número de ejemplares en las diferentes unidades pecuarias del país.

En las experiencias realizadas aplicando el método de (Gospodarowics y Papkoff, 1972) se obtuvieron rendimientos que oscilaban entre el 52.46% y el 76.0%, lo cual corrobora lo expresado en la literatura (Gospodarowics y Papkoff, 1972 *op cit*) que plantea que el rendimiento óptimo debe estar entre el 50 y el 80%.

Tabla 1-Rendimientos obtenidos en dos lotes experimentales del método de Gospodarowics y Papkoff (1972).

# animal	Suero			Producto		
	del	U/ml suero	Cant. empleada (ml)	Cantidad mg	Actividad U/mg	% Rendimiento
57		250	1440	1258	150	52.46
16		200	1000	620	250	76

En los primeros 10 lotes realizados por la tecnología actual los resultados obtenidos en base a rendimiento oscilan entre un 35% y un 52% (Ver anexo 5) para un promedio de 43.8%, independientemente de estos resultados se escogió dicha tecnología porque la materia prima fundamental es de producción nacional además que estos eran resultados preliminares.

Tabla 2-Resultados obtenidos con la aplicación de PMSG cubana y una de importación (I).

PMSG cubana	# de animales	%
Animales con anestro	44	
Animales con estro después de tratados	31	70.4
PMSG importación I	# de animales	%
Animales con anestro	49	
Animales con estro después de tratados	38	76

Tabla 3-Resultados obtenidos con la aplicación de PMSG cubana y una de importación (II).

PMSG cubana	# de animales	%
Animales con anestro	92	
Animales con estro después de tratados	65	70.6

PMSG importacion II	# de animales	%
Animales con anestro	40	
Animales con estro después de tratados	30	75

Los resultados obtenidos con la aplicación de la PMSG cubana, PMSG importación I y PMSG importación II revelaron que hay pequeñas diferencias entre los animales que presentaron estro, como reflejan las tablas 2 y 3, lo cual podría explicarse en función de la mayor pureza de los productos importados, así como que no estaba estabilizada la tecnología ni el método de control de la calidad.

En los últimos años analizados (1996-1998) la cantidad de bulbos X 1000UI producidas y comercializadas en el año 1996 fue muy baja si la comparamos con los 2 años siguientes donde se aprecia un salto muy positivo como refleja la tabla 4.

Tabla 4- Análisis comparativo de cantidad de PMSG producida en el período de 1996-1998 X dosis de 1000UI.

Año	PLAN	REAL	% DE CUMP.
1996	100000	40913	40.9
1997	45787	109169	238.4
1998	88512	134994	152.5
Total	393929	355532	

Es a partir de 1997 se logró un mejor sincronismo entre todas las partes involucradas en la producción de la hormona, dígame los medios de testaje en el campo (test de Látex) para diagnosticar gestación en las yeguas y de esta forma sangrar aquellas que realmente tengan el tiempo que se necesita (40-100 días), por otro lado el test de ELISA para determinar la calidad del plasma enviado por las provincias, todo esto se traduce en un sub-lote de producción de mejor calidad y a su vez un producto final con los requerimientos necesarios para su rápida comercialización a nivel nacional. Además a partir del propio año 1997 se inicia la aplicación del proyecto "Optimización del proceso de obtención de la PMSG cruda para la reproducción animal" presentado al Fondo Fiduciario "Pérez Guerrero" para la Cooperación Económica y Técnica entre

Países en Desarrollo miembros del grupo de los 77 de los Países No Alineados el cual fue aprobado y ha apoyado con creces todo el esfuerzo que viene realizando nuestra empresa para obtener los resultados anteriormente descritos.

De los 10 lotes de producción analizados en el último año en cuanto a rendimiento Podemos destacar que su comportamiento ha sido estable oscilando entre un 49 y un 54.8% para un promedio de un 53.5% (Ver anexo 6), lo cual demuestra que se está trabajando en función de optimizar el método de producción establecido para obtener mejores resultados en cuanto calidad y cantidad.

Tabla #5 Comportamiento de las importaciones en el trienio 1996-1998

Año	Cantidad de dosis X1000UI	Valor en USD
1,996	55,000	131,899
1,997	40,000	108,000
1,998	35,000	114,470.58
Total	130,000	354,370.57

Se aprecia una disminución de las importaciones en los últimos dos años que se analizan, lo cual demuestra cuan importante ha sido el aumento de la producción de la PMSG cubana para disminuir los gastos en divisa que por este concepto tiene que hacer el país, de ahí la importancia de lograr una buena optimización del proceso de obtención de la PMSG para suplir toda la demanda del Ministerio de la Agricultura y de esta forma disminuir a su máxima expresión las importaciones de hormona nacional.

## CONCLUSIONES

Se ha logrado optimizar el proceso productivo lo que permite obtener una PMSG con calidad suficiente y en cantidades encaminadas a satisfacer la demanda de la ganadería cubana, creando las premisas para la obtención por medio de la purificación de un producto de alta calidad.

## BIBLIOGRAFÍA

Barreto,G. y col.(1974).Estudio de la actividad de la Gonadotropina Sérica PMSG, durante la gestación de yeguas en Cuba.

Barreto,G. y col. (1975). Comparación de los niveles de PMSG en yeguas gestantes de la raza Ponies y mestiza criolla.

Cruz de la, M. y col.(1974).Resultados primarios obtenidos con la aplicación de una tecnología para la producción de PMSG.Rev. Reprod. Anim. 12:43-50

Cruz de la, M. y col. (1975). Resultados obtenidos en la extracción de Gonadotropina Sérica.Rev. Reprod Anim. 20:32-41.

Gospodarowicz,D. y Papkoff,H. (1972). Endocrinology. 91. 101p

Legault-Demare, L., Clauser, H. y Jutisz, M., 1958. Biochemic and Biophys. Acta. 30:169.

Lorraine,J.A. y Brawn,L.B.(1954). Método para la determinación de actividad biológica en ratones. Acta Endocrinology.50.172-179.

Remington, C. y Rowlands, I. W., 1941. 35:736.

Veze

## Anexo 1

### FLUJO DE PRODUCCION DE LA PMSG

Recepción de los tanques de plasma de las provincias hasta la planta

»

1 - Recepción de plasma

»

Determinación de actividad biológica  
de cada tanque de plasma por ELISA

»

2 -Preparación del pool de plasma mezclando varios tanques hasta  
aproximadamente 400Ltrs para la producción de un sub lote de  
producción (1.5h)

»

3 -Ajuste del pH del pool de plasma. (3h)

»

4 -Primera precipitación alcohólica (2h).

»

Determinación de actividad biológica  
del pool de plasma en ratones (72h)

»

5 -Centrifugación (Cantidad de sobrenadante 700 Ltrs aprox) (4h) 1600  
rpm.

»

6 -Segunda precipitación alcohólica

»

7 -Decantación (4h).

»

8 -Centrifugación (72h) 2000 rpm

»

9 -Diálisis (48h)

»

10 -Centrifugación (Cantidad de hormona 2 Ltrs aprox) (4h) 2000 rpm

»

Determinación de actividad biológica  
de la hormona obtenida en ratones (72h)

»

Almacenamiento a -20°C hasta que se tengan 5 ó más lotes semanales.

**ANEXO2- Flujo de producción para la elaboración de lotes comerciales.**

- 1 -Descongelación de los lotes semanales que van a conformar lote comercial (4h).  
»
- 2 -Mezcla de lotes semanales obteniéndose un volumen de 10Ltrs aprox (1/2h).  
»
- 3 -Adición de estabilizador (Lactosa al 5%) (1h).  
»

## CARACTERIZACIÓN DE LA GONADOTROPINA SÉRICA EQUINA. SU USO EN LA REPRODUCCION ANIMAL

Rodolfo Pedroso\*, Adiley Gómez \*\*

\* Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal (CIMA).

\*\* Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) e-mail:labiofam@ceniai.inf.cu

### INTRODUCCIÓN

El objetivo que perseguimos con esta conferencia es sintetizar la información disponible sobre las diferentes características de la Gonadotropina Sérica Equina (PMSG) como son: secreción, características bioquímicas, farmacológicas e inmunológicas, así como sus aplicaciones y uso.

La primera referencia existente sobre esta hormona, también conocida como Gonadotropina del Suero de la Yegua Preñada (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin: PMSG) proviene de (*Cole y Hart, 1930*), quienes administraron suero de yeguas gestantes a ratas prepúberes y observaron que producía madurez sexual acompañada de un aumento del peso ovárico. Este primer reporte describe con gran acierto varias características de la hormona tales como su efecto ovariotrófico, períodos de la gestación de la yegua en que es secretada o fluidos de los que es posible aislarla.

Durante la década de 1930 se realizaron varios trabajos con el objetivo de caracterizar, cuantificar y purificar la sustancia (*Catchpole, 1934*), (*Cole y Saunders, 1935*) y (*D'Amour 1940*). En el año 1935 al demostrarse que las cantidades de la hormona que atraviesan el filtro renal son mínimas se describieron varias vías de metabolización de la hormona y se demuestra que su permanencia en sangre es relativamente larga (*Catchpole et al. 1935*). También en este mismo año varios investigadores comprobaron que el ovario no juega un papel importante en el catabolismo de la hormona por lo que una sola dosis causaba el mismo efecto que varias de ellas.

Muy tempranamente se trató de cuantificar la hormona a través de su efecto biológico en ratas definiéndose en primera instancia las UR (Unidades Ratas) (*Cole y Saunders, 1935*) *op cit.*, se continuó trabajando en este sentido para unificar criterios y en 1940 se adopta la UI (*Cole y Erway, 1935*), actualmente se trabaja con el Segundo Standard Internacional definido por Bagham y Woodward en 1966.

A partir de 1940 se comienza a aplicar la PMSG en superovulación en ratas, obteniéndose superfecundidad lo cual abrió un campo a toda una línea de aplicación de la PMSG en tratamientos de inducción superovulatoria (*Cole et al., 1940*).

### **Secreción en la yegua.**

Los niveles de PMSG en la yegua comienzan a ser detectables en sangre entre los 32 y 40 días de gestación, pudiendo encontrarse en la circulación hasta los 140 a 200 días de gestación. En el día 80 se encuentran los niveles máximos de PMSG circulantes siendo estos de 6mg/ml (*Papkof, 1981*). En algunos animales este pico se mantiene un cierto tiempo mientras en otros comienzan a decaer tempranamente. La tasa de desaparición de la hormona en el suero es muy baja durante el 4º y 5º mes de gestación lo que no necesariamente indica el mantenimiento de una alta secreción activa. El aumento de la secreción de PMSG puede correlacionarse con el desarrollo de una estructura endometrial especializada (*Brendemuehl et al., 1996*). Entre los días 10 y 30 de gestación comienzan a aparecer en el útero grávido de la yegua, unas pequeñas estructuras de aspecto ulceroso alrededor del embrión, membranas y líquidos embrionarios, las cuales se van a encontrar yuxtapuestas al corion denominadas copas endometriales. Inicialmente aparecen como pequeñas erupciones localizadas en el endometrio, hacia los días 70-80 de gestación van creciendo por su forma periférica y tomando forma cóncava, haciéndose más localizadas. Su superficie se ve llena de una secreción exocrina de aspecto viscoso y color miel que puede contener hasta 1000000 UI de PMSG por gramo de tejido. Posteriormente entre los días 100 y 120 de gestación comienzan a degenerar viéndoseles necrosadas con su secreción exocrina en el lumen uterino (*Allen, 1984*).

Estas copas endometriales se encuentran cargadas de células secretoras que son las que producen la PMSG y en estos momentos se conoce con certeza que a diferencia de lo que se pensaba en un inicio no son de origen materno, sino son células del trofoblasto que invaden el endometrio uterino y forman las copas endometriales (*Allen y Moor, 1972*) y (*Moor y cols, 1979*). Este proceso se produce de la siguiente forma: hacia los 20 días de gestación el blastocisto está rodeado de una cápsula, antes de la adhesión el epitelio endometrial de la zona donde se va a producir se glicosila, lo que facilita la adhesión y tendría efecto sobre la respuesta inmune local del endometrio. Una vez liberado de la cápsula el trofoblasto entra en íntimo contacto con zonas del endometrio ampliamente vascularizadas, comienza la invasión con el desarrollo de pseudópodos en la superficie apical de las células acordonadas, los que crecen asociándose con el plasmolema de las células epiteliales del endometrio, este es un proceso de corta duración y va seguido de un proceso en el cual las células del epitelio luminal fagocitan las células rotas del endometrio, eventualmente la membrana basal del endometrio es penetrada llegando la invasión al estroma. Por último una pequeña cantidad de los millones de células invasoras son transformadas en células de las copas endometriales lo cual ocurre en el estroma, necrosándose el resto (Ver anexo 1) (*Enders y Liu, 1991*).



Las células de las copas son claramente diferenciables, pues son grandes, binucleadas, con un citoplasma basófilo que contiene numerosas vesículas pequeñas, el núcleo posee uno o dos nucleolos prominentes rodeados por una zona de cuerpos vesiculares y gotitas lipídicas. En el citoplasma existe un abundante retículo endoplasmático rugoso y pocas mitocondrias, lo que indica una alta actividad celular dirigida desde el núcleo. La membrana citoplasmática de estas células tiene aspecto ameboidal con una capa de finos filamentos en el ectoplasma. Las copas en sí tienen poca cantidad de vasos sanguíneos mientras que por debajo del estroma existe un gran desarrollo de sinusoides linfáticos (*Moor et al., 1975*).

### **Regulación de la secreción**

Experimentos realizados demostraron que las células secretoras cultivadas *in vitro* permanecen más tiempo produciendo activamente la PMSG que lo que lo hacen en el animal, lo cual demostró que la hormona no es un mecanismo importante en la inhibición de su liberación. Por otro lado se comprobó que existe una correlación entre el desarrollo de las copas y la aparición de anticuerpos citotóxicos contra el Complejo Mayor de histocompatibilidad (MHC) paternos y por tanto la respuesta inmunológica humoral es progresiva, siendo muy alta entre los días 44 y 70 de gestación (*Crump et al., 1987*).

Una vez que las células invadieron y se instalaron formando las copas, disminuye la expresión del antígeno de MHC de origen paterno, lo que lo hace menos susceptible a una respuesta MHC durante esta etapa, por otro lado se plantea que la PMSG tiene propiedades anti-inmunológicas, que harían que una vez que comienza activamente su secreción disminuya dicha respuesta. Hacia los 90 días de gestación los primeros linfocitos acumulados en la periferia de la copa la invaden fagocitando muchas células. Una gran cantidad de leucocitos queda en la base de la copa, formando la línea de separación por donde esta se desprenderá una vez necrosada. Todo lo anterior permite concluir que la vida de las copas está determinada básicamente por la respuesta inmunológica materna, no existiendo mecanismos hormonales de retroregulación (*Hoppen, 1994*).

### **Relación estructura-efecto.**

Solo se ha reportado la existencia de gonadotropinas séricas en equinos, humanos (*Pierce y Parsons, 1981*) y otros primates (*Norman et al, 1994*). La PMSG es la hormona glicoproteica con mayor contenido de carbohidratos (45%), su PM es de 61000 daltons, su contenido de ácido siálico es del 10% el mayor de todas las glicoproteínas, este es el responsable de su larga vida media (*Matinuk et al., 1991*).

Debido a su tamaño la molécula de PMSG no atraviesa fácilmente el filtro renal lo que alarga su tiempo en circulación, siendo su concentración en la orina de solo 1:100 de la encontrada en sangre, mientras en la leche es aun menor de solo 1:300, por lo que se considera en ambos casos indetectables. Tampoco atraviesa la membrana placentaria y por tanto no se detecta en sangre fetal (*Mc Donald, 1991*).

Está constituida por dos subunidades la a y la b que se encuentran unidas no covalentemente. Es una estructura muy similar a la LH, la FSH y otras Gonadotropinas (*Pierce y parson, 1981*). Ambas subunidades tienen comportamientos cromatográficos diferentes entre sí y a la hormona intacta. Sus PM son de 44000 y 17000 daltons respectivamente. La subunidad a tiene una secuencia aminoacídica igual a la de la eLH y muy parecida a la eFSH a, aunque son codificadas por diferentes genes (*Moore Jr y cols, 1980*), a su vez esta secuencia tiene una similitud entre el 70-90% con las de las cadenas a de las FSH de otras especies. La subunidad b como en todas las gonadotropinas es la responsable de la actividad hormonal específica y es la más larga entre todas las glicoproteínas con 149 residuos de aminoácidos, su estructura primaria es exactamente igual a la de la eLH b y están codificadas por el mismo gen solo difieren en el grado de glicosilación, esto explica la similitud en sus efectos biológicos de la eLH y la PMSG. La subunidad b de la hCG y la PMSG tiene extensiones COOH de 30 residuos de AA, pero además estas zonas (AA 114-149) son las de mayor glicosilación en la molécula, se desconoce que efecto tiene esto. Los carbohidratos en la subunidad a son solamente el 22% de su peso mientras que en la subunidad b son el 50% (*Sugino et al., 1987*).

En tejidos de otras especies puede unirse a receptores de FSH y LH mientras que en la yegua solo se unen a receptores LH. Varios investigadores analizaron esta doble actividad de la hormona en otras especies y concluyeron que era provocada por una sola molécula. Ambas cadenas son codificadas por genes diferentes. La célula productora debe tener capacidad de activar un gen para la subunidad a y seleccionar el gen específico para la subunidad b. Esta última es utilizada totalmente mientras la a debe estar en el tejido en cantidades suficientes para unirse con la anterior (*Boothby et al., 1981*).

Las subunidades de forma separada son inactivas recuperado su actividad biológica cuando son recombinadas. Esto puede ser explicado porque tanto regiones de la subunidad a como algunos dominios de la b están envueltos en el reconocimiento por parte del receptor (*Pierce y Parsons, 1981 op cit*),. Se ha reportado un solo caso de PMSG recombinante y se obtuvo por clonación original de ambas subunidades por separado.

### **Características inmunológicas.**

Desde el punto de vista inmunológico la PMSG es una molécula compleja siendo dispares los resultados de producción de anticuerpos específicos. Además es posible que se inhiba la producción de linfocitos pero esto es posible más por la presencia de contaminantes que por la hormona en sí misma.

Se han producido anticuerpos en conejo (*Wide y Wide, 1963 y Bindom, 1970*), ratón (*Schams y Papkoff, 1972*), ovino (*Jabbour y Evans, 1991*), bovino (*Saumanden y Chupin, 1981*), pavo (*Allen, 1969*) y caprino (*Kummer et al., 1980*). También se han producido anticuerpos monoclonales mediante hibridomas producidos *in vitro*, los sueros anti-PMSG han sido utilizados para estudios de la molécula, determinación de la preñez y actualmente en tratamientos superovulatorios en bovinos y ovinos. Es importante considerar que los anticuerpos anti-PMSG no atraviesan la placenta pero sí el calostro (*Beckers y col, 1995*).

Maurel y col en 1992 realizaron un mapa de determinantes antigénicos de cada subunidad y lograron localizar los epitopes que interaccionan con los receptores de LH y FSH.

Los ensayos realizados para comprobar posibles determinantes antigénicos similares a otras hormonas demuestran que la PMSG tiene características diferentes, los más similares pertenecen a la subunidad a que presenta curvas de inhibición con RIA muy similares a las subunidades a de las otras gonadotropinas equinas. Esto no se comporta así para la subunidad b ni cuando se compara con gonadotropinas no equinas, las curvas más similares resultaron con la eLH, hecho previsible dada la alta similitud estructural que existe entre ellas. En varios ensayos con PMSG y hCG se ha visto que hay reacción cruzada lo que puede inferirse como cierta similitud de en los epitopes de ambas moléculas (*Farmer y Papkof, 1979*).

De manera general en la obtención de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales han sido mucho los trabajos que se han estado realizando y cada uno de ellos han permitido revelar muchas propiedades importantes de las subunidades de la PMSG desde el punto de vista inmunológico (*Ungerfeld y Rubianes, 1998*).

### **Farmacodinámica.**

La larga permanencia en sangre de la PMSG aporta ventajas para su aplicación y en tratamientos superovulatorios, ya que la administración de una sola dosis es suficiente para provocar el efecto deseado. Dicha permanencia es necesaria para mantener el suministro gonadotrófico que requieren los ovarios para sostener la esteroidogénesis (*Wanget al., 1995*).

A continuación se presenta una tabla con el tiempo de vida medio de la PMSG en las diferentes especies.

Especie	Tiempo de vida medio
bovinos	5-7 días aunque su presencia puede ser detectable hasta 10 u 11 días después de ser suministrada.
ovejas	21 hrs
conejo	26 hrs
ratones	No hay un consenso al respecto se plantean 6hrs, 26hrs o 6 días, aunque si hay acuerdo en que a los 54-60 hrs de administrada las concentraciones son biológicamente activas.
ratas	Es la gonadotropina de mayor permanencia en circulación pudiendo estimular varias veces al receptor durante este período.

La no metabolización de la hormona en el ovario se corroboró con experimentos en los cuales se utilizaron animales enteros y ovariectomizados y se observó que las tasas de desaparición de la hormona eran muy similares en ambos casos (*Mc Intosh et al., 1975*).

Al parecer la metabolización de la hormona es realizada básicamente por células parenquimatosas hepáticas que captan la molécula por receptores específicos de calcio una vez que el ácido siálico haya sido removido (*Hudgin y cols, 1974*).

Sin embargo estos valores y otras características farmacológicas, deben ser tomados como propios de cada preparación, ya que existe una alta variabilidad entre las diferentes partidas comerciales (*Saumande, 1990*), puesto que el método de purificación que se utiliza influye en el % de remoción de ácido siálico y esto cambia el tiempo de circulación de la hormona y si bien es cierto que no influye en su actividad como FSH si afecta su comportamiento como LH la cual tiene una dependencia directa con la cantidad de ácido siálico que tiene la molécula (*Hirako y cols, 1996*), por lo que es aconsejable para separa las moléculas de PMSG utilizar cromatografía de adsorción con hidroxilapatita pues no afecta el contenido de ácido siálico de la hormona (*Moore Jr y Ward, 1980*).

## BIBLIOGRAFÍA

Allen, W.R., 1969. A quantitative immunological assay for Pregnant Mare Serum Gonadotrophin. *J. Endocr.* 43:581-591.

Allen, W.R., 1984. Hormonal control of early pregnancy in the mare. *Anim. Rep. Sci.* 7:283-304.

Allen, W.R. y Moor, R.M., 1972. The origin of the equine endometrial cups: I production of eCG by fetal trophoblast cells. *J. Rep. Fert.* 29:313-316.

Bangham, D.R. y Woodward, P. M., 1996. The second international standard for serum gonadotrophin. *Bull. World Health Organ.* 35:731-733

Beckers, J. F., Remy, B., Baril, G., Figueiredo, J. R., Bureau, F., Sulon, J. y Saumande, J. 1995. Anti-eCG antibodies are transmitted via the colostrum in goats. *Theriogenology* 43:165.

Bindon, B. M., 1970. Prolonged activity in vivo of rabbit antisera to placental gonadotrophin. *J. Endocr.* 46: 221-227.

Boothby, M., Ruddon, R. W., Anderson, C., Mc Williams, D. y Boime, I., 1981. A single gonadotrophin  $\alpha$ -subunit gene in normal tissue and tumor-derived cells-lines. *J. Biol. Chem.* 256: 5121-5127.

Brendemuehl, J. P., Carson, R. L., Wenzel, J. G. W., Boosinger, T. R. y Shelby, R. A., 1996. Effects of grazing endophyte-infected tall fescue on eCG and progesterone concentrations from gestation day 21 to 300 in the mare. *Theriogenology* 46:85-96.

Catchpole, H., 1934. The gonad stimulating hormone of pregnant mares. *Am. J. Anat.* 55:167-218.

Catchpole, H., Cole, H. y Pearson, P., 1935. studies on the rat of disappearance and fate of mare gonadotrophic hormone following intravenous injection. Am. J. Physiol. 112:21-26.

Cole, H. y Erway, J., 1941. 48-hours assay test for equine gonadotropin with results expressed in International Units. Am. J. Physiol. 29:514-519.

Cole, H. y Hart, G., 1930. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in affecting the sexual maturity of the immature rat. Am. J. Physiol. 29:57-68.

Cole, H., Pencharz, R. y Goss, H., 1940 . On the biological properties of highly purified gonadotropin from pregnant mare serum. Endocrinology 27:548-553.

Cole, H. y Saunders, F., 1935. The concentration of gonad-stimulating hormone in blood serum and of oestrin in the urine throughout pregnancy in mare. Endocrinology 19:199-208.

Crump, A., Donaldson, W. L., Miller, J., Kyddm, J. H., Allen, W. R. y Antezak, D. F., 1987. Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on horse trophoblast. J. Rep. Fert. (suppl.) 35:379-388.

D'Amour y D'Amour, M., 1940. A comparison of the international gonadotropin standards. Endocrinology 27:68-70.

Enders, A. C. y Liu, I. K. M., 1991. Differentiation, migration and maturation of equine chorionic girdle cells. Biol. Reprod. 44. (suppl. 1):6.

Farmer, S. W. y Papkof, H., 1979. Immunochemical studies with Pregnant Mare Serum Gonadotrophin. Biol. Reprod. 21:425-432.

Ginther, O., 1985. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. Equine vet. J., Suppl. 3:41-48.

Hirako, M., Hotta, M., Kasa, S., Takahashi, T. y Hashizume, K., 1996. Serum half-life and *in vivo* actions of asialo equine chorionic gonadotropin in Holstein heifers. 13<sup>th</sup> ICAR, Sidney, Australia.

Hoppen, H. O., 1994. The equine placenta and equine chorionic gonadotropin - an overview. Exp. Clin. Endocr. 102:235-243.

Hudgin, R., Pricer, W. Jr. y Ashwell, G., 1974. The isolation and properties of a rabbit liver binding proteins specific for asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 249:5536-5543.

Jabbour, H. M. y Evans, G., 1991. Ovarian and endocrine responses of merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. *Anim. Rep. Sci.* 24:259-270.

Kirkwood, R. N., Soede, N. M., Dyck, G. H. y Thacker, P. A., 1995. The effect of immunoneutralization of PMSG at a gonadotropin-induced oestrus on the duration of ovulation and reproductive performance of sows. *Anim. Sci.* 61:321-324.

Kummer, V., Zraly, Z., Holcak, V., Veznick, Z., Schegelova, J. y Hrusca, K., 1980. Supperovulation in cattle: effect of goat anti-PMSG serum. *Theriogenology* 14:383-390.

Martinuk, S., Manning, A., Black, W. and Murphy, B., 1991. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. *Biol. Reprod.* 45:598-604.

Maurel, M., Ban, E., Bidart, J. y Combarous, Y., 1992. Immunochemical study of equine chorionic gonadotrophin (eCG or PMSG): antigenic determinants on a- and b-subunits. *Bioch. Bioph. Acta* 1159:74-80.

Mc Donald, L. E., 1991. *Endocrinología veterinaria y reproducción*. Ed. Iberoamericana Mc-Graw-Hill.

Mc Intosh, J., Moor, R. y Allen, W., 1975. Pregnant Mare Serum Gonadotropin: rate of clearance from the circulation of sheep. *J. Rep. Fert.* 44:95-100

Moor, R. M., Allen, W. R. y Hamilton, D. W., 1975. Origin and histogenesis of equine endometrial cups. *J. Rep. Fert. (suppl.)* 23:391-396.

Moore, J. M., Jr., Burleigh, B. y Ward, D., 1980. Chorionic gonadotropins: comparative studies and comments on relationship to other glycoprotein hormones. En Segal S (ed) *Chorionic gonadotrophins*. Plenum Press, New York, p 89.

Moore Jr., W. y Ward, D., 1980. Pregnant Mare Serum Gonadotrophin. Rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits. *J. Biol. Chem.* 255:6923-6929.

Moore Jr., W. T., Ward, D. N. y Burleigh, B. D., 1979. Primary structure of Pregnant Mare Serum Gonadotrophin alpha subunit.

- Norman R. J., Amato, F. y Simula, A., 1994. Expression and purification of chorionic gonadotropin from marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biol. Reprod.* 50 (suppl.1):458.
- Papkof, H., 1981. Variations in the property of equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology* 15:1-11.
- Pierce, J. y Parsons, T., 1981. Glycoprotein hormone structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50:465-495.
- Saumande, J., 1990. Superovulation chez les bovins: actualities et perspectives. En: *Proceedings de la 6<sup>ta</sup> Reunión A.E.T.E.*, Lyon, Francia, p. 97-141.
- Saumande, J. y Chupin, D., 1981. Production of PMSG antiserum in cattle: assay of inhibitory activity and use in superovulated heifers. *Theriogenology* 15:108.
- Schams, D. y Papkoff, H., 1972. Chemical and immunochemical studies of Pregnant Mare serum Gonadotrophin. *Bioch. Bioph. Acta* 263:139-148.
- Sugino, H., Bousfield, G., Moore Jr, W. y Ward, D., 1987. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequences of equine chorionic gonadotropin b-subunit. *J. Biol. Chem.* 262: 8603-8609.
- Ungerfeld, R. y Rubianes, E. 1998. Effectiveness of short progesterone/progestagen treatment for induce fertile estrus in ewes during late seasonal anestrus. Submitted.
- Ungerfeld, R., 1998. *Gonadotropina Sérica Equina: caracterización y utilización*. Uppsala, Montevideo. report 15:36.
- Wang, X., Kole, A. R. y Greenwald, G. S., 1995. In vitro and in vivo evidence on the site of neutralization of equine chorionic gonadotrophin (eCG) by an eCG antiserum. *J. Rep. Fert.* 104:237-241.



## GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA LA GONADOTROPINA SÉRICA DE YEGUAS GESTANTES. ESTUDIO PRELIMINAR

Rosa María Rodríguez Calle\*, Claudia Mondéjar Noa\*, R.E. Polanco Pérez\*,  
A.M. Alfonso Fernández \*\*, G. Bombino López\*\*

\* Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) e-mail: labiofam@ceniai.inf.cu

\*\*Centro de Inmunología Molecular (CIM)

### INTRODUCCIÓN

Gonadotropina Coriónica equina (**eCG**), previamente conocida como Gonadotropina sérica de yeguas gestantes (**PMSG**), es secretada por las células trofoblásticas durante la gestación. Ésta pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas que incluye la Hormona Luteinizante (**LH**), Hormona Estimulante del Folículo (**FSH**) y la Hormona Estimulante de la tiroide (**TSH**). Estas hormonas son heterodímeros compuestos de dos subunidades asociadas no covalentemente. Dentro de unas especies la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  es idéntica en secuencia de aminoácidos para las diferentes hormonas glicoproteicas, mientras que la subunidad  $\beta$  de cada hormona posee secuencias únicas y confiere la especificidad hormonal (1). Estas dos subunidades están codificadas por genes separados, una única copia para la subunidad  $\alpha$  (2) y una o múltiples copias para  $\beta$  (3 y 4). Desde que en el año 1975 Kohler y Milstein (5) lograron obtener líneas celulares de híbridos generados a partir de la fusión celular de esplenocitos de ratón con células de mieloma murino, capaces de secretar inmunoglobulinas homogéneas de especificidad predefinida, ha revolucionado nuestras posibilidades de uso de las inmunoglobulinas. La selección de esta especie obedece a su amplio repertorio de respuesta de anticuerpos y a la existencia de mielomas bien adaptados al cultivo y que no secreten inmunoglobulinas propias, factor este importante porque conviene lógicamente que los hibridomas resultantes produzcan solo el anticuerpo específico del linfocito parental. Los hibridomas expresan tanto la propiedad de producir anticuerpos como el carácter inmortal de las células de mieloma (6). El extenso uso de los anticuerpos monoclonales (**AcM**) ha creado la necesidad de estrategias y métodos convenientes para su obtención y producción en cantidades y calidad suficiente con el objetivo, entre otros, de producir sustancias destinadas a la investigación, el diagnóstico, el tratamiento y la industria (7 y 8). El desarrollo de esta tecnología ha posibilitado obtener **AcM** con la especificidad, reproducibilidad e inagotabilidad imposibles de lograr por técnicas convencionales de inmunización y preparación de antiseros (9), desde entonces estos han tenido un enorme impacto en la medicina veterinaria, los cuales son ampliamente utilizados en el diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades animales, purificación de proteínas, análisis de receptores hormonales y constituyen poderosas pruebas topográficas que pueden ser utilizadas para examinar la estructura tridimensional de hormonas y para definir sus sitios funcionales (10, 11, 12, 13 y 14). Éstos son reactivos homogéneos y totalmente reproducibles, en la actualidad existen posibilidades tecnológicas que

garantizan su producción en relación con la demanda (15). Por las ventajas que éstos ofrecen sobre los preparados de anticuerpos policlonales nos propusimos como objetivo generar un anticuerpo monoclonal contra la **PMSG/eCG**, con vistas a producir un sistema de detección rápido que garantice un diagnóstico más certero, que permita monitorear la actividad de la gonadotropina en el plasma o suero de yeguas gestantes, el cual nos aportaría las siguientes ventajas:

1) Kits diagnósticos (**ELISA** y **Látex**): La técnica de **Látex** es un método rápido para detectar la gestación temprana a nivel de campo y de esta forma se evitaría la detección por el método tradicional del tacto rectal. La técnica de **ELISA** se utiliza en la determinación de la concentración de la **PMSG/eCG** en el suero para la producción a gran escala de ésta. Con el uso de este **AcM** en los Kits diagnósticos se evitaría todo el proceso de obtención del anticuerpo policlonal en carneros y conejos, y así los problemas de estandarización tales como especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y disponibilidad del producto a gran escala.

2) Superovulación en hembras donantes de embriones para transplantes: Como el tiempo de vida media de la **PMSG** en algunas especies es largo, esto trae consigo efectos adversos durante un tratamiento de superovulación, los cuales pueden ser superados con un **AcM** anti-**PMSG**. Esto deja una producción más alta de embriones transferibles en donantes superovulados con **PMSG**. Como es conocido el transplante de embriones es una técnica más avanzada que la inseminación artificial pues a través de ésta se le pueden introducir gérmenes patógenos a los animales, lo que no sucede así con los transplantes. A su vez, al facilitar la **PMSG** la sincronización del ciclo de los animales, permite que se pueda conocer exactamente cuando se producirían los partos y con ello asegurar condiciones para evitar muertes.

3) Purificación de **PMSG/eCG** por Cromatografía de Afinidad: El desarrollo de la tecnología facilita la purificación de la **PMSG/eCG** a través de Cromatografía de Afinidad con un anticuerpo monoclonal por medio de la cual es posible suministrar cantidades comerciales de un producto altamente purificado. Una gran ventaja del producto altamente purificado es la incidencia reducida de grandes folículos no deseables, lo cual implica problemas en la fertilización.

## MATERIALES Y METODOS

### Hormonas

Las hormonas utilizadas fueron la **PMSG** (1 mg/mL) purificada en el Centro de Inmunología Molecular, la Gonadotropina Coriónica humana (**hCG**) (1,93 mg/mL) purificada en el Centro de Inmunoensayo y la **bFSH** y la **blH** (10 mg/mL) obtenida en el Centro de Investigaciones de Mejoramiento Animal.

### Células y medio

La línea de mieloma de ratón P3-X63.Ag8-653 fue usada para la fusión. Ésta fue mantenida en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 20 %.

## **Inmunización**

10 ratones Balb/c, machos, con un peso corporal de 18-20 gramos fueron utilizados para la inmunización. Los ratones fueron inoculados con 50 ug de PMSG en Adyuvante Completo de Freund's. Ocho semanas después de la inmunización primaria, los sueros de los ratones fueron testados por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (**ELISA**), como se describe debajo. El animal con el título más alto en suero recibió un booster con 50 ug de antígeno en Adyuvante Incompleto de Freund's, y tres días más tarde, las células esplénicas fueron utilizadas para la fusión.

## **Ensayo de ELISA**

Como sistema de testaje se empleó un **ELISA** indirecto de proteínas para medir la presencia de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados y en el sobrenadante de los cultivos de hibridomas. Para esto se emplearon placas de microtitulación de poliestireno (High - binding, Costar), las cuales fueron recubiertas con 10 ug/mL de **PMSG** en tampón carbonato-bicarbonato 100 mM, pH 9,6 toda la noche a 4 °C. Las placas fueron lavadas con PBS-Tween 20 y los sitios libres en los pozos fueron bloqueados con PBS-BSA 1% e incubados a 37 °C por 1 hora. A continuación se añadieron las muestras de los sueros diluidos o los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas y las placas fueron incubadas por 2 horas a 37 °C. Como segundo anticuerpo se empleó un suero anti-ratón de inmunoglobulinas polivalente (**IgG, IgA, IgM**) conjugado a fosfatasa alcalina (**Sigma**), el cual fue añadido a las placas por 1 hora a 37 °C. Las placas fueron lavadas y la reacción se desarrolló luego de la adición de 100 µL/pozo de la solución de sustrato (1 mg/ml) de p-nitrofenilfosfato en tampón dietanolamina, pH 9,8. La absorbancia a 405 nm del producto de la reacción fue medido en un lector de **ELISA** (Organon, Teknika).

## **Fusión celular**

La fusión fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Kohler y Milstein (5) con algunas modificaciones.

## **Selección de hibridomas**

Después de 11 días en cultivo, comienza el ensayo de los sobrenadantes para la detección de anticuerpos específicos por **ELISA**. Los híbridos que resultaron positivos en el **ELISA** fueron clonados dos y/o tres veces por dilución limitante (9).

## RESULTADOS

1.- Análisis de la respuesta generada por la inmunización con **PMSG** en Adyuvante.

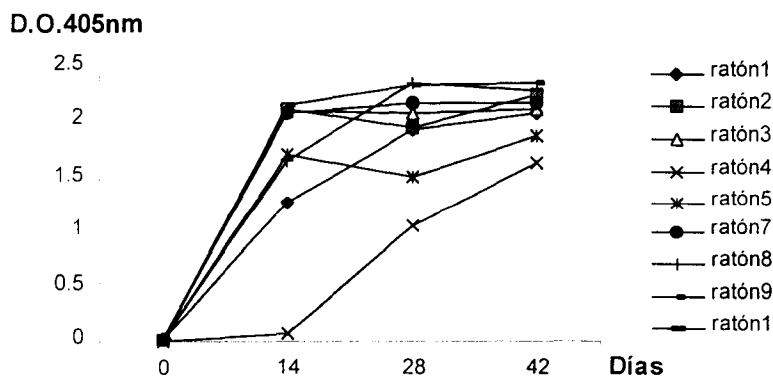


Figura. Cinética de la respuesta anti-PMSG inducida al inmunizar con PMSG + A(C/I)F cada 14 días. 1: 500.

2.-Obtención de anticuerpos monoclonales anti-PMSG

Animales	Título
Ratón 1	1:16 000
Ratón 2	1:128 000
Ratón3	1:32 000
Ratón 4	1:16 000
Ratón 5	1:32 000
Ratón 7	1:32 000
Ratón 8	1:64 000
Ratón 9	1:64 000
Ratón 10	1:32 000

Tabla. Título alcanzado por ELISA al inmunizar con PMSG + A(C/I)F.

## DISCUSIÓN

Con una primera dosis se obtuvo respuesta en 9 de los 10 ratones inmunizados, con una segunda dosis la respuesta se mantuvo en todos los ratones inmunizados, al igual que con una tercera dosis. El título alcanzado por **ELISA** al inmunizar con **PMSG** + A(C/I)F resultó de valores desde 1:16 000 hasta 1:128 000. Según trabajos realizados por Maurel y cols en 1992 (16) sobre 3 **AcM** liberados contra la **PMSG** y sus actividades relativas de unión a diferentes hormonas y sus subunidades, y usando como referencia la **eCG** con un 100 % de actividad relativa de unión donde el **AcM**

*ECG01* reconoce *eCG- $\alpha$* , *eCG- $\beta$*  y *eLH* y tiene reacción cruzada con *hCG*, *hLH* y *eFSH*. El *AcM E10* reconoce *eCG- $\alpha$* , *eCG- $\beta$*  y *eLH* y reacciona con *hCG*, *oLH*, *pLH*, *eFSH* y *pFSH*, El *AcM D7* reconoce *eCG- $\alpha$* , *eCG- $\beta$*  y *eLH* y reacciona cruzadamente con *hCG*, *oLH*, *pLH*, *eFSH* y *pFSH* se llegó a la conclusión que el reconocimiento con *bFSH*, *bLH* y *hCG* en los híbridos obtenidos era de esperar, ya que en todas estas hormonas glicoproteicas la subunidad  $\alpha$  es idéntica en secuencia de aminoácidos. Al realizar un *ELISA* utilizando 2 conjugados: *IgG* anti-ratón e *IgM* anti-ratón resultó que los 3 híbridos eran de tipo tipo *IgM*.

## CONCLUSIONES

- 1.- En todos los ratones inmunizados se obtuvo respuesta de tipo *IgG* con un alto título de anticuerpos séricos.
- 2.- Se obtuvieron 3 híbridos resultantes de la fusión, los cuales fueron clonados 2 y/o 3 veces mediante técnicas de dilución limitante.
- 3.- Los 3 anticuerpos monoclonales obtenidos fueron de tipo *IgM*.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Pierce G-J., Parsons T-F. *Annu Rev. Biochem.* 50 (1981) 465-495.
- 2.- Boothby M., Ruddon R-W., Anderson C., McWilliams D., Boime J. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5121-5127.
- 3.- Fiddes J-C., Talmage k. *Recent Prog. Horn. Res.* 40 (1984) 43-75.
- 4.- Policastro P-F., Daniels McQueen S., Carle G., Boime I. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 5907-5916.
- 5.- Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefinity specificity. *Nature.* 256 (1975) 495:500.
- 6.- Milstein C. Las células híbridas pueden clonarse y producir grandes cantidades de un solo anticuerpo. *Investigación y Ciencia.* 51 (1980) 38-48.
- 7.- Brodeur B-R, Tsang PS. High yield monoclonal antibody production in ascitis. *J. Immunol.Methods.* 1986: 239-241.
- 8.- Pérez M-E., Pérez M., Cosme K. In vitro production of monoclonal antibodies using semiautomated hallow fiber bioreactor. *Biotecnología Aplicada.* 10(2) (1993) 69-70.
- 9.- Gavilondo J-V. *Anticuerpos Monoclonales.* 1995.
- 10.- Schwarz S., Berger P., Wick G. *Endocrinology.* 118 (1986) 189-196.
- 11.- Bidart J-M., Troalen F., Salesse R., Bousfield G-R., Bohuon C-J., Bellet D-H. *Journal of Biological Chemistry.* 262 (1987) 8551-8556.
- 12.- Bidart J-M., Troalen F., Bohuon C-J., Hennen G., Bellet D-H. *Journal of Biological Chemistry.* 262 (1987) 15483-15489.
- 13.- Bidart J-M., Troalen F., Bousfield G-R., Birken S., Bellet D-H. *Journal of Biological Chemistry.* 263 (1988) 10364-10369.
- 14.- Troalen F., Bellet D-H., Ghillani P., Puisieux A., Bohuon C-J., Bidart J- M. *Journal of Biological Chemistry.* 263 (1988) 10370-10376.
- 15.- Baron D. Development and production of monoclonal antibodies. *Pharm-ZTG.* 140(5) (1995) 9:14.
- 16.- Maurel M-C., Ban E., Bidart J-M., Combarous Y. Immunochemical study of equine chorionic gonadotropin (eCG/PMSG): antigenic determinants on  $\alpha$ - and  $\beta$ - subunits. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1159 (1992) 74-80.

Application of Corionic Gonadotrophin of pregnant mare ( eCG) produce in Cuba in technologies of induction and oestrus sychronization programmes in cattle .

R. Pedroso ; G. Martínez ; Felicia Roller ; Noelia González .  
CIMA. Carretera Central K. 21 1/2 Cotorro. C. Habana .

### **Abstrac .**

During three years a research was done with the objective of identify the factors that are affecting the quality and efficiency of artificial insemination service ( AI) in programmes of estrous induction and sychronizate (ISE) in cattle used progesterone + eCG produce in Cuba . In trial # 1 was evaluate the results of some studies carried out on oestrus sychronizate in bovine female made in Cuba during 1980 to 1999 . In trial # 2 was carried out at west of the country and three herds were evaluated with 6357 animals . During experimental period two investigations were done for know the factor that is affecting efficiency of AI service in programmes of ( ISE) and to know the incidence of anoestrus . For carrying out these studies it was used AIDA data base application and the diagnosis by means progesterone analized in blood and milk through radioimmunoassay breeding . In trail # 3. was carried out for measuring some intervention for improvement the efficiency of these programmes of controlled breeding . Data was analysed by means of stadistical system SYSTAT ( 6.0 ). According the results in trial # 1 was know that eCG that is produce in Cuba had similar efficiency that others imported . In trial # 2, this herds had a lower level of conception rate ( 18 %) and great variability in period of conception (  $154 \pm 98.11$  day ) this parameter had significantly difference between herds  $P < 0.001$  . A great number of animals selecting for ISE programmes ( 37 %) had poor body condition score ( BCS)  $< 2.5$  point in ( scale of 1-5 point ) and the motility of semen used was lower (  $< 30$  %) in the 47 % of semen evaluated . The interpretation of progesterone diagnosis showed that error in oestrus detection, lower response to treatment of ( ISE ), no fertilization , embryo mortality and functional disturbance post treatment were the principal causes of losses in the fertility. Trial # 3 showed that in our field condition during dry season in primiparous cows and females with poor BCS are frequently the anoestrus problems The BCS in heifers and the quality of different treatments used had a significant effect on conception rate . This results confirm that AIDA data base application associate to diagnosis by means of progesterone are an adequate medium for evaluating and improvement the quality and efficiency of AI service under the programmes ISE . The eCG produce in Cuba had similar efficiency that others imported .

## **I. Introduction .**

The technology of artificial insemination ( AI) is the principal for achieving an adequate acceleration in genetic progress in cattle . In 1959 with this objective a national programmes was begun for increasing milk and beef production by means genetic improvement . Using this method of breeding was to overtake a conception rate at fist service among 40 to 60 % ( 1) . However during the last two decades the quality and efficiency of AI service showed a level of conception rate that no exceed the 45 % . Recently some reports have been suggested that the principal cause of losses conception rate is the poor assurance in estrous detection ( 2,3,4, 5 ) . In our country the 30 % of cattle in AI are in programmes of estrous induction and synchronization (Table I and II). However the conception rate was lowered of 50 % ( 6 ) .

The objectives of this research were : Evaluate the results of some studies on oestrus synchronize in bovine female . Identify some cause that are affecting the efficiency of AI service in programmes of controlled breeding by means of AIDA data base application and diagnosis through progesterone determine in blood or milk . To ascertain the proportion of female with anoestrus problems . In addition evaluate some strategies for improvement conception rate .

## **II .Materials and Methods**

### **Trial # 1 . Evaluation of results of some studies on oestrus syhchronizate of bovine female use ECG in Cuba .**

In this trial was collected the data of the results of five research carried out in our country on 8520 bovine female in artificial insemination programmes and controllled breeding .

### **Trial II . Use of data base application AIDA and progesterona RIA for identify the cause that affect quality and efficiency AI service in oestrus sychronizate programmes .**

### **Study of factor that affect the efficiency and quality of artificial inseminate service in oestrus sychronizate programmes**

This trial was designed for identify the causes that affect on conception rate in artificial service in oestrus sychronizate programmes and know the incidence of anoestrus . The investigation was carried out in three crossbreed ( HxZ) herds ( I, II and III) . During the performance of this work was used the protocol of AIDA data base application and diagnosis of events and problems at time or after AI service by means progesterone determination for radioimmunoassay (7).



#### Animals and location .

During three years was done a research in three dairy herd of crossbreed Holstein x Zebu cows and heifers with 6357 animals located in the west regions of Cuba . There were carried out two trial . This flock were select according different types of reproductive management used in our country ( Table I).

Tabla I. Characterist of management in herds used in develoment of this investigation .

Characterist	Herd I	Herd II	Herd III
Number of	3	3	2
Technic	5	10	7
Number of bull	Commercial	Commercial	Genetic
Type of farm	Restrict suckling	Grass and two milking	Grass and two milking
Management	Grass+ Zugar cane +	Grass + Zugar cane	milking
Feeding	melaza urea	+ Melaza\Urea	Grass+Forrage+ Concentrate

#### Management .

The animals were grazed with improved pasture and hand or mechanic milking twice daily . In all this herds the mineral mixture and water was available at libitum .

#### Procedure .

According to the general procedure of AIDA in each herd it was taken and evaluation reproductive record , management and feeding system , record of milk production according AIDA protocol . Besides it was evaluated the quality of semen used in each farm and taken the body weigh and body condition of female at the moment of carrying out the AI . In this trial it was analysed the first insemination of cyclic and anestrus female (314 cows ) and ( 478 heifers) in artificial insemination and oestrus synchronization programms .

#### Oestrus synchronization treatment .

The synchronization of oestrus was carried out using three injection ( IM) of progesterone ( 60, 90, 90 mg ) with intervals of 48 hours between each injection , following of a injection of 500 International unit (UI ) of Pregnant Mare Gonadotrophin ( PMSG) in heifers or 1000 UI for cows.

#### Blood and milk samples .

Blood via jugular veni punture( heifers ) or milk samples ( cows) were collected at oestrus and 10-12, 21-22 day after AI . All samples were centrifuged at 2000x g for 15 minute within 3 hours of collectin and the serum or milk was store at -20 °C until were assayed for progesterone by means of RIA using kit FAOIAEA.

Oestrus detection and artificial insemination .

Oestrus detection was made by undertaken at 6:00 to 10:00 Am and 3:00 to 6:00 PM daily during seven days after the end of treatment . The AI was carried out 8 hours after detected. The AI was done by eight experimented technicians using frozen pellet semen of 22 bull from a local center of AI. Pregnancy diagnosis was made by rectal palpation 60 to 70 day after AI service

### **Studies of ovaric activity of bovine female in herd with anoestrus problems .**

In herd I was carried out a research with objective of known the proportion of cows and heifers with anoestrus problems . There were investigated 389 crossbreed ( H x Z ) female 127 suckling cows of > 60 day postpartum and 267 heifers of 24-30 month age and body weight between 270-450 kg under grass management during dry season .

In all female were collected two samples of blood via jugular veni puncture( heifers ) or milk samples with an intervals  $9 \pm 1$  for analyzing progesterone by means of RIA used FAOIAEA kit.

The anoestrus state was determined by taking as base level of progesterone in blood or milk( cows ). The anoestrus states was determine by taking as base level of progesterone in blood or milk samples used as reference  $> 3.18 \text{ nmol/l}$  to descriminate the existence of functional corpus luteum . Females were consider cyclic when one of samples showed  $> 3.18 \text{ nmol/l}$  other levels were considere anoestrus .

### **Statistical Analysis .**

The datas were studied by means of procedure AIDA data base application and using multiple analysis of variance and proportional test using Statistical SYSTAT procedure for windows .

### **Trial # 3 . Effect of Body Condition Score and quality of treatment of oestrus synchronize on conception rate in bovine female under grazed management .**

Effect of the body condition on response to oestrus induction and synchronization treatment in crossbreed Holstein x Zebu heifers under grass management.

### **Animals and location .**

This investigation was carried out with objective of evaluate the effect of BCS to response at treatment of oestrus synchronize with progesterone in oil, prostaglandina y Pregnan Mare Gonadotrophin ( PMSG) . For performance this research was taken in a group of 594 crossbreed heifers ( H x C ) in artificial insemination and oestrus synchronization programmes in herd I under system grass management during dry season .

### Oestrus synchronization .

The treatment of oestrus synchronization using was three injection (IM ) of progesterone ( 60, 90, 90 mg ) with interval of 48 hour between each treatment after that 700 UI of PMSG and 500µg of analogus of prostaglandin F2-alfa Ostrophan - Bioveta (Republic Cheka ) at the end of treatment .

### Blood samples for progesterone determination .

There were collected samples of blood with intervals of  $9\pm 1$  days in all animals with objective of becoming the ovaric activity previous treatment .After of treatment , there were collected samples of blood at the moment AI and 10-12 day after service . The female with progesterone concentration  $> 3.18$  nmol/l in one of two samples before treatment was considered cyclic. The female that had a level progesterone  $< 1.59$  nmol/l at AI and  $> 3.18$  nmol/l 10-12 day after service was considered with ovulatory cyclic.

### Oestrus detection and insemination .

The procedure of oestrus detection was performed by a professional staff involved in this work and it was based on the observation of any sign of homosexual behaviour . Observations were carried out every two hours during the day , the first occurrence of cows standing to be mounted was considered as the onset of oestrus .

The insemination was made at fixe time at 48 and 72 hours after the end of treatment and carried out for similar technic using one fertil bull with the objective of maintain constant these main of variation .The guality of semen was evaluate before use and certificated optimus quality. Pregnancy diagnosis was made by rectal palpation 60 to 70 days after AI service.

### **Conception rate of two methodes of oestrus synchronizate in crossbreed ( Hx Z) in bovine female use Progesterone+ eCG under grass management during dry season .**

#### Animal and location .

This study was made with objective of determine the influency of the type of synchronizate treatment on conception rate of cattle under grass management during dry season in one flock of herd I .There was used 192 animals 85 heifers of 24 to 30 month of age and 107 primiparus cows suckling calves with 80 to 120 day postpartum . Female had BCS between 2.5-3.5 and body weigth 300-450 kg .For treament these females were divided into three groups and were treatments according the principal procedure used for oestrus synchronizate in bovine female in our country .

#### Oestrus sincronization treatment .

- a) Three injections ( IM) of progesterone ( 50 mg) in intervals of 48 hours between each injection following 48 hours after of injection ( IM ) of 500 UI of PMSG.
- b) Three injections ( IM) of progesterone ( 60, 90 , 90 mg ) with interval 48 hours between each injection plus 500 UI PMSG( IM) 48 hours later.

Oestrus detection and artificial insemination service.

Detection of estrus was made twice daily by herd personal of location for 7 days after at the end of treatment . Artificial insemination was realized according to the AM-PM rule . The pregnancy diagnosis was made 60 to 70 day later after AI service by rectal palpation .

Statistical Analysis .

Data was studied by analysis of variance ( GLM) and Chi-Square test using procedure statistical SYSTAT procedure for Windows .

### III . Results .

3.1. Results of the induction and oestrus synchronization programmes by means of progesterone and eCG protocol .

According our data the conception rate had great variability .It appeared was relationship with the different protocol used and reproductive management that exist in our country ( Table II ) .

Table # II . Results of different research carried out in Cuba on induction and oestrus synchronization in cattle by means use ( eCG) produced in Cuba .

Autors\ years	Treatment	N	Responce( %)	Conception ( %)
La Roca et al., 1983	P4 (3)+ eCG( 500 UI)	85	92	44.87
Faure et al., 1986	eCG ( 2000 UI)	71	91	84.6
	P4(3)+ eCG( 2000 UI)	72	83	77.8
	P4( 3)+eCG ( 500 UI)	51	80	97.6
Martinez et al., 1996	P4( 3)+eCG( 500 UI*	8170	98	32.4
Pedroso y Roller, 1999*	Crestar+PGF2alfa+eCG	30	100	27
	Crestar + P+ eCG	41	100	27

Leyenda: \* AI in predetermine time ( 48, and 72 hours ) .

In the national programm 50 % of farmr had a conception rate lower ( < 40 % ) . While the others 42 % between 31to 40 % . The poor region was Matanzas with < 30 % of conception rate ( Table III ) .

**Table # III .Results National Artificial Insemination programmes by means use protocol of [ P4+ eCG ] during year 1997 .**

Concepción (%)	Region	No. Animals ( Tto)	Responce to TTo (%)
< 30	Matanzas	3827	73.3
31- 40	Pinar del rio	3786	94
	La Havana	3010	90.3
	C. Avila	1350	63.5
	Las tunas	3018	97.1
	Stgo. Cuba	2816	94.9
41- 70	Cienfuegos	3185	74.4
	Camaguey	3761	77.1
	Guantanamo	185	88.6
	Holguin	565	81.6
	Gramma	3963	84.4
	Villa Clara	1283	73.3

Treatment : Three intramuscular injection of oil progesterone( P4 ) [ 60 + 90+ 90 (mg) ] with an interval of 48 hours between each injection plus 500 -1000 UI eCG 48 hours late. Artificial insemination were carried out use freezing semen in pellet of sire bulls .

### **3.2. Use of data base application AIDA and progesterona RIA for identify the cause that affect quality and efficiency AI service in oestrus sychronizate programmes .**

#### **Study of factor that affect the efficiency and quality of artificial inseminate service in oestrus sychronizate programmes**

The postpartum interval to first insemination and conception rate of these herds are show in (Table # IV).The interval partum-first AI was  $154.27 \pm 98.1$  days and show a significantly differents between herd  $P < 0.001$  .

**Table IV. Reproductive performance in crossbred cows Holstein x Zebu in artificial insemination and synchronizate programmes .**

Herds	N	Interval Partum -AI ( day)	Distribution (%)			Conception rate (%)
			Interval Partum-AI ( day)			
			40-120	121-200	>200	
I	111	240.0 $\pm$ 82.c	3.5	29.5	67	17.6
II	64	143.5 $\pm$ 101.8a	56.0	17.0	27	26.6
III	85	101.7 $\pm$ 58.4b	81.9	13.5	5.8	12.7

Different superscripts within a column indicate significant differences  $P < 0.001$ .

- Conception rate .

The overall conception rate was 18 % range ( 13 to 47 % ) . The most lower value was found in herd III ( 12.7 % ) while herd I and II had a conception rate of (17.6 % ) and (26.6 % ) respectively .

- Body Weigth and Body Condition Score .

In these herds the 37 % of treated female has a body weigth between 250 to 300 kg and body condition score ( BCS) most lower of 2.5 point in scale of ( 1 -5 ) point . This animals were in 48.9 % herd I, 19.7 % herd II and 31.4 % in herd III .

- Quality of Semen .

Regarding our finding the 27 % of used semen had a motility < 30 % .The 83% of this samples of semen was found in herd III . The most elevate conception rate was obtain when motility of semen was > 30 % P< 0.0 5 .

- Interpretation of results progesterone analysis .

In Table V , VI and VII are showed the results of diagnosis by means progesterone interpretation . Unfortunaly only 38.6 % of the cows were samples three times according AIDA protocol and 3.6 to 23 .1 % taken intermedial values . According with our data take as base one determenation day of oestrus was finding that 4 % of artificial insemination service was carried out in luteal fase. When was take the data as base two samples (day oestrus and 10-12 day after AI ) was found that 33.% ( 213\630) of female have anovulatory cycle, anestrus or short luteal fase and 11.7 % (73\630) was found intermedial value ( < 1.9 nmol/l) .

Table V . Interpretation of results progesterone take as base one samples ( day oestrus) according AIDA protocol .

Herds	N	L		H		Intermedial value	
		n	%	n	%	n	%
I	581	550	94.6a	14	2.4a	17	3.0a
II	106	80	75.4b	18	7.5a	8	7.5b
III	174	165	94.8a	4	2.8b	5	2.8b
Total	861	795	92.3	36	4.1	30	3.6

Differents superscripts for column indicate significant diferences(P<0.05)

Legend: : L: AI development during oestrus . H: : AI done in luteal fase. Intermedial value : AI done too late or too early of relative oestrus .

Table VI. Interpretation of progesterone data take as base two determination ( day oestrus and 10-12 day after AI) according AIDA protocol .

Herds	N	LH		LL		HH		HL		Intermedial value	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	366	164	44.9b	147	40.2a	6	1.6a	3	0.8	46	12.5a
II	72	37	51.3a	12	16.6b	8	11.1b	////	////	15	21.0b
III	192	110	57.3a	54	28.1b	2	1.0c	5	2.6	21	11.0a
Total	630	311	49.4	213	33.8	16	2.5	8	1.3	82	13.0

Different superscripts within a column indicate significant differences  $P < 0.001$  .

Legend:LH : ovulatory cycle ; LL: anoestrus , anovulatory cycle or short luteal fase; HH: AI done in pregnant animal or luteal cyst ; HL: AI done in luteal fase ; Intermedial value

Table VII. Interpretation of progesterone data take as base three determination ( day oestrus, 10-12 and 21-22 after AI) according AIDA protocol.

Herds	N	LHH		LHL		LHH		HHH		Intermedial value	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	168	38	22.6a	78	46.4a	10	5.1b	////	////	42	25.0a
II	45	17	37.8b	8	17.8b	3	6.7b	2	4.4	15	33.3c
III	120	27	22.5a	72	60.0c	1	0.8c	////	////	20	17.0b
Total	333	92	24.6	158	47.4	14	4.2	2	0.7	77	23.1

Different superscript within a column indicate significant differences  $P > 0.001$

Legend:LHH: Pregnant; LHL: Non fertilization , early embryonic mortality, ( post AI-anoestrus); LHH: Late embryonic mortality ( > day 16 ) luteal cyst , persistent CL.Intermedial value ( 1.0 to 2.9nmol/l ).

Studies of ovaric activity in herds with anoestrus problems .

As seen in ( Table VIII and IX ) the proportion of female with anoestrus are significantly (  $P < 0.001$  ) most higher in primiparous cows and all female with poor BCS ( <2.5 point).

Table VIII . Proportion of crossbreed ( Hx Z) cows and heifers cyclic and with anoestrus problems under grass management during dry season.

Female	Number of female	Ovaric activity			
		Cyclic		Anestrus	
		n	%	n	%
Heifers	267	147	55.0ad	120	45 ae
Primiparus cows	41	7	19.5bf	34	80.5bg
Multiparus cows	76	30	35.5 ch	46	64bi
Total	384	184	47.9	200	51.1

Value within the same column ( abc) or row ( defghi ) indicate significant differences  $P < 0.001$  .

Table IX. Effect of body condition score on proportion of crossbreed (HxZ) cows and heifers with anoestrus problem in herd under grass management during dry season .

BCS	Number of female	Ovaric activity			
		Cyclic		Anestrus	
		n	%	n	%
1 - 2.4	158	50	27.2a	108	72.8c
2.5 - 3.5	226	90	39.8b	136	60.2d
Total	384	140	36.4	244	63.6

Value within the same column with different superscript indicate significant difference  $P < 0.001$ .

### 3.3. Effect of Body Condition Score and quality of treatment of oestrus synchronizate on conception rate in crossbreed ( Hx Z) in grass management .

#### Effect of the body condition on response to oestrus induction and synchronization treatment in crossbreed Holstein x Zebu heifers under grass management.

Regarding our finding the poor BCS had a negative and significantly effect on conception rate  $P < 0.05$  ( Table X ). The heifers with an BCS  $< 2.5$  point showed elevate number of anovulatory cycle and lower conception rate.

Table X . Effect of body condition score on response and conception rate to oestrus sychronizate treatment in crossbreed ( Hx Z) heifers under grazed management during dry season in subtropical zone .

Characteristics	BCS	
	1 - 2	2.5 - 3
Number of heifers	191	403
Heifers cycle before treatment ( %)	42.8a	60.2b
Heifers in oestrus after treatment ( %)	87.0a	79.0b
Heifers with ovulatory cycle (%)	26.9a	72.4b
Conception rate ( %)	8.3a	41.3 b

Value within a row with different superscript indicate significant difference  $P < 0.05$

#### Conception rate of two methodes of oestrus synchronizate in crossbreed ( Hx Z) in bovine female use Progesterone+ eCG under grass management during dry season .

In the table XI are showed the results referent the effect of type treatment on conception rate . Results of variance analysis showed a significantly effect of treatment and category on conception rate (  $P < 0.001$  ) but the interaction ( Treatment x Category ) was too significant  $P < 0.001$  .



Tabla XI. Effect of type treatment of oestrus synchronization on conception rate in crossbreed ( Holstein x Zebu ) bovine female under grass management .

Treaments	N	Group			Conception ( % )		
		Heifers	Cows	All	Heifers	Cows	over all
A	76	30	46	76	21.7a c	56.6b	39.4
B	65	30	35	65	90 a d	8.5b	46.1
Totales	141	60	81	141	40	58	45.3

Value within the same row ( ay b ) and column ( cy d ) with different superscript indicate significant differences  $P < 0.001$ .

#### 4. Discussion .

The results showed in this herds respect to reproductive performance demonstrate a large period calving first service was relationship appear to practice of reproductive management . In the particulary case of herd II , it was related with the practice of suckling that is realiced in this farm that cause a lengthening in the period of anovulation postpartum. These finding confirm the results of others studies in identical management system ( 8, 9, 10 ). However the lower conception rate may be associate with lower quality of semen, inadequate selecting of female and efficiency of method of oestrus synchronizate .

In regarded to this finding some previous researcher found that the poor BCS is related with subnutritional anoestrus( 11, 12, 13 ) and with this physiological condition has inadequate response to controled breeding programms ( 14 ). Also the elevate number of dose of semen in use with poor quality there found suggesting that in this practice condition the mistake in the manipulation of semen is an important cause of the lower conception rate in this programms of controlled breeding.

The interpretation of results progesterone diagnosis shown that an elevate number of female no response to oestrus synchronization treatment and others apparent were inseminated too late or too early to relative oestrus. However the results that were showed in tables III and IV, although apparent all animals were inseminated in optimus moment post treatment , is evident that as a mather of fact some of this animals are in anoestrus at the begin , not response to treatment and many of this female probably maintain the state of anoestrus post service. It was most frequently in herds I and III .

The study of ovaric activity in a group of female with anoestrus problems showed that a great number of this female are in anoestrus . Some researchers ( 15, 16 ) demonstrated that female with this physiological condition frequently has anoestrus problems . As was evident in our results a great number of this female had poor BCS . In this way for increase conception rate is necessary the application an adequate strategies of nutritional supplementation . Also to improvement the methods of oestrus synchronizate .

As know the BCS is an expression as state of reserve and capacite of movilization corporal energy in cattle . Some studies has been demostrated that BCS is relationship with capacite for response to oestrus synchronization treatment . Our results show in (Table VIII) indicate that the animals with poor BCS decrece the efficiency of this methods of control breeding .

One most important finding was that the overall means of conception rate obtain here in the group of 2.5-3 BCS ( 30 %) is major that the found previously in the begin survey . It suggesting that only with a adequate selecting of female , prior evaluation of semen and introducing some changes in squeme of treatment may be to improvement the efficiency of artificial insemination service under this practice condition. It suggesting that the nutritional state of the female prior treatment is an important cause of lower conception rate in this programms of controlled breeding .

The finding of recently studies have been suggesting that , it is associate with differents endocrinology changes, disturbance in grow and develoment of ovaric follicle, corpus luteum, also, some disturbance in the grow and develoment of embryo( 16,17,18, 19).

The comparative study of different methods of synchronization used showed that the treatment ( b ) is most efficiently in heifers , while the treatment ( a ) is adequate for cows ( $P < 0.001$ ). The over all means that show the conception rate was 45.3 % but the level of conception rate in some of this treatment are major that reporteds by others investigators (21,22,23 ). It is evident that by means oestrus synchronize programms realicing a adequate selection of female, control of quality of semen is able to increase conception rate in this herds .

#### **IV. General conclusion and recomendation .**

Regarding our finding in basic survey apparent the poor BCS of selecting female quality of semen use are the principal problems that affecting conception rate in Artificial Insemination service under this programms of controlled breeding. The anoestrus affecting great number of animals in this herds and it is associate with loss of BCS. The application of adequate selection of female and the use of semen of good quality should therefore contribute to alleviating this problems . It is important to improvement the nutritional level under this management condition. No Should be recomende carried out treatment of oestrus synchronize in cows or heifers with  $BCS < 2.5$  point in scale 1-5 point . The use of AIDA data base application associate to analysis of progesterone data determine by means RIA is adequate procedure for the control and evaluation of quality and efficiency of artificial insemination service in programms of controlled breeding by means hormonal treatment .

## V. REFERENCES

- [ 1] Menendez, A; J. Morales; J. Dora; C. Iglesias; y H. Chavez . Resultados de los servicios de inseminación artificial en ganado vacuno de diferentes razas en las condiciones de Cuba . Rev. Cub. Reprod. Anim . 2; 28, 1976.
- [2]Pedroso , R y Dora Nuñez . Perfil de progesterona en leche de vacas Holstein fértiles o con el síndrome de repeticiones del celo .Rev. Cub. Reprod. Anim. 15: 73-82, 1989 .
- [3]Pedroso , R ; T. Verdura; Margarita Roque; J. R. del Mar y N. Felipe . Estudio de algunos factores que disminuyen la fertilidad en vacas Holstein en nuestro medio. Rev. Cub. Reprod. Anim. 13: 67-77, 1987.
- [4]Nuñez, D; J. Aragón; L. Hernández; R. Pedroso ; Teresita . Ruiz y R. Ortiz. Estudio de algunas características físico químicas del mucus cervical durante el estro . Rev. Cub. Reprod. Anim. 15: 17-37, 1989 .
- [5]Pedroso, R y Felicia Roller. Diagnóstico de algunas causas de repeticiones del celo en vacas lecheras de rebaños de baja fertilidad . Rev. Cub. Reprod. Anim.23: 43-50, 1997 .
- [6] [12]Pedroso , R., Felicia Roller; Noelia Gonzalez; S. Crespo; N. Felipe; y M. Bravo. Factores que influyen en la eficiencia de los servicios de inseminación artificial . Proc.XI.Jornada Interna CIMA 4-6, junio, 1997
- [7]Garcia, M ; O. Perera; W. Googer; C. Eisele; Amy. Fischer; Corey. Kreutzman and J. Palletier. User manual for AIDA Artificial Insemination database Application. Version. 3.3. Animal Production and health section International atomic Energy Agency.1996 .
- [8]SYSTAT 6.0 for Windows.: Statistics. SPSS.inc.North Michigan EU. 1996.
- [9]Peter, R. A. Reproductive activity of the cows in the post-partum period .I. Factor affecting the length of the post-partum acyclic period . Br. Vet. 140: 76-84, 1984.
- [10]Williams, G. Sukling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle : Review. J. Anim. Sci. 68: 831-832, 1990.
- [11]McLeod , B. J. ; M. E. Williams . Incidence of ovarian dysfunction in post partum dairy cows and the effectiveness of its clinical diagnosis and treatment. Vet. Rec. 9: 121-124, 1991 .
- [12]Short, R; R. A. Bellows ; R. B. Staigmiller ; R. B. Berandinelli JG; and E. E. Custer; Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. J. Anim. Sci. 68: 799-816, 1990.

- [13] Vizcarra, J.A ; R. P. Wettemann and D.K. Bishop . Relationship between puberty in heifers and the cessation of luteal activity after nutritional restriction . Anim. Sci. 61: 507-520, 1995.
- [14]Grimard, B; P. Humblot ; J. P. Mialot ; N. Jeanguyot; D. Sauvant ; M. Thibier: Absence of response to oestrus induction and synchronization treatment is related to lipid mobilization in suckled beef cows . Reprod. Nutr. Dev. 37: 129-140, 1997.
- [15 ] Iglesia, L; E. Soto , Belloso; C. Gonzalez; G. Soto; Castillo; and R. Rincón Urdaneta. factor affecting postpartum ovarian activity in crossbreed primiparous tropicla heifers. Theriogenology. 38: 449-460, 1992.
- [16]Mukasa-Mugerwa, E; D. Anindo; A.K. Lahlou; N. N. Umunna; and A.Tegegne. Effect of body condition and energy utilization on the length of post-partum anoestrus in PRID-treated and untreated postpartum Bos indicus( Zebu) cattle. Anim. Sci. 65: 17-24, 1997.
- [17]Prado, R; S. Rhind; A. Wright; A. F. Russel; S. R. Mcmillan; A. J. Smith; and A. S. Mcneill . Ovarian follicles population , steroidogenicity and micromorphology at 5 and 9 week post partum in beef cows in too levels of body condition. Anim. Prod. 512: 103-108, 1990.
- [18]Rhodes , F. M; L Fitzpatrick; K. W. Entewistle and G. Death. Sequential changes in ovarina dynamic in Bos indicus heifers before and after nutritional anoestrus . J. Reprod.Fert. 104: 41-49, 1995.
- [19]Lopez, L; N. Alvarez; I. Nuñez; R. Solano; D. Fuentes; R. Pedroso; ; G. Palma; and G. Brem.Effect of body condition on the devilmnt competence of IVMIVF bovine oocyte . Theriogenology. 45: 96, 1996.
- [20]Faure, R; O. Fernanez; Libertad García ; A. Gil y F. González. Caracterización fisiológica de la pubertad retardada en novillas y el anestro postparto en vacas . Memorias. ACPA, pp, 45-70,Habana 25-27 de septiembre.
- [ 21]Macmillan. K. L. A. J. Peterson.A new intravaginal progesterone releasing device for cattle ( CIDR-B) for oestrus synchronisation increasing pregnancy rates and the treatment of postpartum anoestrus. Anim. Prod. 33: 1-25, 1993.
- [22]Haulon , D. W. N. B. Williamson; J. J. Whichtal; J. J. Steffert; A. L. Craigie; . The effect of estradiol benzoate administration on oestrus response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. Theriogenology . 45; 775-785, 1996.

[23]Pursley, J. R; M. C. Witbank; J. S. Stevenson; J. S. Ottobre ; H. A. Garverick and L. L. Anderson. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a sychronized ovulation or sychronized oestrus. J. Dairy Sci. 80: 295-300, 1997.