

A detailed historical map of Granada, Spain, showing the city's layout, including the Alhambra, the Gibralfaro fortress, and the Rio Xenil. The map is rendered in a light, sepia tone, with various landmarks and streets clearly visible. The title and author information are overlaid on the map.

Angel Gil Hernández

**EVOLUCION DE LA COMPOSICION NUCLEOTIDICA
EN LECHE DE DIVERSAS ESPECIES DURANTE LA
LACTACION**

**TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

189

R. 32.409

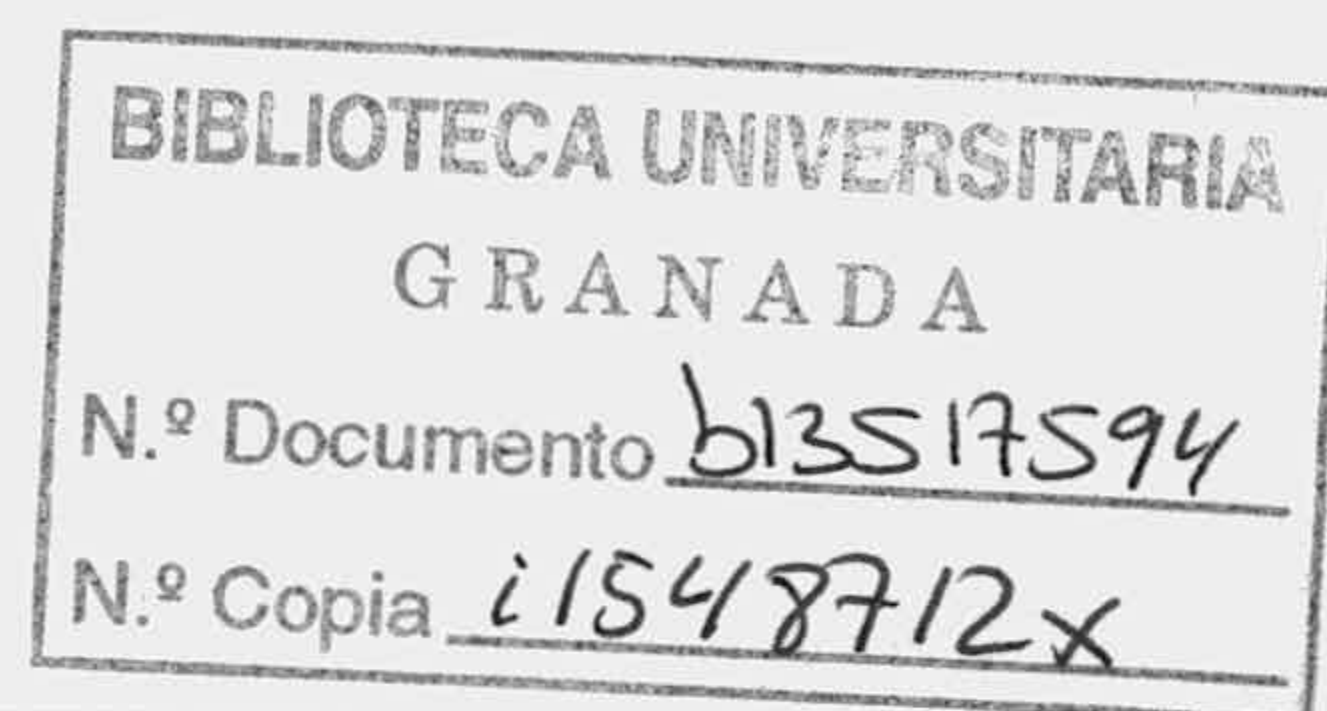
Dupl. R. 20869

4/103

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE BIOQUIMICA

EVOLUCION DE LA COMPOSICION NUCLEOTIDICA EN LECHE
DIVERSAS ESPECIES DURANTE LA LACTACION

ANGEL GIL HERNANDEZ
Tesis Doctoral



UNIVERSIDAD DE GRANADA

1978

Tesis doctoral dirigida por el Prof. Dr. D. Fermín Sánchez de Medina Contreras, Director del Departamento Interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Granada. Fue leída el día 4 de julio de 1978, ante el Tribunal formado por los Profesores: García Villanova, Granada; Montoya Gómez, Granada; Sánchez de Medina Contreras, Granada; García Peregrín, Granada; Martínez Valverde, Málaga. Obtuvo la calificación de sobresaliente "cum laude".

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor
en Ciencias por el Licenciado D. Angel Gil Hernández

Director de esta Tesis:

PROF. DR. D. FERMIN SANCHEZ DE MEDINA Y CONTRERAS

Licenciado D. Angel Gil Hernández, aspirante al Grado
de Doctor en Ciencias

Granada, Julio de 1978

El trabajo que presentamos ha sido realizado en el laboratorio del DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE BIOQUIMICA de la Universidad de Granada y en el laboratorio de INVESTIGACION Y CONTROL DE CALIDAD de UNIASA (Unión Industrial y Agro-Ganadera S.A.) durante los cursos 1974-1975, 1975-1976, 1976-1977 y 1977-1978.

La realización del trabajo experimental ha sido sufragado por la sociedad UNIASA de Granada.

Mi profundo agradecimiento al Pr.Dr.D.Fermín Sánchez de Medina, Director de esta Memoria Doctoral. El, que me inició en la investigación bioquímica, ha orientado en todo momento este trabajo honrándome con su confianza y dedicación. Por todo ello y por lo que científicamente yo pueda desarrollar en el futuro, gracias.

Deseo expresar mi más sincera gratitud al Director General de UNIASA, D. Rafael Pérez-Pire García por su inestimable apoyo y a D. Luis Valverde Hurtado por la ilusión e inquietud con que ha seguido la realización de este trabajo.

A Mercedes Campos, mi valiosa y eficaz compañera, que hizo posible la realización de esta Tesis, va mi máxima gratitud. Nadie sabe como ella el sacrificio que ha supuesto llevar a cabo este trabajo.

A Manuel Canteras por su inestimable colaboración en el tratamiento estadístico de los datos acumulados en esta memoria.

Quiero recordar a mis compañeros y amigos de los Departamentos de Bioquímica y General Técnico de UNIASA, especialmente a Charo Muñoz y José A. Lupiáñez, por su interés y ayuda. A todos ellos, incluido el personal auxiliar, gracias.

Mi agradecimiento público a todas las instituciones, empresas y personas que hicieron posible la obtención de las muestras biológicas.

A Mercedes

A mis padres

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|------------------------------------|
| ADP | Adenosín difosfato |
| AMP | Adenosín monofosfato |
| A _t | Adenín nucleótidos totales |
| ATC- asa | Aspartato transcarbamilasa |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| A - X | Adenosín derivado |
| CDP | Citosín difosfato |
| CMP | Citosín monofosfato |
| C _t | Citosín nucleótidos totales |
| CTP | Citosín trifosfato |
| C - X, X' | Citosín derivados |
| DHO-asa | Dihidroorotasa |
| DHODH-asa | Dihidroorotato deshidrogenasa |
| E.C. | Comisión internacional de enzimas. |
| EDTA | Acido etilendiamino -tetracético |
| GA | Acido glucurónico |
| Ga-NH ₂ | Galactosamina |
| GDP | Guanosín difosfato |
| GDP- Fuc | Guanosín difosfato fucosa |
| GDP- Man | Guanosín difosfato manosa |
| GDP - X, X', X'' | Guanosín difosfato derivados |
| G _t | Guanosín nucleótidos totales |
| GMP | Guanosín monofosfato |
| GMPK | Guanosín monofosfato cinasa |
| G-NH ₂ | Glucosamina |
| G-1-P | Glucosa -1- fosfato |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| IMP | Inosín monofosfato |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| MK | Miocinasa |
| NAD ⁺ | Nicotín adenín dinucleótido |

| | |
|-----------------|---|
| NADH | Nicotín adenín dinucleótido re- ducido |
| N-AG | N-acetil- glucosamina |
| N-AGa | N-acetil - galactosamina |
| NMPK | Nucleótido monofosfato cinasa |
| NDPK | Nucleótido difosfato cinasa |
| OMP | Orotidín monofosfato |
| OPP-asa | Orotato pirofosforilasa |
| OPDC-asa | Orotidín fosfato descarboxilasa |
| PDE | Fosfodiesterasa |
| PEP | Fosfoenolpiruvato |
| PK | Piruvato cinasa |
| PP _i | Pirofosfato |
| PRPP | Fosforribosil pirofosfato |
| UDP | Uridín difosfato |
| UDPG | Uridín difosfato glucosa |
| UDPGa | Uridín difosfato galactosa |
| UDPGA | Uridín difosfato ácido glucurónico |
| UDPGDH | Uridín difosfato glucosa deshidro- genasa |
| UDPGP | Uridín difosfato glucosa pirofos- forilasa |
| UHT | Ultra alta temperatura |
| UMP | Uridín monofosfato |
| UDP-N-AGa | Uridín difosfato-N-acetil gluco- samina |
| UDP-N-AGa | Uridín difosfato-N-acetil galacto- samina |
| U _t | Uridín nucleótidos totales |
| UT | Uridil transferasa |
| XDP | Xantin difosfato |
| XMP | Xantin monofosfato |

INDICE

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| INTRODUCCION..... | 17 |
| I.-PARTE TEORICA..... | 23 |
| 1.1.-Biosíntesis de leche..... | 25 |
| 1.1.1.-Aspectos generales del metabolismo de la glándula mamaria..... | 25 |
| 1.1.2.-Acido orótico y biosíntesis de nu- cleótidos..... | 28 |
| 1.1.3.-Biosíntesis de las proteínas lácteas | 35 |
| 1.1.4.-Biosíntesis de lactosa..... | 37 |
| 1.1.5.-Biosíntesis de lípidos en la leche.. | 41 |
| 1.1.6.-Regulación de la biosíntesis de le- che..... | 46 |
| 1.2.-La flora intestinal del hombre..... | 52 |
| 1.2.1.-Posición taxonómica de las bifido- bacterias..... | 53 |
| 1.2.2.-Presencia e importancia de las bifi- dobacterias en la flora intestinal de los lactantes y de los adultos... | 55 |
| 1.2.3.-Factores de crecimiento de las bifi- dobacterias..... | 58 |
| II.-PARTE EXPERIMENTAL..... | 61 |
| 2.1.-Material biológico y tratamientos..... | 63 |
| 2.1.1.-Material biológico..... | 63 |
| 2.1.1.1.-Tipos de leche empleados.. | 63 |
| 2.1.1.2.-Micoorganismo empleado.... | 64 |
| 2.1.2.-Tratamientos..... | 64 |
| 2.2.-Material utilizado..... | 64 |
| 2.2.1.-Productos..... | 64 |
| 2.2.2.-Medios de cultivo..... | 65 |
| 2.2.2.1.-Medios de crecimiento..... | 65 |

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 2.2.2.2.-Medio de conservación..... | 66 |
| 2.2.2.3.-Medios mínimos..... | 67 |
| 2.2.2.4.-Medios mínimos suplementados..... | 69 |
| 2.2.3.-Aparatos..... | 69 |
| 2.3.Métodos..... | 71 |
| 2.3.1.-Tratamiento previo de la leche para el análisis de los nucleótidos..... | 71 |
| 2.3.2.-Determinación de nucleótidos por cromatografía de intercambio aniónico..... | 72 |
| 2.3.2.1.-Fraccionamiento..... | 72 |
| 2.3.2.2.-Liofilización de las fracciones cromatográficas eluidas..... | 74 |
| 2.3.2.3.-Identificación de los nucleótidos separados..... | 75 |
| 2.3.2.3.a.-Identificación de nucleótidos por cromatografía en papel..... | 75 |
| 2.3.2.3.b.-Identificación de los compuestos glucídicos unidos a los nucleótidos..... | 77 |
| 2.3.2.4.-Análisis cuantitativo de los nucleótidos identificados..... | 79 |
| a)Medida de la absorbancia en el ultravioleta de los eluatos cromatográficos.. | 79 |
| b)Determinación enzimática de 5'-nucleótidos totales como nucleósidos-5'-monofosfatos..... | 80 |
| 2.3.3.-Determinaciones enzimáticas en muestras de leche sin fraccionamiento previo..... | 85 |

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 2.3.3.1.-Determinación enzimática de orotato..... | 85 |
| 2.3.3.2.-Determinación enzimática de adenosín, guanosín, uridín y citidín-5'-monofosfatos.. | 86 |
| 2.3.3.3.-Determinación enzimática de uridín-difosfato-glucosa y uridín-difosfato-galactosa..... | 87 |
| 2.3.3.4.-Determinación de adenosín, guanosín, uridín y citidín nucleótidos totales..... | 89 |
| 2.3.4.-Determinación de proteínas..... | 89 |
| 2.3.5.-Técnica utilizada en la caracterización del microorganismo empleado.... | 90 |
| 2.3.6.-Técnicas de cultivo de <u>B.bifidum</u> | 91 |
| 2.3.6.1.-Obtención de inóculos de <u>B.bifidum</u> | 91 |
| 2.3.6.2.-Cultivo de <u>B.bifidum</u> | 91 |
| 2.3.6.3.-Conservación de <u>B.bifidum</u> .. | 91 |
| 2.3.7.-Tratamiento estadístico de los datos obtenidos..... | 92 |
| III.-RESULTADOS..... | 95 |
| 3.1.-Nucleótidos presentes en leche de vaca:Variación del contenido en nucleótidos durante la lactación..... | 97 |
| 3.2.-Nucleótidos presentes en leche de oveja:Variación del contenido en nucleótidos durante la lactación..... | 117 |
| 3.3.-Nucleótidos presentes en leche de cabra:Variación del contenido en nucleótidos durante la lactación..... | 135 |
| 3.4.-Nucleótidos presentes en leche humana:Variación del contenido en nucleótidos durante la lactación..... | 153 |
| 3.5.-Nucleótidos presentes en leche de cerda.... | 173 |

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 3.6.-Análisis estadístico comparativo de los nucleótidos de leches de vaca,oveja,cabra y humana..... | 179 |
| 3.7.-Relación existente entre los valores de nucleótidos totales,absorción en el ultravioleta de los filtrados libres de proteínas y las concentraciones proteicas de leches de vaca,oveja,cabra y humana..... | 183 |
| 3.8.-Efectos de los tratamientos térmicos industriales sobre la concentración de nucleótidos de leche de vaca..... | 195 |
| 3.9.-Efectos de los nucleótidos sobre el crecimiento de <u>B.bifidum Ti</u> | 201 |
| 3.9.1.-Crecimiento de <u>B.bifidum Ti</u> en un medio de cultivo mínimo suplementado con nucleótidos..... | 201 |
| 3.9.2.-Crecimiento de <u>B.bifidum Ti</u> en leche humana y leche de vaca suplementada con nucleótidos..... | 207 |
| 3.10.-Efecto de los aminoazúcares glucosamina,gallactosamina,N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina sobre el crecimiento de <u>B.bifidum Ti</u> | 213 |
| IV.-DISCUSION..... | 217 |
| V.-CONCLUSIONES..... | 229 |
| VI.-BIBLIOGRAFIA..... | 235 |

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Las diferencias de composición química, tanto cualitativas como cuantitativas existentes entre leche humana y leche segregada por otras especies, son objeto de una constante investigación en sus aspectos bioquímicos, microbiológicos, inmunológicos, bromatológicos, etc.,. En todo momento, las diferencias encontradas se valoran desde un punto de vista pediátrico, e industrialmente surge la conveniencia de una adecuación cada vez más estrecha entre leche maternizada, preparada a base de leche de vaca, y leche humana.

Uno de los aspectos menos conocidos de la bioquímica de la leche es su contenido en nucleótidos, a pesar de que estas biomoléculas son fundamentales tanto en el metabolismo intermediario como en las reacciones transformadoras de energía.

Los estudios llevados a cabo para dilucidar la composición nucleotídica de leche de vaca, -- oveja y cabra, se reducen al análisis exclusivamente cromatográfico de unas pocas muestras individuales, que no permiten deducir conclusiones sin riesgo de error. Por otra parte, los conocimientos que se tienen sobre el contenido en nucleótidos de leche humana se refieren exclusivamente a las diferencias existentes entre una muestra de leche humana y una de leche de vaca.

Teniendo en cuenta esta situación, el Seminario Internacional Post-IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, " Utilización de la leche y sus componentes en preparados alimenticios", celebrado en Santander en Octubre de 1.974, recomendaba en su 5^a conclusión el estudio de los nu -

cleótidos en leche de distintas especies y sus posibles aplicaciones en dietética infantil.

La mayor parte del contenido de esta memoria se relaciona con el estudio de la composición nucleotídica de leche de vaca, oveja, cabra y cerda y de leche humana bajo el aspecto dinámico de las variaciones cuantitativas y cualitativas que tienen lugar durante la lactación. La iniciación de este tipo de investigación ha exigido que previamente se pusieran a punto una serie de técnicas analíticas para la obtención de resultados múltiples, estadísticamente significativos.

Paralelamente a este estudio se ha analizado también el contenido en orotato dado que este compuesto es un precursor en la síntesis de nucleótidos pirimidínicos cuyas funciones están bien establecidas. Desde su descubrimiento el orotato se ha considerado un compuesto que se acumulaba en la leche de los ruminantes sugiriendo, bien, una vía alterada en la síntesis de los nucleótidos pirimidínicos, bien una asociación con el proceso mismo de secreción láctea.

En esta memoria, a menos que se especifique de otro modo, se ha considerado al orotato incluido dentro de los nucleótidos de la leche con objeto de simplificar la exposición de los resultados.

Dentro del estudio de la composición nucleotídica de la leche de diversos orígenes se han establecido las relaciones existentes entre las densidades ópticas a 250 nm, 260 nm y 280 nm de los filtrados libres de proteínas y contenido en nucleótidos totales con el fin de poder obtener una información previa de la concentración de estos compuestos antes de llevar a cabo toda una larga y laboriosa metodología analítica.

Una vez demostradas las diferencias existentes, en el contenido de nucleótidos de leche humana y leche de vaca, y supuesta la posibilidad de poder adicionar estos compuestos a determinadas leches humanizadas fabricadas a base de leche de vaca, se ha creído conveniente iniciar un estudio del efecto de los -- tratamientos térmicos industriales (pasteurización, esterilización convencional, esterilización UHT por inyección directa de vapor (Uperización^R) y secado por concentración y atomización) sobre los nucleó - tidos presentes en leche de vaca.

La última parte de esta memoria doctoral - describe unas experiencias preliminares en las que se determina el efecto de los nucleótidos sobre el crecimiento de Bifidobacterium bifidum Ti.

En 1900, Tissier (*) observó que las - - heces de los niños lactantes alimentados con leche - humana eran ricas en B. bifidum mientras que las de los niños lactantes alimentados con leche de vaca -- estaban prácticamente desprovistas de esta bacteria. Una propiedad notable de B. bifidum es que fermenta la lactosa en ácido L- (+) - láctico y ácido acético. Existe la creencia general de que el descenso de pH del medio intestinal y de las materias fecales provocado por la liberación de estos ácidos, puede explicar la acción beneficiosa de la leche humana en la defensa del lactante frente a numerosos gérmenes - - patógenos como los bacilos tíficos, sensibles a los ácidos.

Puesto que la leche humana contiene nucleó - tidos que no están presentes en la leche de vaca, al menos durante la mayor parte de la lactación, pare - ció interesante el estudio de dichos compuestos como posibles factores de crecimiento de B. bifidum Ti.

* TISSIER, H. en " Recherches sur la flore intesti - nante des nourrissons. Thèse Doctoral". 1-253. Paris (1900)

I.-PARTE TEORICA

I. PARTE TEORICA

1.1.- BIOSINTESIS DE LECHE

1.1.1.- Aspectos generales del metabolismo de la glándula mamaria.-

La biosíntesis de leche es el resultado complejo de múltiples reacciones químicas que tienen lugar en la célula secretora de la glándula mamaria durante la lactación. La producción de leche, en este sentido, es pues, dependiente del estado de esta " factoría " biosintética celular, o lo que es igual, de las reacciones químicas interdependientes de las vías metabólicas y de sus mecanismos de control en la célula secretora.

La biosíntesis de leche tiene lugar en -- millones de células epiteliales con actividad secretora. Todas ellas llevan a cabo diversas funciones. Así, deben oxidar sustratos para la obtención de -- energía, necesaria para llevar a cabo los procesos biosintéticos de los componentes específicos de la leche tales como lactosa, proteínas lácteas y grasa. Las células epiteliales, además, regulan la composición de la leche al controlar las cantidades de los constituyentes que no son sintetizados en la glándula mamaria, tales como agua, vitaminas y sustancias minerales.

El metabolismo durante el periodo de lactación se caracteriza por una serie de vías biosintéticas altamente operativas y específicas de la glándula mamaria junto a otros caminos metabólicos presentes en la mayoría de los tejidos y que funcionan normalmente o a niveles incrementados.

Igual que ocurre con el hígado y algunos otros tejidos que llevan a cabo una gran actividad biosintética, la vía metabólica de las pentosas fosfato es operativa hasta el punto de que más de la mitad de la glucosa se metaboliza por este camino, en lugar de utilizarse la vía glucolítica de Embden-Meyerhoff (1). Los niveles de glucosa -6- fosfato deshidrogenasa y 6- fosfogluconato deshidrogenasa aumentan significativamente después del parto (2). Por otra parte el tejido de la glándula mamaria in vitro oxida preferentemente el C -1 de la glucosa antes que el C -6 y se detectan con facilidad los intermediarios del ciclo de las pentosas fosfato (3).

La aparición de nuevas vías metabólicas tales como la biosíntesis de lactosa, está relacionada con la célula secretora en lactación y tiene lugar exclusivamente en la glándula mamaria. Aparecen, también, otros productos específicos como son las proteínas mayoritarias de la leche, algunas de las cuales en realidad son enzimas relacionadas de alguna forma con las vías metabólicas implicadas en la biosíntesis de leche (4).

La producción de NADPH por la vía de las pentosas fosfato conduce a la síntesis reductora de ácidos grasos característicos de la grasa láctea y el alto cociente respiratorio de la glándula mamaria se incrementa desde algo menos de la unidad, antes del periodo de lactación, hasta un valor mayor que uno, después de producido el parto, lo que indica una conversión de glúcidos en lípidos (5).

Las funciones de muchas vías metabólicas de la célula secretora de la glándula mamaria son poco conocidas.

Aún no se ha establecido con claridad el papel específico del glucógeno en relación con la biosíntesis de leche y hasta hace muy pocos años se ha especulado con la posibilidad de una vía biosintética anormal para la síntesis de los derivados -- pirimidínicos como única explicación del alto contenido de ácido orótico en la leche de ruminantes (6).

Actualmente, aún cuando se reconoce la -- mayor o menor universalidad de los mecanismos biológicos en las diferentes especies animales y vegetales, la atención de los investigadores se dirige, cada vez más, hacia los organismos superiores, incluidos los mamíferos, donde los mecanismos de control parecen ser considerablemente más complejos. Estos sistemas resultan difíciles de estudiar en relación a organismos inferiores a causa de factores tales como sus largos ciclos de vida, las escasas posibilidades de obtener material biológico activo continuamente y la dependencia de un control hormonal. Sin embargo, en los mamíferos existen algunos sistemas celulares muy activos. Uno de ellos es la célula secretora de la glándula mamaria en lactación. Las características específicas de este tipo celular en cuanto a su capacidad de producción, -- diferenciación y proliferación en el adulto, así como la dependencia de las influencias externas hormonales hacen que resulte atractivo el estudio de las vías metabólicas y los mecanismos de control de la biosíntesis de leche.

El estudio de algunos de los componentes de la leche durante el periodo de lactación es un primer paso para deducir e interpretar las características de las vías metabólicas que tienen lugar en la célula secretora de la glándula mamaria.

De este modo, la investigación de los nucleótidos presentes en leche de diversas especies nos da una primera información de la operatividad de las vías biosintéticas de derivados de purinas y pirimidinas, de sus niveles de actividad en relación al periodo de lactación y de las características peculiares -- que presentan dichas vías en cada especie.

1.1.2.- Acido orótico y biosíntesis de nucleótidos.-

Los primeros estudios sobre los componentes nucleotídicos de la glándula mamaria se remontan al año 1952 en el que Rutter y Hansen (7) demostraron la presencia de UDPG en la glándula mamaria de rata.

Smith y Col. (8) estudiaron algunos de los nucleótidos ácidosolubles de la glándula mamaria de cobaya durante la lactación llegando a identificar la presencia de UMP,AMP,ADP,UDPG,UDP-Ga y ATP. W. Manson en 1956 estudió los nucleótidos presentes en las glándulas mamarias de vaca y cabra en periodo de lactación comprobando que no existen diferencias cualitativas entre los nucleótidos procedentes de las dos fuentes citadas, si bien, podían demostrarse amplias variaciones en el aspecto cuantitativo. Las diferencias encontradas, probablemente se debían a que los extractos tisulares se obtuvieron a partir de animales en diferentes estadios de lactación. Además de AMP,CMP,UMP,GMP,NAD,CDP,ADP,UDP,ATP, y UTP se identificaron UDPNAG y UDPG en cantidades elevadas (15-40 umoles/100 g de tejido). De ácido orótico sólo se encontraron trazas (9).

Deñamur y Col. (10) estudiaron los nucleótidos ácidosolubles de la glándula mamaria de oveja durante el último periodo de la gestación y a todo lo largo de la lactación.

Aún cuando, debido a lo extenso de los métodos analíticos empleados, el número de muestras biológicas examinadas no permite un análisis estadístico de los resultados obtenidos, estos investigadores concluían que la composición nucleotídica de la glándula mamaria depende de su actividad fisiológica: gestación y lactación y que los nucleótidos más abundantes durante la lactación eran los derivados de la adenosina, guanosina e inosina, mientras que durante la gestación, los nucleótidos derivados de la uridina eran mucho más abundantes (61 % de los nucleótidos totales). El contenido en NAD + se multiplica por cuatro en la glándula en periodo de secreción lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por Mc. Lean en la glándula mamaria de rata (11). Al parecer se acumula UDP-Ga antes del parto y el contenido de este nucleótido disminuye progresivamente durante el transcurso de la lactación. Por otra parte, poco antes de producirse el parto resultan particularmente abundantes los UDP-N-Acetil-hexosaminas (12). De los escasos trabajos realizados para esclarecer la composición nucleotídica de la glándula mamaria y de la leche de diversas especies animales (13) (14) (15) (16) (17) (18) - parece deducirse que el contenido de nucleótidos ácidosolubles de la glándula mamaria difiere tanto cualitativamente como cuantitativamente de la leche segregada. Sería deseable el que se investigaran más profundamente los aspectos cualitativos y cuantitativos de los nucleótidos ácidosolubles presentes en la glándula mamaria de distintas especies con el fin de poder establecer las posibles diferencias existentes en los mecanismos de síntesis y regulación de los nucleótidos, así como la regulación de la acumulación de algunos de ellos en la leche.

El ácido orótico se descubrió en el suero de leche de vaca en 1904 y desde entonces se ha supuesto un

compuesto típico en la leche de rumiantes (20). Los valores que, sin embargo, se encuentran en la literatura, son ampliamente contradictorios como consecuencia de la aplicación de distintos métodos de análisis, tanto químicos como microbiológicos, relativamente inespecíficos (21) (22) (23) (24) (25) (26). No obstante, la opinión actual más generalizada es que únicamente la leche procedente de los bóvidos contiene cantidades elevadas de ácido orótico (hasta 6 mg/100 ml) en contraste con la leche procedente de los óvidos que contiene solo pequeñas cantidades (0'8-1 mg/100 ml) y la leche humana en donde está virtualmente ausente (26) (27).

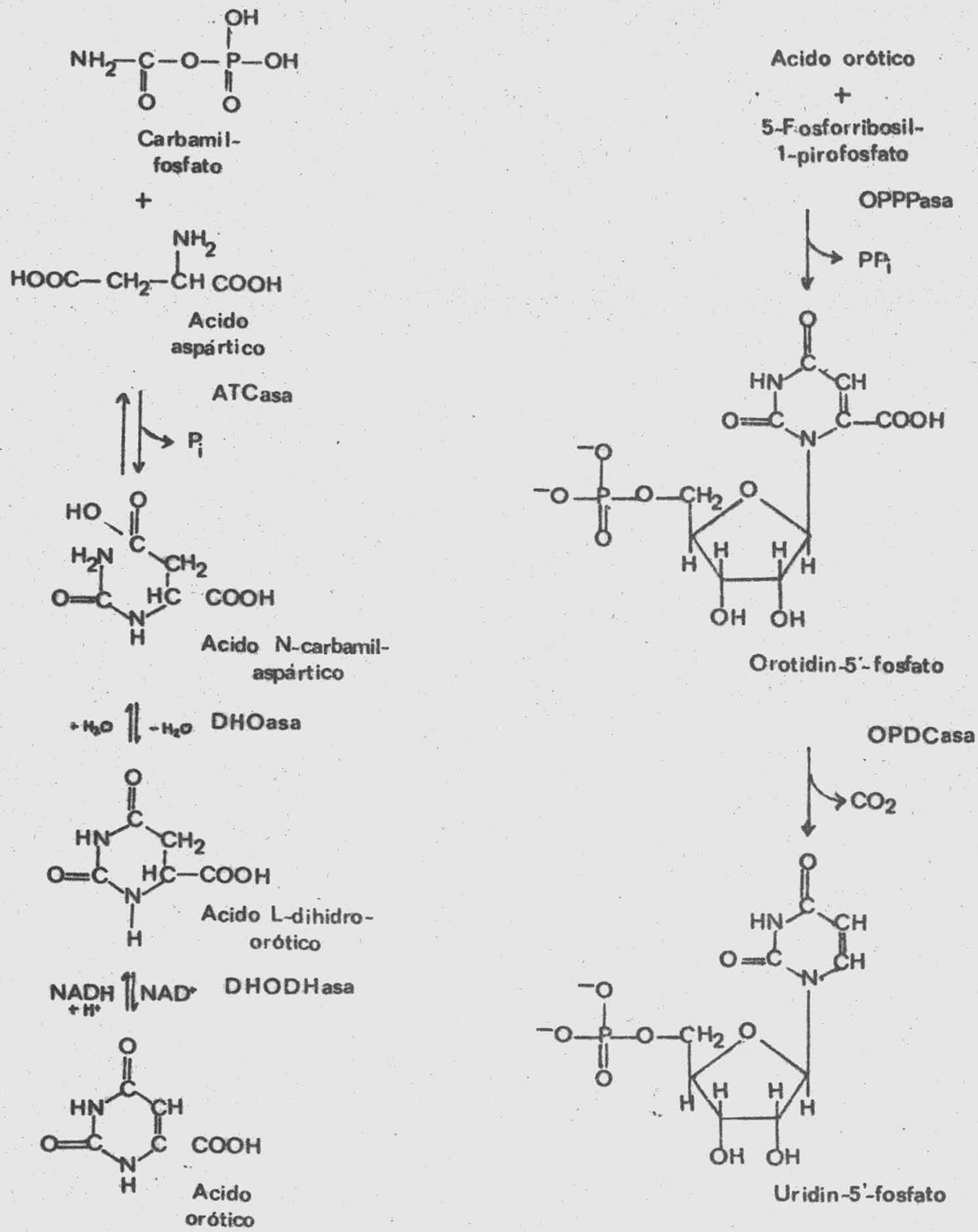
Los valores de ácido orótico encontrados en la célula secretora de la glándula mamaria de vaca son semejantes a los de otros muchos tejidos y órganos animales por lo que el elevado contenido de orotato es aparentemente peculiar de la leche de los bóvidos (28). Únicamente en otras dos situaciones metabólicas se ha encontrado ácido orótico en gran cantidad: en el medio de cultivo donde crece un cierto mutante de E. coli y en la orina de hombres con aciduria por ácido orótico y orotidina (29) (30).

No hay evidencia de que exista una ruta metabólica distinta para la biosíntesis de las pirimidinas en la célula secretora de la glándula mamaria en lactación. Sin embargo, el elevado contenido de ácido orótico en la leche de los bóvidos podría, en principio, sugerir una vía alterada.

La vía metabólica para la síntesis de pirimidinas queda reflejada en la Fig. 1

Las enzimas aspartato- transcarbamilasa, dihidroorotasa y dihidroorotato deshidrogenasa están presentes en la célula secretora de la glándula mamaria como en el resto de los tejidos animales, incluidas aquellas

Figura 1



Esquema de la vía metabólica de síntesis de nucleótidos pirimidínicos.

situaciones donde se acumula ácido orótico (31).

Las determinaciones de actividad de dihidroorotato deshidrogenasa, orotidín -5'- fosfato fosforibosiltransferasa y orotidín -5'- fosfato descarboxilasa llevadas a cabo por Larson en glándula mamaria de rata y de vaca indican que, si bién en el primer material biológico la actividad específica de estas enzimas es de 2 - 4 veces menor que en el tejido mamario de vaca, tanto en uno como en otro, hay suficiente actividad para hacer evidente la operatividad de la vía metabólica de la síntesis de pirimidinas ya descritas en otros sistemas (31) (31).

Si el alto contenido de ácido orótico en la leche de vaca no puede explicarse sobre la base de la inexistencia de actividad de orotidín -5'- fosfato fosforibosiltransferasa y/ó orotidín -5'- fosfato descarboxilasa, es necesario contemplar otras posibilidades tales como un funcionamiento desproporcionado de la primera parte de la ruta biosintética, ocasionado por las disponibilidades de PRPP (fosforibosil-pirofosfato) y por ciertos productos finales que pueden o no ejercer un control por retroinhibición sobre la aspartato transcarbamilasa, o bién, el ácido orótico puede estar asociado con el proceso mismo de secreción (33) (34).

Al utilizar un sistema de cultivo de células para evaluar la distribución de ácido orótico como índice de retención celular de dicho ácido, se observa que el tejido mamario de vaca pierde muy rápida y constantemente el ácido orótico, lanzándolo al medio que le rodea (28). Más que una ruta biosintética anómala parece existir una incapacidad de retención de ácido orótico por la célula.

De este modo, para mantener un nivel intracelular de ácido orótico suficientemente alto, para que la biosíntesis de derivados pirimidínicos sea operativa, la célula debe sintetizar grandes cantidades del citado ácido, la mayoría del cual se pierde con la leche (4).

La biosíntesis de pirimidinas opera bajo un control de retroinhibición complejo. Este control se ejerce en las bacterias por ciertos pirimidín - nucleótidos los cuales inhiben la aspartato trans - carbamilasa (35). El control de esta biosíntesis - en los mamíferos se ejerce sobre la carbamil-fosfato sintetasa(36). Se ha postulado un segundo punto de control en los mamíferos a nivel de la OMP-descarboxilasa ya que varios nucleótidos inhiben el enzima - aislado de algunos tejidos como el hígado de rata - (37) (38) y el cerebro de vaca (39). Sin embargo, la significatividad de esta inhibición no resulta - clara en ausencia de acumulación de orotato. La OMP - descarboxilasa de tejido mamario bovino se inhibe - también por varios nucleótidos (XMP,XDP,UMP y CMP) y como en este tejido ocurre la acumulación de orotato, la primera porción de la biosíntesis de pirimidinas no puede ser inhibida efectivamente, lo cual implica que la retroinhibición en este tejido pu -- diera tener una gran importancia como elemento efec -- tivo de control (40).

La inhibición de OMP-descarboxilasa por - xantín derivados no resulta clara ya que estos nu - cleótidos están en muy baja concentración en la - - glándula mamaria bovina (41). Aunque estos compues - tos son intermediarios en la degradación de los - - purín-nucleótidos y la leche de vaca contiene xantín - oxidasa en cantidades apreciables (42).

La inhibición de OMP descarboxilasa por UMP resulta significativa ya que es el producto de la reacción y el precursor del UDP necesario para la síntesis de lactosa. Tanto UMP como UDP (más sus derivados) aumentan en el tejido en lactación hasta alcanzar una concentración (0.2 mM) (10) - (43).

Otros dos factores podrían también contribuir a la acumulación de orotato en la leche de vaca. El primero es que la PRPP-sintetasa necesaria en la biosíntesis de nucleótidos purínicos y pirimidínicos, podría estar inhibida en las células. Sin embargo, los resultados obtenidos por Switzer indican una alta actividad específica del enzima en el tejido mamario bovino (44). El segundo factor es que la acumulación de orotato ocurriera, más que por inhibición de su utilización, por una aceleración en su formación. En este sentido, la reciente caracterización de la carbamil fosfatosintetasa del tejido mamario bovino parece demostrar que difiere de la de otros tejidos animales, siendo inhibida en menor proporción por UTP y capaz de usar amonio como sustrato primario en lugar de glutamina (45).

No hay pues una explicación simple de la acumulación de ácido orótico en la leche de vaca. Existe, más bien, una interacción de un número complejo de factores que requieren posteriores investigaciones, para delinear totalmente la cuestión planteada.

La biosíntesis de nucleótidos derivados del anillo de la purina se supone debe transcurrir en el tejido mamario por la misma vía descrita para otros sistemas (32), aunque hasta el momento no se hayan estudiado las características de las enzimas

implicadas en este proceso en la glándula mamaria. Está demostrada la presencia de derivados de la -- adenina y de la guanina tanto en el tejido glandular mamario (9) (12) como en la leche de diversas especies (14) (17), sin embargo, resulta necesario investigar los cambios que se producen en la glándula mamaria, y en la leche, desde la gestación al final de la lactación, para obtener resultados significativos bajo el punto de vista estadístico que permitan abordar una explicación clara de la biosíntesis de derivados purínicos y pirimidínicos.

En este sentido, en la presente memoria se ha llevado a cabo un estudio de los nucleótidos ácidosolubles presentes en las leches de vaca, cabra, oveja, cerda y humana durante el periodo de lactación, como una primera contribución a los temas anteriormente planteados.

1.1.3.- Biosíntesis de las proteínas lácteas.-

No existe ninguna razón para creer que los mecanismos generales de síntesis proteica conocidos en la naturaleza son diferentes en la célula secretora mamaria (46). Sin embargo, ciertos mecanismos de control han podido ser adaptados de tal forma que hayan evolucionado hasta un alto grado de especialización en la célula mamaria (4).

Las principales fracciones proteicas de la leche son α -caseína, β -caseína, γ -caseína, k-caseína, α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina sérica, inmunoglobulinas $I_g G_1$, $I_g G_2$, $I_g M$, $I_g A$ y proteosa-peptona. Todas estas fracciones presentan "variantes", reflejo de la acción de genes autosómicos transmitidos por herencia mendeliana simple (47).

La α -caseína, β -lactoglobulina y α -lactalbúmina - suponen el 90 - 95 % del total de las proteínas - lácteas. Estas tres proteínas se sintetizan en la glándula mamaria, sin embargo, la albúmina sérica, las inmunoglobulinas y la γ -caseína son absorbidas aparentemente desde la sangre (48).

Las tres posibles fuentes de precursores sanguíneos para la síntesis de proteínas en la glándula mamaria son: péptidos del plasma sanguíneo los cuales aportan hasta el 10 % de los aminoácidos de la proteína formada, proteínas plasmáticas, las cuales aportan menos del 10 % de las proteínas sintetizadas, y aminoácidos libres que aportan la mayoría del nitrógeno requerido para la síntesis de las proteínas lácteas (49).

Los resultados obtenidos a partir de medidas de las diferencias arterio-venosas de aminoácidos indican que tanto los aminoácidos esenciales como la mayoría de los no esenciales llegan a la glándula mamaria a través de la corriente sanguínea (50) (51). En algunos casos los aminoácidos no esenciales son sintetizados a partir de otros aminoácidos. Así, existe una considerable absorción de ornitina por la glándula mamaria, no obstante la ornitina no se encuentra en las proteínas lácteas. Parece ser que la ornitina es convertida en prolina en el tejido mamario (52).

Los aminoácidos no esenciales pueden ser también sintetizados en la glándula mamaria a partir de carbohidratos y ácidos grasos tales como la glucosa y acetato. Esto ocurre con los aminoácidos glutamato, aspartato, serina, glicocola y alanina - (53).

Las experiencias llevadas a cabo por B.L. Larson (4) suponen un primer paso en el largo recorrido de los posibles mecanismos de control de la síntesis de proteínas lácteas. La puromicina - - inhibe la síntesis de β -lactoglobulina y β -caseína en los cultivos de células de glándula mamaria, mientras que la actinomicina D inhibe tan solo la síntesis de β -caseína. Este hecho resulta altamente -- significativo y podría ser explicado por la presencia de un ARN-m de " larga vida " tal y como se ha propuesto en la síntesis de la hemoglobina en el reticulocito (54), o bien, podría significar que - la β -lactoglobulina actúa más como una proteína -- " constitutiva " de la célula que como una proteína del tipo de la β -caseína no necesaria para la supervivencia celular. Otra explicación de los hechos -- podría estar en la conversión hormonal de una - - - β -lactoglobulina previamente sintetizada de una forma activa a otra inactiva y de esta forma no se observaría una síntesis neta de proteínas.

Estas especulaciones abren interesantes - posibilidades de que la β -lactoglobulina, más que un constituyente misceláneo de la leche, sea una proteína con un papel determinado en el metabolismo de la célula secretora de la glándula mamaria.

1.1.4.- Biosíntesis de lactosa.-

La lactosa se encuentra casi exclusiva - mente en la leche y en las glándulas mamarias de los animales. Ocasionalmente se encuentra en algunas -- plantas, aunque en concentraciones muy bajas, y su formación transcurre por una vía biosintética distinta de la operativa en los animales (55).

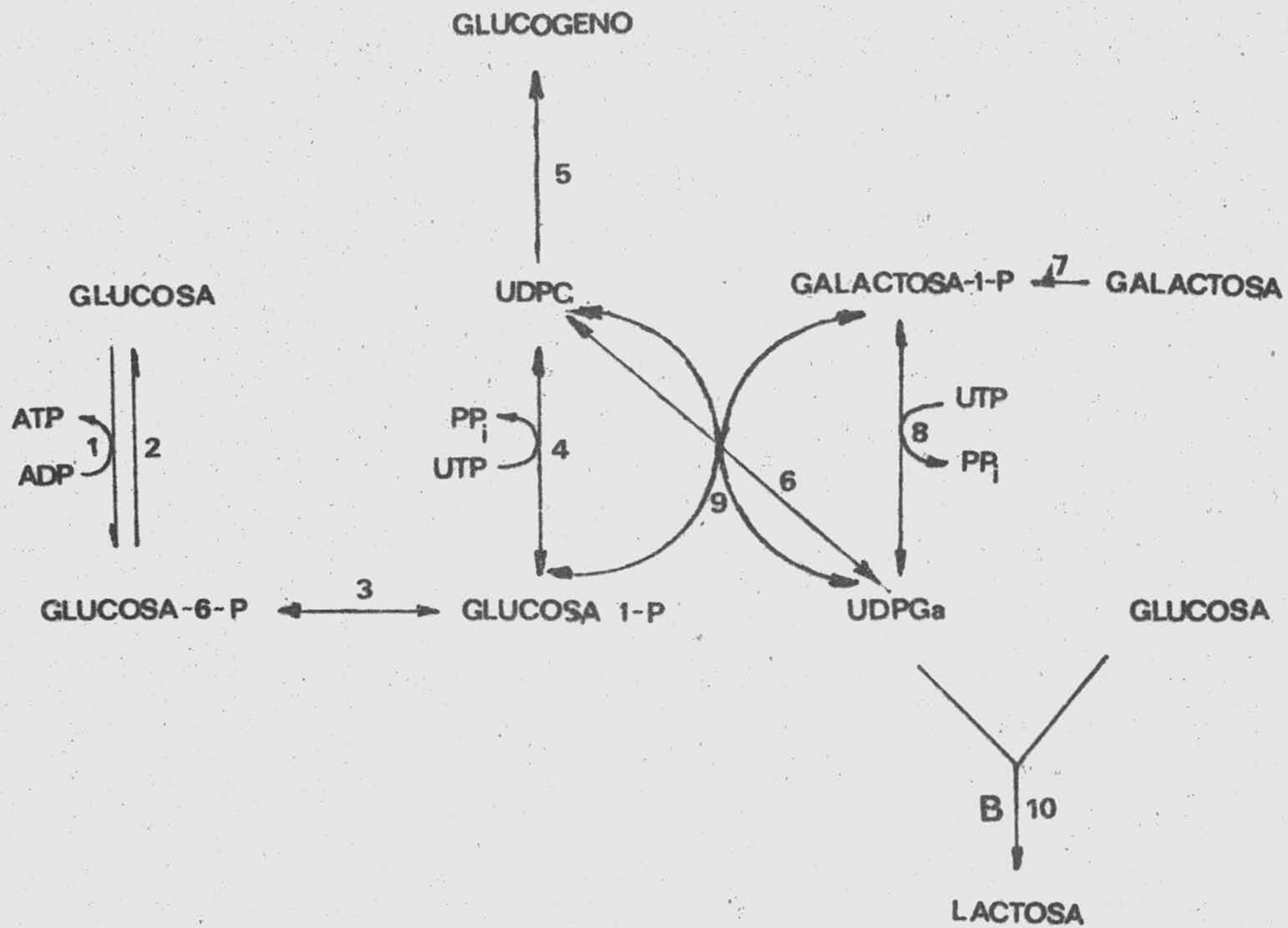
El esquema propuesto actualmente para la síntesis de la lactosa en la glándula mamaria puede observarse en la fig. 2.

Originalmente se creyó que la molécula de galactosa reaccionaba con glucosa-1-fosfato para formar galactosa-1-fosfato la cual era convertida en lactosa con la liberación del ión fosfato en presencia de una fosfatasa (56).

Investigaciones posteriores han demostrado que el aceptor del resto de galactosa es la glucosa libre. Esta evidencia ha sido demostrada en glándula mamaria de rata, y glándula mamarias de vaca intacta y perfundida (57) (58) (59).

La lactosa sintetasa es la última enzima de esta vía biosintética. Ebner y Brodbeck (60) demostraron que la lactosa sintetasa es un complejo de dos proteínas diferentes, ambas necesarias para la actividad enzimática. Una de estas dos proteínas, la proteína B, estaba presente en la leche en grandes concentraciones y fué aislada en estado cristalino e identificada como α -lactalbúmina, una proteína conocida durante muchos años como un componente del suero pero a la cual no se atribuía ninguna función. El otro componente, la proteína A, fue identificado subsiguientemente por Brew y Col (61) como una galactosil-transferasa no específica y normalmente presente en una gran variedad de tejidos, además de la glándula mamaria. Por sí misma, en ausencia de α -lactalbúmina, esta enzima es capaz de transferir la galactosa desde el UDP-Ga a compuestos tales como N-acetil-glucosamina pero no a glucosa. Sin embargo, en presencia de la proteína B, o α -lactalbúmina, este complejo enzimático transfiere el resto de galactosa solamente a glucosa (62).

Figura 2



Esquema de la síntesis de lactosa a partir de glucosa y galactosa. Las enzimas implicadas son: 1) Hexocinasa, 2) Glucosa-6-fosfatasa, 3) Fosfoglucomutasa, 4) UDPG-pirofosforilasa, 5) UDPG-glucógeno transglucosidasa, 6) UDPGc epimerasa, 7) Galactocinasa, 8) UDPGg pirofosforilasa, 9) Galactosa-1-fosfato uridil transferasa, 10) Lactosa sintetasa y B) α -lactalbúmina.

La progesterona parece reprimir la formación de lactalbúmina durante el embarazo. Cuando la concentración de progesterona plasmática desciende al producirse el parto, comienza la síntesis de α -lactalbúmina que permite a su vez la síntesis de lactosa (67).

La actividad de lactosa sintetasa en glándula mamaria de rata se incrementa muy marcadamente durante la lactación. Este aumento va paralelo al del contenido de lactosa en el tejido mamario, por lo que este complejo enzimático puede ser un paso limitante en la secreción láctea (63).

La interesante situación de un sistema de control especializado en la glándula mamaria en lactación que se produce cuando una proteína que aparece solo durante la galactopoyesis se combina y redirige la actividad de una enzima ya presente para sintetizar un determinado producto, en el caso que nos ocupa, lactosa, puede ser el primero de una serie de ejemplos de este tipo que ocurran en la glándula mamaria (4).

Algunas otras enzimas implicadas en la biosíntesis de lactosa presentan un interés especial. La uridil transferasa no se puede demostrar en el tejido mamario por lo que aparentemente toda la galactosa formada proviene de la glucosa a través de la reacción catalizada por la UDP-Ga epimerasa(59).

Se ha señalado que las actividades de UDP-Ga-4- epimerasa y UDPG pirofosforilasa se incrementan marcadamente después del comienzo de la lactación en rata, cobaya y conejo. La actividad fosfoglucomutasa también aumenta desde el comienzo de la lactación en rata y cobaya. En contraste con estas especies, no

existe un aumento significativo de estas tres enzimas en la glándula mamaria de vaca después de comenzada la lactación (64) (65).

Se puede concluir, por tanto, que la iniciación de la lactación en la vaca no implica la adquisición repentina de un potencial enzimático para la biosíntesis de leche, sino que las enzimas están ya presentes durante el embarazo y la causa del comienzo de la lactación se deberá a otros factores. Así, la hipofisectomía causa un marcado descenso en las actividades de UDP-glucosa pirofosforilasa y fosfogluco-mutasa en la glándula mamaria de rata (66).

1.1.5.- Biosíntesis de lípidos en la leche.-

La grasa es uno de los componentes mayoritarios de la leche y el más variable ya que está influenciado por la nutrición y determinados factores ambientales en mucho mayor grado que cualquier otro componente lácteo. Existe, por otra parte, una considerable variación en el porcentaje y composición de la grasa de leche perteneciente a diferentes especies.

La grasa de la leche está compuesta principalmente de triglicéridos. La leche de bóvidos, por ejemplo, contiene solamente el 1 % de otros lípidos (68).

La diferencia más significativa entre la leche de rumiantes y la de animales monogástricos es el porcentaje relativamente alto de ácidos grasos de cadena corta en los primeros y el mayor contenido de ácidos grasos insaturados en los segundos (69).

Los precursores de grasa láctea que son absorbidos en cantidades suficientes por la glándula mamaria para la biosíntesis de los lípidos son: glucosa, β -hidroxibutirato y triglicéridos plasmáticos (70).

Los ácidos grasos de dieciocho carbonos y algunos de los de dieciseis provienen casi totalmente de los triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad en forma de quilomicrones presentes en la sangre. Sin embargo, las cantidades de ácidos grasos libres que aparecen en leche y que son absorbidos de la sangre parecen apreciables (71). Las diferencias arteriovenosas de ácidos grasos libres son extremadamente pequeñas, no obstante, empleando ácidos grasos marcados se puede observar un descenso sustancial en la radiactividad de la corriente sanguínea. Esto indica que hay una absorción de ácidos grasos libres pero que es compensada por una liberación casi igual de estos ácidos en la corriente venosa, dando una pequeña pero neta absorción de ácidos grasos libres por la glándula mamaria (72).

Riis y Col. (73) después de inyectar ácidos grasos marcados en una vaca en lactación concluyeron que el 50 % de los ácidos grasos de la leche derivaban de los lípidos plasmáticos. Barry (74) estimaba que el 30 % de los átomos de carbono de la leche derivaban el acetato y los restantes de los ácidos grasos plasmáticos. Groves y Larson (75) concluyeron que el 40 - 60 % de los compuestos lipídicos de la leche derivaban de los lípidos del suero sanguíneo. A partir de todos estos estudios se deduce que al menos la mitad de los ácidos grasos de la leche de bóvidos proviene de los triglicéridos presentes en la sangre.

La información sobre los precursores de la materia grasa de leche de animales no rumiantes es algo limitada. Parece que existe una síntesis significativa de ácidos grasos en las glándulas mamarias de rata y conejo a partir de glucosa y posiblemente

acetato (74). Por otra parte, se puede detectar una considerable radiactividad en los ácidos grasos C_{12} , C_{14} y C_{16} de leche de cerda después de la inyección de glucosa marcada, indicando la conversión de glucosa en grasa láctea en esta especie (76).

En la glándula mamaria de rumiantes, existe una síntesis despreciable de ácidos grasos a partir de glucosa. Al principio, se creyó que esto era debido a que la glucosa no da lugar a la formación de acetil-CoA en los tejidos de la glándula mamaria, pero evidencias posteriores han indicado que el hecho se debe a una pérdida de actividad de la enzima citrato-liasa (77). El acetil-CoA se forma en la mitocondria a partir de piruvato y al no poder pasar directamente al compartimento citoplasmático es convertido en citrato, el cual aparentemente pasa sin dificultad al citoplasma (el citrato se encuentra en concentraciones relativamente altas en la leche). En la glándula mamaria de rata el citrato da lugar a la formación de acetil-CoA por la acción de la citrato liasa. La actividad citrato liasa en la mayoría de los tejidos de las glándulas mamarias de los rumiantes es baja; por tanto el número de unidades de acetil-CoA formadas a partir de glucosa y que resultan disponibles para la síntesis de ácidos grasos es mucho más bajo. El acetil-CoA usado por la célula epitelial de la glándula mamaria de rumiantes para la síntesis de grasa láctea se forma principalmente a partir del acetato en el citoplasma (78).

La demostración de que los ácidos grasos de cadena corta ($C_4 - C_{16}$) se formaban en la glándula mamaria a partir de acetato se llevó a cabo por Popják (79) al inyectar acetato marcado en el sangre de cabras en periodo de lactación. La activi

específica en grasa de la leche era mucho más alta que en ácidos grasos plasmáticos, indicando que el acetato se incorporaba en los lípidos de la leche. La implicación del acetato en la síntesis de los ácidos grasos de cadena corta ha sido demostrado por un gran número de investigadores. Annison y Col. (80) calculaban que las actividades específicas de los ácidos grasos de C_4 a C_{14} eran 75 - 90 % del acetato presente en la sangre. La pequeña cantidad de ácido propiónico incorporado en la grasa láctea se utiliza como la unidad de tres carbonos a la que se unen las unidades de acetato para formar los ácidos grasos con número impar de átomos de carbonos (81).

Aproximadamente el 30 % del ácido palmítico se deriva del acetato, en rumiantes, o a partir de glucosa en animales monogástricos. El 70 % restante del ácido palmítico procede de triglicéridos presentes en la corriente sanguínea (82).

Los ácidos oleíco y esteárico proceden fundamentalmente de los triglicéridos plasmáticos, sin embargo, el ácido esteárico se absorbe en cantidades mucho mayores que el ácido oleíco, aún cuando éste se encuentra en la leche en gran cantidad. Este hecho se basa en la capacidad de la célula epitelial de las glándulas mamarias bovina, ovina y de animales monogástricos, de convertir el ácido esteárico en ácido oleíco; no obstante, este último no puede ser saturado para formar ácido esteárico (83).

No se han llevado a cabo medidas precisas que indiquen las cantidades de glicerol que se incorporan en la glándula mamaria a partir de diversas fuentes del organismo, sin embargo, se estima que el glicerol libre en la corriente sanguínea aporta

menos del 10 % del presente en los triglicéridos de la leche (74). La mayor parte del glicerol (70 %) es suministrado por la síntesis de glicerol-3- fosfato a partir de glucosa por la vía glucolítica(84).

Los ácidos grasos se sintetizan a partir de acetato y otros ácidos grasos a través de dos -- vías biosintéticas. El sistema mitocondrial da lugar a la síntesis de ácidos grasos por un camino inverso a la β -oxidación. Este sistema está implicado en el alargamiento de los ácidos grasos de cadena corta. El segundo sistema está localizado en el citoplasma celular y da lugar a la formación de ácido -- palmítico a partir de acetil-CoA sin la participación de las enzimas mitocondriales de la vía oxidativa de los ácidos grasos. Es la conocida biosíntesis de ácidos grasos vía malonil -CoA.

Estos dos sistemas biosintéticos se han demostrado en las glándulas mamarias de rata, conejo y vaca, sin embargo, la ruta del malonil -CoA parece ser la predominante (85) (86) (87).

La esterificación de los ácidos grasos con la molécula de glicerol no ocurre al azar. Los análisis de triglicéridos de la leche de vaca indican que los ácidos grasos C_{12} - C_{16} se encuentran sobre el C-2 del glicerol y los ácidos grasos de cadena corta, C_4 y C_6 , así como el ácido esteárico, se localizan fundamentalmente en los C-1 y C-3 (88).

Aunque se ha postulado la acilación directa del 2-monoglicérido para formar el 1-2 diglicérido -- (89), en glándula mamaria existen evidencias de que la esterificación de los ácidos grasos con el glicerol se lleva a cabo a través de la formación de ácidos fosfatídicos. En efecto, la incorporación de ácidos grasos en glándula mamaria de rata requiere ATP, Mg^{++} y

CoA. Por otra parte, se ha demostrado la presencia de palmitoil-transferasa en la glándula mamaria de cobaya. Se ha sugerido que en esta transferasa podría estar el punto adecuado para la regulación de la síntesis de grasa láctea ya que el palmitoil-CoA está situado en una encrucijada del metabolismo y la esterificación del glicerol-3-fosfato representa una interacción de dos áreas mayoritarias metabólicas (82).

1.1.6.-Regulación de la biosíntesis de leche

No existe duda de que la biosíntesis de leche está influenciada por muchos factores. Todas las células secretoras en la glándula mamaria y el estado de cada célula en sí misma están bajo una gran influencia hormonal, y la leche sintetizada en cada momento, depende de los niveles de metabolitos y precursores disponibles, así como de las actividades enzimáticas en cada una de las vías biosintéticas implicadas en la síntesis de leche.

Larson ha propuesto que la biosíntesis de leche debe considerarse como una serie de vías biosintéticas cada una de las cuales estaría sometida a un control general o superior y a un control específico análogo al sugerido para un operón bacteriano.

El control general de la lactación se llevaría a cabo bajo la influencia de hormonas y otras señales, y cada vía biosintética actuaría con independencia de las demás de tal forma que su operatividad dependería de la presencia o ausencia de inductores adecuados. Las enzimas específicas de cada vía biosintética, al menos las directamente implicadas en la lactogénesis, podrían estar relacionadas de tal manera que estarían todas presentes o ausentes bajo una situación dada (4).

Se han podido obtener algunas evidencias que apoyan esta hipótesis para el control de la biosíntesis de leche. En efecto, las células de la glándula mamaria in vitro pierden su capacidad para sintetizar los constituyentes específicos de la leche, sin embargo, la pérdida de estas funciones específicas no desaparece de una forma paralela sino discontinua (90). No obstante, las razones que pueden explicar esta observación no están claras. Una de ellas podría ser que determinadas vías biosintéticas se afectan más que otras por la pérdida o dilución en el medio de cultivo de inductores, hormonas, intermediarios biosintéticos u otros factores. Otra razón podría estar en la acumulación de productos sintetizados en el medio de cultivo, los cuales ejercerían una retroinhibición sobre determinados caminos biosintéticos. Esto último ha sido demostrado al comprobar que la grasa sintetizada y acumulada en la glándula mamaria de vaca inhibe la continuidad de la síntesis de lípidos (91). Por otra parte la adición de α -lactalbúmina al medio de cultivo inhibe la síntesis de la propia α -lactalbúmina (4). En cualquier caso, parece que en sistemas de cultivo de células, las vías biosintéticas

dejan de ser funcionales independientemente unas de otras.

Se han llevado a cabo ciertas investigaciones usando cultivos de células bovinas encaminadas a seguir la desaparición de determinadas enzimas y proteínas de leche en función del tiempo.

Ha podido demostrarse que las enzimas UDPG pirofosforilasa, UDPGa-4- epimerasa y lactosa sintetasa (α -lactalbúmina), todas ellas implicadas en la síntesis de lactosa, disminuyen su actividad de acuerdo con una igual ecuación exponencial. La disminución de la síntesis de β -Caseína y β -lactoglobulina siguen ecuaciones exponenciales independientes entre sí y entre las enzimas implicadas en la síntesis de lactosa (90) (92). Estos estudios parecen soportar la hipótesis de que las enzimas de una determinada vía metabólica están íntimamente relacionadas. Obviamente, si esto es cierto, la identificación de otras enzimas que sigan la misma ecuación exponencial que una proteína a la cual no se le ha asignado ninguna función metabólica, por ejemplo la β -lactoglobulina, suministraría un punto de apoyo para una posible misión de esa proteína en determinada vía biosintética de leche (93).

Se han llevado a cabo estudios en otros sistemas donde los controles pueden eliminarse. Este es el caso de ciertos tumores mamarios. En los ratones, estos tumores parecen sintetizar leche sin aparente control hormonal, además en la leche desaparecen ciertos constituyentes normales. Así, la pérdida de estos componentes parece ser el resultado de la ausencia de funcionalidad de vías biosintéticas normales asociadas con la lactación (94).

El desarrollo de la glándula mamaria después de la pubertad está bajo control hormonal. Por otra parte, las hormonas están implicadas en la lactación de tal manera que son responsables de la iniciación de la secreción láctea y juegan un papel vital en el mantenimiento de la secreción después de que ésta se haya establecido (95).

Antes de producirse el parto, los lípidos y las proteínas forman a modo de gránulos, en las células epiteliales, que se acumulan en el lumen de los alveolos de la glándula mamaria, como calostro. La iniciación de la secreción de leche ocurre por un incremento repentino de la actividad secretora de las células epiteliales. En la leche de rata, la lactosa no aparece hasta producido el parto (96). Simultáneamente se produce un incremento en la relación ARN:ADN, un aumento en el número de ribosomas y en el número de mitocondrias por célula (97).

La hipofisectomía previene la iniciación de la lactación y la parte anterior de la pituitaria contiene hormonas específicas responsables de la iniciación de la lactación, entre las cuales la prolactina parece ser la más importante (98). Esta hormona causa la iniciación de la secreción de leche cuando se inyecta en la glándula mamaria de cualquier animal (99). Además de la prolactina, se requieren para la iniciación de la lactación las hormonas de la corteza de los adrenes, aunque en una raza de ratón la hormona somatotropa (STH) puede reemplazar a la prolactina en la iniciación de la secreción, sin necesidad de la presencia de las hormonas corticoides (100).



La insulina y el cortisol representan los requerimientos mínimos para mantener viable el tejido mamario in vitro. Antes de que las células de la glándula mamaria puedan sintetizar caseína, como respuesta a la prolactina, deben dividirse y la división celular tiene lugar en presencia de insulina y cortisol (101).

El control hormonal de la iniciación de la lactación no ha sido aún completamente explicado. La teoría más comunmente aceptada es que existe un aumento en los niveles sanguíneos de prolactina y glucocorticoides además de una caída brusca en el nivel de los compuestos que poseen un efecto inhibi dor sobre el proceso de secreción láctea, concretamente la progesterona y la transcortina. Esta última se une a los glucocorticoides inhibiendo su actividad biológica y la progesterona inhibe la acción enzimática de la lactalbúmina (102).

La secreción de prolactina y/o la liberación por la pituitaria están a su vez controladas - por el hipotálamo y por una acción directa de ciertos compuestos producidos por la misma glándula pituitaria. El hipotálamo produce un compuesto de bajo peso molecular denominado factor inhibidor de la prolactina (PIF), el cual inhibe su producción y/o liberación en la pituitaria. Otros compuestos tales como reserpina, epinefrina y acetil-colina, así como la acción del ordeño o el estímulo del recién nacido sobre la glándula mamaria, ejercen su efecto al hacer descender el contenido hipotalámico del PIF. El estradiol parece actuar del mismo modo, además del efecto estimulante directo sobre la glándula pituitaria, y la triodotironina y la tiroxina parecen - actuar directamente sobre la liberación de la prolactina de la pituitaria (103).

El mantenimiento de la secreción láctea - depende de la eliminación de la leche sintetizada - por la glándula mamaria, así como del efecto estimulante del recién nacido ya que está implicado en la liberación de prolactina, ACTH y Oxitocina (104). La cabra parece ser una excepción en cuanto que no necesita el estímulo del hijo o del ordeño para mantener la secreción láctea (105).

En lo que se refiere a la galactopoyesis, o aumento de la lactación establecida, los extractos de la pituitaria anterior incrementan la producción de leche. La mayor parte de este efecto se debe a la hormona somatotropa. La prolactina tiene muy poco efecto sobre la galactopoyesis en la vaca pero causa un ligero efecto en las cabras durante la parte final del periodo de lactación (106). La prolactina, sin embargo, tiene una gran actividad galactopoyética en rata y en conejo; en éste último, además, aumenta el porcentaje de lactosa en leche (107). La inyección de triiodotiro- nina y tiroxina a vacas en periodo de lactación produce un gran incremento en la producción de leche pero también causa una necesidad incrementada de nutrientes, una pérdida de peso y aumento en las actividades cardíacas y respiratorias en los animales (106).

1.2.- La flora intestinal del hombre.-

La aplicación de métodos cuantitativos al estudio bacteriológico de las materias fecales ha cambiado por completo la concepción primitiva que se tenía sobre la composición normal de la flora intestinal. Esta concepción ha estado, desde hace tiempo, basada en resultados puramente cualitativos obtenidos a partir de cultivos aerobios. Se admitía la preponderancia normal y obligatoria de Escherichia coli en las heces del hombre y diversas especies animales (108). En el hombre sano no se admitía más que una sola excepción: el contenido bacteriano de las heces del lactante alimentado con leche materna, donde el Bifidobacterium bifidum, descubierto por Tissier, se presentaba como la especie predominante y casi exclusiva (109).

Las investigaciones llevadas a cabo por Werner y Seeliger (110) y Spaulding y Col. (111) han cambiado totalmente la idea que sobre la composición de la flora intestinal humana se tenía. Los gérmenes anaerobios constituyen el 80 - 95 % de las bacterias cultivables de la flora fecal del adulto. El porcentaje de E. coli, así como el de enterococos, oscila de 1-5 % y el de los lactobacilos no sobrepasa el 6 % de la microflora total en el adulto. Otras especies tales como estafilococos, bacilos esporulados, Pseudomonas spp. y levaduras no están regularmente presentes y no son numéricamente importantes.

La gran mayoría de las bacterias anaerobias del intestino humano está formada por bacilos Gram positivos no esporulados y bacilos Gram negativos. Las especies Gram negativas anaerobias constituyen un grupo heterogéneo de bacterias proteolíticas y sacaroclásticas pertenecientes al género Bacteroides, las cuales

dependiendo del medio de cultivo utilizado pueden constituir 40 - 80 % del total de las bacterias fecales cultivables en el adulto (112) (117). Del mismo modo, en los adultos normales las bacterias Gram positivas no esporuladas anaerobias suponen de 10 - 60 % de los porcentajes totales (110) (112). En contraste con los adultos, las heces de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna se caracterizan por una preponderancia absoluta de los bacilos Gram positivos anaerobios. Las bacterias anaerobias Gram negativas estan normalmente ausentes (110) (113).

1.2.1.- Posición taxonómica de las bifidobacterias.-

Las bifidobacterias estan encuadradas actualmente en el Gen. Bifidobacterium perteneciente a la Fam. Actinomycetaceae. El género Bifidobacterium está formado por bacilos de apariencia variable. A menudo en aislados frescos toman forma de V ó Y y la morfología puede estar influenciada por las condiciones nutricionales. Son Gram positivos, no móviles y no esporulados. A menudo se tiñen irregularmente; son sacaroclásticos, sin producción de gas. La glucosa es fermentada dando lugar a ácido acético y L (+) ácido láctico a través de la vía de las pentosas fosfato. Son anaerobios estrictos con temperatura óptima de crecimiento de 36 - 38 °C (114).

Hasta la clasificación definitiva del Gen. Bifidobacterium, en 1974, ha existido una fuerte controversia en cuanto que muchos autores consideraban a las bifidobacterias como pertenecientes al Gen. Lactobacillus y más concretamente a la especie L. bifidus (115) (116).

Tissier creía que B. bifidum estaba confinado a los niños lactantes y este punto de vista ha sido ampliamente aceptado de tal manera que los aislados a partir de heces de adultos se consideraban como microorganismos diferentes (114).

El conocimiento de las bifidobacterias se mejoró notablemente por los trabajos de Dehnert quien suministró el primer esquema práctico de diagnóstico para la diferenciación en grupos y tipos bioquímicos. El diagnóstico diferencial, a parte de diferencias morfológicas minoritarias, se basa en la fermentación de ciertos carbohidratos (113).

Reuter en 1963 dió los nombres de B. adolescentis, B. longum, B. breve, B. parvulorum, B. infantis, B. liberorum y B. lactentis a lo que en principio habían sido considerados biotipos de B. bifidum (117).

Estudios de homología ADN-ADN han mostrado que B. bifidum y B. adolescentis parecen genéticamente distintos. B. infantis, B. liberorum y B. lactentis tienen ADN homólogo y por tanto se toman como una sola especie: B. infantis, B. breve y B. parvulorum son genéticamente homólogos y con ellos se ha determinado la especie B. breve (118).

B. bifidum (Grupos I y II de Dehnert) fué aislado originalmente de heces de lactantes alimentados con leche materna; posteriormente se ha encontrado en el intestino delgado y heces de adultos y niños alimentados tanto con leche materna como con leches humanizadas. B. adolescentis se aísla a partir de heces de lactantes y adultos. B. infantis (Grupo III y IV de Dehnert) se ha aislado exclusivamente de las heces de niños alimentados con leche materna. B. breve (Grupo III y VI de Dehnert) se ha aislado de las heces de los in-

fantas y de la vagina de mujer. B. longum (Grupo V de Dehnert) se ha aislado de las heces de niños lactantes y de adultos, así como del intestino de ratas, cobayas y terneras (114).

A menudo se ha investigado con una bifidobacteria denominada B. bifidum var. pennsylvanicus. Este microorganismo necesita aminoazúcares para crecer, al menos, en los aislamientos primarios y actualmente no se diferencia de la raza tipo B. bifidum biotipo b (aislado de niños lactantes). Frecuentemente las conclusiones deducidas de las investigaciones llevadas a cabo con B. bifidum var. pennsylvanicus se han aplicado al resto de las bifidobacterias (119) (120) (121).

1.2.2.- Presencia e importancia de las bifidobacterias en la flora intestinal de los lactantes y los adultos.

Los estudios llevados a cabo fundamentalmente por Werner y Seeliger y Reuter indican que la mayoría de las bacterias anaerobias Gram positivas aisladas de heces pertenecen al género Bifidobacterium. A veces se encuentran corynebacterias, pero no suponen un elemento constante y persistente, y cuando están presentes, su número no excede de 10^4 /g de material fecal (110) (117) (122).

El número de bifidobacterias en relación al número de bacterias viables totales y la distribución de sus diferentes especies o tipos bioquímicos varía con la edad y con el tipo de alimento ingerido. En las heces de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna, las bifidobacterias están presentes en un valor que oscila entre 10^9 y 10^{11} /g y su número supera con mucho a las otras especies presentes, especialmente E. coli. En las heces de los lactantes ali-

mentados con productos infantiles a base de leche de vaca se encuentra un número similar de bifidobacterias, pero el número de bacterias Gram negativas - - aerobias y anaerobias, además de los enterococos, aumenta hasta hacerse igual o mayor que el de bifidobacterias. En las heces de los adultos, las bifidobacterias aún persisten, entre un número creciente de especies entre las que predominan las bacterias Gram negativas (110) (122). De este modo se confirma la hipótesis de Orla-Jensen y Haenel y otros investigadores, de que la multiplicación de distintos biotipos bacterianos no causan la desaparición de las bifidobacterias de la flora fecal del adulto (123) (124).

Las bifidobacterias de los lactantes alimentados con leche materna, difieren de las presentes en los lactantes alimentados con productos infantiles derivados de leche de vaca y de las de los adultos. El tipo bioquímico de mayor preponderancia encontrado en las heces de los niños alemanes alimentados con leche materna corresponden a los grupos III y IV de Dehnert (B. infantis) (110) (113), si bien, también puede aislarse B. bifidum (Grupo I y II de Dehnert) (125).

Las bifidobacterias presentes en los niños alimentados con una alimentación mixta a base de leche materna y alimentos infantiles derivados de leche de vaca no difieren en nada de los alimentados exclusivamente con leche materna (110) (125)

La flora intestinal anaerobia Gram positiva de los niños alimentados con leches adaptadas y de los adultos está constituida fundamentalmente por razas de bifidobacterias pertenecientes fundamentalmente al -

grupo V de Dehnert junto con algunas cepas del grupo I y el grupo III (110) (125).

Desde el descubrimiento de B. bifidum en 1900 se ha acumulado una información considerable sobre las bacterias anaerobias Gram positivas presentes en el intestino humano. Sin embargo, nuestros conocimientos acerca de las bifidobacterias son aún muy limitados.

Algunas cuestiones, no obstante, se han resuelto definitivamente. En efecto, no es posible mantener la pretensión de que una simple especie, denominada Lactobacillus bifidus, es un constituyente de la flora intestinal de los niños lactantes y de los adultos, sino que se trata de diversas especies morfológica, bioquímica y genéticamente distintas, pertenecientes todas ellas al género Bifidobacterium. Estas bacterias, por otra parte, pueden ser claramente diferenciadas de los lactobacilos y las corynebacterias, las cuales también están presentes, aunque en un número más bajo, en la flora fecal.

Entre las cuestiones que quedan por resolver está el de la ecología global de las diferentes especies de Bifidobacterium, así como los tipos bioquímicos y morfológicos de este género en otros países del mundo, distintos de Alemania, en donde los hábitos alimentarios difieren notablemente.

Diversos autores, han atribuido a la flora bacteriana fecal un valor simbiótico, en razón de -- antagonismos constatados o supuestos entre ciertas especies bacterianas (108) (109) (126). En este sentido resultan interesantes las investigaciones llevadas a cabo por Negishi y Billy (127) sobre el antagonismo entre B. bifidum y las bacterias aminógenas. Recientemente se ha demostrado que los medios de cultivo don-

de ha crecido E. coli estimulan el crecimiento de B. bifidum. Esto parece ser debido a ciertas cantidades de aminoazúcares producidas y presentes en dichos -- medios de cultivo. Por otra parte E. coli es incapaz de crecer en el medio donde lo hace B. bifidum (128).

1.2.3.-Factores de crecimiento de las bifidobacterias.-

Las bifidobacterias presentan unos requerimientos nutritivos complejos. Su crecimiento depende de la presencia de carbohidratos y de nitrógeno orgánico. Por otra parte, el anhídrido carbónico resulta imprescindible. Su anaerobiosis es estricta y mueren rápidamente en subcultivos aeróbicos. Las bifido -- bacterias acidifican la leche y llegan a coagularla cuando se le adiciona cisteína (114).

Segun Gyllenber las demandas básicas de factores de crecimiento varían segun la especie de bifido bacteria: El grupo IV de Dehnert necesita para su crecimiento cisteína, biotina y ácido pantoténico, los -- grupos III y V crecen en presencia de cisteína, pan -- tetina y riboflavina y el grupo I puede necesitar, -- además de esos tres factores, la presencia de amino -- azúcares, sobre todo durante el aislamiento (121).

Se han descrito razas de B. bifidum que requieren para su crecimiento ácidos grasos insaturados, deoxiribósidos y vitamina B₁₂, además de los factores de crecimiento usuales para el crecimiento de las bifidobacterias (129) (130).

Norris y Col. estudiaron algunas de las características nutricionales de B. bifidum con el fin de comparar e intentar explicar la adopción de formas ramificadas y no ramificadas por las bifidobacterias. El medio mínimo diseñado y utilizado para el cultivo de B. bifidum contenía lactosa, un hidrolizado enzi --

mático de caseína, triptófano y asparagina y las bases adenina, guanina, xantina y uracilo. El medio de cultivo estaba completado por un suplemento de sales que contenían hierro, magnesio y manganeso y vitaminas (tiamina, riboflavina, pantotenato, piridoxina, p-aminobenzoico, ácido fólico, biotina y ácido ascórbico) (131).

La inducción del pleomorfismo en B. bifidum, aún no clarificada totalmente, parece estar directamente relacionada con la concentración de cationes monovalentes presentes en el medio de cultivo (132).

Parece ser, por otra parte, que el tipo y cantidades de azúcares disponibles en el contenido intestinal, afectan a las diferencias observadas en los niños alimentados con leche materna o con alimentos preparados industrialmente, en lo que se refiere al tipo y número de bifidobacterias (133).

Gyorgy y Col. aislaron una raza de B. bifidum, designada como variedad Pennsilvanicus, a partir de heces de lactantes y secreciones vaginales de mujeres embarazadas, que requería leche humana para su crecimiento, si bien, con el transcurso del tiempo esta dependencia revertía (119) (120). Este factor de crecimiento presente en leche humana en concentraciones del orden de cincuenta veces más que en leche de rumiantes, ha sido identificado como N-Acetil-lactosamina, aunque existe una gran cantidad de derivados de la N-Acetil-glucosamina que presentan actividad frente al crecimiento de B. bifidum var. Penn. (130) (134) (135). La unidad para este factor de crecimiento de B. bifidum var. Penn. fue definida arbitrariamente por Gyorgy y Col. como la equivalente a 0,06 ml de leche humana (5-6 mg de sustancia seca)

(119), sin embargo, esta unidad no puede ser mantenida, ya que, como ha demostrado Cabezas y Col.(136) la cantidad de ácidos siálicos en el calostro y leche humanos varía muy fuertemente con el tiempo de lactación .

El hecho de encontrar especies de bifido - bacterias diferentes en los niños alimentados exclusivamente con leche humana y con alimentos fabricados industrialmente a partir de leche de vaca y el número mayor de bifidobacterias presentes en las heces de los primeros, exige el continuar profundizando en las diferencias de composición de la leche humana y la de otras especies, para después tratar de investigar la acción estimuladora del crecimiento de las bifidobacterias por los compuestos analizados.

II. -PARTE EXPERIMENTAL

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO Y TRATAMIENTOS

2.1.1.- Material biológico

2.1.1.1.- Tipos de Leche empleados

Las muestras de leche de vaca se obtuvieron en la explotación ganadera " Cooperativa Santiago - - Apóstol " a partir de vacas de raza Holstein -Frisona. Tanto la leche de vaca de gran mezcla, como la tratada térmicamente, por procedimientos industriales, fueron suministradas por Union Industrial y Agroganadera S.A.

La leche de cabra se obtuvo de la Granja -- Experimental de la Exma. Diputación Provincial de Granada. Todos los animales eran de " Raza Granadina".

La leche de oveja fué suministrada por la explotación ganadera de D. Manuel Taboada. Todos los animales eran de " Raza Manchega".

La leche materna se obtuvo en el Hospital - Clínico de S. Cecilio de la Universidad de Granada.

Las muestras experimentales de leche de cerda se obtuvieron de una granja porcina de la firma -- Nutrotón.

En todos los casos, al tomar las muestras, se hizo referencia al periodo de lactación (tiempo - transcurrido desde la fecha de parto) al que pertenecían las muestras.

2.1.1.2.- Microorganismo empleado.

Bifidobacterium bifidum Ti

En todas las experiencias que se exponen en este trabajo se ha empleado la raza tipo Ti (Tissier) de B. bifidum suministrada directamente por los laboratorios Wisby de Copenhague (Dinamarca).

Esta raza fué comprobada en nuestro laboratorio de acuerdo con las claves sistemáticas del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974).

2.1.2.- Tratamientos

La leche pasteurizada se obtuvo por calentamiento de la muestra, en un intercambiador térmico de placas, a 72 - 75 °C durante 15 segundos, después del cual se enfrió inmediatamente a 4 °C.

La leche esterilizada se obtuvo por preesterilización previa a 135 °C durante 15 segundos en un intercambiador térmico tubular, seguida de envasado en botella de vidrio y tratamiento térmico ulterior en torre de esterilización a 120 °C durante 12 minutos a una velocidad de 7500 unidades/hora.

La leche esterilizada por procedimiento UHT - (Ultra High Temperature) con inyección directa de vapor se obtuvo por calentamiento a 155 °C durante 2.4 segundos en un Uperizador, seguida de enfriamiento inmediato a 20 - 25 °C y envasada por un procedimiento aséptico en recipientes adecuados.

2.2.- Material utilizado

2.2.1.- Productos

En la preparación de tampones y demás reactivos generales se han utilizado productos MERCK (Darmstadt Alemania).

Los líquidos para los desarrollos cromato -
gráficos procedían de las firmas MERCK, BDH Chem.LTD
(Poole, Inglaterra) y Carlo Erba (Milán, Italia).

Los sustratos, coenzimas, aminoácidos y vi
taminas fueron suministrados por Sigma Chemical Co. -
(USA) y Boehringer (Mannheim, Alemania).

Las enzimas en su totalidad procedían de la
firma Boehringer.

La resina Dowex 1 x 8 (Cl^-) fué suministra
da por la firma Sigma.

La caseína hidrolizada con ácido clorhídrico
y libre de vitaminas (Acidicase Peptone # 2 low salt)
y el hidrolizado pancreático de caseína (Trypticase
Peptone) así como el medio de cultivo deshidratado Tio
glicolato 135 - C sin indicador fueron suministrados -
por la firma Baltimore Biological Laboratory (Cockeys
ville, Maryland, USA).

2.2.2.- Medios de cultivo

2.2.2.1.- Medios de crecimiento

Caldo MRS. (141) Utilizado para el crecimiento de B. bi
fidum, responde a la siguiente composición:

| | |
|---|---------|
| Peptona de caseína " Trypticase" | 5 g |
| Peptona seca de carne | 5 g |
| Extracto de carne "Bovril" | 10 g |
| Extracto de levadura (Oxoid L 21) | 5 g |
| Glucosa | 20 g |
| Tween 80 | 1 ml |
| Fosfato dipotásico | 2 g |
| Acetato sódico hidratado (3 H_2O) | 5 g |
| Citrato triamónico | 2 g |
| Sulfato magnésico hidratado (7 H_2O) | 0'2 g |
| Sulfato de manganeso hidratado(1 H_2O) | 0'38 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Se disuelven los componentes sólidos y el pH se ajusta con KOH al 10 % entre 6.2 y 6.6. El medio es esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos después de repartido en tubos de 150 mm x 16 mm, a razón de -- 10 ml por tubo. El pH después de la esterilización debe ser 6.0 - 6.5.

Agar MRS. Utilizado para el crecimiento en medio sólido de B. bifidum, responde a la misma composición que el medio anterior pero con la adición de 1.5 % de Agar purificado.

Se mezclan los componentes sólidos con el agua destilada; la suspensión obtenida se mantiene en autoclave durante diez minutos a vapor fluyente, tras los cuales se ajusta el pH con KOH al 10 % entre 6.2-6.6. El medio se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, y el pH después de la esterilización debe ser 6.0-6.5.

2.2.2.2.- Medio de conservación

Medio de Tioglicolato 135.-C sin indicador: Este medio - fué descrito por Brewer (142) y modificado por Vera (143). Se ha empleado para el mantenimiento y conservación de B. bifidum y responde a la siguiente composición:

| | |
|---------------------------------|---------|
| Peptona de caseina "Tripticase" | 17 g |
| Peptona de carne "Thiotone" | 3 g |
| Glucosa | 6 g |
| Cloruro sódico | 2'50 g |
| Tioglicolato sódico | 0'50 g |
| L - Cistina | 0'25 g |
| Sulfito sódico | 0'10 g |
| Agar | 0'70 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| pH después de la esterilización | 7'0 |

Se suspenden 30 g del medio deshidratado - comercial en 1000 ml de agua y se agita hasta obtener una suspensión homogénea. Se calienta con frecuente agitación y se hierve durante 1 minuto. Se reparte en tubos con tapón de rosca de 150 mm x 20 mm, a razón de 20 ml por tubo, a los cuales anteriormente se les ha puesto aproximadamente 0'1 g de carbonato cálcico. El medio se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y se guarda hasta el momento de su uso en oscuridad y a temperatura ambiente.

2.2.2.3.- Medios mínimos

Medio MB: (Medio basal) Se ha utilizado para investigar las características culturales de B. bifidum y responde a la siguiente composición:

| | |
|---|---------|
| Hidrolizado pancreático de caseina (Trypticase) | 5 g |
| Hidrolizado ácido de caseina libre de vitaminas (Acidicase low salt) | 5 g |
| Glucosa | 20 g |
| Acetato sódico hidratado (3 H ₂ O) | 5 g |
| Fosfato dipotásico | 2 g |
| Sulfato magnésico hidratado (7 H ₂ O) | 0'2 g |
| Sulfato de manganeso hidratado (1 H ₂ O) | 0'04 g |
| Sulfato ferroso hidratado | 0'01 g |
| L - Alanina | 100 mg |
| L - Triptófano | 100 mg |
| L - Cisteina Cl H | 100 mg |
| Tiamina Cl H | 1 mg |
| Riboflavina | 1 mg |
| Nicotinamida | 2 mg |
| Piridoxal Cl H | 0'4 mg |
| Pantotenato cálcico | 1 mg |
| D (+) Biotina | 0'05 mg |

| | |
|----------------------------|---------|
| Acido Ascórbico | 500 mg |
| Tween 80 | 1 ml |
| Agua desionizada destilada | 1000 ml |

Se preparan soluciones concentradas de aminoácidos, vitaminas y sales minerales, se esterilizan se paradamente por filtración y se mantienen a 4 °C.

Por otra parte se disuelven en agua las peptonas de caseína, glucosa y Tween 80. A esta última so lución se adicionan los volúmenes adecuados de solucio nes de aminoácidos, vitaminas y sales minerales y el conjunto se esteriliza a 118 °C durante 10 minutos des pués de repartir en tubos de 150 mm x 16 mm a razón de 10 ml por tubo y ajustar el pH a 6.3 - 6.5 con KOH al 10 %.

Medio LAV (Leche, aminoácido, vitamina). Este medio se ha utilizado, igualmente que el anterior, para estudiar algunas características culturales de B. bifidum. Su -- composición es la siguiente:

| | |
|----------------------------|---------|
| Leche en polvo " spray " | 100 g |
| L - Cisteina Cl H | 100 mg |
| Tiamina Cl H | 1 mg |
| Riboflavina | 1 mg |
| Nicotinamida | 2 mg |
| Piridoxal Cl H | 0'40 mg |
| Pantotenato cálcico | 1 mg |
| D (+) Biotina | 0'05 mg |
| Acido ascórbico | 500 mg |
| Agua desionizada destilada | 1000 ml |

Se dispersa la leche en polvo en agua y se adi ciona el volumen necesario de soluciones concentradas de vitaminas y aminoácidos, esterilizadas previamente por filtración. Se ajusta el pH del medio a 6.6 - 6.8 con -- KOH al 10 % y se esteriliza a 115 °C durante 15 minutos-

después de repartir el medio en tubos de 150 mm x 16 mm, a razón de 10 ml por tubo.

2.2.2.4.- Medios mínimos suplementados

A los medios mínimos señalados en el apartado anterior, se han añadido distintos compuestos tales como nucleótidos y aminoazúcares en forma de soluciones previamente esterilizadas por filtración, con el fin de estudiar la respuesta de B. bifidum a estos posibles factores de crecimiento.

2.2.3.- Aparatos

Las pesadas se realizaron en Balanza Mettler H 20 T (p. máximo 160 g \pm 0'01 mg).

Para la medida del pH se utilizó un pH-metro Beckman Expandomatic SS - 2 (pH \pm 0'005).

Las centrifugaciones en frío a gran velocidad se realizaron en las centrífugas MSE (High Speed 18) y BECKMAN J 21 B. En los demás casos se utilizó una centrífuga angular modelo " Piccolo " de la firma "Martin - Christ".

Para la agitación de los tubos se empleó un agitador Whirlimixer de la firma Fisons Scientific Apparatus Ltd. (Inglaterra).

La adición de sustratos y enzimas se realizó con micropipetas " EMIL - WORKS " de enrase automático por estrangulación (Auto Cero High Precision).

Las columnas empleadas han sido de vidrio Quicfit (1 x 40 cm) equipadas en sus terminales con sendos émbolos provistos de placas porosas de teflón, que pueden regular la altura útil de la columna. Cada extremo del émbolo lleva conectado un tubo de teflón que canaliza la entrada y salida del eluyente.

La elución se ha llevado a cabo mediante una bomba peristáltica para regulación de flujo LKB ReCy - Chrom.

Las fracciones eluidas de la columna se han recogido utilizando un colector de fracciones automático (LKB, ultrorac). La liofilización de fracciones eluidas se ha llevado a cabo en un liofilizador de sobre mesa constituido por un generador de frío que alcanza -- hasta - 60 °C, un conjunto evaporador-condensador, con capacidad de condensación de 3 Kg de agua, y una bomba de vacío Torricelli con vacío final de 0'005 mm de Hg. En una de las salidas del evaporador-condensador se ha colocado un vacuómetro Edwards para detectar las posibles -- pérdidas de vacío.

Las cromatografías sobre papel se han llevado a cabo en cubetas de vidrio Quicfit herméticamente cerradas.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en espectrofotómetros Beckman 25 y PYE-Unicam SP 1700, -- ambos con registro gráfico incorporado y compartimento de cubetas termostatizado. Se utilizaron cubetas TSL de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico. Para las determinaciones de proteínas se ha utilizado un colorímetro PROMILK II a/SN. FOSS ELECTRIC (DINAMARCA).

Las incubaciones para las hidrólisis de los -- nucleótidos se llevaron a cabo en un baño termostatizado TECAM.

Los cultivos en anaerobiosis se realizaron en una campana de Gas-Pack (Biological Baltimore Laboratory USA).

2.3.- Métodos

2.3.1.- Tratamiento previo de la leche para el análisis de los nucleótidos

Se extrae la leche de la hembra correspondiente e inmediatamente se enfria a 2 - 4 °C; a un volumen de leche, previamente agitado se adiciona un volumen de Acido perclórico 1 M a igual temperatura. Esta mezcla se agita durante treinta segundos cada dos minutos, hasta un total de cinco veces y posteriormente se centrifuga a 20000 g y 2 °C durante diez minutos. El sobrenadante obtenido se filtra a través de filtro lavado al ácido. Cuando la muestra está destinada a fraccionamiento cromatográfico en columna de intercambio aniónico, se neutraliza con KOH 5 N hasta pH 6.5 - 7.0. Cuando la muestra está destinada al análisis enzimático de nucleótidos, sin previo fraccionamiento por columna cromatográfica, se neutraliza con una solución de trietanolamina 0.21 M y de carbonato potásico 1.16 M hasta pH 7.5 - 8.0. En ambos casos el precipitado de perclorato potásico es eliminado por centrifugación a 10000 g durante 15 minutos y a 2 °C, después de haberle dejado sedimentar durante 30 minutos a igual temperatura.

A la muestra desproteïnizada y neutralizada se le mide la absorbancia a 250 nm, 260 nm y 280 nm.

Este método está basado en el de Hurlbert y Col. (144) modificado por Cherry y Hageman (145) y modificado en nuestro laboratorio para este material biológico.

Se ha utilizado ácido perclórico como agente desproteïnizante por permitir una más fácil neutralización y ser ópticamente inactivo en la región del ultravioleta.

2.3.2.- Determinación de nucleótidos por cromatografía de intercambio aniónico

2.3.2.1.- Fraccionamiento

Se ha utilizado una resina fuertemente básica con matriz de poliestireno con 8 % de entrecruzamiento (Dowex 1 x 8) y 200 - 400 mallas bajo la forma de formiato según el método propuesto por Hurlbert y colaboradores (144).

Preparación de la resina. Se ha seguido el procedimiento empleado por W.E. Cohn (146).

Una cantidad determinada de resina comercial (forma de cloruro) es lavada con agua destilada dejándola sedimentar y eliminando el sobrenadante. Esta operación debe repetirse tres ó cuatro veces. Para arrastrar las impurezas de tipo orgánico la resina se somete a un lavado con agua, acetona-agua (1:1), acetona, acetona-éter de petróleo (1:1), éter de petróleo, éter de petróleo-acetona (1:1), acetona-agua (1:1) y agua.

Se trata la resina con formiato amónico 3 M con el fin de intercambiar los iones Cl^- por HCOO^- . La ausencia de cloruros se verifica por la ausencia de precipitado de cloruro de plata al hacer reaccionar el líquido de lavado con una solución de nitrato de plata - - fuertemente ácida.

La resina se suspende en ácido fórmico al 88% para eliminar ciertas impurezas coloreadas solubles en ácido. Finalmente se elimina el exceso de ácido mediante repetidas suspensiones en agua.

Preparación de la columna.

La columna utilizada ha sido descrita en el apartado 2.2.3.-

La preparación de la columna, así como el proceso cromatográfico completo se lleva a cabo en cámara fría a 4 °C.

Una vez fijado el émbolo inferior de la columna se dispone ésta en posición vertical y se conecta su salida a una bomba peristáltica para regular el flujo. Se adiciona por el extremo superior agua hasta llenar la tercera parte de su volumen, procurando que no quede atrapada ninguna burbuja de aire en la placa porosa del émbolo. Se va añadiendo la suspensión de Dowex; se deja drenar la columna a un pequeño flujo (0'7 - 0'8 ml/min) y se continua la adición hasta conseguir la altura deseada (40 cm). Alcanzada ésta, se deja una pequeña capa de agua sobre la parte superior de la resina, se cierra la salida inferior y se termina el montaje introduciendo el émbolo superior hasta que la placa porosa contacte con la resina. Una vez comprobada la ausencia de burbujas a lo largo del conducto de entrada, se sumerge éste en un reservorio que contenga agua destilada.

Para su estabilización se hacen pasar 200 - 300 ml de formiato amónico 1.6 M y 200 - 300 ml de agua destilada a un flujo de 0.75 ml/min.

De esta forma la columna queda estabilizada y puede recibir la muestra.

Aplicación y elución de la muestra: El extremo del tubo superior se introduce hasta el fondo de una probeta que contiene la cantidad de muestra, preparada según 2.3.1.-, que se desea pasar por la columna.

Se hace pasar la muestra a un flujo de 0.75 ml/min. hasta que quede prácticamente agotada, procurando que no llegue a introducirse ninguna burbuja de aire. Después con una pequeña cantidad de agua se lava el tubo introducido en la muestra.

La elución se ha llevado a cabo en tres estadios. El primero consiste en un gradiente lineal -- con 500 ml de agua y 500 ml de ácido fórmico 4 M colocados en dos reservorios iguales y paralelos interconectados. El segundo estadio de elución consiste en un gradiente lineal con 500 ml de ácido fórmico 4 M y 500 ml de formiato amónico 0.2 M en ácido fórmico -- 4 M en los reservorios. El tercer estadio de elución consiste en un gradiente lineal con 500 ml de formiato amónico 0.2 M y 500 ml de formiato amónico 0.8 M, ambos en ácido fórmico 4 M, en los reservorios.

Las distintas fracciones eluidas en la columna se han recogido utilizando un colector de fracciones automático. El sistema empleado para la colección de fracciones es el de volumen fijo por contaje del número de gotas; en estas condiciones, hemos recogido fracciones de 10 ml a un flujo de 0.75 ml/min. El cambio de fracción queda indicado en el registro que se efectúa en transmitancia a 280 nm a lo largo del proceso de elución.

Las fracciones conteniendo nucleótidos han sido medidas independientemente a 260 nm y 280 nm puesto que la relación E_{260}/E_{280} es típica para cada base púrica o pirimidínica y por tanto nos da una primera información para la identificación de los nucleótidos separados.

2.3.2.2.- Liofilización de las fracciones cromatográficas eluidas

Las distintas fracciones correspondientes a cada uno de los picos registrados se mezclaron y los eluyentes se eliminaron por medio de liofilización a - 60 °C y una presión de 0.02 mm de mercurio.

La liofilización se lleva a cabo en un periodo de 12 - 16 horas sin aporte de calor externo.

2.3.2.3.- Identificación de los nucleótidos separados

a) Identificación de nucleótidos por cromatografía en papel.

Las fracciones cromatográficas liofilizadas se han disuelto en un volumen de 0.5 - 2 ml de agua - destilada. Estas soluciones han sido cromatografiadas sobre papel Whatman nº 1 con los siguientes sistemas (147) (148):

- 1.- Fosfato sódico 0.2 M pH = 6.8 Sulfato amónico
n - propanol(100 : 60 : 2)
- 2.- Acido isobutírico - hidróxido amónico 0.5 N(100:60).

El volumen usual de muestra cromatografiada fué 25 μ l. Con ambos sistemas el desarrollo tiene lugar en 24 horas a 4 °C. Con el primer solvente el desarrollo es ascendente y con el segundo descendente, ambos sobre un recorrido máximo de 25.5 cm.

Sistemas tales como Propanol-amoniaco-agua (6 : 3 : 1), Alcohol amílico- alcohol isopropílico - ácido láctico 75 %- ácido tricloroacético 5 % (10-30 - 1 - 20) y sulfato amónico 1 % - alcohol isopropílico (1:2), citados en la bibliografía (17) no se utilizaron, debido a que solo se separaban satisfactoriamente los nucleósidos monofosfato.

En la tabla nº 1 se muestran los R_f y R_{AMP} - medios de algunos nucleótidos interesantes en este trabajo.

TABLA Nº 1

R_f , R_{AMP} y avance en cm de diversos nucleótidos en fosfato 0.2 M pH = 6.8 - sulfato amónico - n-propanol - - (100 : 60 : 2) y ácido isobutírico - hidróxido amónico 0.5 N (100 : 60).

| | Fosfato 0.2M pH=6.8 Sulfato amónico n - propanol <u>100 : 60 : 2</u> | | Acido isobutírico - Hidróxido amónico 0.5N <u>100 : 60</u> | |
|----------|---|--------------|--|--------------|
| | R_f | Avance en cm | R_{AMP} | Avance en cm |
| AMP | 0.26 | (6.70) | 1 | (20.80) |
| CMP | 0.77 | (19.70) | 0.81 | (17.20) |
| GMP | 0.40 | (10.30) | 0.31 | (8.20) |
| UMP | 0.71 | (18.50) | 0.50 | (10.40) |
| NAD | 0.27 | (6.60) | 0.09 | (1.40) |
| OROTATO | ---- | ----- | 0.35 | (7.00) |
| ADP | 0.30 | (7.60) | 0.77 | (18.50) |
| GDP | 0.50 | (12.70) | 0.34 | (7.40) |
| GDP-Man | 0.52 | (13.30) | 0.24 | (5.70) |
| UDP | 0.76 | (19.50) | 0.27 | (6.00) |
| UDP-G | 0.75 | (19.26) | 0.26 | (5.80) |
| UDP-Ga | 0.78 | (19.80) | 0.35 | (7.00) |
| UDP-N-AG | 0.78 | (19.80) | 0.22 | (4.30) |
| UDP-GA | 0.68 | (17.30) | 0.32 | (6.40) |
| UDP-GaA | 0.81 | (20.80) | 0.22 | (4.50) |
| UTP | 0.80 | (20.60) | 0.22 | (5.10) |
| ATP | 0.36 | (9.20) | 0.75 | (15.90) |
| GTP | 0.58 | (14.70) | 0.31 | (7.50) |

Los diferentes nucleótidos fueron visualizados mediante una lámpara ultravioleta de 254 nm de longitud de onda.

b) Identificación de los compuestos glucídicos unidos a los nucleótidos

Una parte, usualmente 0.2 ml, de cada fracción cromatográfica liofilizada y redisuelta en agua destilada, fué sometida a hidrólisis con un volumen igual de Cl H 0.01N a 98 °C durante 30 minutos.

El hidrolizado se cromatografió en desarrollo descendente con los siguientes solventes, durante 24 - horas a 25 °C (149).

- 1.- n - Butanol - Piridina - Agua (6:4:3)
- 2.- n - Butanol - Etanol - Agua (28:7:13)

Después de evaporados los disolventes los azúcares son revelados al hacerlos reaccionar con Ftalato ácido de anilina o/y reactivo de Elson - Morgan modificado por Partridge (149). Estos reactivos se preparan de la siguiente manera:

Ftalato ácido de anilina: Se disuelven 1.66 g de ácido ftálico y 1 ml de anilina en 100 ml de butanol saturado de agua. Después de pulverizar con esta solución los papeles cromatográficos se mantienen en estufa a 110 °C durante 10 - 15 minutos.

Reactivo de Elson - Morgan: Se disuelven de forma independiente 0.5 ml de Acetilacetona en 50 ml de n-butanol y 5 ml de Hidróxido potásico al 50 % en 20 ml de alcohol etílico. Se mezclan extemporáneamente 100 ml de la primera solución con 5 ml de la segunda. Se pulverizan los papeles cromatográficos y se mantienen a 105 °C durante 5 minutos. Después de aplicar esta primera solución se pulveriza con otra constituida por 1 g de p-dimetilamino benzaldehído en 30 ml de ácido clorhídrico concentrado y 180 ml de n - butanol y se mantienen los papeles cromatográficos a 90 - 100 °C durante cinco minutos.

Con este segundo revelado los aminoazúcares se colorean de rojo violáceo, los derivados N-acetilados de los aminoazúcares se colorean de violeta y los ácidos urónicos de marrón. El resto de los azúcares toman un color grisáceo.

En la tabla N° 2 se muestran los R_G medios de los azúcares identificados en este trabajo.

TABLA N° 2

R_G y avance en cm de diversos azúcares en n-butanol - etanol- agua (6: 4 : 3) y n - butanol - piridina- - agua (28: 7 : 13).

| | n-Butanol Etanol Agua <u>6:4:3</u> | | n-Butanol Piridina Agua <u>28:7:13</u> | |
|-----------------------------|---|--------------|---|--------------|
| | R_G | Avance en cm | R_G | Avance en cm |
| Glucosa | 1 | (9.20) | 1 | (10.48) |
| Galactosa | 1 | (9.18) | 0.87 | (12.05) |
| Manosa | 1.22 | (11.12) | 1.20 | (15.50) |
| Fucosa | 1.58 | (14.35) | 1.48 | (20.13) |
| Acido galacturónico | 0.28 | (2.58) | 0.17 | (2.44) |
| N - Acetil Glucosamina | 1.28 | (11.75) | 1.28 | (17.67) |
| N - Acetil Galactosamina | 1.42 | (13.15) | 1.40 | (19.23) |

2.3.2.4.- Análisis cuantitativo de los nucleótidos identificados

a) Medida de la absorbancia en el ultravioleta de los eluatos cromatográficos

De acuerdo con el método de Markham y Smith (150) se traza un área determinada de 9 cm^2 , alrededor de cada mancha visualizada en el papel cromatográfico. Esa superficie de papel es cortada en pequeños fragmentos que se colocan en un tubo con 5 ml de ácido clorhídrico 0.01N y se agita durante 30 minutos. De este modo se eluyen los nucleótidos contenidos en el papel. Los eluatos se decantan y se centrifugan a 3000 r.p.m. para eliminar los restos de papel. Posteriormente se determinan los espectros de absorción a pH 2 y pH 11 en la región ultravioleta.

La relación de absorbancias a dos longitudes de onda distintas así como el espectro de absorción a la luz ultravioleta son específicos para cada base púrica o pirimidínica.

A partir de la absorbancia a 260 nm y pH 2 podemos conocer la cantidad de nucleótidos por unidad de volumen de leche.

Los resultados obtenidos se expresan en μmoles de nucleótidos/ 100 ml de leche.

$\mu\text{moles de nucleótido}/100 \text{ ml de leche} =$

$$= \frac{D.O._{260} \times V_E \times V_L \times 100}{E \times V_C \times V_M}$$

$D.O._{260}$ = Absorbancia a 260 nm del eluato a pH 2

V_E = Volumen del eluato cromatográfico en ml

V_C = Volumen de muestra cromatografiada en ml

V_L = Volumen de solución redisuelta de liofilizado en ml

- V_M = Volumen de leche sometido a desproteínización en ml
 E_A = $14.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$: Coeficiente de extinción μmolar de los adenín derivados a pH 2 y 260 nm
 E_C = $6.8 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$: Coeficiente de extinción μmolar de los citidín derivados a pH 2 y 260 nm
 E_G = $11.6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$: Coeficiente de extinción μmolar de los guanósín derivados a pH 2 y 260 nm
 E_U = $9.9 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$: Coeficiente de extinción μmolar de los uridín derivados a pH 2 y 260 nm
 $E_{\text{OROTATO}} = 4.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$: Coeficiente de extinción μmolar de orotato a pH 2 y 260 nm.

Cuando se eluyen nucleótidos puros el error obtenido es de $\pm 5 \%$.

b) Determinación enzimática de nucleótidos totales como nucleósidos - 5' - monofosfato.

La determinación analítica se basa en la hidrólisis de 5' - nucleótidos mediante fosfodiesterasa de veneno de serpiente (PDE) (EC.3.1.4.1) seguida de determinación específica de los nucleótidos - 5' - mono -- fosfato liberados (151).

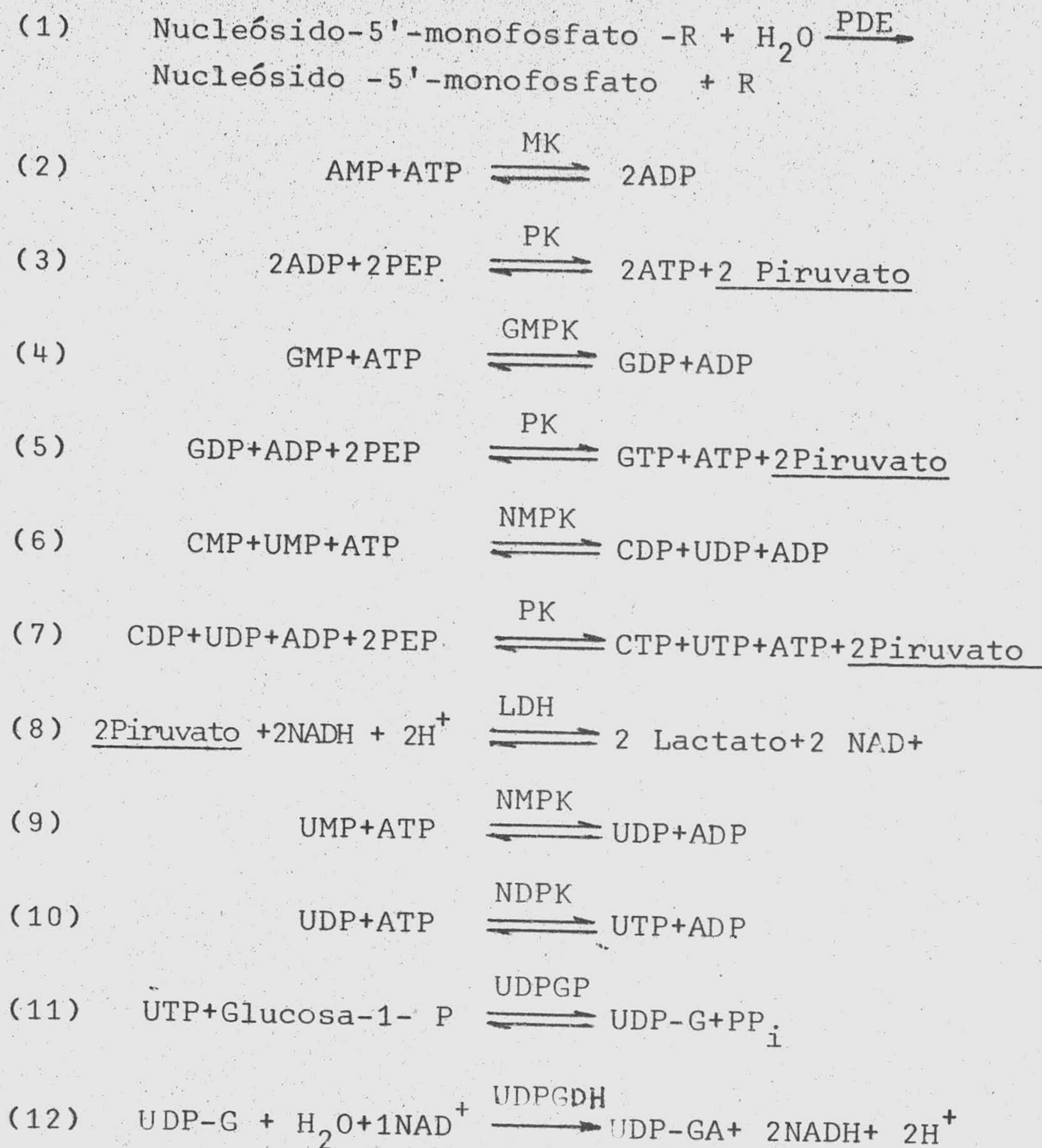
El AMP se determina con miocinasa (MK) (EC 2.7.4.3.), piruvato - cinasa (PK). (EC 2.7.1.40) y lactato deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27).

El GMP se determina por adición de guanósín - monofosfato - cinasa (GMPK) (EC 2.7.4.8) al anterior sistema. La posterior adición de nucleósido monofosfato - cinasa (NMPK) (EC 2.7.4.4.) permite la determinación de CMP + UMP.

La determinación específica de UMP se lleva a cabo con nucleósido monofosfato cinasa, nucleósido difosfato cinasa (NDPK) (EC 2.7.4.6.), UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGP) (EC 2.7.7.9) y UDP glucosa deshidro-

genasa (UDPGDH) (EC 1.1.1.22)

Las reacciones correspondientes a estas determinaciones siguen el siguiente esquema:



a) Reactivos

Tampón Tris 0.2 M, Acetato magnésico 1mM pH=8.9

Tampón Trietanolamina 0.3 M, Acetato magnésico 9mM,
pH = 7.5

Tampón Glicocola 0.5 M, Acetato magnésico 4mM, pH=8.7.

Fosfodiesterasa de veneno de serpiente (E.C.3.1.4.1)
comercial PDE.

Lactato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.27) comercial LDH.

Piruvato cinasa (E.C. 2.7.1.40) comercial PK.

Miocinasa (E.C. 2.7.4.3) comercial MK.

Guanosin - monofosfato cinasa (E.C.2.7.4.8) comer--
cial GMK.

Nucleósido-monofosfato cinasa (E.C.2.7.4.4.) comer--
cial NMPK.

Nucleósido-difosfato-cinasa (E.C.2.7.4.6) comercial
NDPK.

UDP- glucosa - pirofosforilasa (E.C. 2.7.7.9) comer--
cial UDPGP.

UDP - glucosa- deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.22) comer--
cial UDPGDH.

Adenosín trifosfato. Sal disódica

NADH. Sal disódica

β - NAD⁺. Acido libre.

Glucosa-1-Fosfato. Sal dipotásica (G-1-P)

Fosfoenol - piruvato. Sal triciclohexilamónica (PEP)

Reactivo mezcla I: Disolver 6 mg de PEP-K, 3 mg NADH-
Na₂ y 1 mg de ATP-Na₂-H₂. 3H₂O en 9.91 de Tampón Trieta-
nolamina; añadir 60 μ l de LDH y 30 μ l de PK y mezclar.

Reactivo mezcla II: Disolver 20 mg de ATP-Na₂. H₂.3H₂O,
8 mg de G-1-P-K₂. 2H₂O, 16 mg de NAD⁺ y 30 mg de CO₃HK
en 9.6 ml de Tampón glicocola; añadir 300 μ l de UDPG-DH,
50 μ l de UDPGP y 50 μ l de NDPK y mezclar.

Muestra: Preparada según la sección 2.3.3. liofilizado
disuelto en 0.5-2 ml de agua destilada.

b) Técnica

b.1.- Hidrólisis de nucleótidos

Se preparan tubos de centrifuga, con tapón de rosca, con el siguiente contenido:

| | |
|----------------------|---------|
| Muestra(liofilizado) | 0.10 ml |
| Tampón Tris 0.2M | 2.00 ml |
| PDE | 0.10 ml |

Cuando la concentración de nucleótidos es elevada, el volumen de muestra se reduce a 0.05 ml.

Se mezclan e incuban los tubos cerrados a 40 °C durante 20 minutos. La reacción se para manteniendo los tubos - durante cinco minutos en un baño a 98 °C - 100 °C. Se - centrifuga a 2000 x g durante 10 minutos a 4 °C. En el sobrenadante se determinan los nucleósidos -5'- monofosfato.

b.2.- Determinación de AMP, GMP, UMP+CMP

Se preparan las cubetas con el siguiente contenido:

| | <u>Muestra</u> | <u>∅</u> | <u>Blanco</u> |
|---|----------------|----------|---------------|
| Reactivo Mezcla I | 1.50ml | 1.50ml | 0.60ml |
| Agua | --- | 0.60ml | 1.61ml |
| Muestra(hidrolizado) | 0.60ml | --- | --- |
| Mezclar hasta extinción constante y leer E ₁ | | | |
| MK | 0.02ml | 0.02ml | --- |
| Mezclar y leer E ₂ cuando la extinción sea constante | | | |
| GMPK | 0.05ml | 0.05ml | --- |
| Mezclar y leer E ₃ cuando la extinción sea constante | | | |
| NMPK | 0.03ml | 0.03ml | --- |
| Mezclar y leer E ₄ cuando la extinción sea constante | | | |

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340nm y temperatura ambiente.

$\Delta E_1 = (E_1 - E_2)_{\text{Muestra}} - (E_1 - E_2)_{\emptyset}$ corresponde al contenido de AMP

$\Delta E_2 = (E_2 - E_3)_{\text{Muestra}} - (E_2 - E_3)_0$ corresponde al contenido de GMP

$\Delta E_3 = (E_3 - E_4)_{\text{Muestra}} - (E_3 - E_4)_0$ corresponde al contenido de CMP+UMP

b.3 Determinación de UMP

Las cubetas han sido preparadas con las siguientes cantidades de reactivos:

| | <u>Muestra</u> | <u>Blanco</u> |
|--|----------------|---------------|
| Reactivo mezcla II | 1.50ml | 1.50ml |
| Agua | --- | 0.60ml |
| Muestra(hidrolizado) | 0.60ml | --- |
| Mezclar y leer la extinción E_1 | | |
| NMPK | 0.03ml | 0.03ml |
| Mezclar y leer hasta extinción constante E_2 | | |

$E = (E_2 - E_1)_{\text{Muestra}} - (E_2 - E_1)_{\text{Blanco}}$ corresponde al contenido de UMP de la muestra.

c) Cálculos

Las cantidades de 5'- nucleótidos existentes se expresan en μmoles de 5'-nucleótido por 100 mililitros de leche.

$\mu\text{moles de 5'- nucleótido/100ml de leche} =$

$$= \frac{\Delta E \times V_C \times V_H \times 100}{2 \cdot E \times V_M \times V_{MH} \times V_L}$$

ΔE = Incremento de la densidad óptica

V_C = Volumen total en la cubeta

V_H = Volumen total en la hidrólisis

$E = 6.22 \times \text{cm}^2 / \mu\text{mol}$. Coeficiente de extinción micromolar del NADH.

V_M = Volumen de muestra hidrolizada

V_{MH} = Volumen de muestra en la hidrolisis (liofilizado)

V_L = Volumen de leche correspondiente al volumen des-proteinizado-neutralizado fraccionado a través de columna.

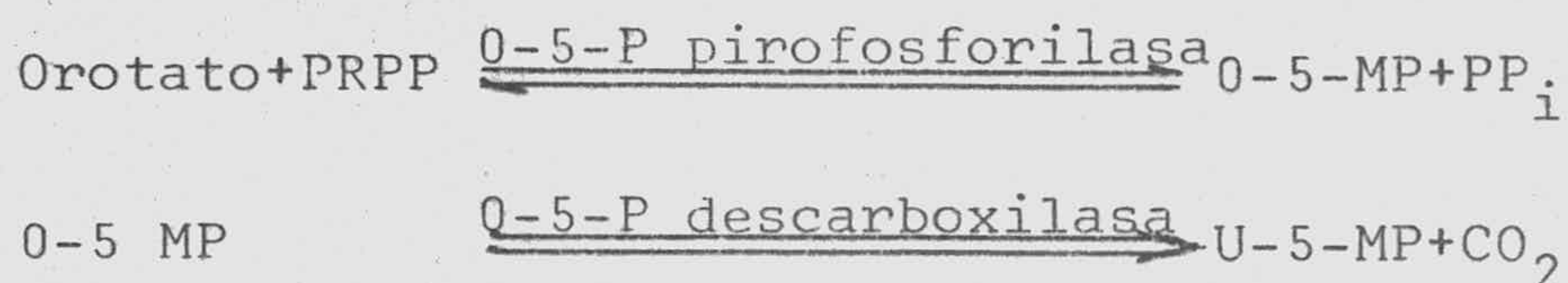
El error de este método, cuando se emplean nucleótidos puros, es del $\pm 2\%$.

2.3.3. Determinaciones enzimáticas en muestras de leche sin fraccionamiento previo

2.3.3.1.- Determinación enzimática de orotato

La determinación de orotato en leche se ha llevado a cabo según H. Moellering (152).

El método seguido se basa en la fosforilación del orotato a orotidín-5'-monofosfato y descarboxilación de éste último a uridín-5'-monofosfato, midiendo el incremento negativo de la extinción a 295 nm.



a) Reactivos

- I - Tampón glicil-glicocola 0.05 M, Cl_2Mg 2mM pH = 8.0
- II- Tampón glicil-glicocola 0.1 M, Cl_2Mg 4mM pH = 8.0
- 5-Fosfo α -D-ribose 1-difosfato 10 mM
- 0-5-MP Pirofosforilasa/0-5-MP descarboxilasa liofilizada (20 mg/ml 6.2U 0-5-MP Pirofosforilasa/ml)

Muestra obtenida según 2.3.1.

b) Técnica

Se preparan las cubetas con el siguiente contenido:

| | <u>Muestra</u> | <u>Blanco</u> |
|---------------------------|----------------|---------------|
| Tampón glicil-glicocola I | 0.88ml | 1.88ml |
| Enzima | 0.10ml | 0.10ml |
| Muestra | 1.00ml | --- |

Mezclar y leer E_1 después de estabilización

| | <u>Muestra</u> | <u>Blanco</u> |
|------|----------------|---------------|
| PRPP | 0.04ml | 0.04ml |

Mezclar y leer E_2 hasta valor constante (aproximadamente 20 - 25 minutos).

Para muestras con menor contenido en orotato se utiliza Tampón glicil-glicocola II (0.44 ml) y se aumenta el volumen de muestra hasta 1.44 ml, manteniéndose igual el resto de los reactivos.

c) Cálculos

La concentración de orotato se expresa en micromoles de orotato por 100 mililitros de leche.

Micromoles de orotato/100 ml de leche =

$$= \frac{\Delta E \times V_C \times V_D \times F_N}{E \times V_M \times V_L}$$

ΔE = $(E_1 - E_2)$ Muestra - $(E_1 - E_2)$ Blanco = Incremento de la densidad óptica.

V_C = Volumen total en la cubeta.

V_D = Volumen de leche desproteïnizada y neutralizada.

F_N = Factor de neutralización de la muestra.

E = $3.95 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ coeficiente de extinción micromolar del orotato.

V_M = Volumen de muestra en la cubeta

V_L = Volumen de leche inicial.

2.3.3.2.- Determinación enzimática de adenosín, guanosín, uridín y citidín -5'- monofosfatos

La determinación de AMP, GMP, CMP y UMP en leche se lleva a cabo como se indica en las secciones b.2 y b.3 del apartado 2.3.6.2, utilizando como muestra leche desproteïnizada y neutralizada con trietano-

lamina y carbonato potásico según se indica en la sección 2.3.1.

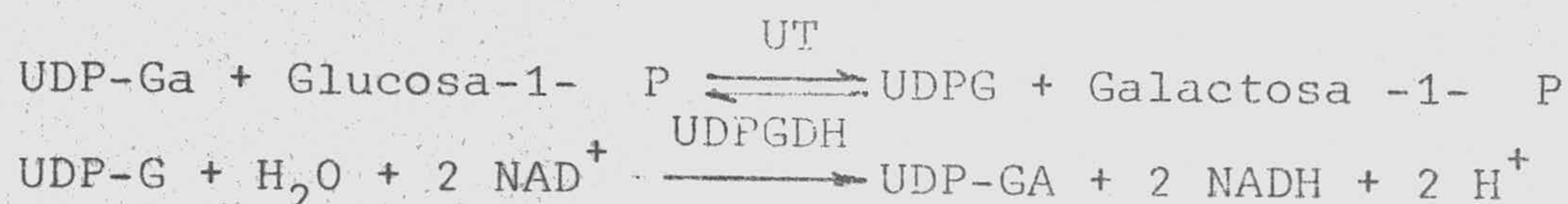
2.3.3.3.- Determinación enzimática de uridín-difosfato-glucosa y uridín-difosfato-galactosa

La determinación específica de UDPGa se lleva a cabo mediante la conversión a UDPG en presencia de glucosa -1- fosfato. Esta reacción es catalizada por la uridiltransferasa (UT) (E.C.2.7.7.12)

La determinación específica de UDP-G se realiza mediante su oxidación irreversible a UDPGA-- con NAD⁺ y UDPGDH.

Para la determinación de ambos nucleótidos se ha seguido el método descrito por D. Keppler y K. Decker (153).

El fundamento analítico de este método es el siguiente:



El incremento de la extinción medida a 340 nm debido a la reducción del NAD⁺ es proporcional a las cantidades de UDPG ó UDP-Ga presentes en la muestra analizada.

a) Reactivos

Tampón glicocola 0.5 M pH = 8.7

Glicocola 0.1 M pH = 7.9

Reactivo mezcla: Disolver 22 mg de NAD⁺, 30 mg de EDTA-Na₂H₂.2H₂O y 7.5 mg de G-1-P-K₂.2H₂O en 10 ml de Tampón glicocola 0.5 M (Glicocola 0.5M; 3mM NAD; 8 mM EDTA; 2 mM G-1-P)

UDPGDH comercial.

UT comercial: Disolver 5 mg de proteína en 1 ml de Glicocola 0.1M y añadir 5 µl de Mercaptoetanol.

Muestra: Leche desproteïnizada y neutralizada según 2.3.1

b) Técnica

Se preparan cubetas con los siguientes reactivos:

| | <u>Muestra</u> | <u>Blanco</u> |
|---|----------------|---------------|
| Reactivo mezcla | 1.00ml | 1.00ml |
| Muestra | 1.00ml | --- |
| Agua | --- | 1.00ml |
| Mezclar y leer la extinción E_1 | | |
| UDPGDH | 0.04ml | 0.04ml |
| Mezclar y leer hasta extinción constante E_2 (10min.) | | |
| UT | 0.04ml | 0.04ml |
| Mezclar y seguir el incremento en la extinción hasta que sea constante E_3 (10-15 minutos) | | |

$\Delta E_1 = (E_2 - E_1)_{\text{Muestra}} - (E_2 - E_1)_{\text{Blanco}}$ corresponde al contenido de UDP-Ga

$\Delta E_2 = (E_3 - E_2)_{\text{Muestra}} - (E_3 - E_2)_{\text{Blanco}}$ corresponde al contenido de UDP-G

c) Cálculos

La concentración de UDP-glucosa y UDP-galactosa se expresan en micromoles de nucleótido por 100 mililitros de leche.

Micromoles de nucleótido/100ml de leche =

$$= \frac{\Delta E \times V_C \times V_D \times F_N \times 100}{2 \times E \times V_M \times V_L}$$

ΔE = Incremento de la densidad óptica

V_C = Volumen total en la cubeta

V_D = Volumen de leche desproteinizada y neutralizada

F_N = Factor de neutralización de la muestra

E = $6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ Coeficiente de extinción micromolar del NADH

V_M = Volumen de muestra en la cubeta

V_L = Volumen de leche inicial

2.3.3.4.- Determinación de adenosín, guanosín, uridín y citidín nucleótidos totales

La determinación de A_T , G_T , U_T , y C_T en leche se ha llevado a cabo como en el apartado 2.3.6.2 utilizando como muestra leche desproteïnizada y neutralizada en las cantidades siguientes:

| | |
|-------------|---------|
| Muestra | 0.60 ml |
| Tampón Tris | 1.50 ml |
| PDE | 0.10 |

2.3.4.- Determinación de proteínas

Se ha utilizado el método de aglomeración de proteínas con negro de amido (154).

Este método se basa en la medida colorimétrica del filtrado obtenido después de hacer reaccionar un volumen de leche determinado con un volumen conocido de una solución de negro de amido. El colorímetro está calibrado de forma que directamente puede leerse el contenido de proteínas lácteas en tanto por ciento. El error del método es de ± 0.06 %.

Reactivos:

- Solución de negro de amido: calentar 300 ml de agua destilada a 80 °C y disolver en ella 15.84 g de ácido cítrico monohidratado, 1.98 g de fosfato bisódico dihidratado, 0.3 g de Timol y 0.925 g de negro de amido. Adicionar 0.1 ml de Tritón x - 10 y completar con agua destilada hasta 1 l medido a 20 °C.

Técnica: Adicionar 20 ml de solución de negro de amido a 1 ml de leche, mezclar suavemente, filtrar y medir en el colorímetro ajustado previamente a 0 % de transmitancia con la solución de negro de amido y a 45 % de transmitancia con la misma solución diluida al 28.57% en agua destilada.

2.3.5.- Técnica utilizada en la caracterización del microorganismo empleado.-

A partir de la raza liofilizada se siembra con un fuerte inóculo un tubo de caldo MRS que se -- cultiva en atmósfera de hidrógeno y anhídrido carbónico a 37 °C durante 24 horas. De este cultivo se re -- siembra sobre caldo MRS cada 24 horas durante tres -- días, el último sobre un tubo de centrífuga que contiene caldo MRS. El cultivo se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se elimina y con el sedimento bacteriano se hace una suspensión en -- 10 ml de solución de Ringer diluida al cuarto. Se -- centrifuga de nuevo a 2500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se elimina y el sedimento se suspende -- en 2 ml de caldo MRS al que se le ha suprimido la -- glucosa.

La solución de Ringer y el caldo MRS deben de ser -- calentados a 30 - 37 °C antes de ser utilizados para suspender las bacterias.

A partir de la suspensión bacteriana preparada se obtiene una nueva suspensión cuya densidad óptica esté cercana a 0,200 medida en un espectrofotómetro a -- 525 nm.

Esta nueva suspensión es el inóculo que se utiliza -- para sembrar distintos tubos de caldo MRS sin glucosa y a los que se han añadido diferentes azúcares esterilizados por filtración hasta alcanzar una concentración del 2 % en el medio de cultivo.

La caracterización de la bacteria empleada se hace de acuerdo con el crecimiento o ausencia de -- él en estos medios adicionados de azúcares y las -- características morfológicas que exhibe.

2.3.6.- Técnicas de cultivo de B. bifidum.-

2.3.6.1.- Obtención de inóculos de B. bifidum.-

Se parte de cultivos de B. bifidum en - -
caldo MRS incubados a 37 °C durante 24 horas en - -
anaerobiosis los cuales se centrifugan a 2500 rpm
durante diez minutos y el sedimento se lava 3 - 4
veces con solución de Ringer diluida al cuarto re-
suspendiendo y centrifugando sucesivamente. Con la
última suspensión, se prepara por dilución una nueva
suspensión que tiene una absorbancia alrededor de -
0,200 a 525 nm y que se utiliza como inóculo.

2.3.6.2.- Cultivo de B. bifidum.-

Esta bacteria se ha cultivado sobre los -
medios de cultivo anteriormente descritos, en anaero-
biosis estricta proporcionada por una atmósfera de
90 % de hidrógeno y 10 % de anhídrido carbónico a --
37 °C durante 24 - 36 horas en una campana para --
anaerobiosis Gas - Pack.

2.3.6.3.- Conservación de B. bifidum.-

Se ha realizado por siembras periódicas ca-
da 15 días en tubos con Medio de Tioglicolato 135-C
sin indicador. Después de inoculados los tubos se in-
cuban 24 - 30 horas en anaerobiosis a 37 °C y a con-
tinuación se conservan en la oscuridad a temperatura
ambiente (20 - 25 °C).

2.3.7.- Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

Con el fin de comparar si existen diferencias significativas entre los valores de nucleótidos de leches de diferentes especies y en distintos periodos de lactación, se han tratado los datos obtenidos mediante un análisis de varianza correspondiente a un diseño factorial 9 x 4 x 7 con cuatro réplicas (155). Los estadísticos (F de Snedecor) para este análisis de varianza se han calculado de la siguiente manera:

$$F_I = \frac{S_I^2}{S_0^2} \quad F_J = \frac{S_J^2}{S_0^2} \quad F_K = \frac{S_K^2}{S_0^2} \quad F_{IJ} = \frac{S_{IJ}^2}{S_0^2}$$

$$F_{IK} = \frac{S_{IK}^2}{S_0^2} \quad F_{JK} = \frac{S_{JK}^2}{S_0^2} \quad F_{IJK} = \frac{S_{IJK}^2}{S_0^2}$$

Siendo I= Nucleótidos comparados, J= Tipos de leche, K= Periodos de lactación, L= Repeticiones ó réplicas, IJ, IK, IJK las interacciones correspondientes e -- i= 1,2,..., 9, j= 1,2,...,4, k= 1,2,..., 7, y l= 1,2,...,4.

$$S_I^2 = \frac{Q_I}{I-1} \quad S_J^2 = \frac{Q_J}{J-1} \quad S_K^2 = \frac{Q_K}{K-1} \quad S_{IJ}^2 = \frac{Q_{IJ}}{(I-1)(J-1)}$$

$$S_{IK}^2 = \frac{Q_{IK}}{(I-1)(K-1)} \quad S_{JK}^2 = \frac{Q_{JK}}{(J-1)(K-1)} \quad S_{IJK}^2 = \frac{Q_{IJK}}{(I-1)(J-1)(K-1)}$$

$$S_0^2 = \frac{Q_0}{(IJKL-1)-((I-1)+(J-1)+(K-1)+(I-1)(J-1)+(I-1)(K-1)+(J-1)(K-1)+(I-1)(J-1)(K-1))}$$

$$Q_I = \frac{\sum_I x_{i...}^2}{JKL} - \frac{x^2....}{IJKL}$$

$$Q_J = \frac{\sum_J x^2.j..}{IKL} - \frac{x^2....}{IJKL}$$

$$Q_K = \frac{\sum_k X^2_{..k.}}{IJL} - \frac{X^2_{\dots}}{IJKL}$$

$$Q_{IJ} = \left(\frac{\sum_{ij} X^2_{ij..}}{KL} - \frac{X^2_{\dots}}{IJKL} \right) - (Q_I + Q_J)$$

$$Q_{IK} = \left(\frac{\sum_{ik} X^2_{i.k.}}{JL} - \frac{X^2_{\dots}}{IJKL} \right) - (Q_I + Q_K)$$

$$Q_{JK} = \left(\frac{\sum_{jk} X^2_{.jk.}}{IL} - \frac{X^2_{\dots}}{IJKL} \right) - (Q_J + Q_K)$$

$$Q_{IJK} = \left(\frac{\sum_{ijk} X^2_{ijk.}}{L} - \frac{X^2_{\dots}}{IJKL} \right) - (Q_I + Q_J + Q_K + Q_{IJ} + Q_{IK} + Q_{JK})$$

$$Q_o = Q - (Q_I + Q_J + Q_K + Q_{IJ} + Q_{IK} + Q_{JK} + Q_{IJK})$$

$$Q = \frac{\sum_{ijkl} X^2_{ijkl}}{IJKL} - \frac{X^2_{\dots}}{IJKL}$$

En la nomenclatura utilizada existen las siguientes correspondencias:

$$X_{i\dots} = \sum_{jkl} X_{ijkl} \quad X_{.j\dots} = \sum_{ikl} X_{ijkl}$$

$$X_{\dots k.} = \sum_{ijl} X_{ijkl} \quad X_{ij\dots} = \sum_{kl} X_{ijkl}$$

$$X_{.jk.} = \sum_{il} X_{ijkl} \quad X_{i.k.} = \sum_{jl} X_{ijkl}$$

$$X_{ijk.} = \sum_l X_{ijkl} \quad X_{\dots} = \sum_{ijkl} X_{ijkl}$$

La comparación entre los valores de nucleótidos hallados con distintos métodos (análisis cromatográfico y análisis enzimático) en los diferentes tipos de leche y en diferentes periodos de lactación se ha realizado mediante un análisis de varianza correspondiente a un diseño factorial 9x2x7 con cuatro bloques (155). Siendo I=Nucleótidos, J=Métodos de análisis, K=Periodos de lactación, L=Bloques, e Ij, IK, JK e

IJK las interacciones correspondientes e $i=1,2,\dots,9$
 $j=1,2$, $k=1,2,\dots,7$ y $l=1,2,\dots,4$, los estadísticos
 utilizados tienen iguales ecuaciones que para el análisis de
 varianza anterior. La única variación supone la introducción de una
 nueva suma de cuadrados Q_L .

$$Q_L = \frac{\sum_{IJK} x^2_{\dots l}}{IJK} - \frac{x^2_{\dots}}{IJKL}$$

Los análisis de varianza se han realizado en el Centro de Cálculo de la Universidad de Granada mediante los programas titulados GRCA90 y GRCA92 en un ordenador UNIVAC 1108 "MULTI-PROCESSR SYSTEM".

La comparación de valores medios, en todos los casos, se ha llevado a cabo mediante la aplicación de una prueba t de Student (155).

III.-RESULTADOS

III.-RESULTADOS

3.1.-Nucleótidos presentes en leche de vaca:Variación del contenido en nucleótidos durante el periodo de lactación.

En los escasos trabajos realizados para determinar el contenido en nucleótidos de leche de vaca, algunos autores señalan que "no se debería dar demasiada importancia a los datos cuantitativos obtenidos, tanto para las fracciones individuales como para los nucleótidos totales "per se", ya que el análisis de la absorción al ultravioleta de los filtrados libres de proteínas de varias muestras de leche presentaban grandes diferencias" (15) (16). En efecto, todos los trabajos publicados referentes al estudio de nucleótidos de leche de vaca, bien representan un análisis meramente cualitativo (18), bien expresan los resultados obtenidos a partir de muestras aisladas y por tanto carentes de valor estadístico (14) (15) (16).

En este capítulo se estudia la evolución del contenido en nucleótidos en leche de vaca desde el momento del parto y durante todo el periodo de lactación, tanto en muestras individuales, sometidas a análisis cromatográfico (Tablas N°3 a N°10), como en muestras múltiples en las que el análisis de nucleótidos se ha llevado a cabo por métodos enzimáticos (Tabla N°11). Las Gráficas N°1 a N°8 muestran las fracciones eluidas durante el análisis cromatográfico y las Gráficas N°9 y N°10 expresan la evolución durante el periodo de lactación de los nucleótidos monofosfato y de los nucleótidos totales presentes en leche de vaca.

El periodo de lactación se ha dividido en intervalos desiguales y con un tamaño sensiblemente menor en los primeros días, ya que durante ese tiempo es cuando se

obtienen grandes variaciones en el contenido nucleotídico de la leche analizada.

Los nucleótidos de leche, obtenidos después de eliminar los eluyentes cromatográficos, tal y como se ha descrito en las secciones 2.3.2.2., 2.3.2.3 y 2.2.2.4.a presentan espectros de absorción al ultravioleta a pH 2 y pH 11 (Gráfica N°11), similares a las registradas para nucleótidos puros.

Los compuestos parcialmente identificados se expresan como C-X y A-X. Estos productos tienen los espectros ultravioleta correspondientes a los mononucleótidos de la citosina y adenina, sin embargo, los R_f obtenidos en cromatografía en papel no corresponden a aquellos que se obtienen para los ribósidos mono, di o trifosfato y tampoco liberan restos de azúcar después de hidrólisis clorhídrica con ClH 0.01 N a 98°C durante 30 minutos.

TABLA N° 3

Contenido en nucleótidos de leche de vaca a las dos horas de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X" | 0.41 | 3.81 |
| C-X | 0.95 | 8.78 |
| CMP | 2.60 | 24.10 |
| AMP, A.URICO | 1.91 | 17.69 |
| OROTATO | 4.92 | 45.59 |

TABLA N° 4

Contenido en nucleótidos de leche de vaca a las 27 horas de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 1.34 | 0.79 |
| CMP | 3.68 | 2.17 |
| AMP, A.URICO | 5.38 | 3.18 |
| A-X | 0.96 | 0.57 |
| UMP | 39.49 | 23.34 |
| OROTATO | 7.37 | 4.35 |
| GDP-X | 6.74 | 3.98 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 90.73 | 53.73 |
| UDPGA | 13.47 | 7.96 |

TABLA N°5

Contenido en nucleótidos de leche de vaca a las 78 horas de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 8.68 | 8.39 |
| AMP, A.URICO | 8.03 | 7.77 |
| A-X | 2.15 | 2.08 |
| UMP | 9.33 | 9.02 |
| OROTATO | 16.67 | 16.11 |
| GDP-X | 4.13 | 3.99 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG UDPGa | 48.91 | 47.30 |
| UDPGA | 5.53 | 5.34 |

TABLA N°6

Contenido en nucleótidos de leche de vaca a los 5 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 0.57 | 1.30 |
| CMP | 3.02 | 6.85 |
| C-X' | 0.45 | 1.00 |
| AMP, A.URICO | 3.15 | 7.15 |
| A-X | 0.22 | 0.51 |
| GMP | 0.83 | 1.88 |
| UMP | 2.87 | 6.52 |
| OROTATO | 26.26 | 59.67 |
| ADP | 2.25 | 5.12 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG UDPGa | 1.54 | 3.50 |
| UDPGA | 3.31 | 7.51 |

TABLA N° 7

Contenido en nucleótidos de leche de vaca a los 15 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 0.50 | 1.62 |
| CMP | 4.90 | 15.99 |
| C-X' | 1.40 | 4.58 |
| AMP, A. URICO | 2.91 | 9.49 |
| ADP | 2.66 | 8.69 |
| OROTATO | 16.38 | 53.44 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 1.90 | 6.19 |

TABLA N° 8

Contenido en nucleótidos de leche de vaca a los 21 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 1.20 | 3.44 |
| CMP | 4.12 | 11.80 |
| C-X' | 1.17 | 3.34 |
| AMP, A. URICO | 1.81 | 5.18 |
| A-X | 1.50 | 4.30 |
| ADP | 2.37 | 6.80 |
| OROTATO | 19.87 | 56.99 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 2.84 | 8.15 |

TABLA N°9

Contenido en nucleótidos de leche de vaca a los 2 meses de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 2.37 | 6.58 |
| CMP | 3.22 | 8.95 |
| AMP, A. URICO | 2.35 | 6.53 |
| A-X | 1.21 | 3.36 |
| OROTATO | 26.84 | 74.57 |

TABLA N°10

Contenido en nucleótidos de leche de vaca a los 6 meses de lactación.

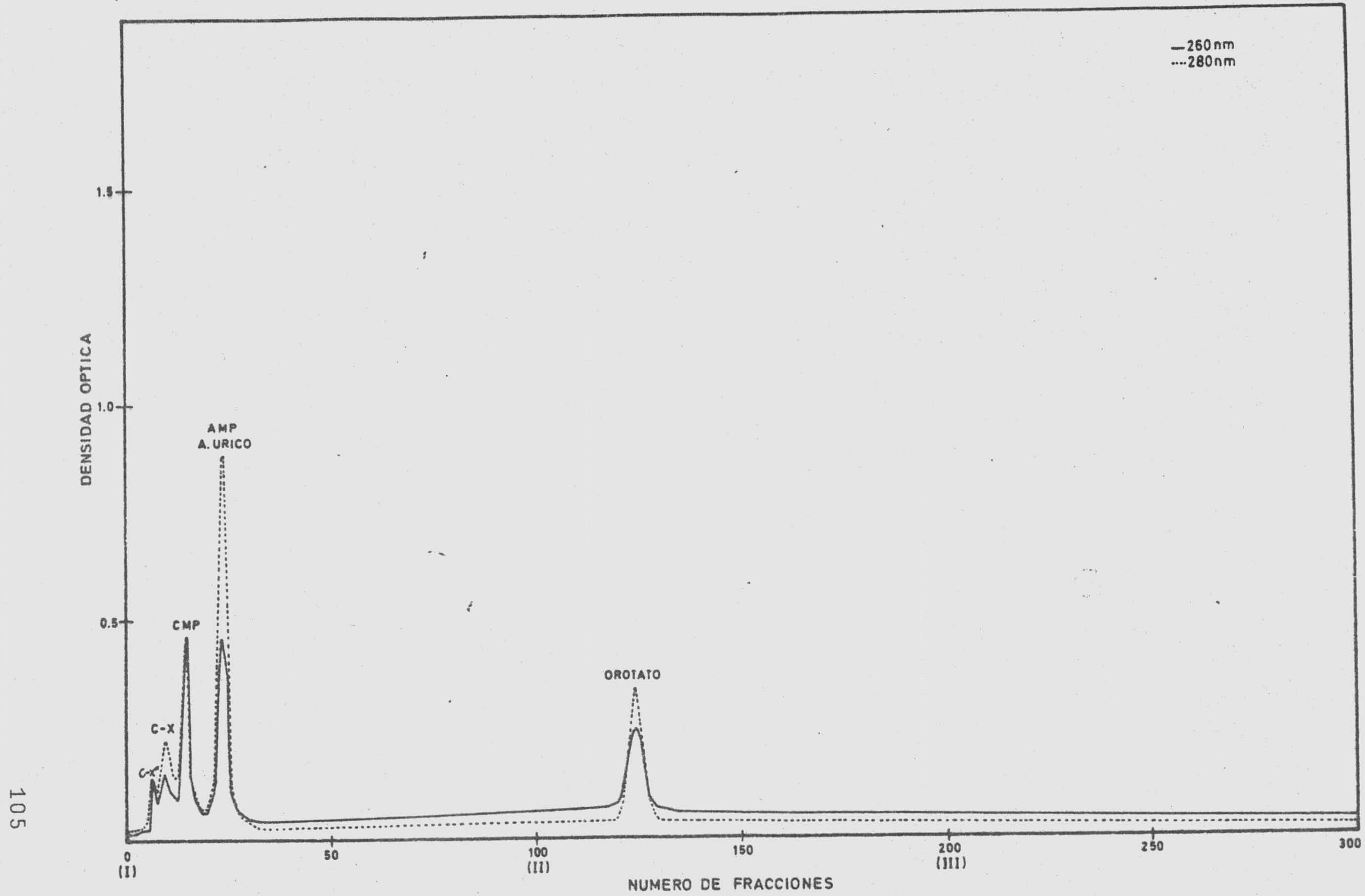
| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 1.59 | 4.43 |
| CMP | 1.23 | 3.42 |
| AMP, A. URICO | 1.58 | 4.38 |
| OROTATO | 41.94 | 88.73 |

TABLA N°11

Contenido en nucleótidos de leche de vaca en diferentes periodos de lactación. Los nucleótidos se han medido mediante métodos enzimáticos y se expresan como valores medios en $\mu\text{moles}/100\text{ ml}$ de leche. El \pm representa el error estándar de la media y n el número de muestras analizadas.

| Periodo de lactación | 0-24 horas | 24-48 horas | 48-120 horas | 5-10 días | 10-20 días | 2 meses | 6 meses |
|----------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| n | 5 | 6 | 6 | 7 | 7 | 8 | 8 |
| OROTATO | 4.81 \pm 0.51 | 9.51 \pm 1.31 | 17.61 \pm 1.71 | 31.59 \pm 1.45 | 26.08 \pm 2.46 | 36.73 \pm 2.23 | 36.50 \pm 1.42 |
| CMP | 3.19 \pm 0.41 | 5.25 \pm 0.51 | 6.80 \pm 0.48 | 4.74 \pm 0.41 | 4.54 \pm 0.26 | 3.32 \pm 0.24 | 1.89 \pm 0.12 |
| AMP | 3.97 \pm 0.75 | 6.18 \pm 0.49 | 5.73 \pm 0.40 | 4.19 \pm 0.29 | 3.40 \pm 0.26 | 2.75 \pm 0.14 | 2.03 \pm 0.23 |
| GMP | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| UMP | 18.63 \pm 5.01 | 39.00 \pm 5.43 | 7.97 \pm 0.16 | 3.12 \pm 0.74 | 2.92 \pm 0.65 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| UDPG | 17.23 \pm 4.58 | 36.23 \pm 4.70 | 7.82 \pm 1.97 | 4.38 \pm 2.08 | 0.83 \pm 0.09 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| UDPGa | 15.98 \pm 4.10 | 32.02 \pm 5.15 | 6.94 \pm 1.72 | 3.38 \pm 1.38 | 0.78 \pm 0.09 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| C _t | 3.92 \pm 0.51 | 6.05 \pm 0.46 | 7.57 \pm 0.47 | 5.42 \pm 0.40 | 5.62 \pm 0.43 | 4.31 \pm 0.34 | 2.82 \pm 0.17 |
| A _t | 4.44 \pm 0.41 | 6.78 \pm 0.43 | 7.11 \pm 0.74 | 4.88 \pm 0.45 | 3.95 \pm 0.39 | 3.56 \pm 0.11 | 3.26 \pm 0.21 |
| G _t | 1.41 \pm 0.56 | 3.65 \pm 1.07 | 1.57 \pm 0.58 | 0.41 \pm 0.20 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| U _t | 106.00 \pm 26.59 | 149.50 \pm 17.00 | 36.42 \pm 7.23 | 16.03 \pm 5.36 | 5.90 \pm 0.95 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |

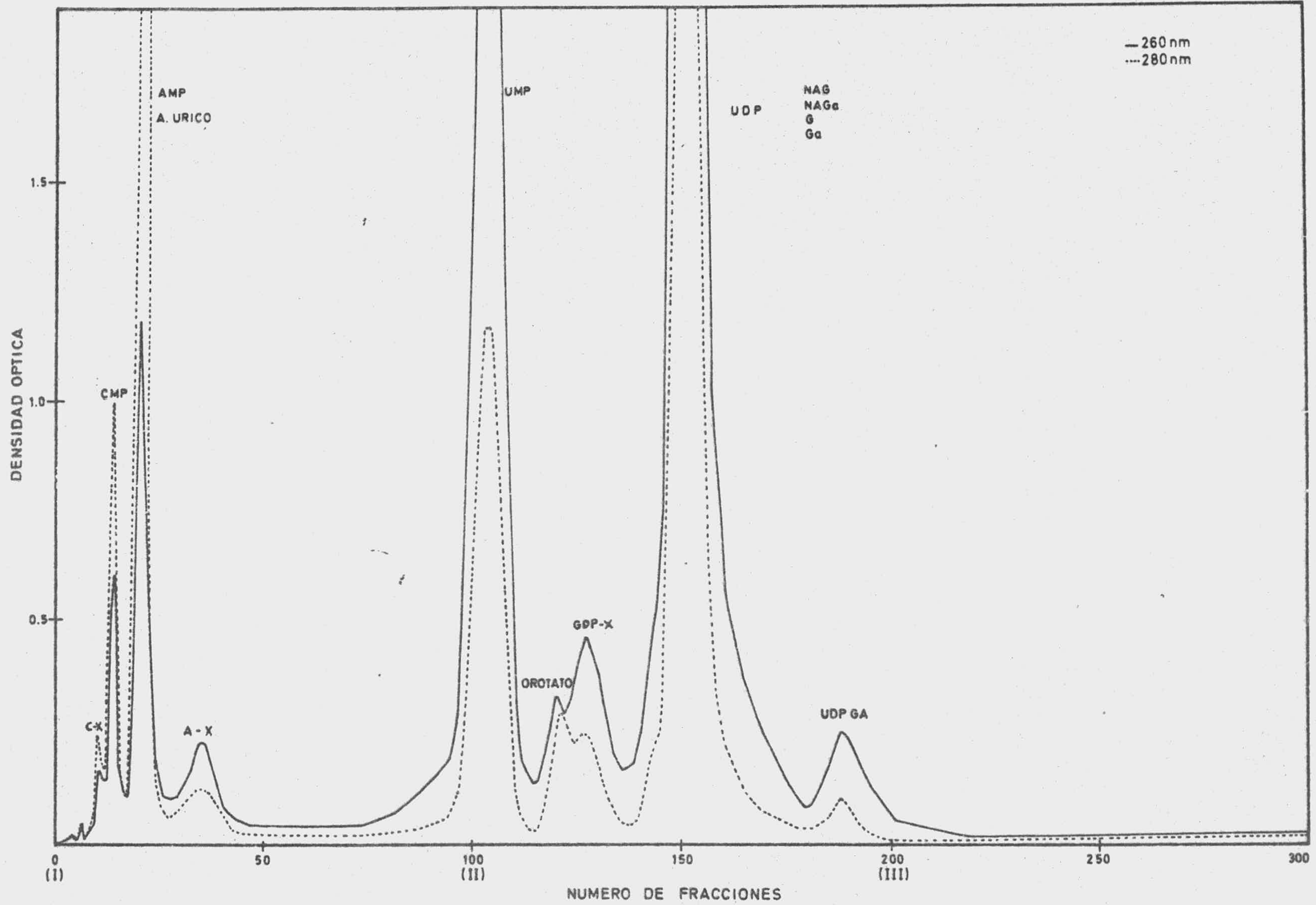
GRAFICA N°1



105

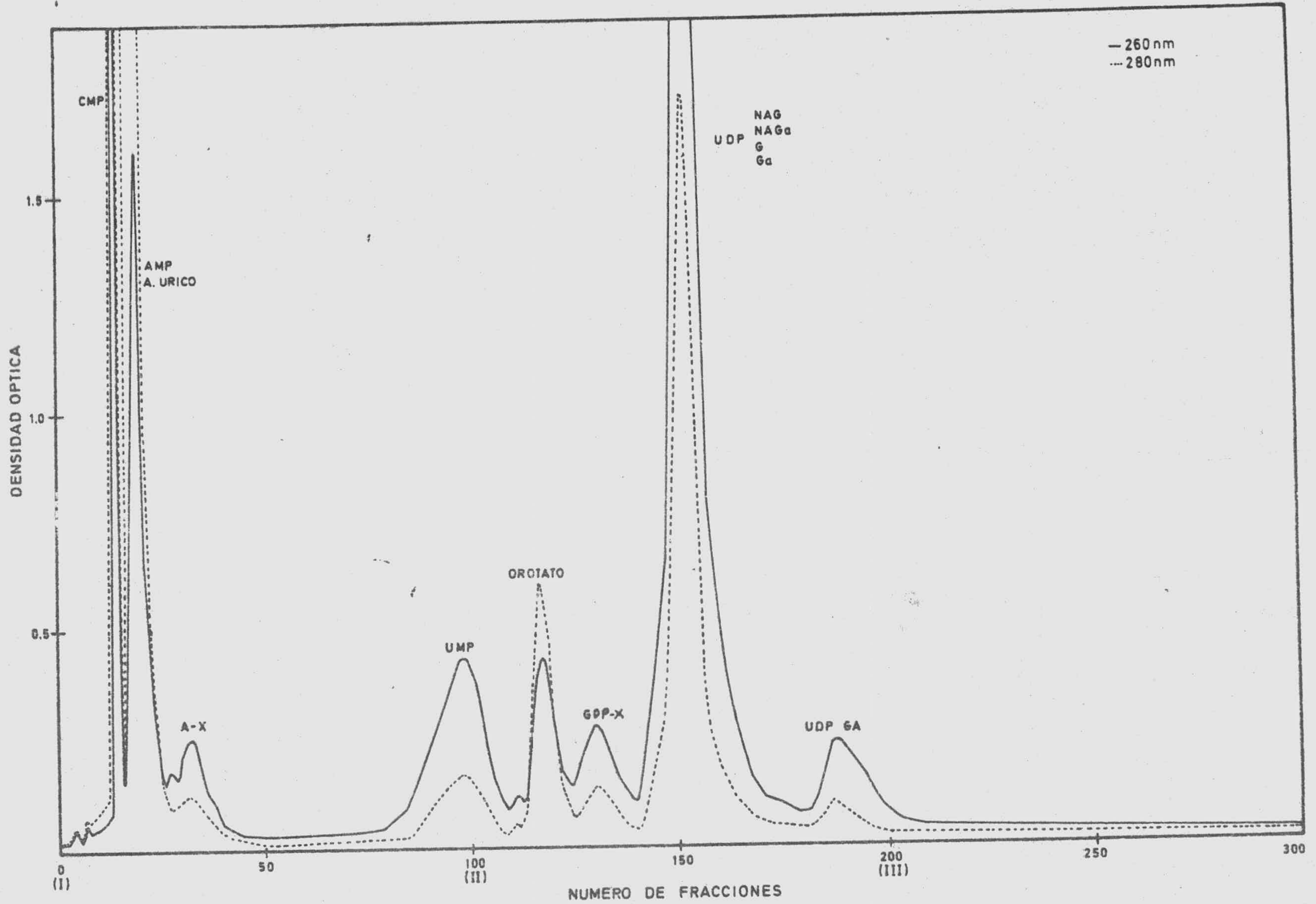
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 60 ml de calostro de vaca, 2 horas de lactación.

GRAFICA N°2



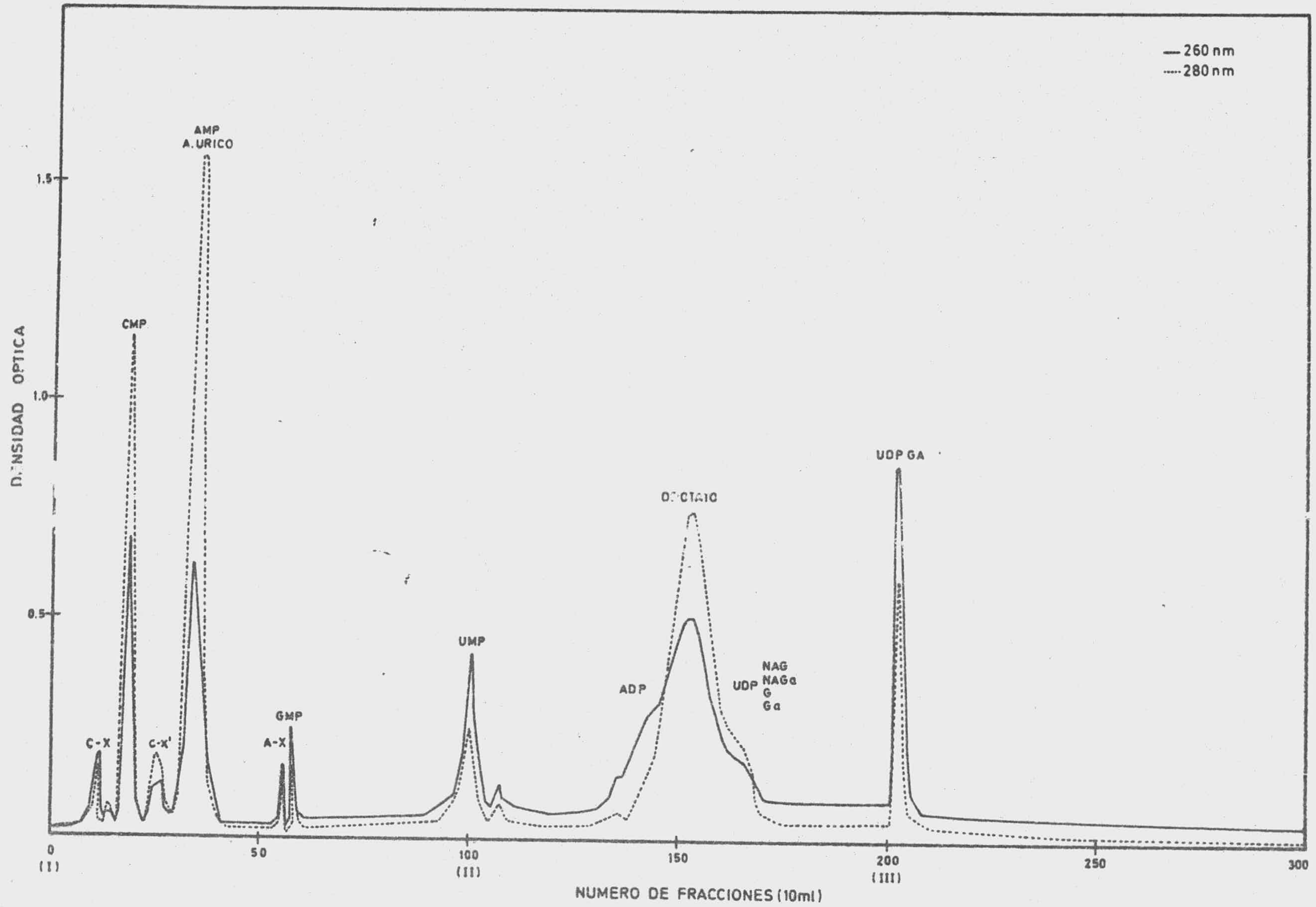
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 60 ml de calostro de vaca, 27 horas de lactación. Las densidades ópticas máximas a 260 nm de las fracciones UMP, UDPG y UDPGa y UDP-N-AG y UDP-N-AGa son respectivamente 2.480, 6.450 y 3.150.

GRAFICA N° 3



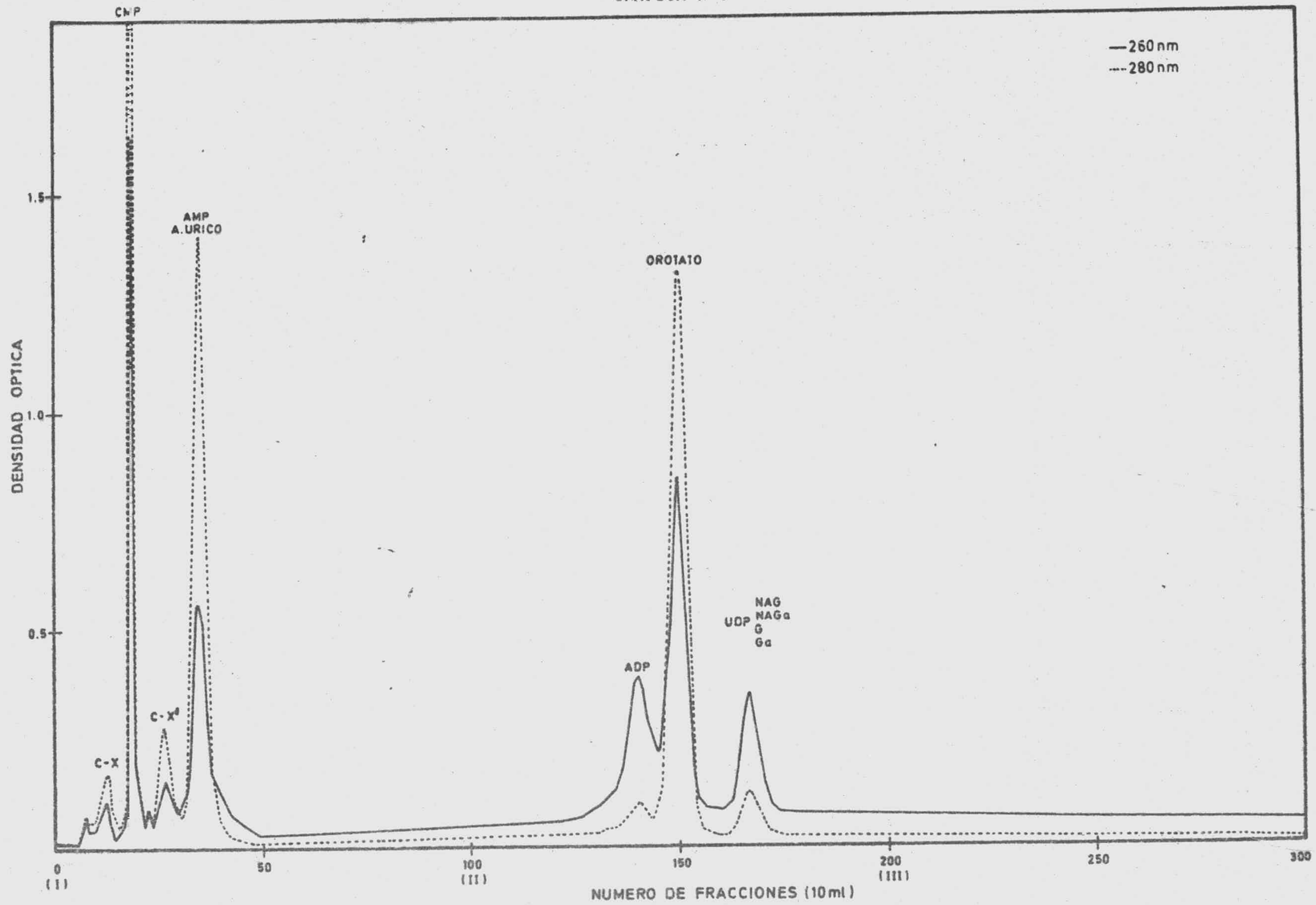
107

Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 60 ml de calostro de vaca, 78 horas de lactación. Las densidades ópticas máximas a 260 nm de las fracciones CMP y UDPG, UDPGa, UDP-N-AG y UDP-N-AGa son respectivamente 2.385 y 4.440.



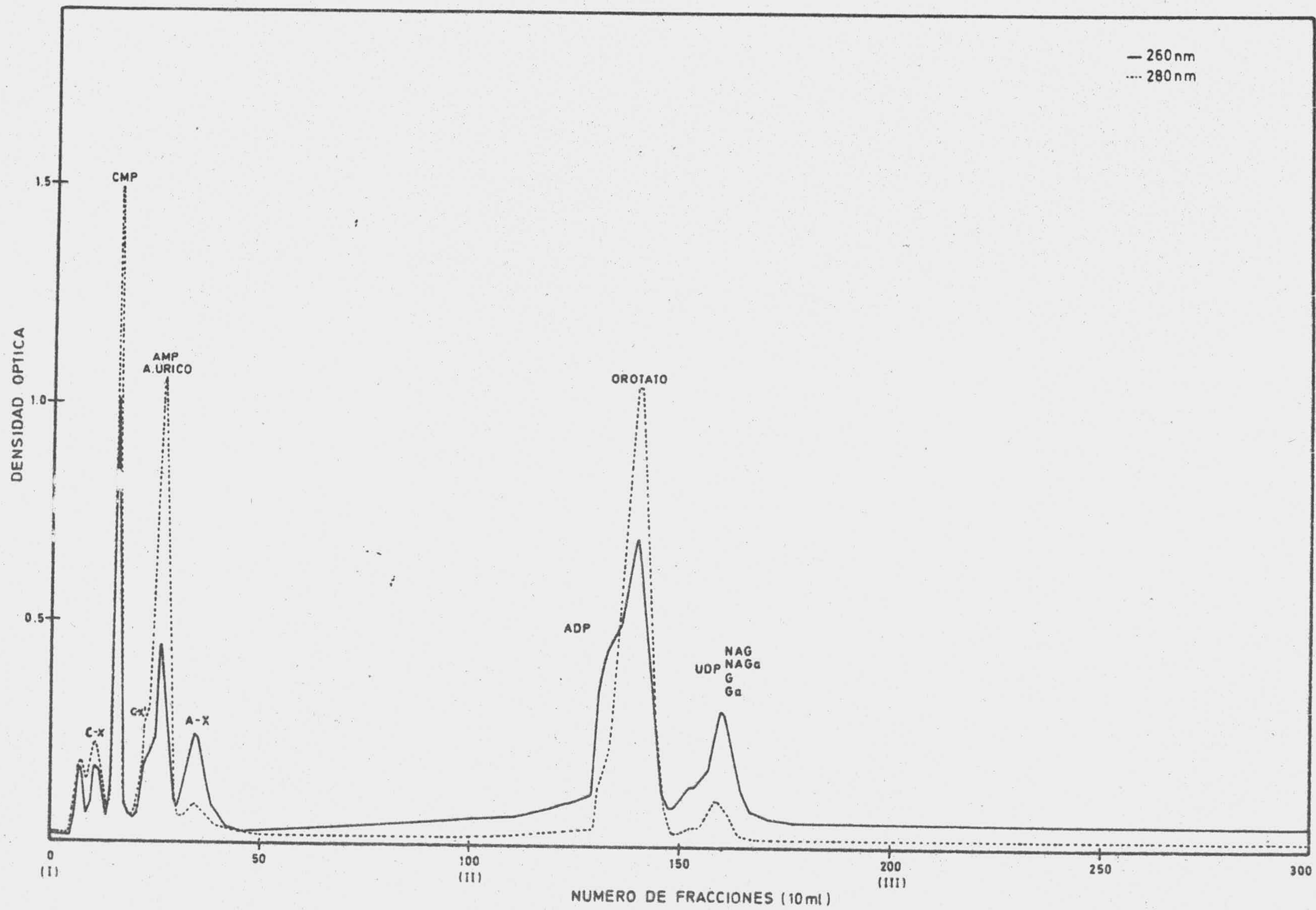
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 60 ml de leche de vaca, 5 días de lactación.

GRAFICA Nº5



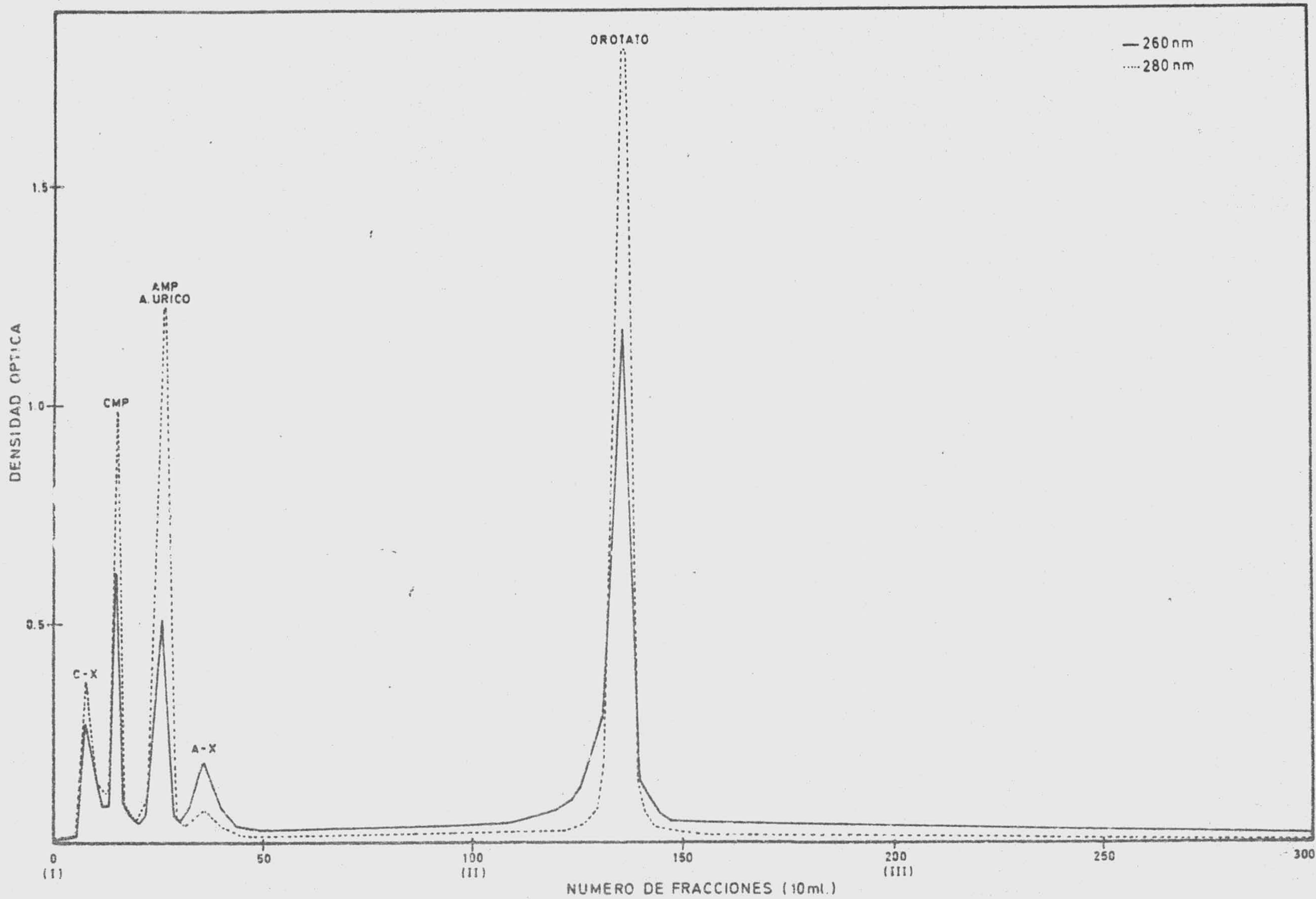
109

Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 60 ml de leche de vaca, 15 días de lactación.



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 60 ml de leche de vaca, 21 días de lactación.

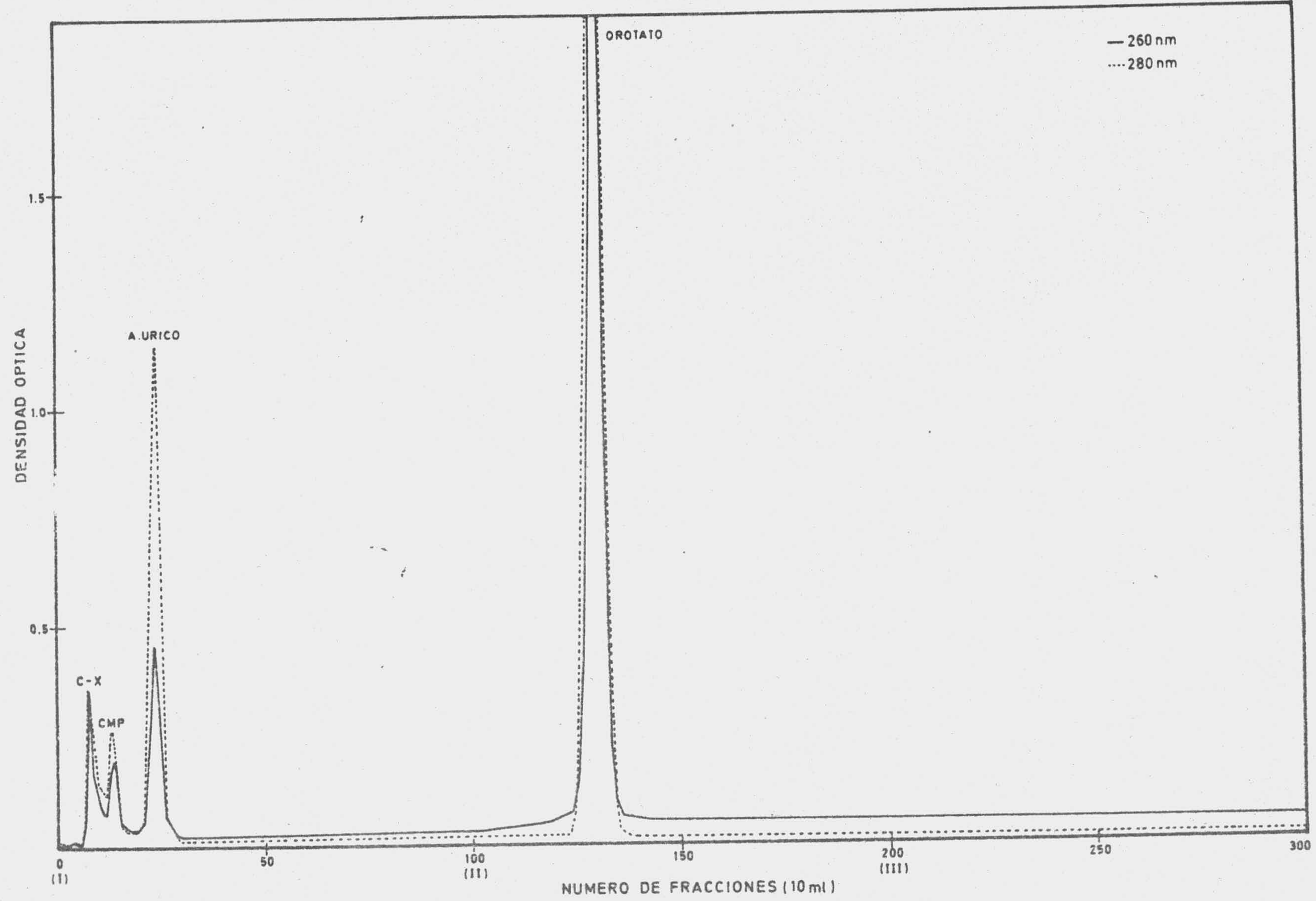
GRAFICA Nº7



111

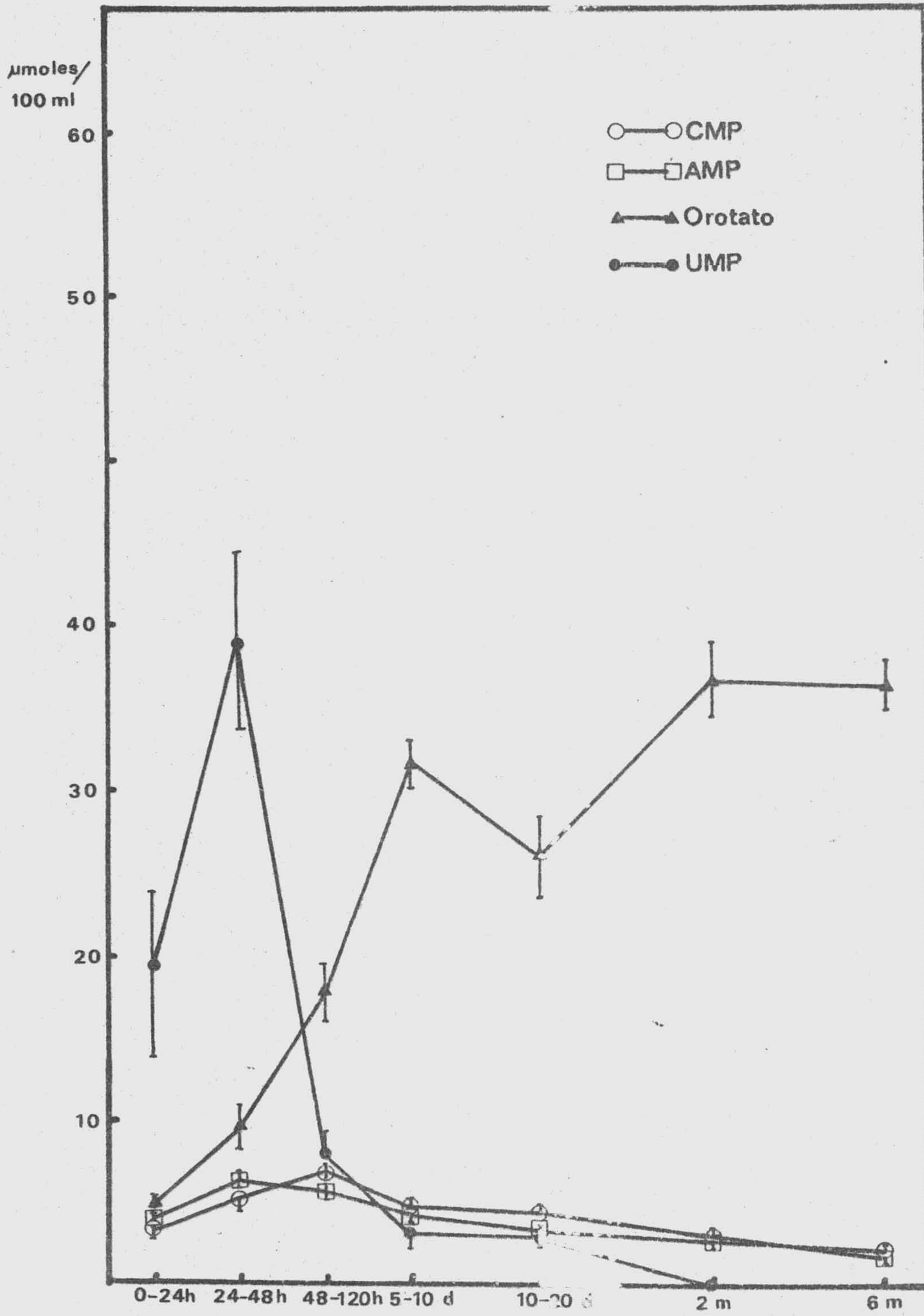
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 60 ml de leche de vaca, 2 meses de lactación.

GRAFICA Nº 8



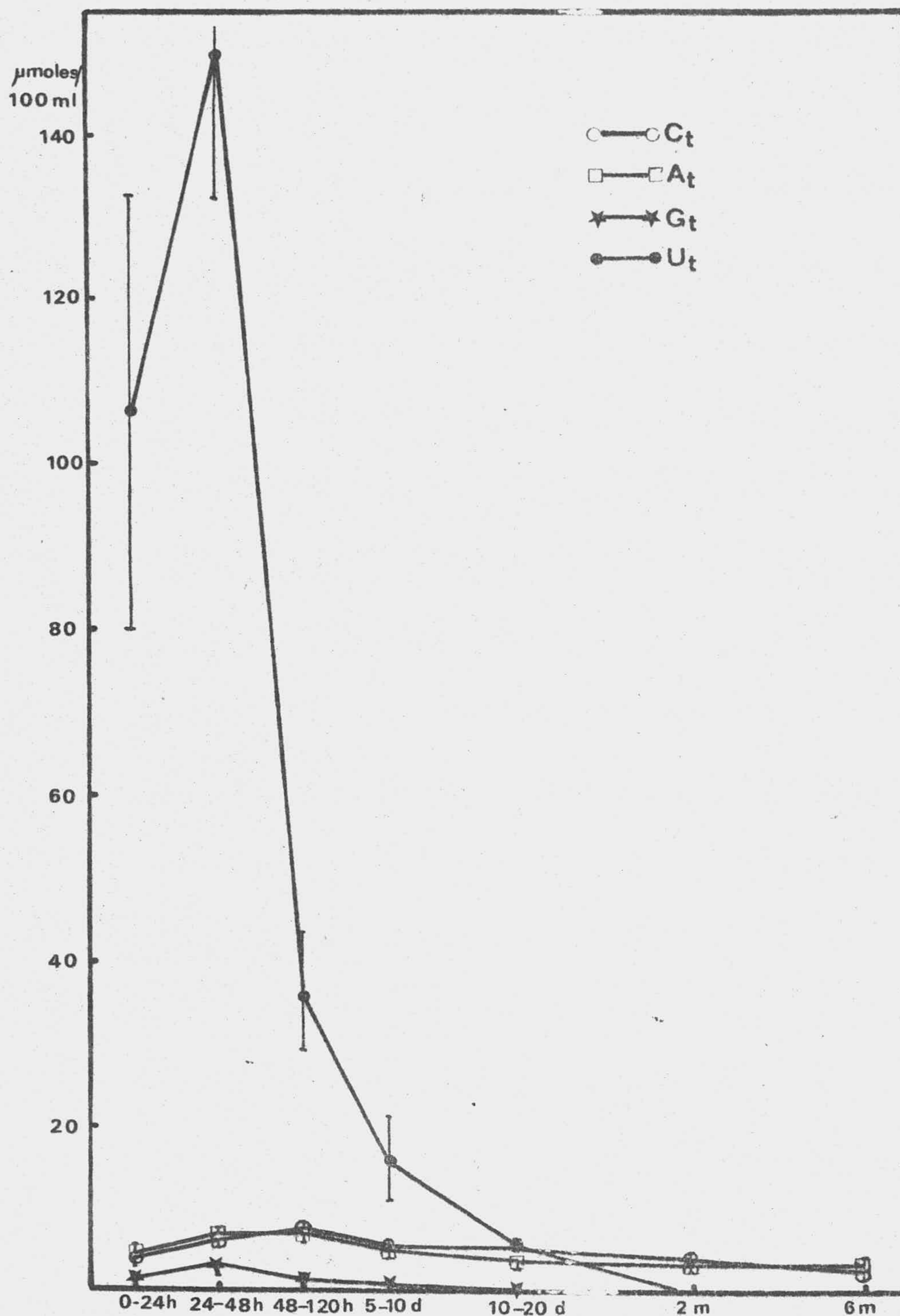
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 60 ml de leche de vaca, 6 meses de lactación.

GRAFICA N° 9



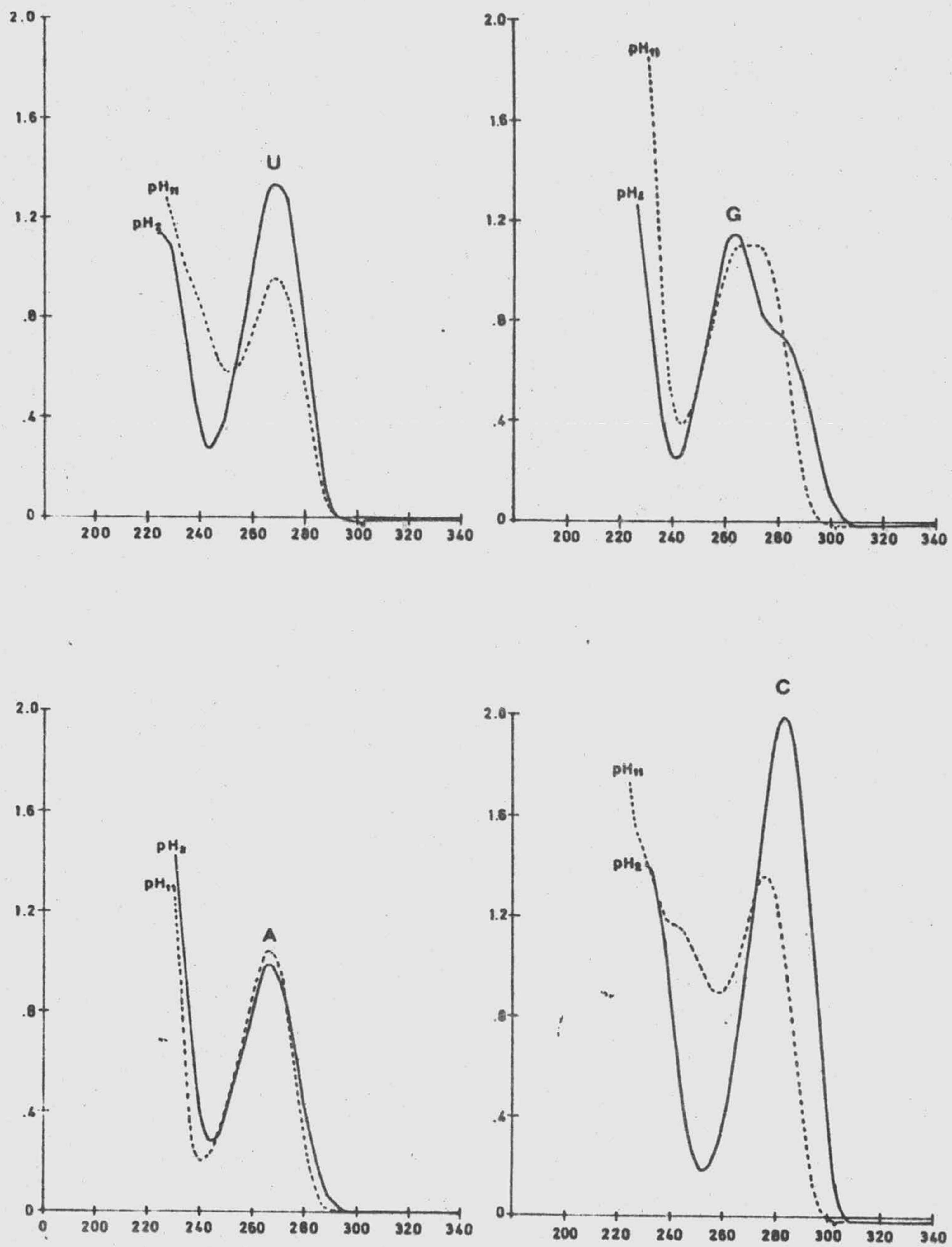
Evolución del contenido de Orotato, CMP, AMP, GMP y UMP de leche de vaca durante el periodo de lactación

GRAFICA N°10



Evolución del contenido de citidín, adenín, guanósín y uridín monofosfatos totales de leche de vaca durante el periodo de lactación.

GRAFICA N°11



Espectros de absorción en la región ultravioleta a pH 2 y pH 11 de los nucleótidos correspondientes a las bases uracilo, guanina, adenina y citosina, aislados de leche, (U,G,A,C).

3.2.-Nucleótidos presentes en leche de oveja:Variación del contenido en nucleótidos durante el periodo de lactación.

Igual que ocurre con la leche de vaca, los trabajos realizados sobre la composición nucleotídica de la leche de oveja son escasos (10) (11). El pequeño número de muestras analizadas por estos autores podría dar paso a la deducción de conclusiones erróneas.

En este apartado se ha estudiado el contenido en nucleótidos de la leche de oveja a través de una amplia serie de muestras que han sido analizadas cromatográficamente (Tablas N°12 a N°18 y Gráficas N°12 a N°18) y mediante métodos enzimáticos (Tabla N°19 y Gráficas N°19 y N°20) con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos que reflejen con un cierto nivel de confianza los cambios en el contenido nucleotídico durante el transcurso de la lactación.

Los espectros de absorción al ultravioleta de los nucleótidos aislados de leche de oveja a pH 2 y pH 11 coinciden exactamente con los obtenidos para leche de vaca (Gráfica N°11).

El periodo de lactación se ha dividido en intervalos desiguales de tamaño menor en los primeros días de lactación, debido a las grandes variaciones en el contenido nucleotídico que tienen lugar durante ese tiempo.

Los compuestos parcialmente identificados y expresados como A-X y GDP-X presentan espectros de absorción al ultravioleta correspondientes a los nucleótidos de la adenina y guanina. A-X muestra características similares a las halladas en el compuesto encontrado en leche de vaca

y designado con el mismo nombre. GDP-X libera un resto azucarado, después de hidrólisis clorhídrica, que da reacción positiva (color violeta) con el reactivo de Elson-Morgan. Sin embargo, este resto presenta una movilidad muy baja en el desarrollo cromatográfico en papel.

TABLA N°12

Contenido en nucleótidos de leche de oveja a las 4 horas de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 13.10 | 2.85 |
| AMP | 15.40 | 3.35 |
| UMP | 102.72 | 22.36 |
| GDP-X | 10.58 | 2.30 |
| OROTATO | 3.35 | 0.73 |
| GDP-Fuc, GDP-Man | 23.21 | 5.05 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 112.39 | 24.47 |
| UDPG, UDPGa | 134.70 | 29.32 |
| UDPGA | 10.13 | 2.20 |
| UDP | 33.75 | 7.35 |

TABLA N°13

Contenido en nucleótidos de leche de oveja a las 25 horas de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 36.20 | 3.01 |
| AMP | 28.68 | 2.38 |
| A-X | 3.99 | 0.33 |
| GMP | 3.96 | 0.33 |
| UMP | 92.56 | 7.69 |
| GDP-X | 20.45 | 1.70 |
| OROTATO | 3.02 | 0.25 |
| GDP-Fuc | 13.65 | 1.13 |
| GDP-Man | 24.49 | 2.03 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 405.08 | 33.69 |
| UDPG, UDPGa | 480.22 | 39.89 |
| UDPGA | 17.25 | 1.43 |
| UDP | 74.44 | 6.18 |

TABLA N°14

Contenido en nucleótidos de leche de oveja a los 3 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 10.43 | 1.52 |
| AMP | 14.63 | 2.13 |
| UMP | 145.15 | 21.17 |
| GDP-X | 14.32 | 2.09 |
| OROTATO | 2.62 | 0.38 |
| GDP-Fuc, GDP-Man | 25.85 | 3.77 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 146.47 | 21.37 |
| UDPG, UDPGa | 280.33 | 40.89 |
| UDPGA | 10.41 | 1.52 |
| UDP | 35.31 | 5.15 |

TABLA N°15

Contenido en nucleótidos de leche de oveja a los 8 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 23.30 | 3.47 |
| AMP | 15.67 | 2.33 |
| A-X | 0.47 | 0.07 |
| GMP | 1.50 | 0.22 |
| UMP | 65.16 | 9.70 |
| GDP-X | 24.00 | 3.57 |
| ,OROTATO | 3.55 | 0.53 |
| GDP-Fuc | 7.13 | 1.06 |
| GDP-Man | 19.46 | 2.90 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 220.28 | 32.82 |
| UDPG, UDPGa | 248.38 | 36.99 |
| UDPGA | 9.76 | 1.45 |
| UDP | 32.77 | 4.88 |

TABLA N°16

Contenido en nucleótidos de leche de oveja a los 15 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 7.17 | 2.83 |
| AMP | 11.87 | 4.68 |
| UMP | 20.07 | 7.92 |
| GDP-X | 14.55 | 5.74 |
| OROTATO | 3.75 | 1.48 |
| GDP-Fuc, GDP-Man | 23.70 | 9.35 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 63.11 | 24.90 |
| UDPG, UDPGa | 100.00 | 39.46 |
| UDPGA | 5.25 | 2.07 |
| UDP | 8.96 | 3.53 |

TABLA N°17

Contenido en nucleótidos de leche de oveja a 1 mes de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 8.70 | 3.55 |
| AMP | 8.47 | 3.45 |
| A-X | 1.00 | 0.41 |
| UMP | 26.08 | 10.63 |
| GDP-X | 2.93 | 1.19 |
| OROTATO | 6.43 | 2.62 |
| GDP-Fuc, GDP-Man | 22.47 | 9.16 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 156.80 | 63.91 |
| UDPGA | 12.56 | 5.12 |

TABLA N°18

Contenido en nucleótidos de leche de oveja a los 2 meses de lactación.

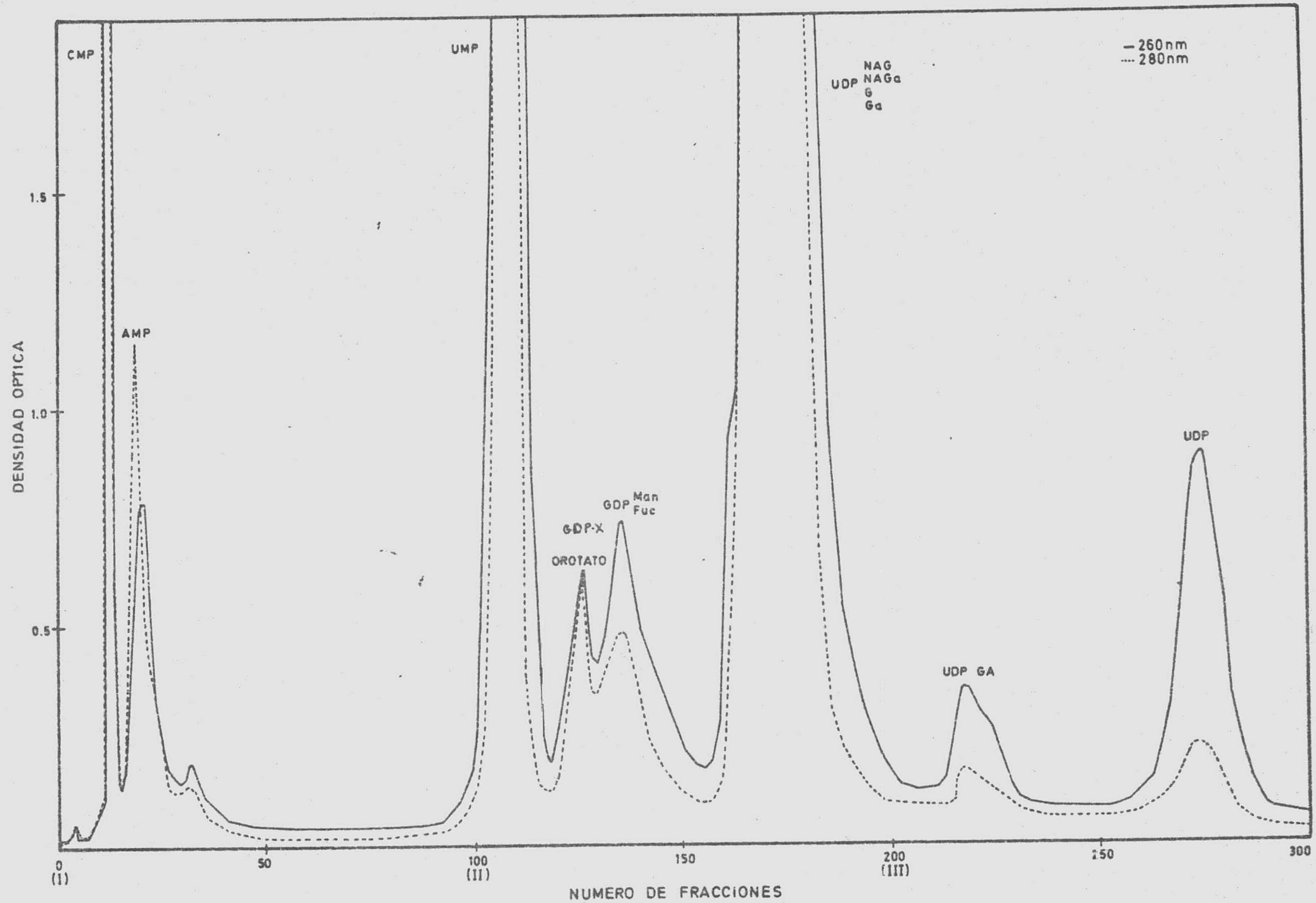
| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 6.26 | 2.69 |
| AMP | 9.62 | 4.13 |
| A-X | 0.78 | 0.33 |
| UMP | 30.88 | 13.26 |
| GDP-x | 10.52 | 4.52 |
| OROTATO | 3.27 | 1.41 |
| GDP-Fuc, GDP-Man | 23.30 | 10.00 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 122.18 | 52.47 |
| UDPGA | 6.20 | 2.67 |
| UDP | 19.88 | 8.54 |

TABLA N° 19

Contenido en nucleótidos de leche de oveja en diferentes periodos de lactación. Los nucleótidos se han medido mediante métodos enzimáticos y se expresan como valores medios en $\mu\text{moles}/100 \text{ ml}$ de leche. El \pm representa el error estándar de la media y n el número de muestras analizadas.

| Periodo de lactación | 0-24 horas | 24-48 horas | 48-120 horas | 5-10 días | 10-20 días | 2 meses | 3 meses |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| n | 4 | 6 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 |
| OROTATO | 3.39 \pm 0.34 | 3.51 \pm 0.27 | 3.29 \pm 0.30 | 3.55 \pm 0.25 | 3.82 \pm 0.19 | 4.09 \pm 0.26 | 4.16 \pm 0.13 |
| CMP | 16.79 \pm 1.88 | 32.75 \pm 2.79 | 13.55 \pm 2.21 | 15.02 \pm 0.16 | 9.02 \pm 0.77 | 7.43 \pm 0.51 | 8.74 \pm 0.98 |
| AMP | 21.09 \pm 3.23 | 29.73 \pm 0.80 | 15.44 \pm 1.05 | 14.42 \pm 1.32 | 12.08 \pm 0.87 | 9.36 \pm 0.55 | 7.50 \pm 0.46 |
| GMP | 1.15 \pm 0.43 | 3.46 \pm 0.43 | 1.15 \pm 0.36 | 0.49 \pm 0.31 | 0.34 \pm 0.22 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| UMP | 102.28 \pm 4.87 | 113.30 \pm 7.01 | 107.78 \pm 9.98 | 58.46 \pm 2.74 | 25.85 \pm 2.20 | 25.09 \pm 2.60 | 19.18 \pm 0.14 |
| UDPG | 93.15 \pm 9.61 | 237.80 \pm 14.59 | 123.71 \pm 8.97 | 114.71 \pm 7.06 | 60.34 \pm 3.67 | 40.24 \pm 1.22 | 30.37 \pm 2.39 |
| UDPG _a | 80.43 \pm 7.95 | 220.11 \pm 15.56 | 108.13 \pm 5.76 | 100.56 \pm 4.65 | 53.14 \pm 3.84 | 34.68 \pm 1.54 | 25.06 \pm 2.48 |
| C _t | 18.02 \pm 2.40 | 34.20 \pm 2.93 | 14.33 \pm 2.53 | 15.60 \pm 2.07 | 9.82 \pm 0.84 | 7.96 \pm 0.46 | 9.37 \pm 0.89 |
| A _t | 22.92 \pm 3.15 | 31.39 \pm 2.08 | 16.40 \pm 0.98 | 15.56 \pm 1.14 | 13.25 \pm 1.02 | 10.57 \pm 0.57 | 8.33 \pm 0.41 |
| G _t | 39.59 \pm 2.10 | 50.13 \pm 2.14 | 49.02 \pm 2.48 | 43.51 \pm 2.21 | 35.55 \pm 2.22 | 26.85 \pm 1.95 | 22.92 \pm 1.33 |
| U _t | 344.00 \pm 18.12 | 951.99 \pm 55.81 | 591.90 \pm 27.43 | 414.63 \pm 40.86 | 208.63 \pm 10.08 | 160.89 \pm 6.27 | 112.53 \pm 7.40 |

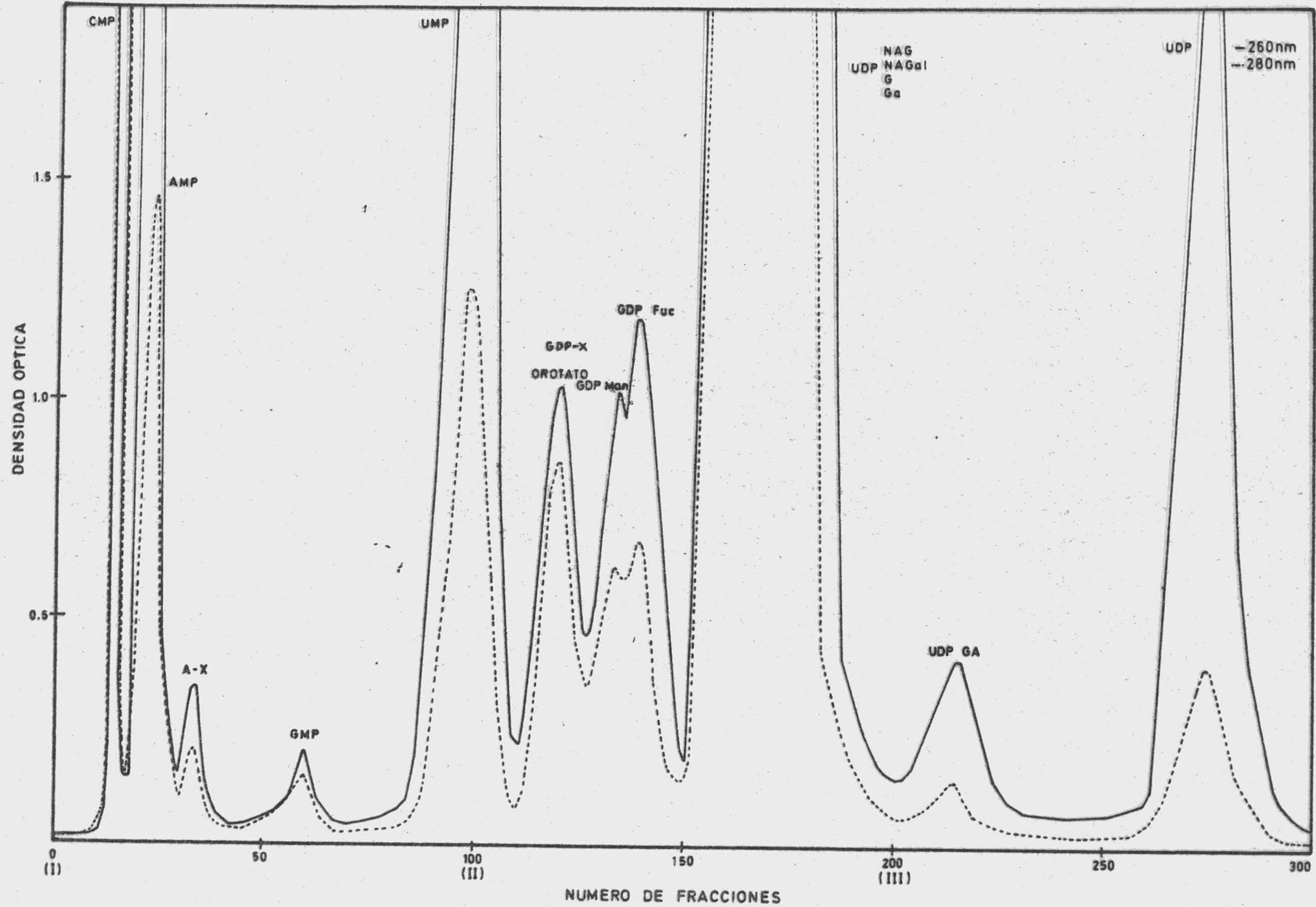
GRAFICA Nº12



125

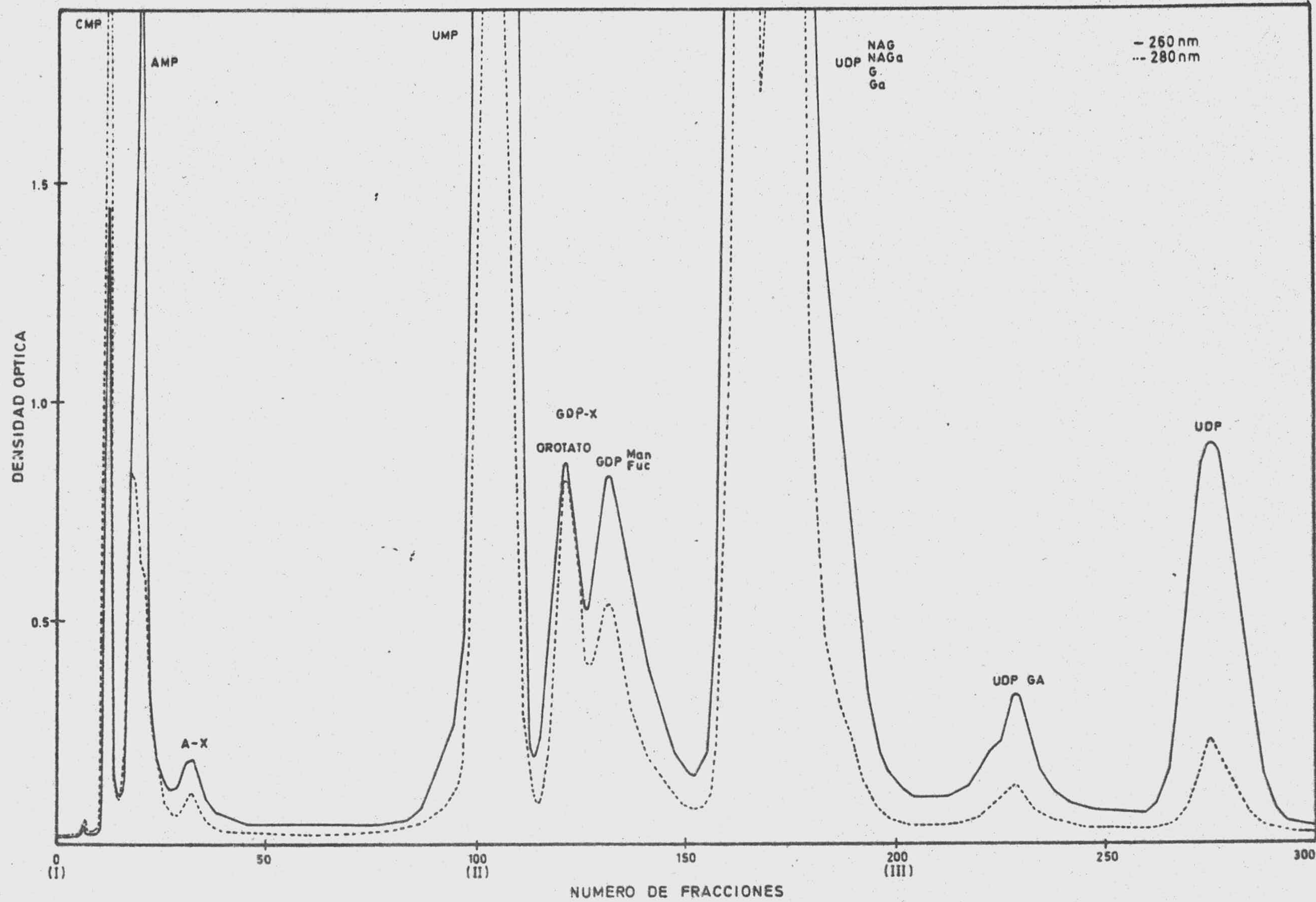
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de calostro de oveja, 4 horas de lactación. Las densidades ópticas máximas a 260 nm de las fracciones CMP, UMP, UDP-N-AG y UDP-N-AGa y UDPG y UDPGa son respectivamente 2.280, 5.500, 5.950 y 7.490.

GRAFICA Nº13



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de calostro de oveja, 25 horas de lactación. Las densidades ópticas máximas a 260 nm de las fracciones CMP, AMP, UMP, UDP-N-AG y UDP-N-AGa, UDPG y UDPGa y UDP son respectivamente 7.970, 4.450, 3.410, 17.200, 20.100 y 2.900.

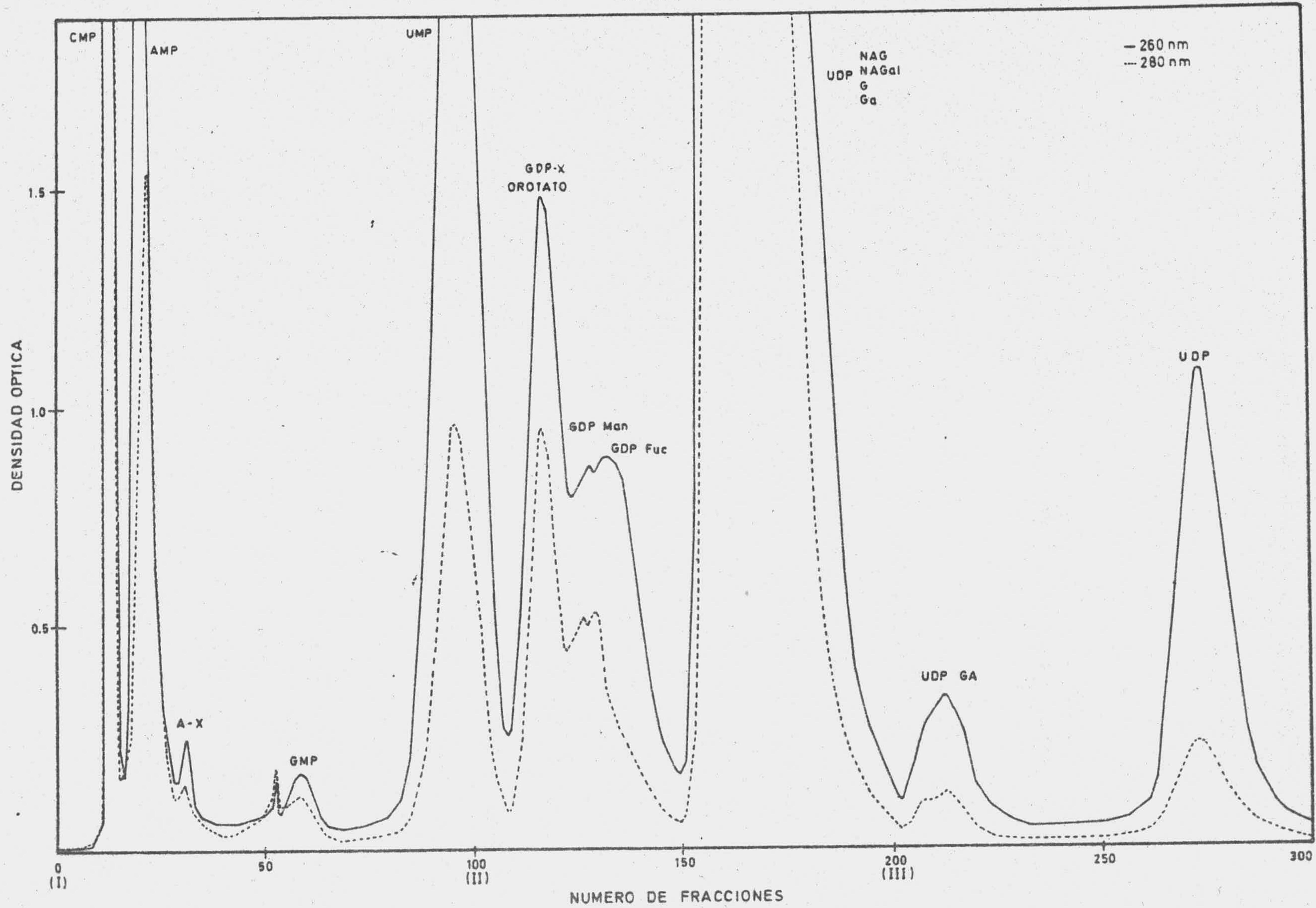
GRAFICA N° 14



127

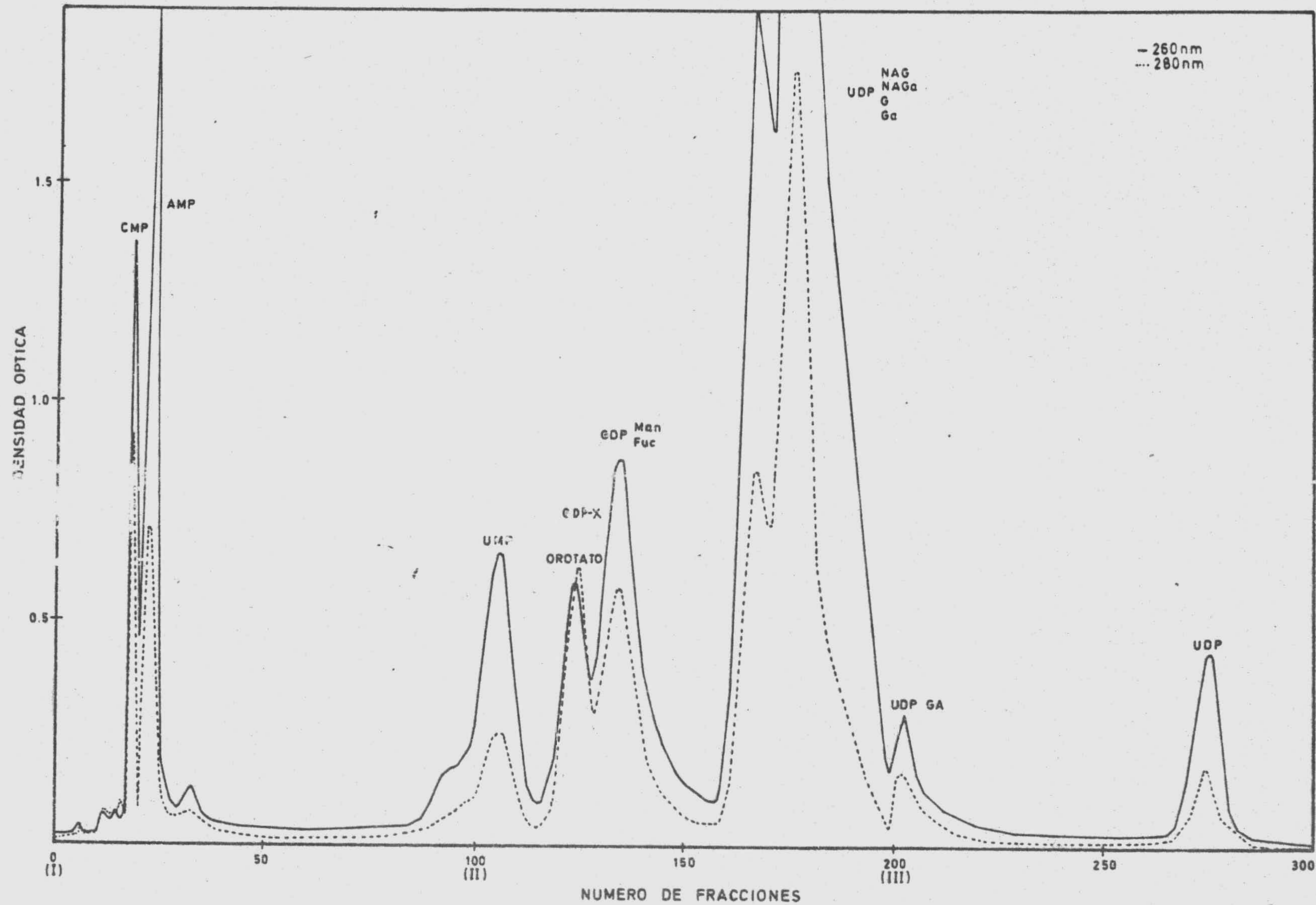
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de calostro de oveja, 3 días de lactación. Las densidades ópticas máximas a 260 nm de las fracciones AMP, UMP, UDP-N-AG y UDP-N-AGa y UDPG y UDPGa son respectivamente 2.100, 6.880, 9.500 y 10.960.

GRAFICA Nº15



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 50 ml de leche de oveja, 8 días de lactación. Las densidades ópticas máximas a 260 nm de las fracciones CMP, AMP, UMP, UDP-N-AG y UDP-N-AGA y UDPG y UDPGa son respectivamente 4.120, 2.350, 2.600, 11.200 y 10.800.

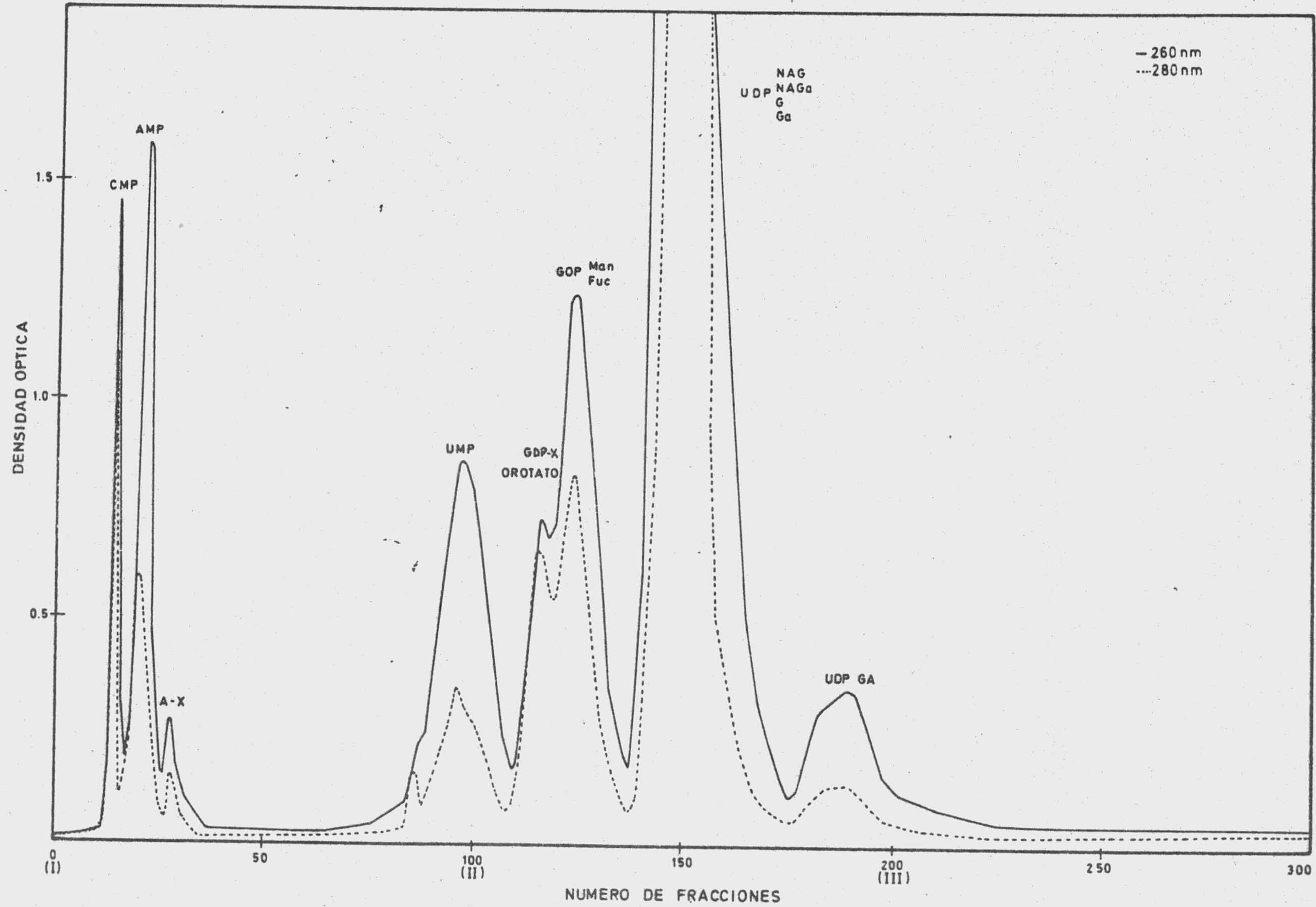
GRAFICA Nº16



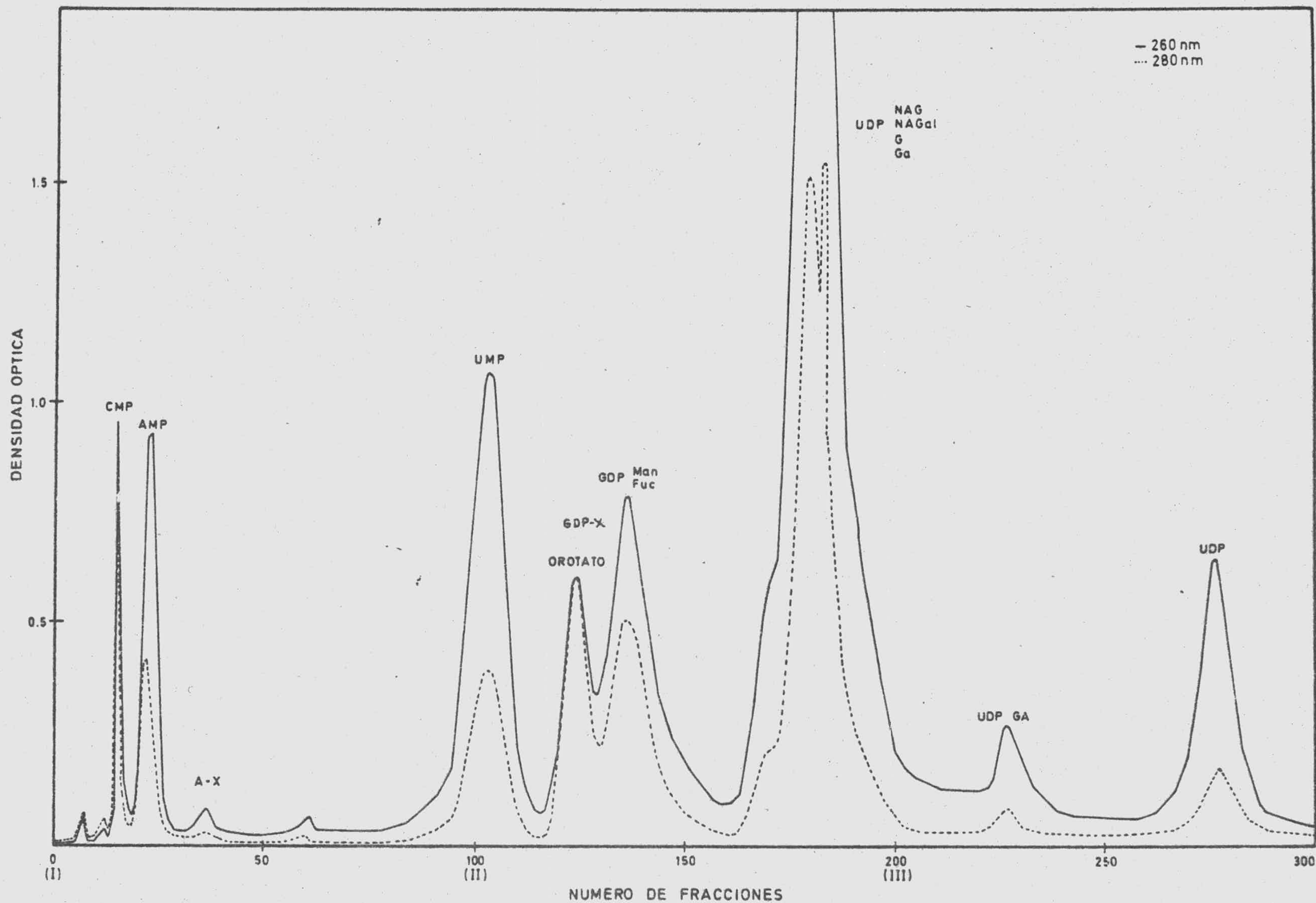
129

Cromatorafía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche de oveja, 15 días de lactación. La densidad óptica máxima a 260 nm de la fracción UDPG y UDPGa es 4.320.

GRAFICA N°17



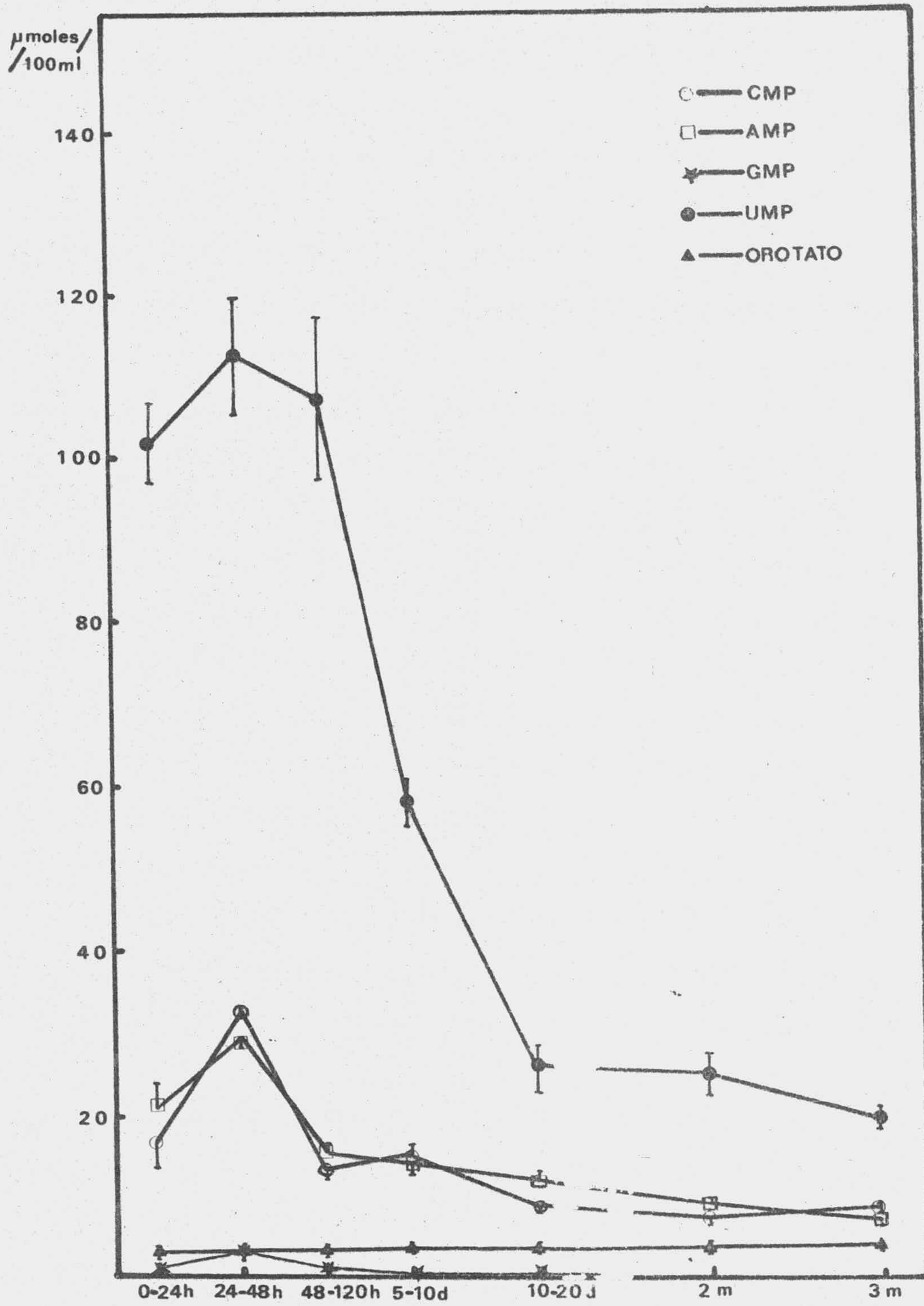
Chromatografía de los nucleótidos correspondientes a 50 ml de leche de oveja, 1 mes de lactación. La densidad óptica máxima a 260 nm de la fracción UDPG y UDPGa es 7.300.



131

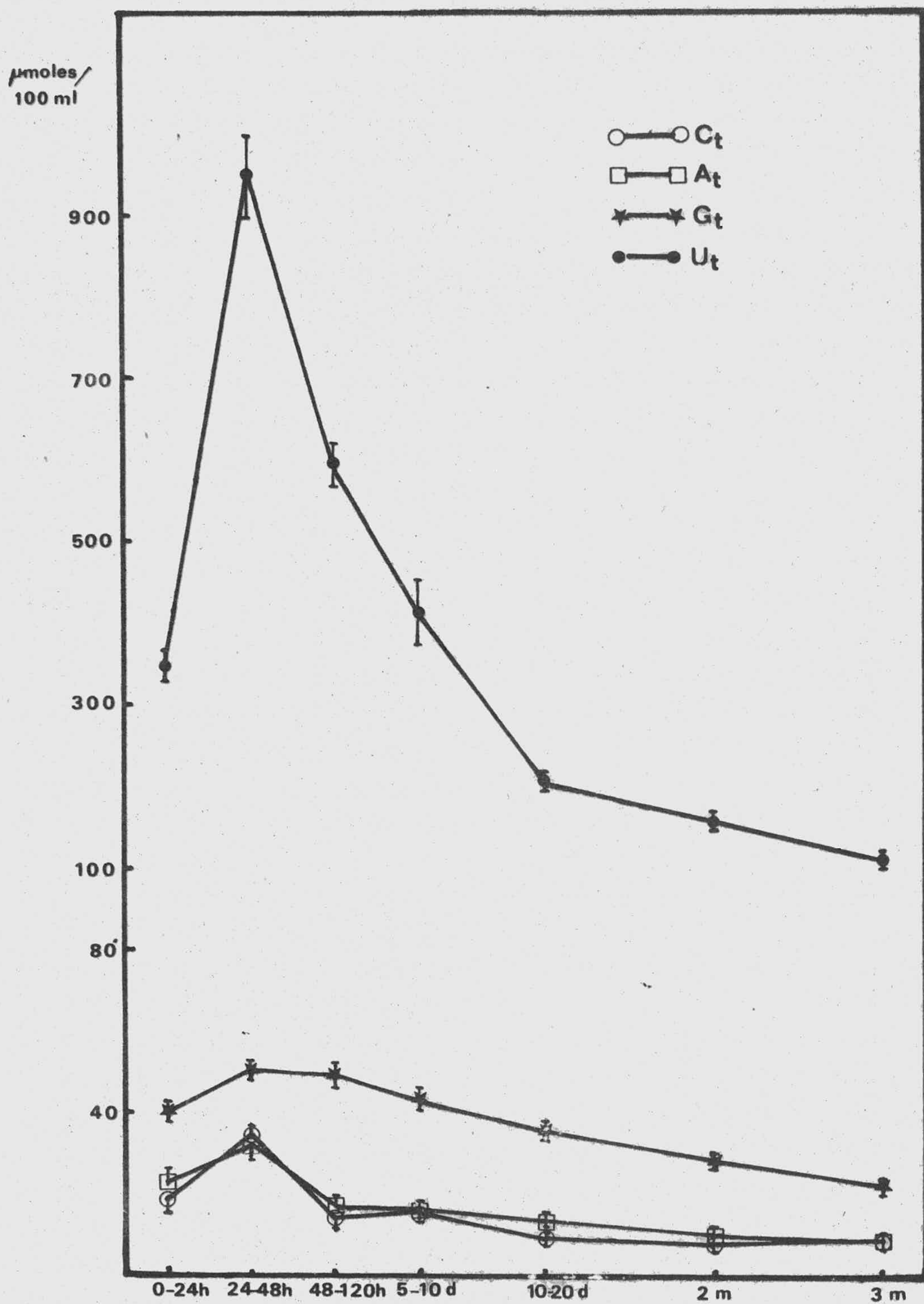
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche de oveja, 2 meses de lactación. Las densidades ópticas máximas a 260 nm de las fracciones UDP-N-AG y UDP-N-AGa y UDPG y UDPGa son respectivamente 3.900 y 4.300.

GRAFICA N°19



Evolución del contenido de Orotato, CMP, AMP, GMP y UMP de leche de oveja durante el periodo de lactación.

GRAFICA N° 20



Evolución del contenido de citidín, adenín, guanósín y uridín monofosfatos totales de leche de oveja durante el periodo de lactación.

3.3.-Nucleótidos presentes en leche de cabra: Variación del contenido en nucleótidos durante el periodo de lactación.

Los trabajos publicados sobre el contenido nucleotídico en la leche de cabra se reducen al análisis de una muestra correspondiente al final del periodo de lactación, llevado a cabo por Denamur y col.(14), y un estudio posterior de Johke y col. fundamentalmente cualitativo realizado sobre cuatro muestras de leche correspondientes a 2, 10, 30 y 121 días de lactación (17).

Dada la escasa información existente sobre el contenido en nucleótidos en leche de cabra, se ha procedido a realizar un estudio de los nucleótidos en esta especie, tanto sobre muestras aisladas, analizadas cromatográficamente (Tablas N°20 a N°27 y Gráficas N°21 a N°28), como sobre muestras múltiples, analizadas por métodos enzimáticos (Tabla N°28 y Gráficas N°29 y N°30), desde el momento del parto hasta el fin del periodo de lactación.

El periodo de lactación, al igual que en experiencias anteriores, ha sido dividido en intervalos desiguales. Estos intervalos se han fijado teniendo en cuenta que la concentración de nucleótidos varía rápidamente en los días cercanos al parto, estabilizándose a medida que avanza la lactación.

Los espectros de absorción en el ultravioleta de los nucleótidos aislados de leche de cabra a pH 2 y pH 11 son coincidentes con los obtenidos para leche de otras especies analizadas (Gráfica N°11).

Los derivados de la adenina y guanina, parcialmente identificados y denominados A-X y GDP-X, como ocurre en

otros tipos de leche, presentan los espectros ultravioleta característicos de los nucleótidos monofosfato, si bien los R_f en los desarrollos cromatográficos en papel son distintos. Los GDP derivados, después de hidrólisis clorhídrica, liberan restos glucídicos con movilidad muy reducida en los solventes cromatográficos utilizados en esta memoria. Estos restos glucídicos reaccionan con p-aminobenzaldehído en medio básico, por lo que sin duda contienen algún o algunos grupos amino en su molécula.

TABLA N°20

Contenido en nucleótidos de leche de cabra a las 10 horas de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 4.20 | 3.05 |
| AMP | 5.41 | 3.92 |
| A-X | 0.41 | 0.30 |
| UMP | 7.97 | 5.78 |
| GDP-X | 7.00 | 5.07 |
| OROTATO | 7.56 | 5.48 |
| GDP-Fuc, GDP-Man | 11.01 | 7.98 |
| GDP-X' | 5.97 | 4.33 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 23.87 | 17.31 |
| UDPG, UDPGa | 57.82 | 41.94 |
| UDPGA | 6.65 | 4.82 |

TABLA N°21

Contenido en nucleótidos de leche de cabra a las 48 horas de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 3.94 | 1.50 |
| AMP | 2.31 | 0.88 |
| A-X | 0.82 | 0.31 |
| UMP | 55.86 | 21.25 |
| GDP-X | 8.96 | 3.41 |
| OROTATO | 6.29 | 2.39 |
| GDP-Fuc, GDP-Man GDP-X' | 24.80 | 9.43 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 32.50 | 12.36 |
| UDPG, UDPGa | 120.18 | 45.71 |
| UDPGA | 7.23 | 2.75 |

TABLA N° 22

Contenido en nucleótido de leche de cabra a los 5 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 8.07 | 3.85 |
| AMP | 11.00 | 5.25 |
| IMP | 10.32 | 4.92 |
| UMP | 12.37 | 5.90 |
| GDP-X | 8.01 | 3.82 |
| OROTATO | 9.65 | 4.60 |
| GDP-Man | 12.45 | 5.94 |
| GDP-Fuc GDP-X' | 20.75 | 9.90 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 59.92 | 28.58 |
| UDPG,UDPGa | 52.85 | 25.20 |
| UDPGA | 4.32 | 2.06 |

TABLA N° 23

Contenido en nucleótidos de leche de cabra a los 8 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 5.86 | 3.23 |
| AMP | 6.30 | 3.47 |
| A-X | 0.68 | 0.37 |
| UMP | 12.59 | 6.93 |
| GDP-X | 5.53 | 3.04 |
| OROTATO | 10.36 | 5.70 |
| GDP-Man | 8.12 | 4.47 |
| GDP-Fuc, GDP-X' | 19.19 | 10.57 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 31.54 | 17.37 |
| UDPG,UDPGa | 76.60 | 42.18 |
| UDPGA | 4.85 | 2.67 |

TABLA N° 24

Contenido en nucleótidos de leche de cabra a los 15 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 2.28 | 1.90 |
| AMP | 2.79 | 1.92 |
| A-X | 1.00 | 0.69 |
| GMP | 0.99 | 0.68 |
| UMP | 16.08 | 11.04 |
| GDP-X | 1.32 | 0.91 |
| OROTATO | 2.48 | 1.70 |
| GDP-Man | 4.36 | 2.99 |
| GDP-Fuc, GDP-X' | 13.80 | 9.47 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 28.35 | 19.46 |
| UDPG, UDPGa | 66.15 | 45.41 |
| UDPGA | 6.06 | 4.16 |

TABLA N° 25

Contenido en nucleótidos de leche de cabra al mes de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 3.55 | 3.29 |
| AMP | 4.07 | 3.77 |
| A-X | 0.65 | 0.60 |
| UMP | 12.64 | 11.72 |
| GDP-X | 5.45 | 5.05 |
| OROTATO | 10.22 | 9.48 |
| GDP-Fuc, GDP-Man GDP-X' | 17.18 | 15.93 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 51.06 | 47.34 |
| UDPGA | 3.03 | 2.81 |

TABLA N°26

Contenido en nucleótidos de leche de cabra a los 3 meses de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 6.00 | 4.20 |
| AMP | 9.52 | 6.66 |
| UMP | 20.86 | 14.59 |
| GDP-X | 7.50 | 5.24 |
| OROTATO | 14.05 | 9.82 |
| GDP-Fuc, GDP-Man | 16.96 | 11.86 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 68.10 | 47.62 |

TABLA N°27

Contenido en nucleótidos de leche de cabra a los 4 meses de lactación.

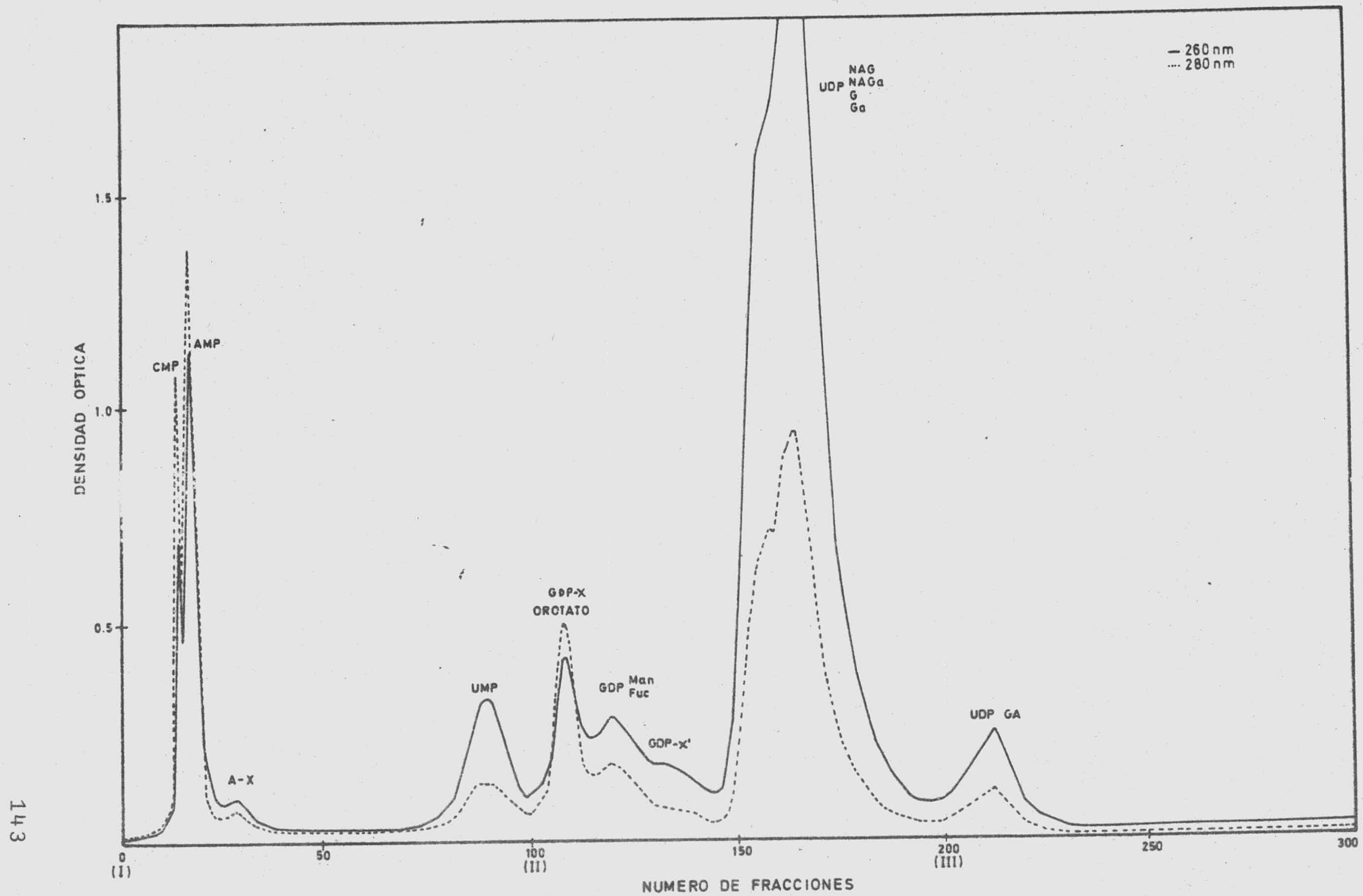
| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 6.49 | 9.37 |
| AMP | 3.63 | 5.24 |
| UMP | 8.30 | 11.99 |
| GDP-X | 6.90 | 9.96 |
| OROTATO | 12.93 | 18.67 |
| GDP-Man | 6.21 | 8.96 |
| GDP-Fuc, GDP-X' | 5.70 | 8.23 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 8.72 | 12.59 |
| UDPG, UDPGa | 9.55 | 13.79 |
| UDPGA | 0.81 | 1.17 |

TABLA N°28

Contenido en nucleótidos de leche de cabra en diferentes periodos de lactación. Los nucleótidos se han medido mediante métodos enzimáticos y se expresan como valores medios en $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ de leche. El \pm representa el error estándar de la media y n el número de muestras analizadas.

| Periodo de lactación | 0-24 horas | 24-48 horas | 48-120 horas | 5-10 días | 10-20 días | 1 mes | 2 meses |
|----------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| n | 6 | 5 | 6 | 6 | 7 | 6 | 7 |
| OROTATO | 5.56 \pm 1.22 | 7.65 \pm 0.37 | 9.24 \pm 0.54 | 11.07 \pm 0.37 | 10.68 \pm 1.42 | 11.61 \pm 0.72 | 11.87 \pm 0.53 |
| CMP | 4.06 \pm 0.44 | 6.45 \pm 0.68 | 6.75 \pm 0.46 | 5.33 \pm 0.33 | 4.99 \pm 0.47 | 4.91 \pm 0.30 | 5.40 \pm 0.30 |
| AMP | 3.78 \pm 0.48 | 4.70 \pm 0.41 | 8.34 \pm 0.79 | 6.27 \pm 0.44 | 5.08 \pm 1.16 | 6.10 \pm 0.65 | 6.73 \pm 0.55 |
| GMP | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| UMP | 5.99 \pm 0.86 | 53.77 \pm 0.76 | 13.93 \pm 1.23 | 12.01 \pm 0.60 | 12.33 \pm 1.54 | 14.33 \pm 0.62 | 14.48 \pm 1.24 |
| UDPG | 24.65 \pm 2.42 | 60.66 \pm 3.41 | 35.91 \pm 0.88 | 35.82 \pm 1.07 | 29.31 \pm 1.26 | 26.10 \pm 1.32 | 19.64 \pm 1.67 |
| UDPGa | 23.48 \pm 2.47 | 58.00 \pm 3.89 | 33.53 \pm 1.08 | 43.13 \pm 1.14 | 27.80 \pm 1.53 | 22.86 \pm 1.40 | 17.23 \pm 1.44 |
| C _t | 4.35 \pm 0.39 | 6.52 \pm 0.57 | 6.78 \pm 0.39 | 5.49 \pm 0.31 | 5.16 \pm 0.50 | 5.10 \pm 0.26 | 5.53 \pm 0.25 |
| A _t | 4.12 \pm 0.52 | 5.26 \pm 0.39 | 8.81 \pm 0.85 | 6.75 \pm 0.65 | 5.49 \pm 0.46 | 6.45 \pm 0.65 | 6.76 \pm 0.48 |
| G _t | 19.99 \pm 1.28 | 34.14 \pm 1.19 | 33.96 \pm 2.21 | 29.51 \pm 0.68 | 23.17 \pm 1.36 | 24.58 \pm 1.11 | 22.74 \pm 1.23 |
| U _t | 75.98 \pm 9.96 | 215.11 \pm 6.97 | 121.15 \pm 3.80 | 118.92 \pm 2.96 | 111.33 \pm 4.10 | 92.24 \pm 3.41 | 73.09 \pm 4.54 |

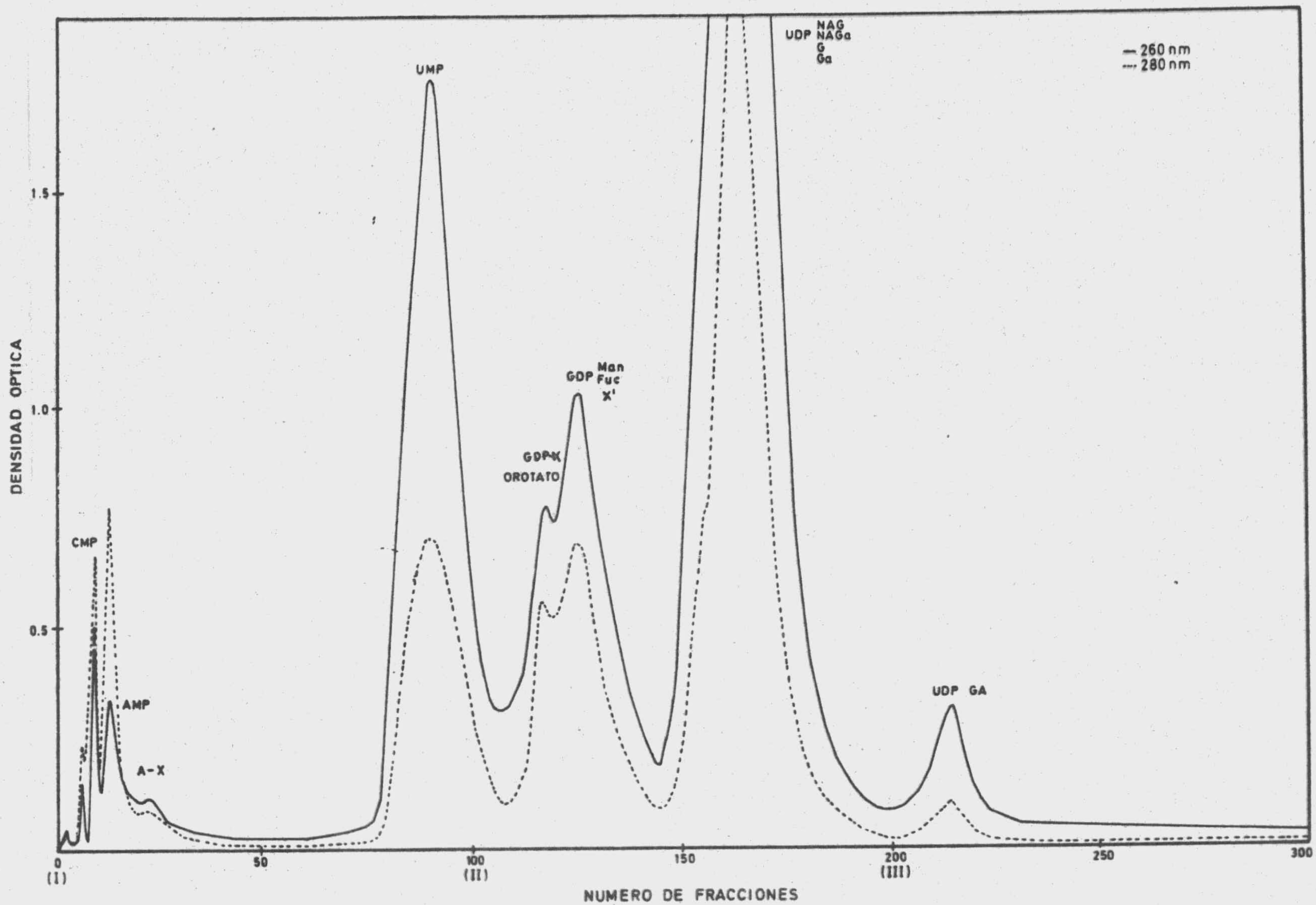
GRAFICA Nº 21



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 50 ml de calostro de cabra, 10 horas de lactación. La densidad óptica máxima a 260 nm para la fracción UDPG y UDPGa es 2.024.

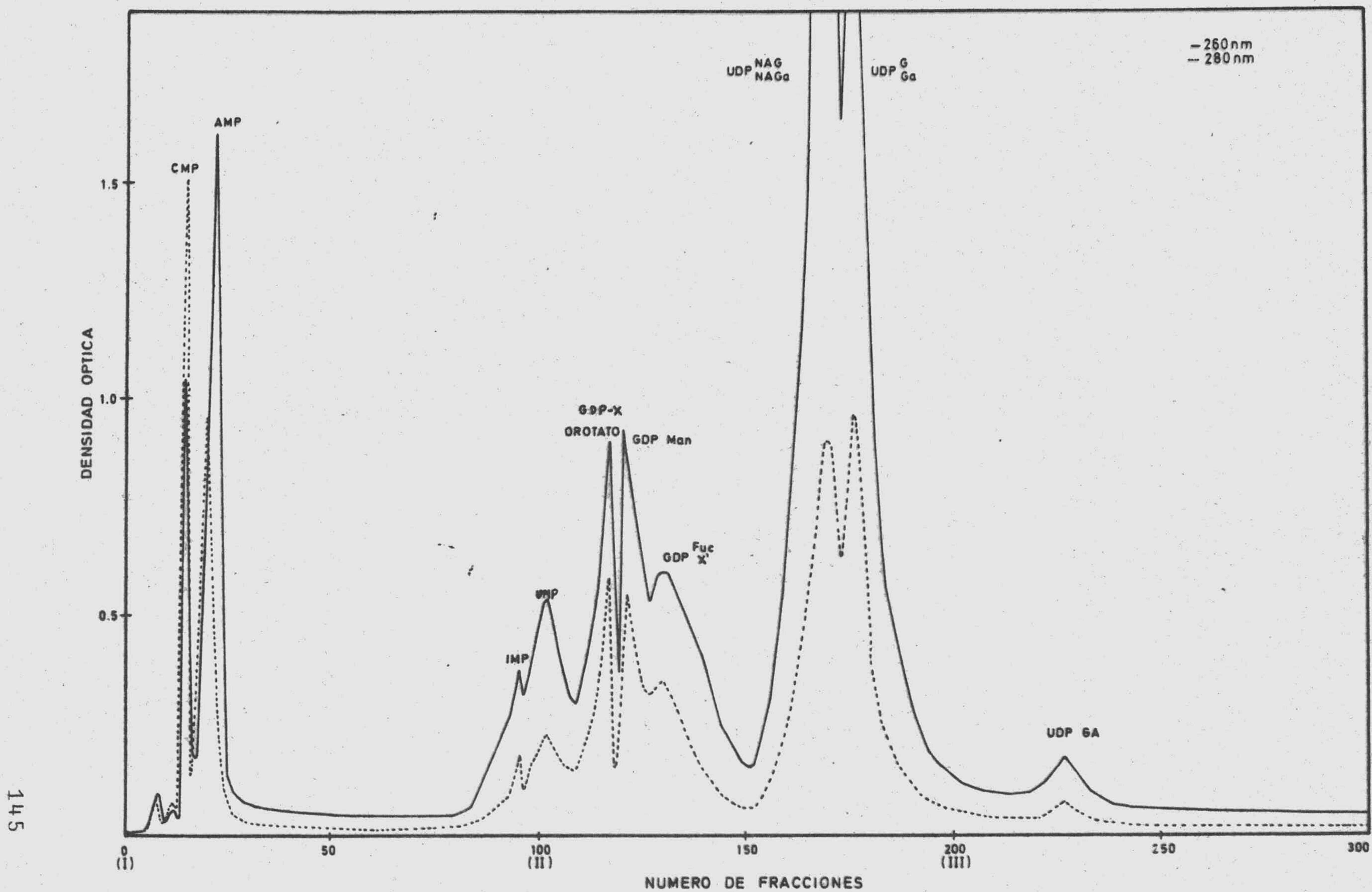
GRAFICA Nº 22

144



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 50 ml de calostro de cabra, 48 horas de lactación. La densidad óptica máxima a 260 nm para la fracción UDPG y UDPGa es 5.370.

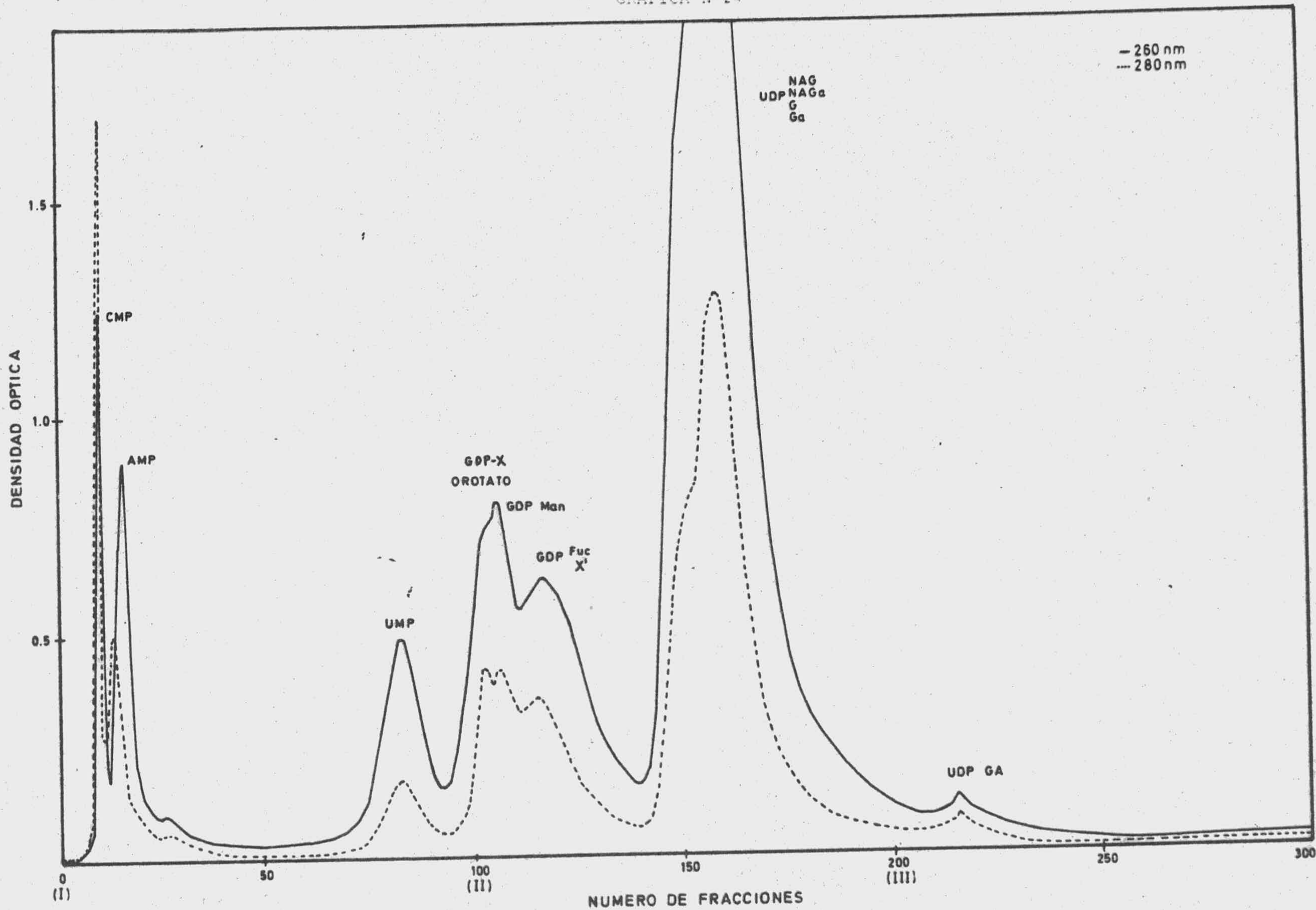
GRAFICA N°23



145

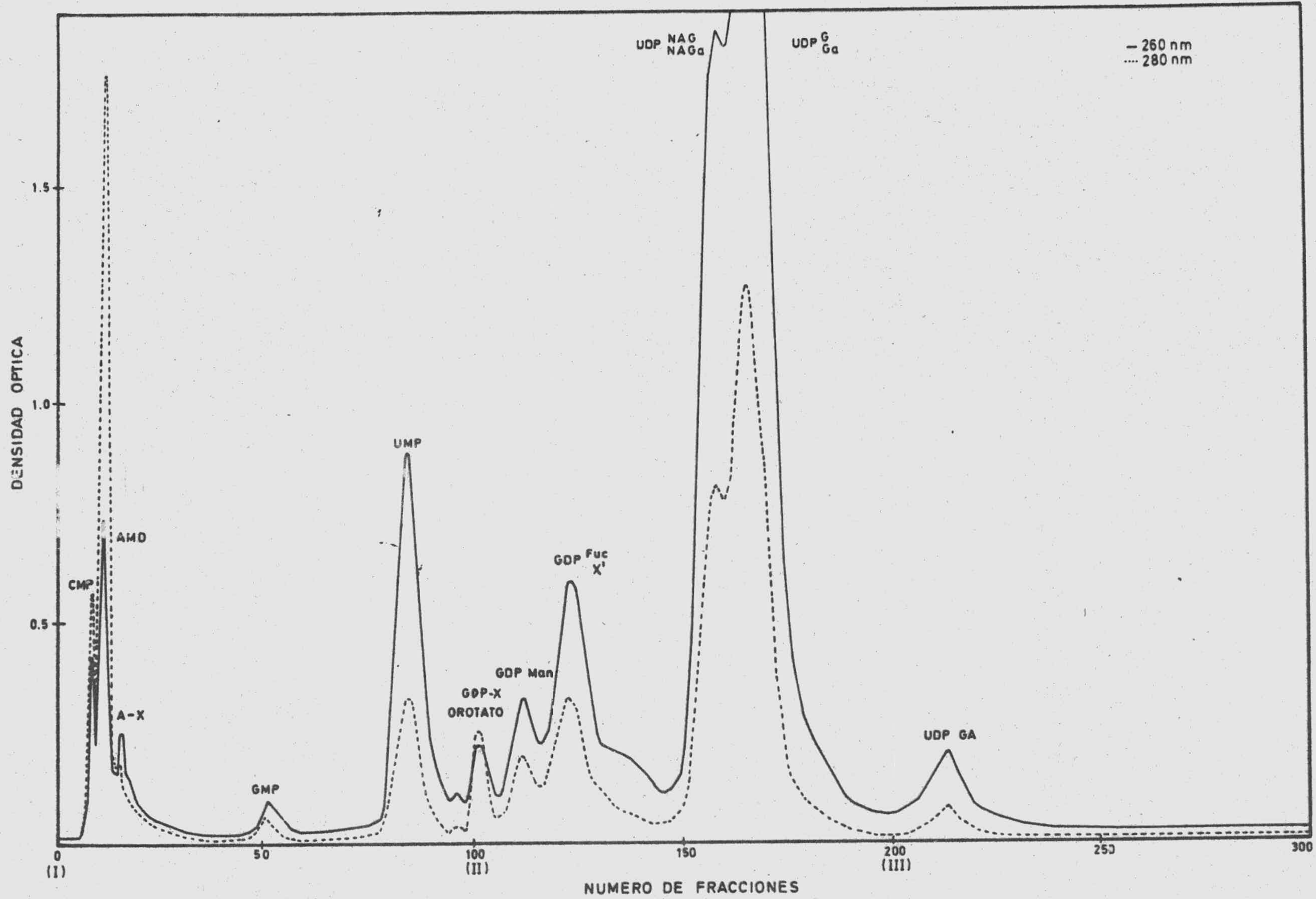
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche de cabra, 5 días de lactación. Las densidades ópticas máximas a 260 nm para las fracciones UDP-N-AG y UDP-N-AGa y UDPG y UDPGa son respectivamente 2.170 y 2.300.

GRAFICA N°24



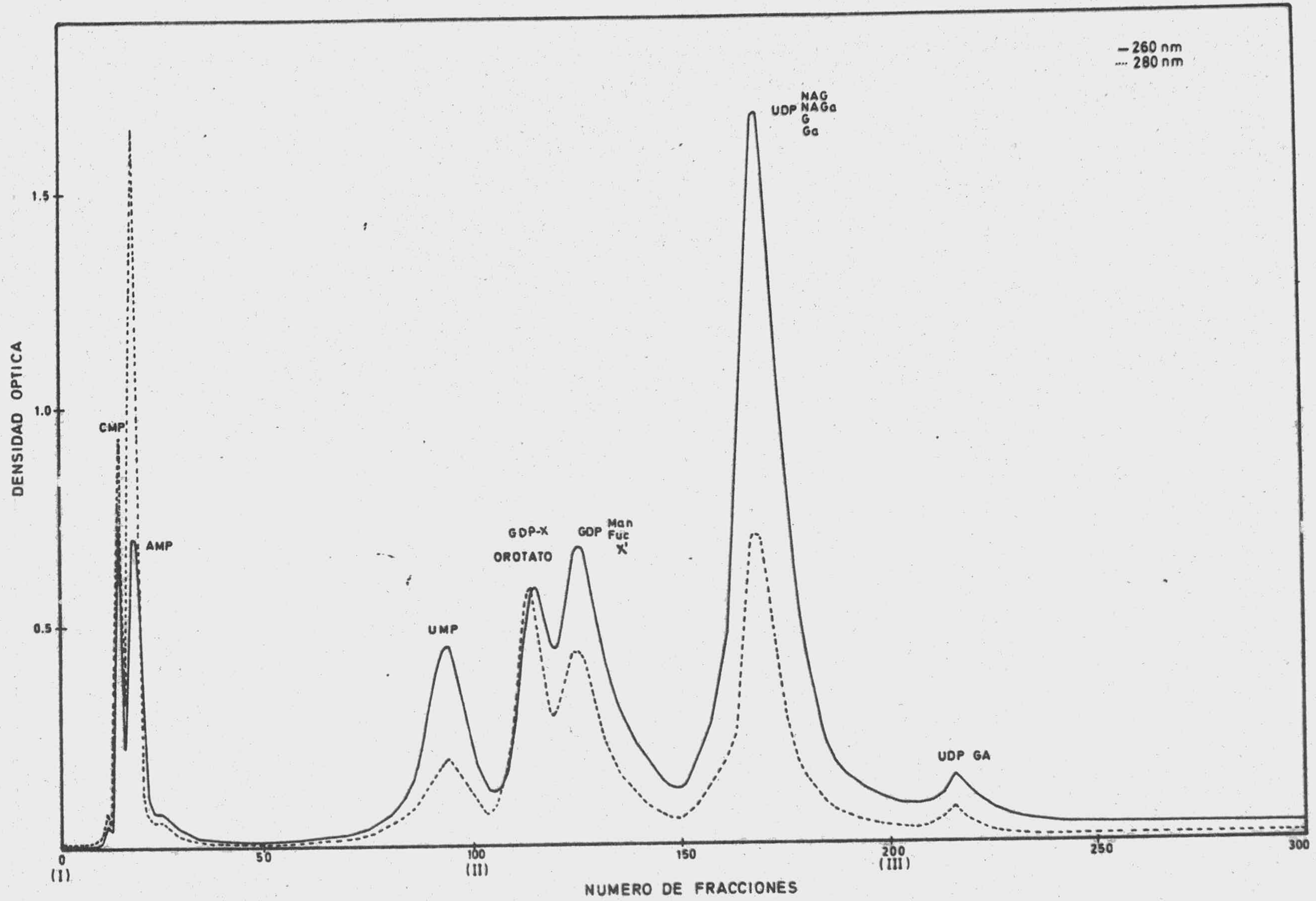
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 50 ml de leche de cabra, 8 días de lactación. La densidad óptica máxima a 260 nm para la fracción UDPG y UDPGa es 2.700.

GRAFICA Nº 25



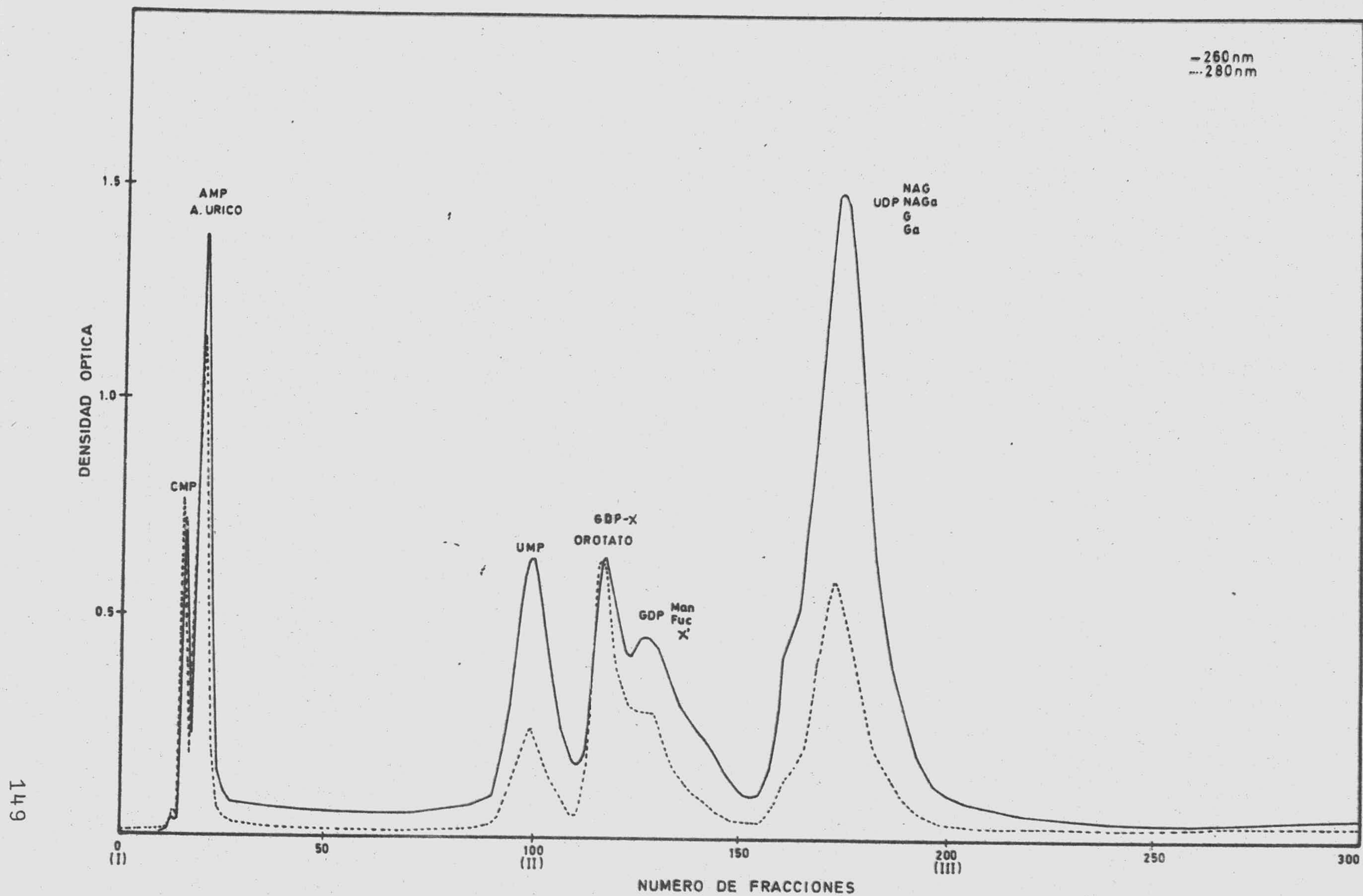
147

Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 50 ml de leche de cabra, 15 días de lactación. La densidad óptica máxima a 260 nm para la fracción UDPG y UDPGa es 3.620.

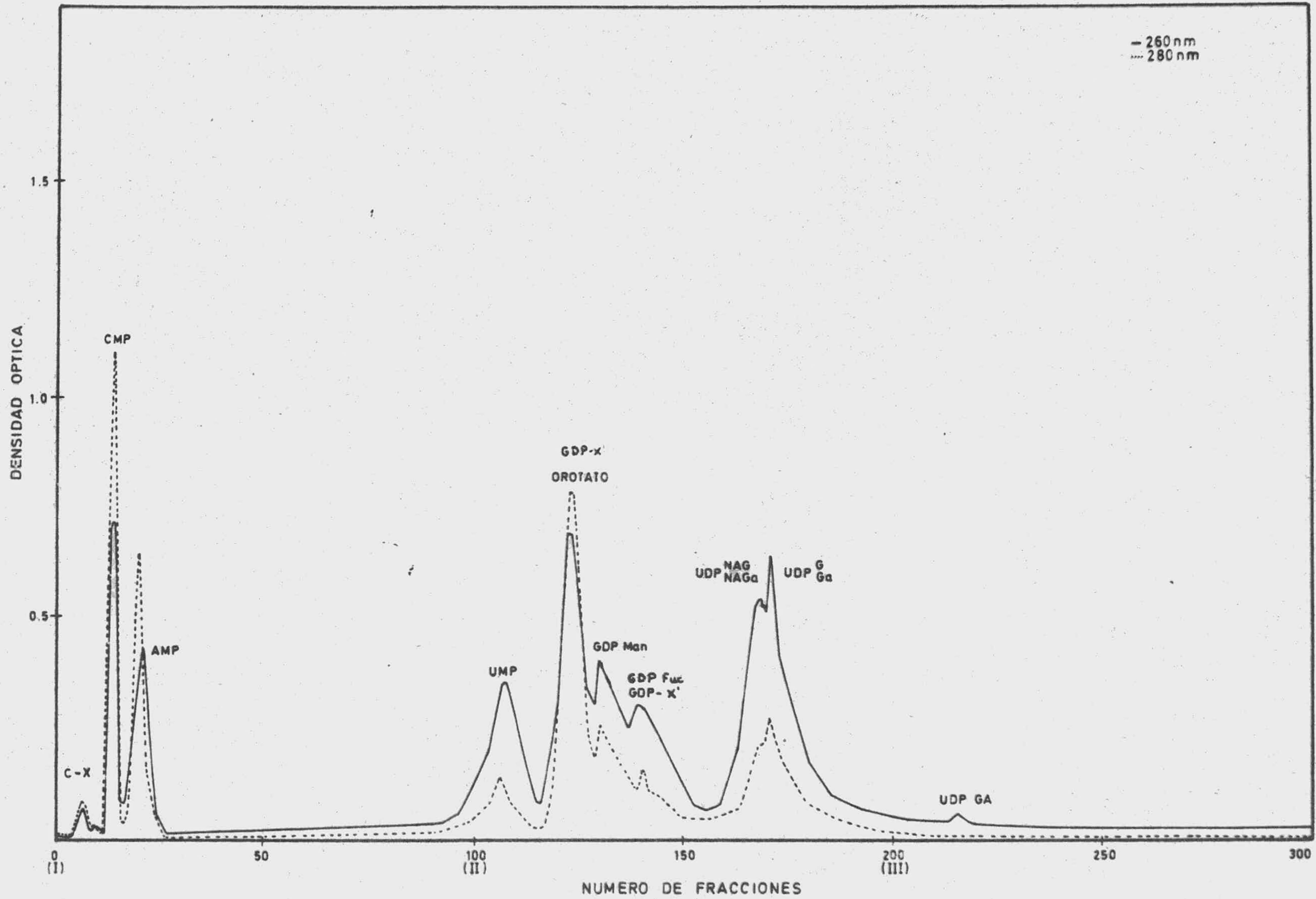


Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche de cabra, 1 mes de lactación.

GRAFICA Nº27

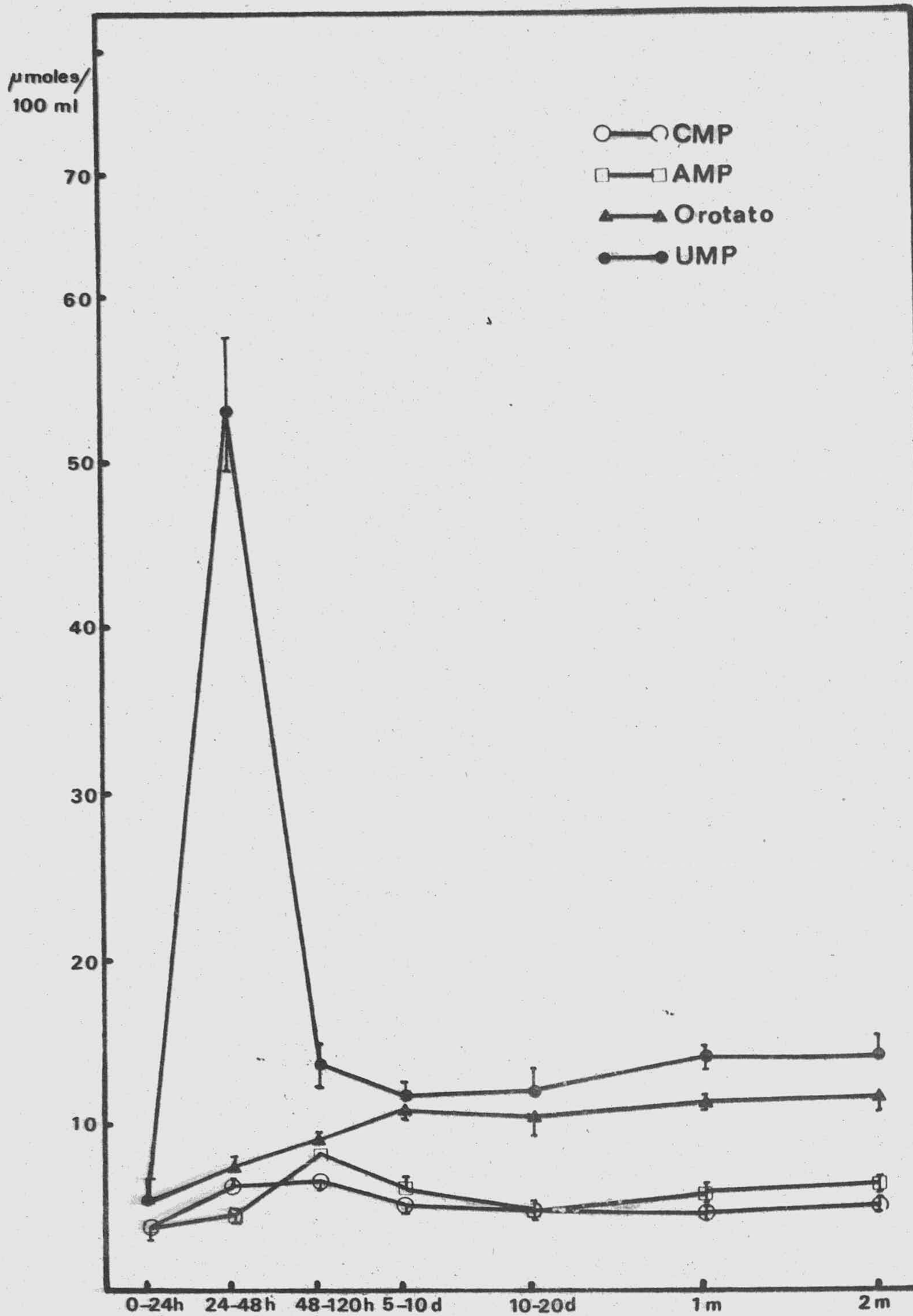


Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche de cabra, 3 meses de lactación.



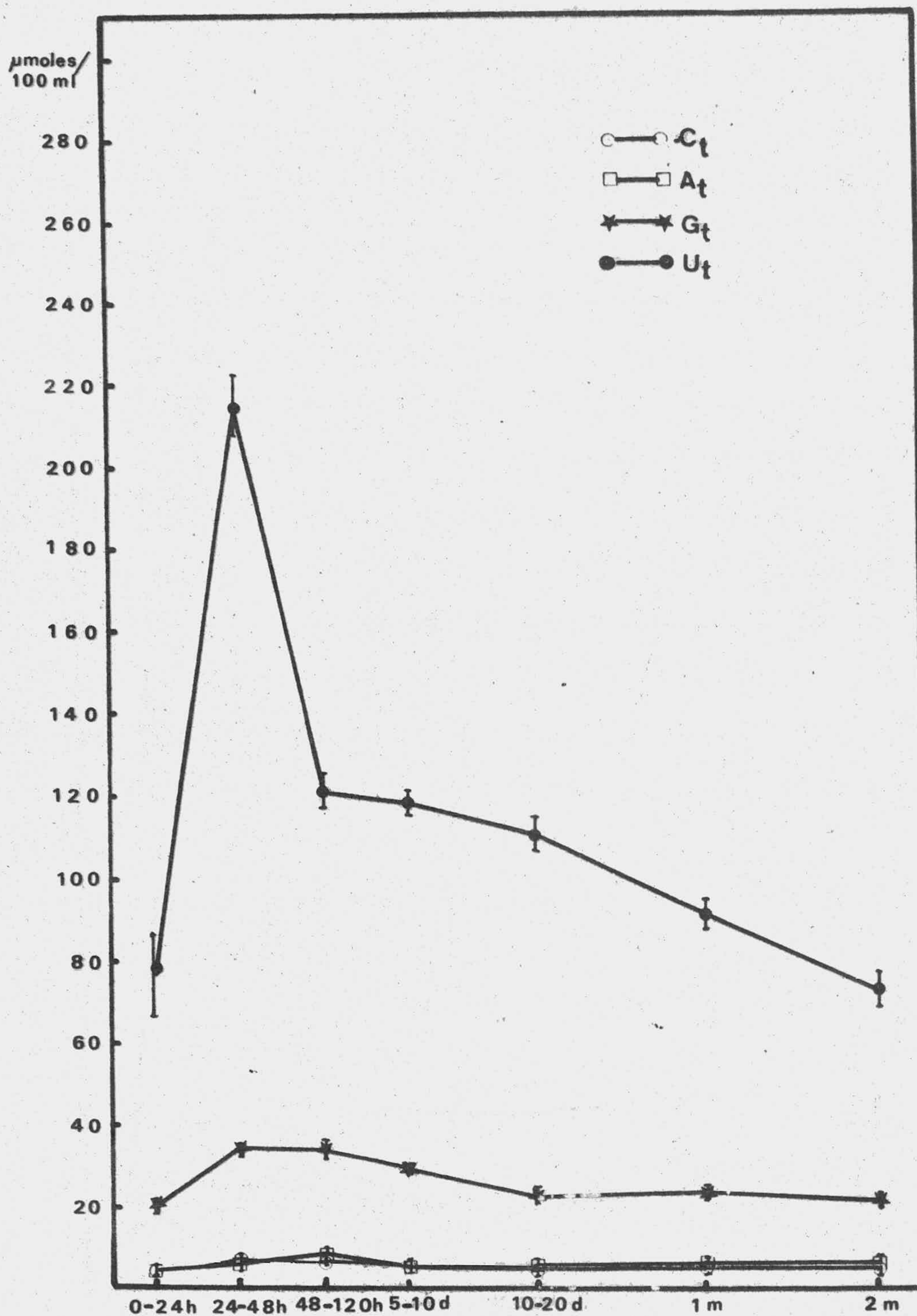
romatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche de cabra, 4 meses de lactación.

GRAFICA N°29



Evolución del contenido de Orotato, CMP, AMP, GMP y UMP de leche de cabra durante el periodo de lactación.

GRAFICA N° 30



Evolución del contenido de citidín, adenín, guanósín y uridín monofosfatos totales de leche de cabra durante el periodo de lactación.

3.4.-Nucleótidos presentes en leche humana: Variación del contenido en nucleótidos durante el periodo de lactación.

Los estudios llevados a cabo para dilucidar la composición nucleotídica de leche humana se reducen tan solo a la referencia de datos no publicados (15) (17) y a la somera investigación realizada por Takeda Chemical Industries Ltd. que resume en su patente 3,231,385 US (137).

Resultaba, pues, necesario acometer un estudio de los nucleótidos presentes en leche humana que tuviese como objetivo establecer las variaciones de estos compuestos durante el periodo de lactación. En efecto, se han analizado por métodos cromatográficos (Tablas N°29 a N°34 y Gráficas N°31 a N°36) y enzimáticos (Tabla N°35 y Gráficas N°37 y N°38) el contenido de nucleótidos presentes en 33 muestras de leche humana correspondientes a seis periodos de lactación diferentes.

La división en intervalos del periodo de lactación ha seguido el mismo criterio que en anteriores apartados.

Hasta después de las primeras 36 horas desde el momento del parto no se pudieron analizar muestras de secreción calostrál ya que el volumen obtenido de dicha secreción fué insignificante para llevar a cabo todo el proceso analítico descrito en la presente memoria.

Los espectros de absorción en el ultravioleta de los nucleótidos aislados de la leche humana a pH 2 y pH 11 son exactamente iguales, como era de esperar, a los obtenidos para leche de vaca (Gráfica N°11).

Los compuestos A-X y C-X corresponden a dos nucleótidos no identificados que presentan las mismas características que los hallados en leche de otras especies analizadas.

A manera de resumen de los resultados expuestos hasta este momento y con objeto de mostrar clara y separadamente la evolución de cada uno de los nucleótidos estudiados en los distintos tipos de leche ,se han agrupado dichos resultados en las Gráficas N°39,N°40 y N°41.

TABLA N°29

Contenido en nucleótidos de leche humana a las 48 horas de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 5.51 | 30.56 |
| AMP | 3.34 | 18.52 |
| A-X | 0.69 | 3.82 |
| GMP | 0.33 | 1.83 |
| UMP | 1.77 | 9.82 |
| GDP-Man | 0.53 | 2.94 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 4.45 | 24.68 |
| UDP | 1.41 | 7.82 |

TABLA N°30

Contenido en nucleótidos de leche humana a los 3 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 3.45 | 27.03 |
| AMP | 2.41 | 18.89 |
| GMP | 0.36 | 2.82 |
| UMP | 1.32 | 10.34 |
| GDP-Man | 0.97 | 7.60 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 3.57 | 27.98 |
| UDP | 0.68 | 5.33 |

TABLA N° 31

Contenido en nucleótidos de leche humana a los 6 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 0.35 | 2.74 |
| CMP | 3.10 | 24.29 |
| AMP | 2.24 | 17.55 |
| A-X | 0.38 | 2.98 |
| GMP | 0.50 | 3.92 |
| UMP | 1.49 | 11.68 |
| GDP-Man | 0.54 | 4.23 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 2.32 | 18.18 |
| UDPG, UDPGa | 1.31 | 10.27 |
| UDP | 0.53 | 4.15 |

TABLA N° 32

Contenido en nucleótidos de leche humana a los 15 días de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 2.64 | 25.50 |
| AMP | 2.60 | 25.12 |
| A-X | 0.41 | 3.96 |
| UMP | 0.70 | 6.76 |
| GDP-Man | 0.46 | 4.44 |
| UDP-N-AG, -N-AGa UDPG, UDPGa | 3.14 | 30.34 |
| UDP | 0.40 | 3.86 |

TABLA N° 33

Contenido en nucleótidos de leche humana al mes de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 0.40 | 3.74 |
| CMP | 1.87 | 17.51 |
| AMP | 2.02 | 18.91 |
| A-X | 0.64 | 5.99 |
| GMP | 0.32 | 3.00 |
| UMP | 1.29 | 12.07 |
| GDP-Man | 0.46 | 4.31 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 19.67 | 2.10 |
| UDPG,UDPGa | 0.82 | 7.68 |
| UDP | 0.76 | 7.12 |

TABLA N° 34

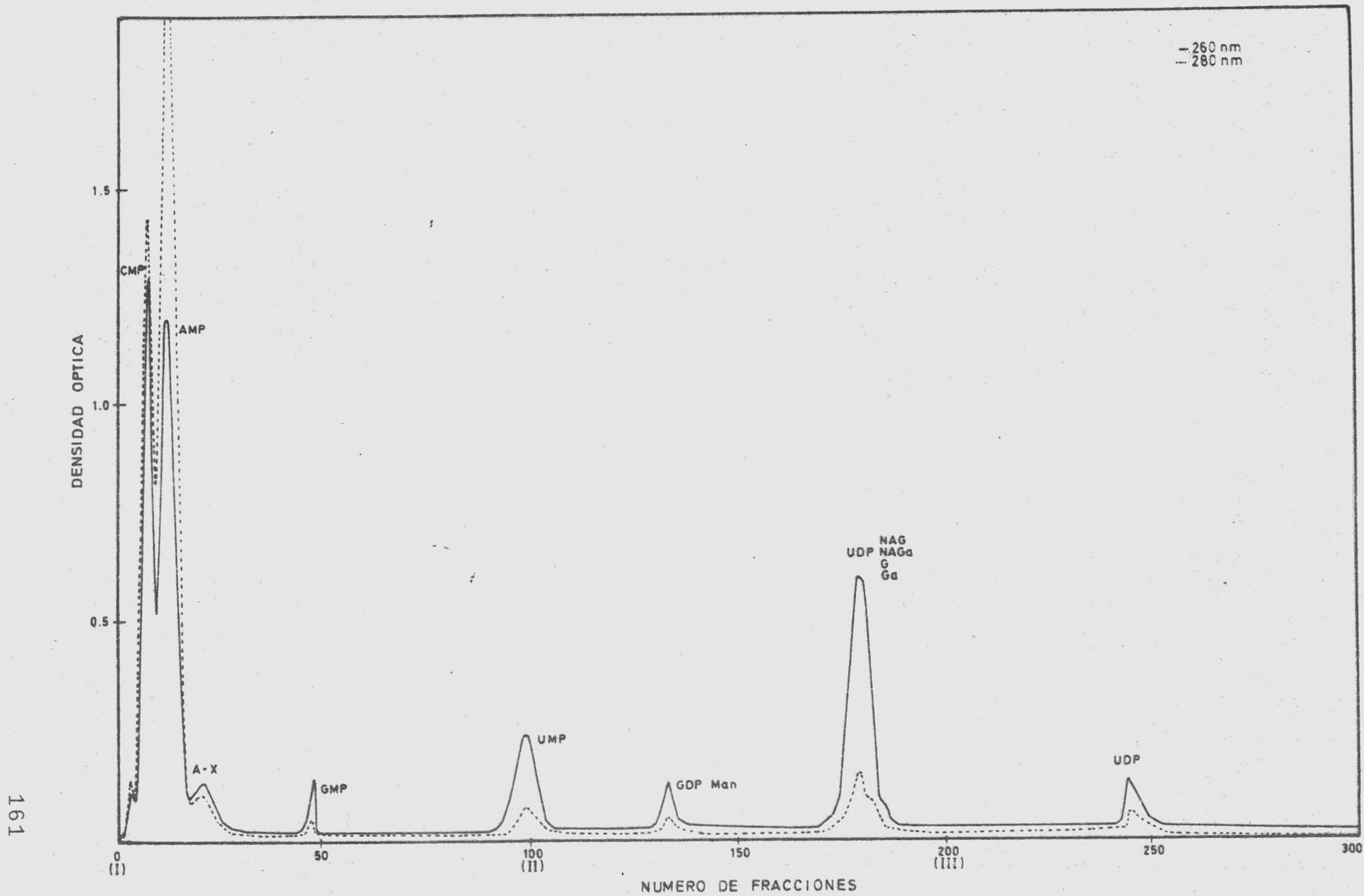
Contenido en nucleótidos de leche humana a los 3 meses de lactación.

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| C-X | 0.73 | 7.42 |
| CMP | 1.83 | 18.62 |
| AMP | 1.51 | 15.36 |
| A-X | 0.53 | 5.39 |
| UMP | 0.93 | 9.46 |
| GDP-Man | 0.44 | 4.48 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 2.20 | 22.38 |
| UDPG,UDPGa | 1.01 | 10.27 |
| UDP | 0.65 | 6.61 |

TABLE No. 35

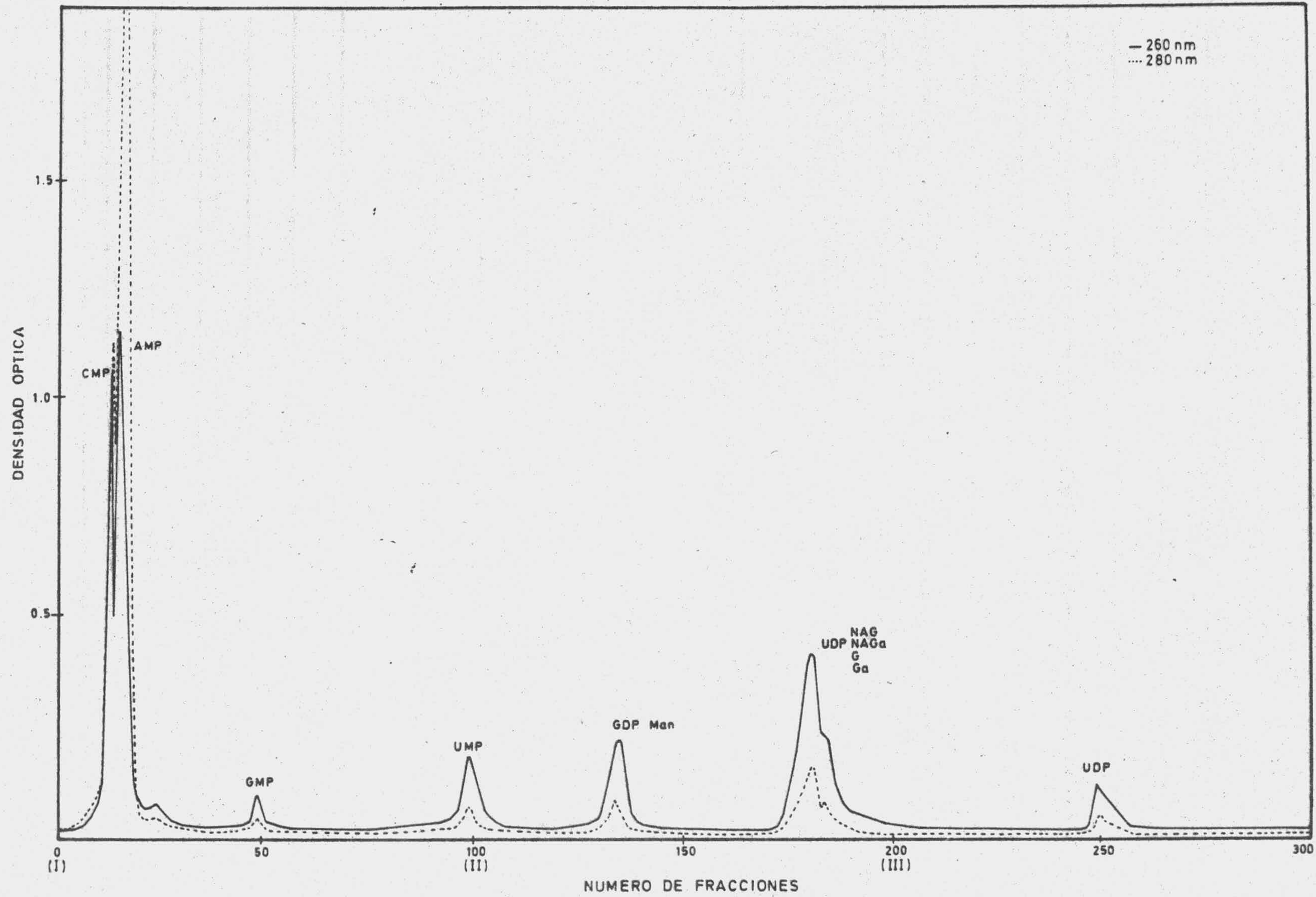
Contenido en nucleótidos de leche humana en diferentes periodos de lactación. Los nucleótidos se han medido mediante métodos enzimáticos y se expresan como valores medios en $\mu\text{moles}/100 \text{ ml}$ de leche. El \pm representa el error estándar de la media y n el número de muestras analizadas.

| Periodo de lactación | 36-48 horas | 48-120 horas | 5-10 días | 10-20 días | 1 mes | 2 meses | 3 meses |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| CRDLACTO | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| CMP | 4.71 \pm 0.20 | 3.60 \pm 0.19 | 3.22 \pm 0.10 | 2.84 \pm 0.10 | 2.15 \pm 0.10 | 1.97 \pm 0.04 | 1.94 \pm 0.04 |
| AMP | 3.29 \pm 0.15 | 3.18 \pm 0.25 | 3.02 \pm 0.13 | 2.84 \pm 0.12 | 2.57 \pm 0.15 | 2.09 \pm 0.11 | 1.97 \pm 0.13 |
| GMP | 0.32 \pm 0.04 | 0.33 \pm 0.03 | 0.33 \pm 0.08 | 0.19 \pm 0.05 | 0.16 \pm 0.03 | 0.16 \pm 0.03 | 0.20 \pm 0.13 |
| UMP | 1.57 \pm 0.17 | 1.31 \pm 0.04 | 1.30 \pm 0.06 | 0.95 \pm 0.08 | 1.20 \pm 0.07 | 1.12 \pm 0.07 | 1.05 \pm 0.05 |
| UDP _G | 1.38 \pm 0.04 | 1.08 \pm 0.04 | 0.96 \pm 0.03 | 0.97 \pm 0.04 | 0.89 \pm 0.03 | 0.95 \pm 0.03 | 0.95 \pm 0.07 |
| UDP _C | 1.37 \pm 0.04 | 1.00 \pm 0.03 | 0.92 \pm 0.02 | 0.93 \pm 0.03 | 0.80 \pm 0.02 | 0.92 \pm 0.02 | 0.88 \pm 0.04 |
| C _t | 4.87 \pm 0.19 | 3.76 \pm 0.12 | 3.29 \pm 0.07 | 2.91 \pm 0.10 | 2.29 \pm 0.12 | 2.12 \pm 0.19 | 2.16 \pm 0.12 |
| A _t | 3.52 \pm 0.23 | 3.38 \pm 0.18 | 3.02 \pm 0.22 | 3.04 \pm 0.07 | 2.80 \pm 0.12 | 2.24 \pm 0.15 | 2.14 \pm 0.06 |
| G _t | 0.82 \pm 0.05 | 1.31 \pm 0.09 | 0.99 \pm 0.05 | 0.66 \pm 0.03 | 0.67 \pm 0.07 | 0.61 \pm 0.04 | 0.62 \pm 0.08 |
| U _t | 7.47 \pm 0.19 | 5.67 \pm 0.27 | 5.21 \pm 0.12 | 4.78 \pm 0.14 | 4.77 \pm 0.16 | 4.98 \pm 0.06 | 4.93 \pm 0.05 |

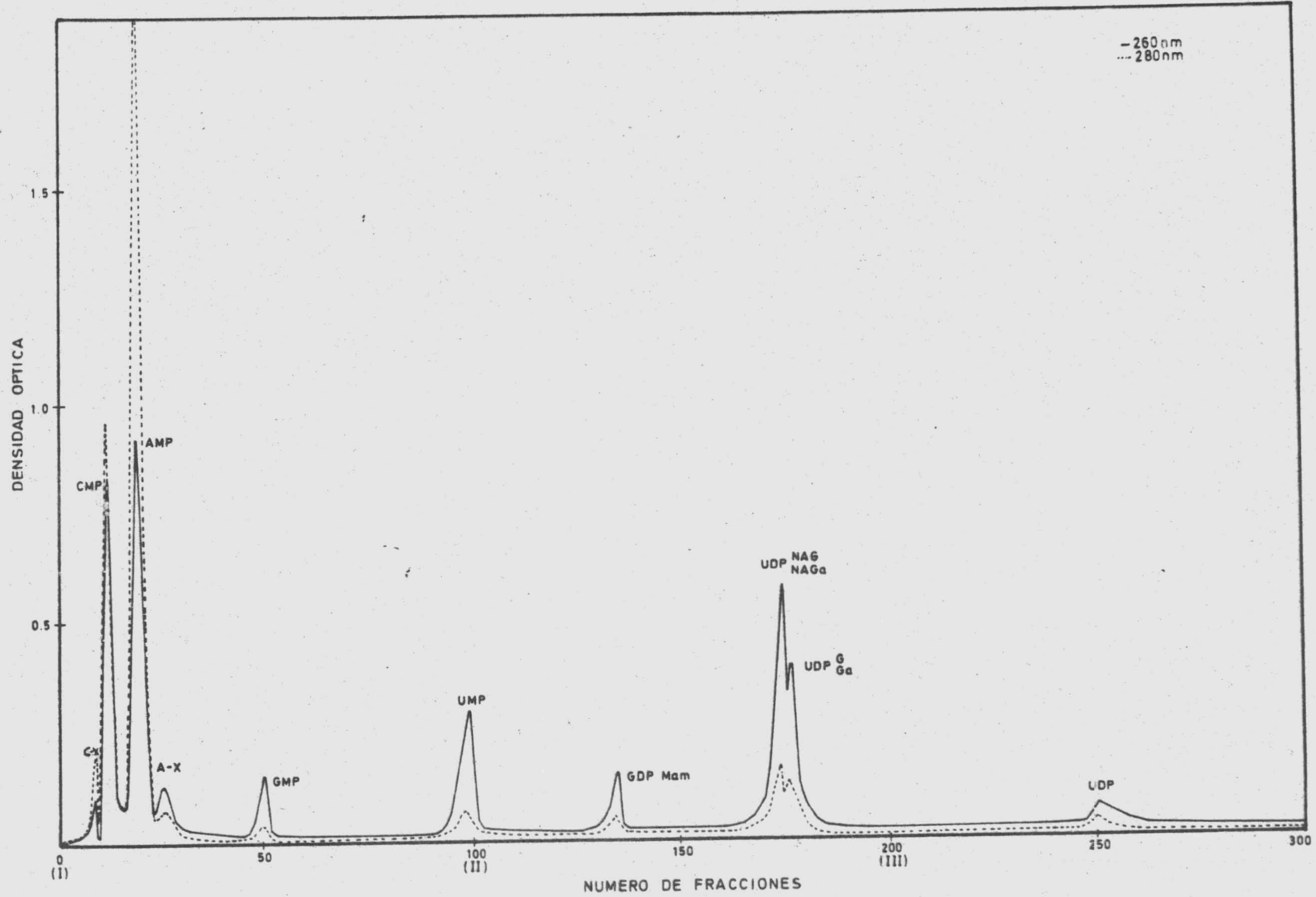


161

Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 100 ml de calostro humano, 48 horas de lactación.

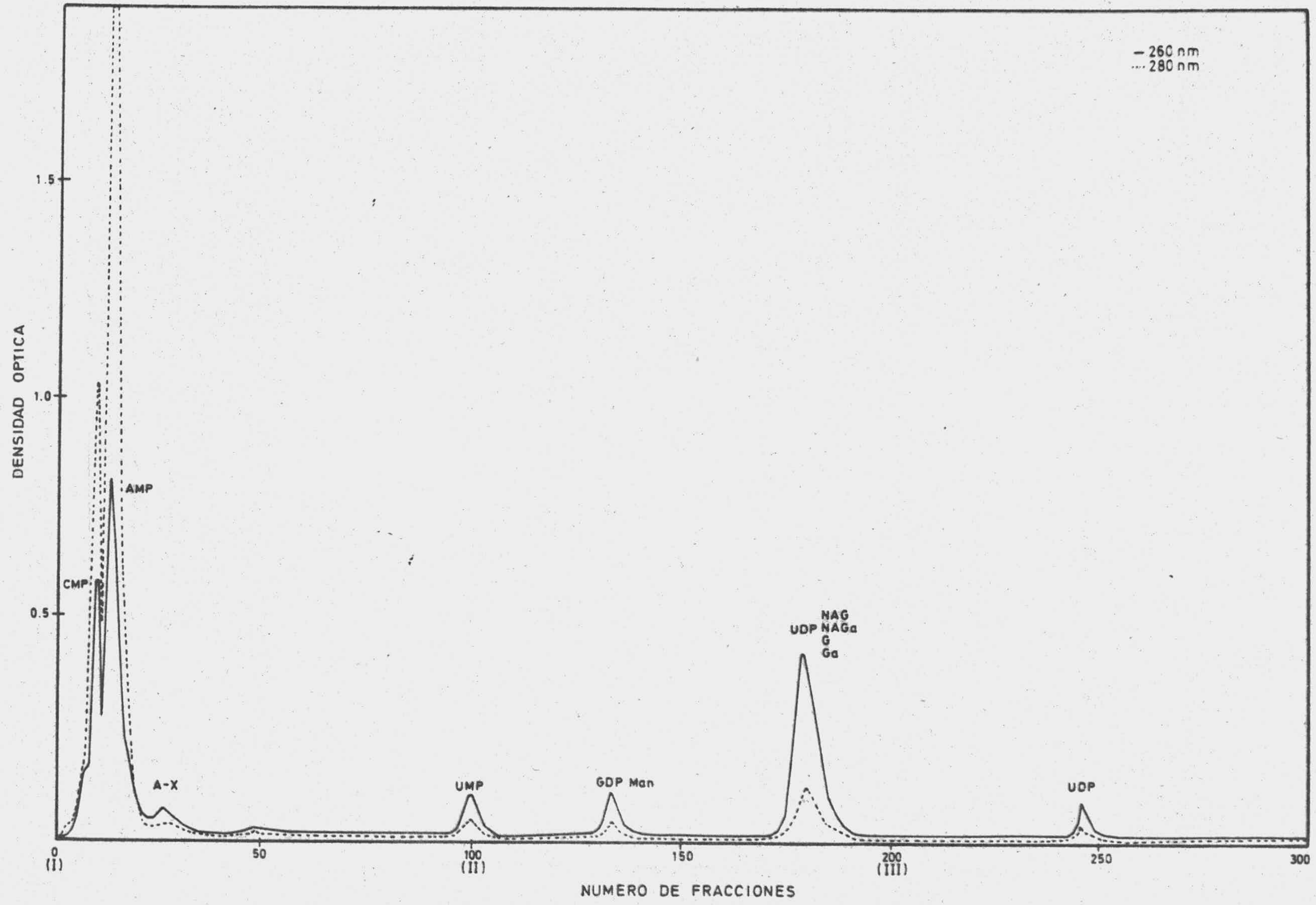


Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 100 ml de calostro humano, 2 días de lactación.



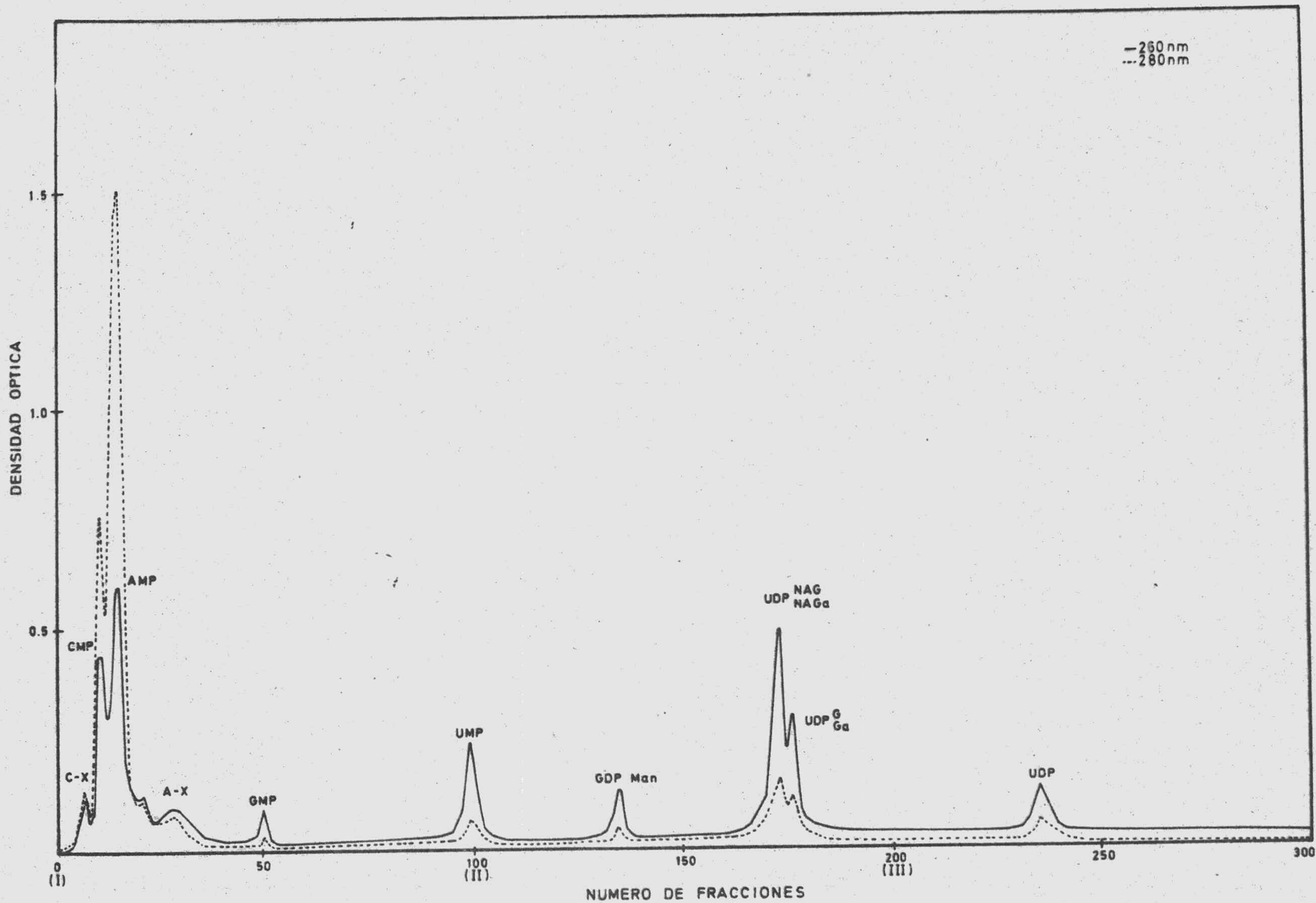
163

Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 100 ml de leche humana, 6 días de lactación.



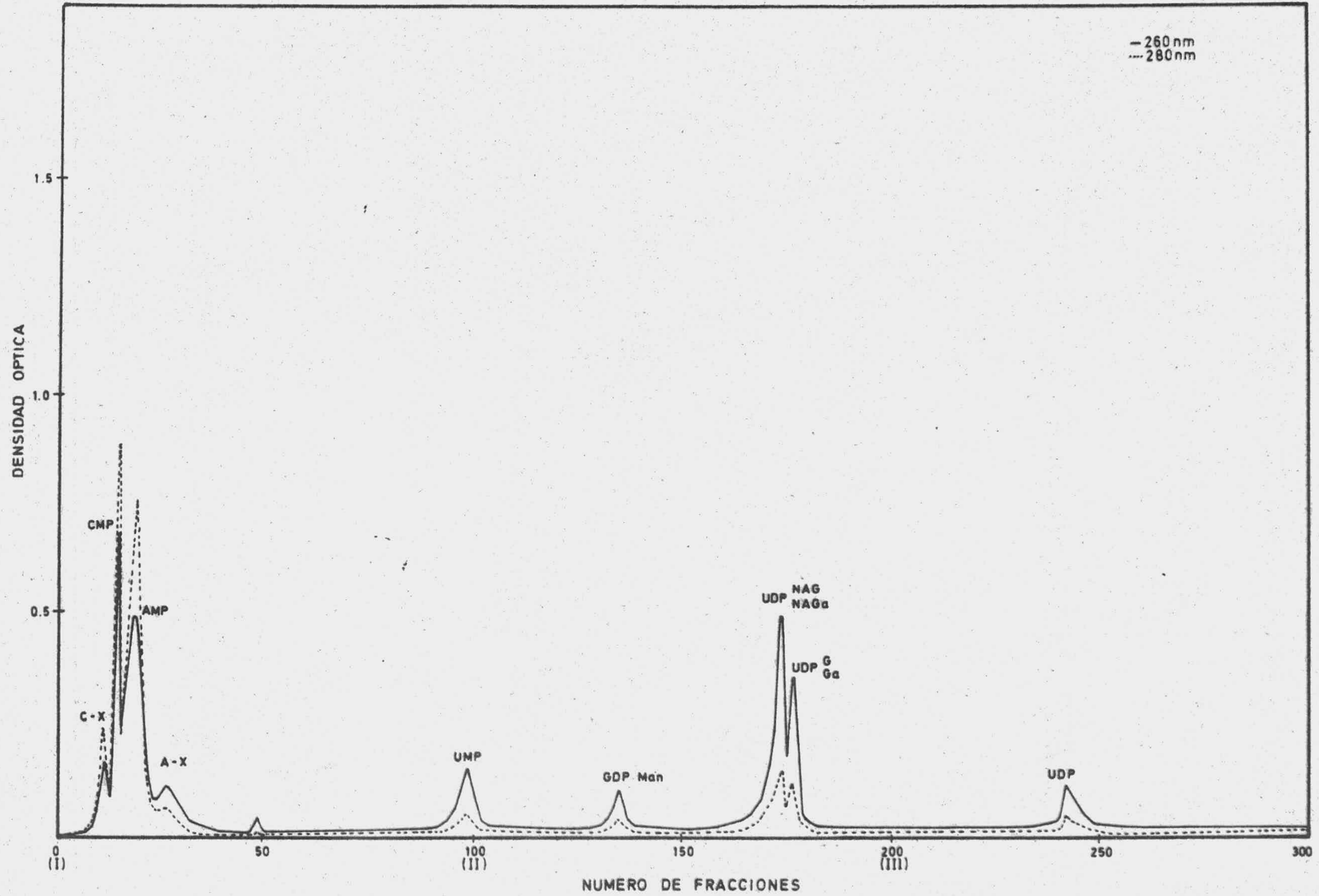
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 100 ml de leche humana, 15 días de lactación.

GRAFICA Nº 35



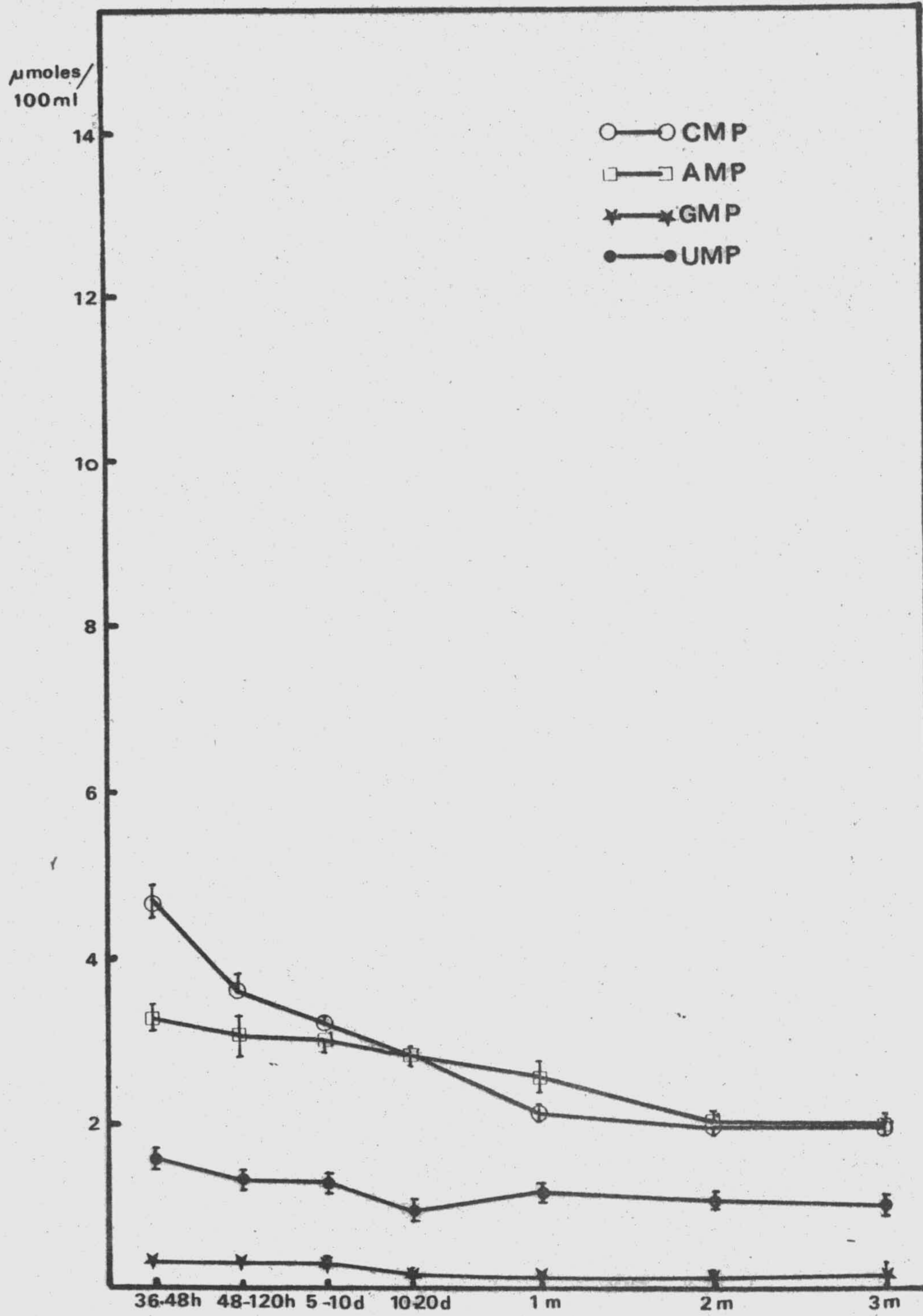
165

Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 100 ml de leche humana, 1 mes de lactación.



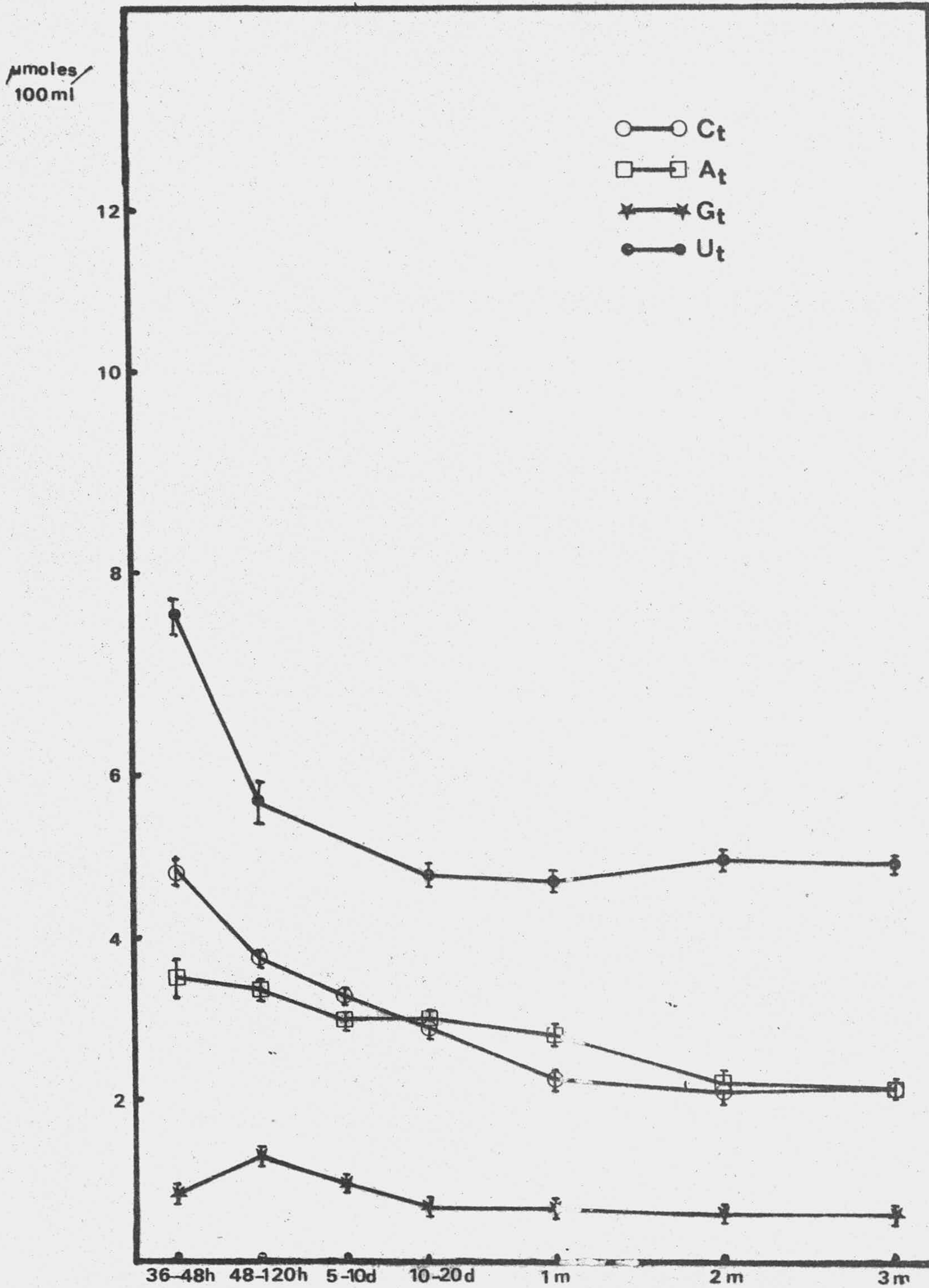
Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 100 ml de leche humana, 3 meses de lactación.

GRAFICA N° 37



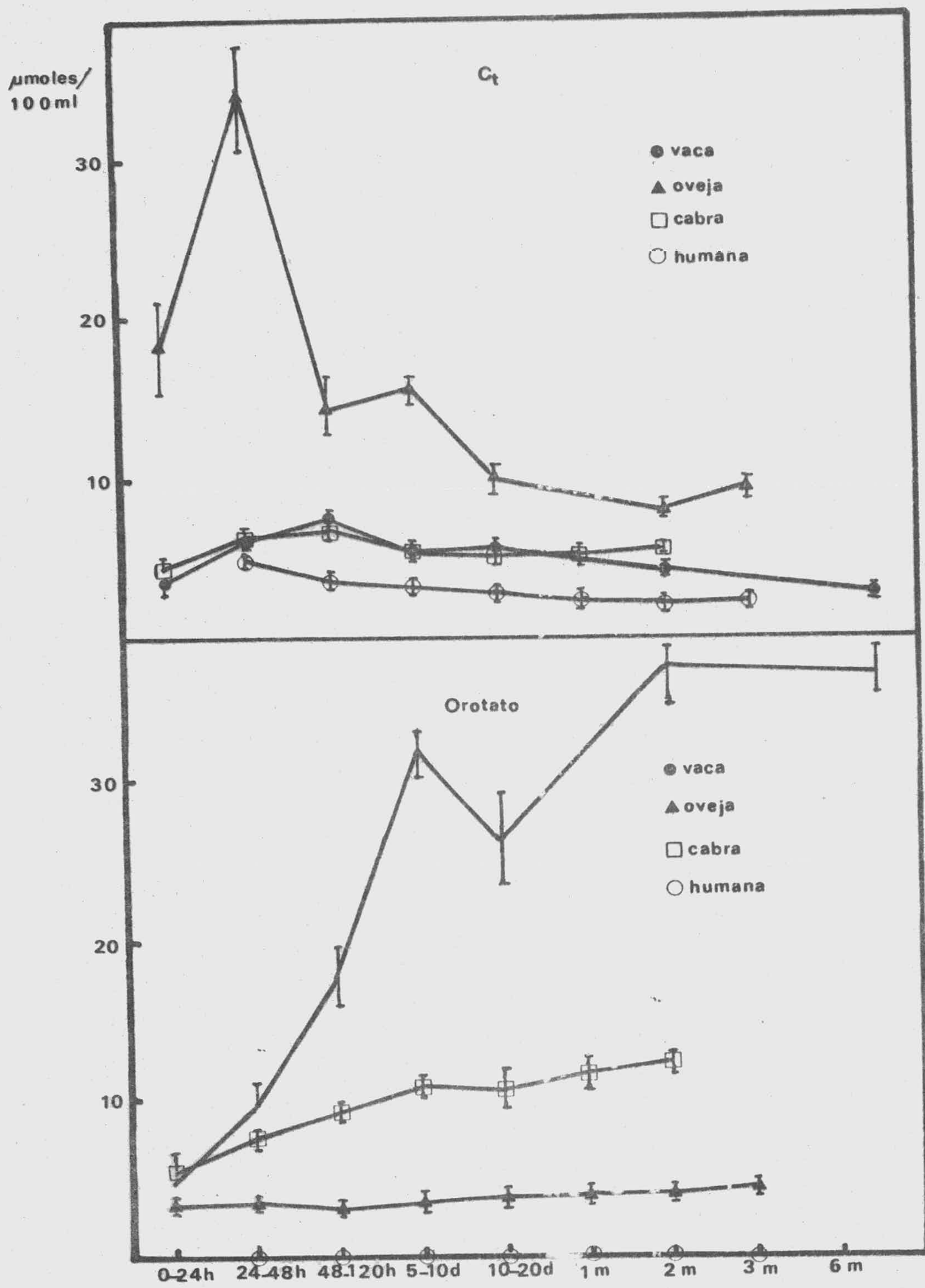
Evolución del contenido de Orotato, CMP, AMP, GMP y UMP de leche humana durante el periodo de lactación.

GRAFICA N° 38



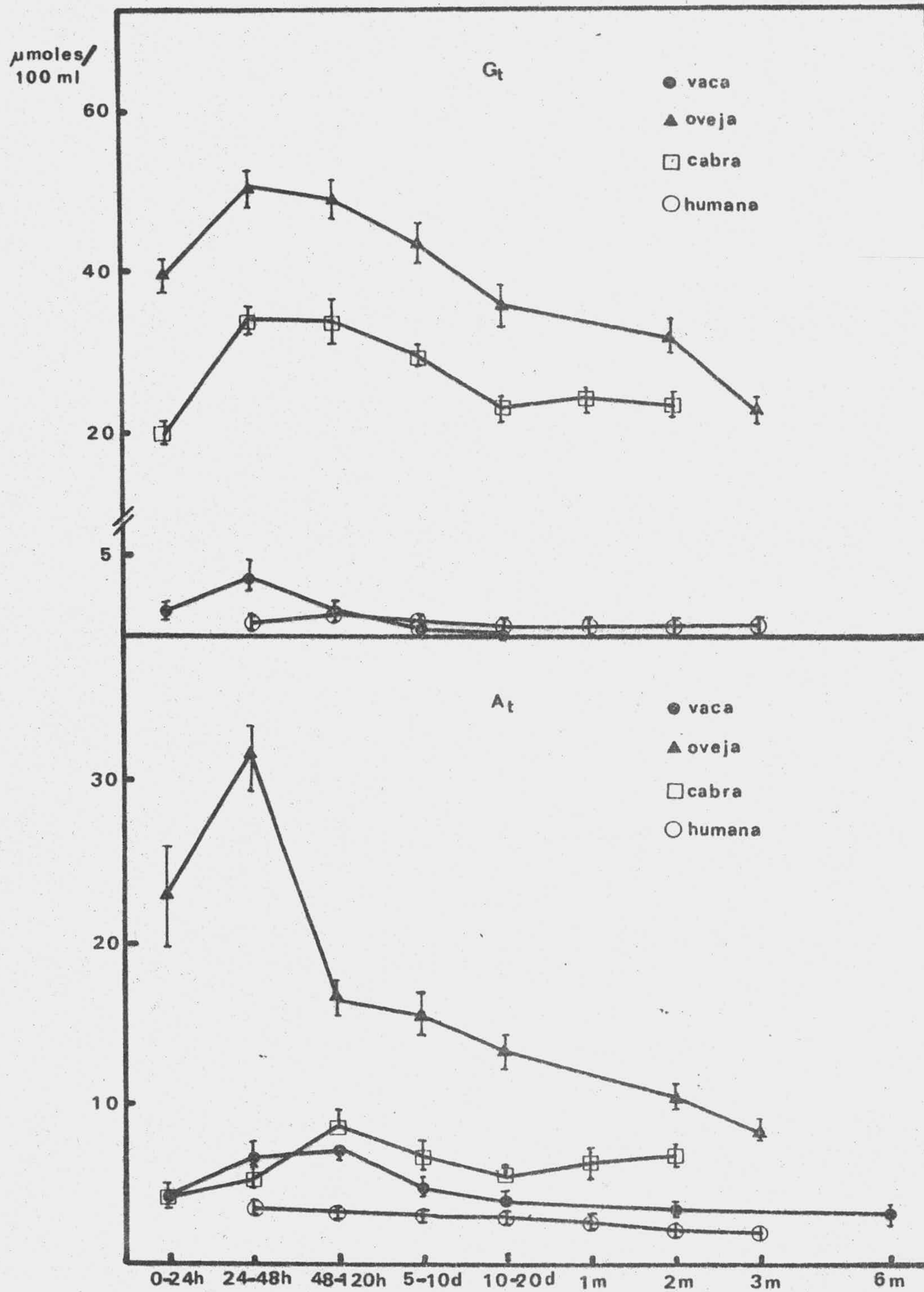
Evolución del contenido de citidín, adenín, guanósín y uridín monofosfatos totales de leche humana durante el periodo de lactación.

GRAFICA N° 39



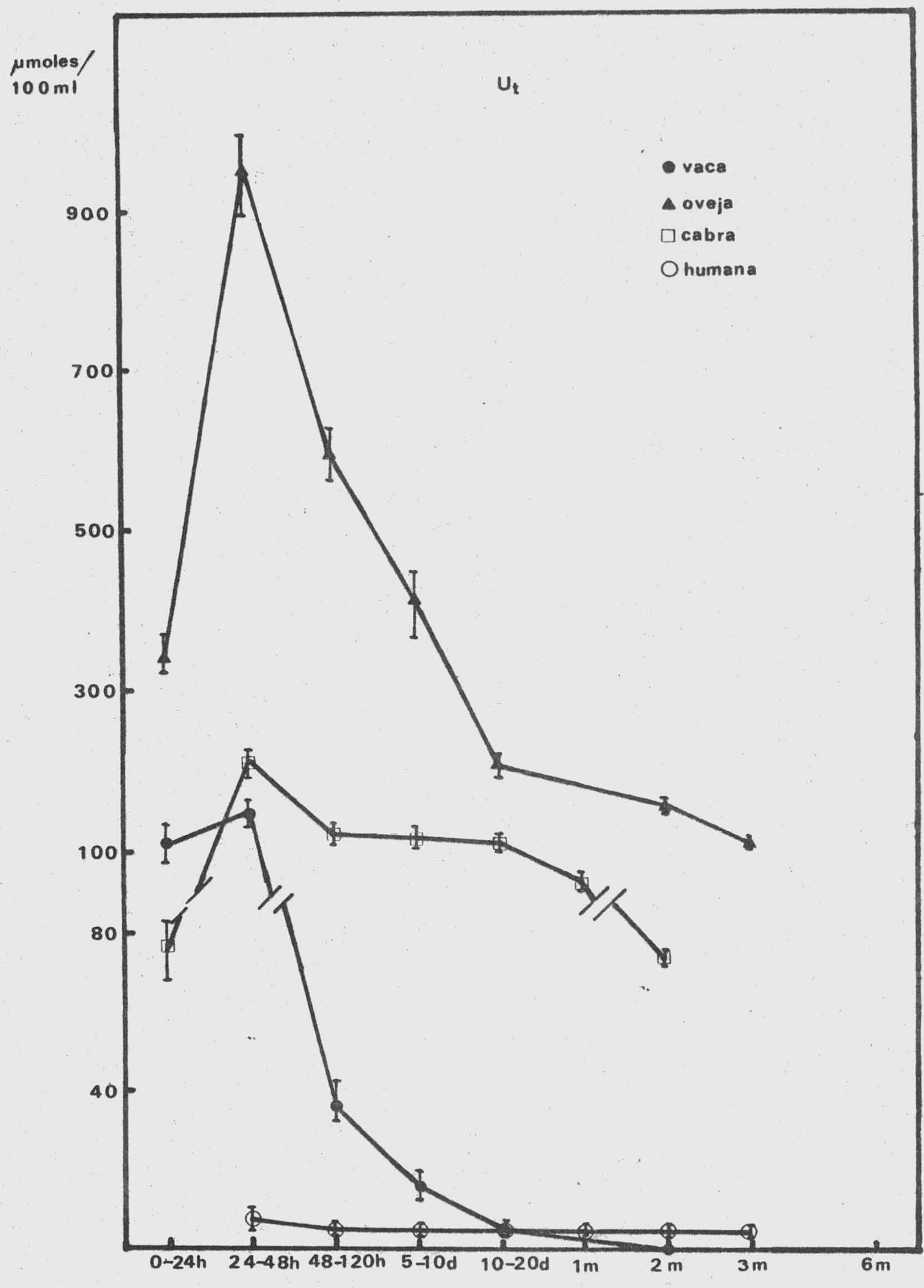
Orotato y Citidín nucleótidos totales en leches de vaca, oveja, cabra y humana.

GRAFICA N°40



Adenín y guanosín nucleótidos totales en leches de vaca, oveja, cabra y humana.

GRAFICA N°41



Uridín nucleótidos totales en leches de vaca, oveja, cabra y humana.

3.5.-Nucleótidos presentes en leche de cerda

Se han llevado a cabo unas experiencias preliminares encaminadas a determinar los nucleótidos existentes en leche de cerda con el fin de establecer las diferencias de composición nucleotídica entre leche de rumiantes, leche de cerda y leche humana.

Se han analizado los nucleótidos de tres muestras de calostro y leche de cerda correspondientes a 1 hora, 24 horas y 22 días de lactación mediante análisis cromatográfico (Tablas N°36 N°37 y N°38 y Gráficas N°42 N°43 y N°44). La muestra con 22 días de lactación se obtuvo después de inyección de oxitocina por vía intravenosa.

A-X, como en el resto de las leches analizadas, representa un nucleótido no identificado derivado de la adenina con R_f distinto al de los ribósidos mono, di y trifosfato, al desarrollarlo por cromatografía en papel.

TABLA N° 36

Contenido en nucleótidos de leche de cerda a la hora de lactación.

| Compuesto | umoles/100ml | % umoles totales |
|------------------|--------------|------------------|
| CMP | 11.03 | 4.54 |
| AMP | 8.07 | 3.32 |
| A-X | 1.55 | 0.64 |
| GMP | 1.58 | 0.65 |
| UMP | 25.59 | 10.54 |
| GDP-Man | 5.08 | 2.09 |
| GDP-Fuc, GDP-X' | 9.94 | 4.09 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 45.25 | 18.64 |
| UDPG, UDPGa | 125.90 | 51.87 |
| UDPGA | 8.62 | 3.55 |

TABLA N° 37

Contenido en nucleótidos de leche de cerda a las 24 horas de lactación.

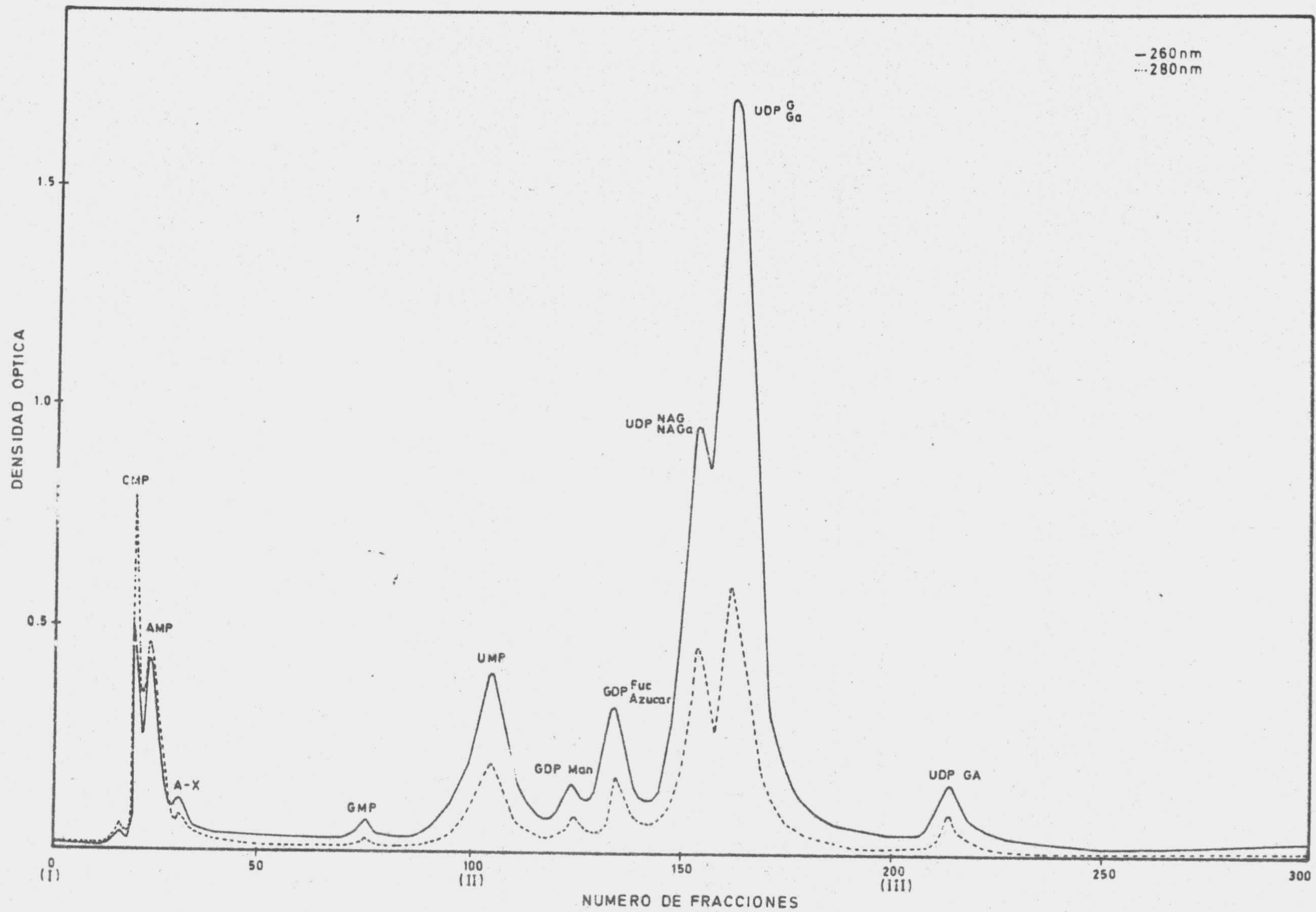
| Compuesto | umoles/100ml | % umoles totales |
|------------------|--------------|------------------|
| CMP | 13.50 | 4.33 |
| AMP | 9.04 | 2.90 |
| A-X | 3.13 | 1.00 |
| GMP | 7.65 | 2.45 |
| UMP | 103.25 | 33.11 |
| GDP-Man | 7.04 | 2.26 |
| GDP-Fuc | 14.12 | 4.53 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 38.58 | 12.37 |
| UDPG, UDPGa | 86.86 | 27.85 |
| UDPGA | 28.62 | 9.18 |

TABLA N° 38

Contenido en nucleótidos de leche de cerda a los 22 días de lactación.

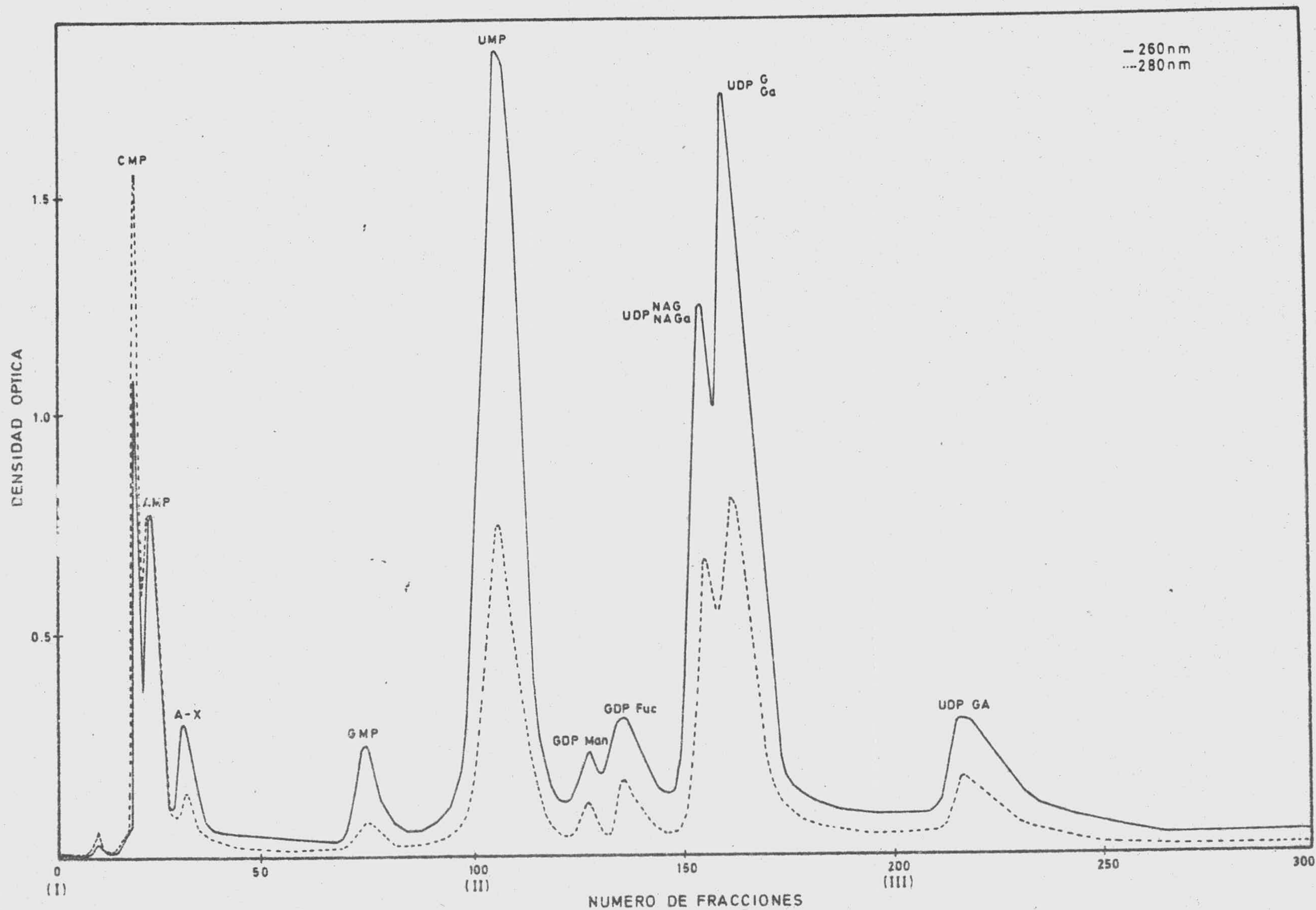
| Compuesto | umoles/100ml | % umoles totales |
|------------------|--------------|------------------|
| CMP | 6.18 | 4.12 |
| AMP | 5.54 | 3.69 |
| GMP | 3.79 | 2.52 |
| UMP | 12.31 | 8.20 |
| GDP-Man | 3.71 | 2.47 |
| GDP-Fuc | 9.93 | 6.62 |
| UDP-N-AG, -N-AGa | 27.78 | 18.51 |
| UDPG, UDPGa | 69.44 | 46.28 |
| UDPGA | 11.37 | 7.58 |

GRAFICA Nº 42



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 15 ml de calostro de cerda, 1 hora de lactación.

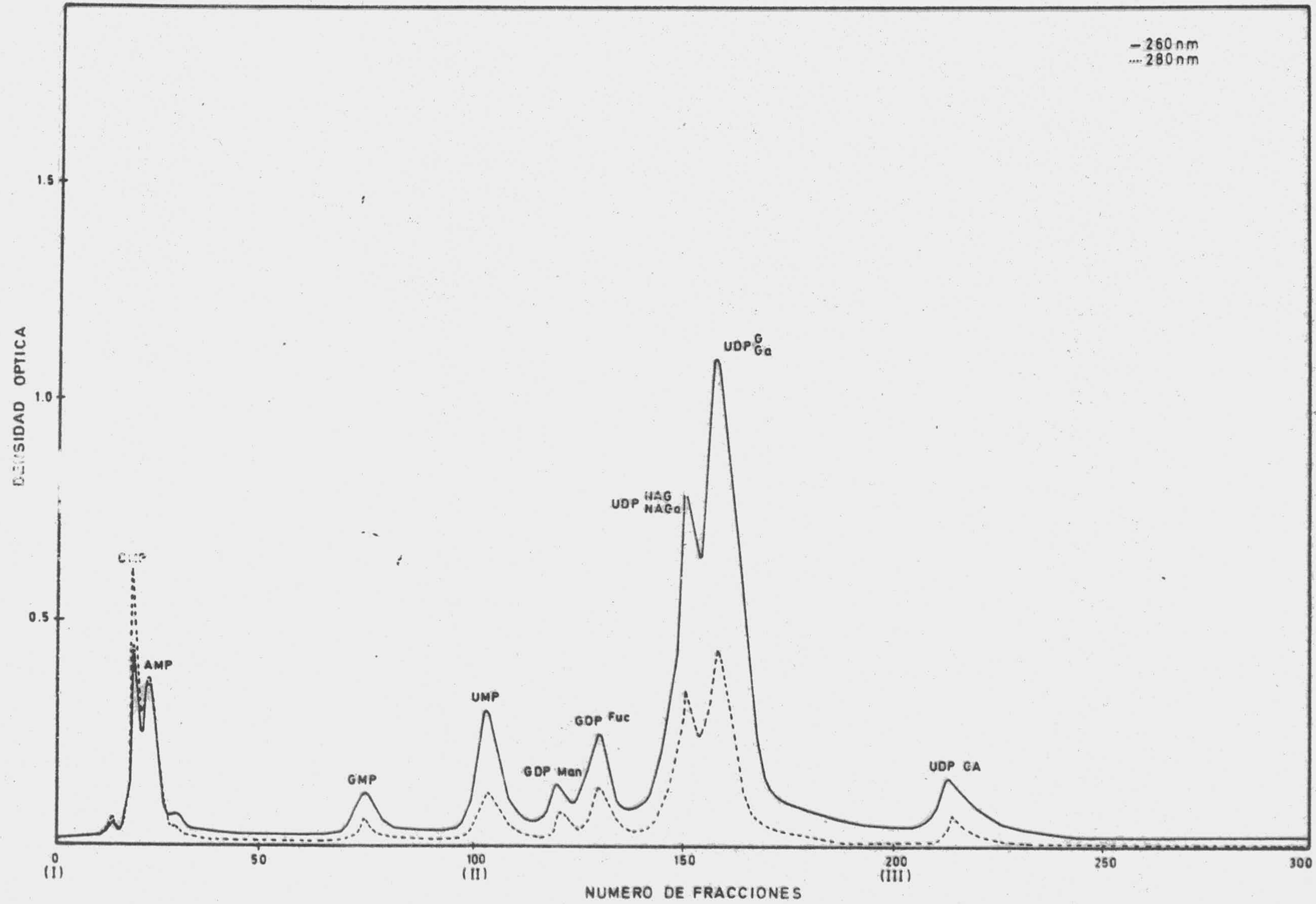
GRAFICA Nº43



177

Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 18 ml de calostro de cerda, 24 horas de lactación.

GRAFICA Nº 44



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 16 ml de leche de cerda. 22 días de lactación.

3.6.-Análisis estadístico comparativo de los nucleótidos de leches de vaca,oveja,cabra y humana.

Los resultados obtenidos al aplicar un análisis de varianza,correspondiente a un diseño factorial $9 \times 4 \times 7$ con 4 réplicas,de acuerdo con las ecuaciones expuestas en la sección 2.3.7 de esta memoria,ha permitido comparar simultáneamente los niveles de Orotato,CMP,AMP,GMP,UMP, C_t , A_t , G_t y U_t presentes en leches de vaca,oveja,cabra y humana durante 7 subdivisiones de cada uno de los periodos de lactación.Para cada tipo de nucleótido,tipo de leche e intervalo dentro del periodo de lactación se han elegido al azar,de entre todos los análisis efectuados,cuatro resultados.

Como se muestra en la Tabla N°39 existen diferencias significativas con un error menor que 1% ($P < 0.01$) entre las concentraciones de diferentes nucleótidos en distintos tipos de leche,distintos intervalos de lactación y las interacciones dos a dos y tres de los factores anteriormente citados y considerados en el análisis de varianza.

Los resultados obtenidos después de aplicar un análisis de varianza correspondiente a un diseño factorial $9 \times 2 \times 7$ con cuatro bloques,según las ecuaciones expuestas en la sección 2.3.7 de esta Memoria Doctoral,han determinado que no existen diferencias significativas con un nivel de confianza mayor que 99% ($P > 0.99$) en los niveles de nucleótidos (Orotato,CMP,AMP,GMP,UMP, C_t , A_t , G_t y U_t)determinados mediante análisis cromatográfico y análisis enzimático para cualquiera de las leches de vaca,oveja,cabra y humana en cualquier intervalo del periodo de lactación considerado.Los resultados de este análisis estadístico se reflejan en la Tabla N°40.

TABLA N° 39

Análisis de varianza correspondiente a un diseño factorial 9x4x7 con 4 réplicas

| Fuentes de observación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Medias cuadráticas | F _{estadístico} | F-Snedecor | Nivel de significación |
|-------------------------|--------------------|------------------------------|--|---------------------------|------------|------------------------|
| Nucleótidos:I | 8 | Q _I =1813610.21 | S _I ² =226701.28 | F _I =1901.8356 | 2.51 | <0.01 |
| Tipos de leche:J | 3 | Q _J =572211.55 | S _J ² =190737.18 | F _J =1600.1267 | 3.78 | <0.01 |
| Periodos de lactación:K | 6 | Q _K =149383.24 | S _K ² =24897.21 | F _K =208.8669 | 2.80 | <0.01 |
| Interacción:IJ | 24 | Q _{IJ} =2386271.94 | S _{IJ} ² =99427.99 | F _{IJ} =834.1184 | 1.69 | <0.01 |
| Interacción:IK | 48 | Q _{IK} =706891.93 | S _{IK} ² =14726.91 | F _{IK} =123.5466 | 1.52 | <0.01 |
| Interacción:JK | 18 | Q _{JK} =216302.65 | S _{JK} ² =12016.81 | F _{JK} =100.8111 | 1.99 | <0.01 |
| Interacción:IJK | 144 | Q _{IJK} =1050286.09 | S _{IJK} ² =7293.65 | F _{IJK} =61.1877 | 1.00 | <0.01 |
| Error aleatorio | 756 | Q ₀ =90116.18 | S ₀ ² =119.20 | | | |
| TOTAL | 1007 | Q=6985073.79 | | | | |

TABLA N°40

Análisis de varianza correspondiente a un diseño factorial 9x2x7 con 4 bloques

| Fuentes de observación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Medias cuadráticas | F estadístico | F-Snedecor | Nivel de significación |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------|------------------------|
| Nucleótidos:I | 8 | $Q_I=999664.48$ | $S_I^2=124958.06$ | $F_I=25.4465$ | 2.51 | <0.01 |
| Métodos de análisis:J | 1 | $Q_J=0.49$ | $S_J^2=0.49$ | $F_J=0.0001$ | 6.64 | >0.99 |
| Periodos de lactación:K | 6 | $Q_K=85285.68$ | $S_K^2=14214.28$ | $F_K=2.8946$ | 2.80 | <0.01 |
| Interacción:IJ | 8 | $Q_{IJ}=113.92$ | $S_{IJ}^2=14.24$ | $F_{IJ}=0.0029$ | 1.52 | >0.99 |
| Interacción:IK | 48 | $Q_{IK}=405066.72$ | $S_{IK}^2=8438.89$ | $F_{IK}=1.7185$ | 2.51 | >0.99 |
| Interacción:JK | 6 | $Q_{JK}=150.26$ | $S_{JK}^2=25.04$ | $F_{JK}=0.0051$ | 2.80 | >0.99 |
| Interacción:IJK | 48 | $Q_{IJK}=1060.65$ | $S_{IJK}^2=22.10$ | $F_{IJK}=0.0045$ | 1.52 | >0.99 |
| Error aleatorio | 378 | $Q_0=1856213.86$ | $S_0^2=4910.62$ | | | |
| TOTAL | 503 | $Q=3347556.06$ | | | | |

3.7.-Relación existente entre los valores de nucleótidos totales, absorción en el ultravioleta de los filtrados libres de proteínas y las concentraciones proteicas de leches de vaca, oveja, cabra y humana.

La medida de los nucleótidos de leche de cualquier especie, ya sea por métodos cromatográficos, ya sea por métodos enzimáticos, lleva consigo un largo tiempo.

Con el fin de estudiar si a partir de la absorbancia en el ultravioleta de los filtrados libres de proteínas puede estimarse el contenido total de nucleótidos presentes en la leche, se han correlacionado las densidades ópticas a 250 nm, 260 nm y 280 nm de los filtrados desproteinizados de leche en las distintas especies estudiadas con los nucleótidos totales presentes en las mismas obtenidos por suma de los adenín, citidín, guanosín y uridín nucleótidos.

Por otra parte, y con el fin de estudiar si la mayor o menor cantidad de proteínas presentes en la leche de cualquier especie está relacionada con su concentración de nucleótidos, se ha analizado si existía dependencia lineal entre ambos parámetros.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas N°41 a N°45.

En todos los tipos de leche analizados la concentración de nucleótidos es independiente de la concentración de proteínas ya que los coeficientes de correlación r presentan unos valores muy por debajo de 1. Por otra parte, en todos los tipos de leche estudiados se han podido establecer relaciones lineales entre las absorbancias en el ultravioleta a 250 nm, 260 nm y 280 nm de los filtrados libres de proteínas y la concentración de nucleótidos totales.

TABLA N°45

Coeficientes de correlación lineal (r), pendientes (a_1) y ordenadas en el origen (a_0) de las rectas correspondientes a las relaciones entre densidades ópticas de los filtrados libres de proteínas de leche a 250 nm, 260 nm y 280 nm y nucleótidos totales, y proteínas y nucleótidos totales de leches de vaca, oveja, cabra y humana.

| Leche de | D.O. 250: N_t | D.O. 260: N_t | D.O. 280: N_t | Proteínas: N_t |
|----------|---|---|---|--|
| Vaca | $a_0=4.212$ $a_1=0.012$ $r=0.98$ | $a_0=5.869$ $a_1=0.0011$ $r=0.98$ | $a_0=-24.206$ $a_1=0.028$ $r=0.91$ | $a_0=-141.615$ $a_1=61.365$ $r=0.74$ |
| Oveja | $a_0=-127.370$ $a_1=0.028$ $r=0.99$ | $a_0=-110.328$ $a_1=0.022$ $r=0.99$ | $a_0=-201.685$ $a_1=0.050$ $r=0.96$ | $a_0=367.662$ $a_1=10.045$ $r=0.06$ |
| Cabra | $a_0=16.851$ $a_1=0.013$ $r=0.96$ | $a_0=24.714$ $a_1=0.010$ $r=0.97$ | $a_0=40.145$ $a_1=0.016$ $r=0.80$ | $a_0=146.761$ $a_1=3.545$ $r=0.05$ |
| Humana | $a_0=1.520$ $a_1=0.005$ $r=0.93$ | $a_0=2.324$ $a_1=0.004$ $r=0.96$ | $a_0=4.584$ $a_1=0.004$ $r=0.89$ | $a_0=12.873$ $a_1=-0.611$ $r=0.06$ |

TABLA N°41

Absorbancia a 250 nm, 260 nm y 280 nm de filtrados libres de proteínas y nucleótidos totales de leche de vaca. Las proteínas se expresan en % en peso y los nucleótidos totales en $\mu\text{moles}/100 \text{ ml}$. Los valores de cada parámetro se dan como media seguida del error estándar de la media. n representa el número de muestras analizadas.

| Periodo de lactación | 0-24 horas | 24-48 horas | 48-120 horas | 5-10 días | 10-20 días | 2 meses | 6 meses |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| n | 5 | 6 | 6 | 7 | 7 | 8 | 8 |
| D.O. 250 | 10.878±1.915 | 13.270±1.021 | 5.615±0.795 | 4.306±0.470 | 3.299±0.172 | 2.841±0.092 | 2.905±0.042 |
| D.O. 260 | 12.026±2.075 | 14.692±0.963 | 6.480±0.879 | 5.039±0.566 | 3.477±0.178 | 2.921±0.151 | 3.056±0.045 |
| D.O. 280 | 9.778 ±1.498 | 9.337±0.747 | 5.706±0.181 | 4.630±0.191 | 4.023±0.099 | 3.708±0.127 | 3.742±0.038 |
| Proteínas | 3.22±0.38 | 4.67±0.21 | 3.80±0.08 | 3.63±0.10 | 3.21±0.05 | 3.16±0.07 | 3.14±0.04 |
| N _t | 120.72±27.50 | 175.50±16.68 | 63.61±12.38 | 62.63±6.79 | 41.67±2.83 | 44.61±2.83 | 42.60±1.36 |

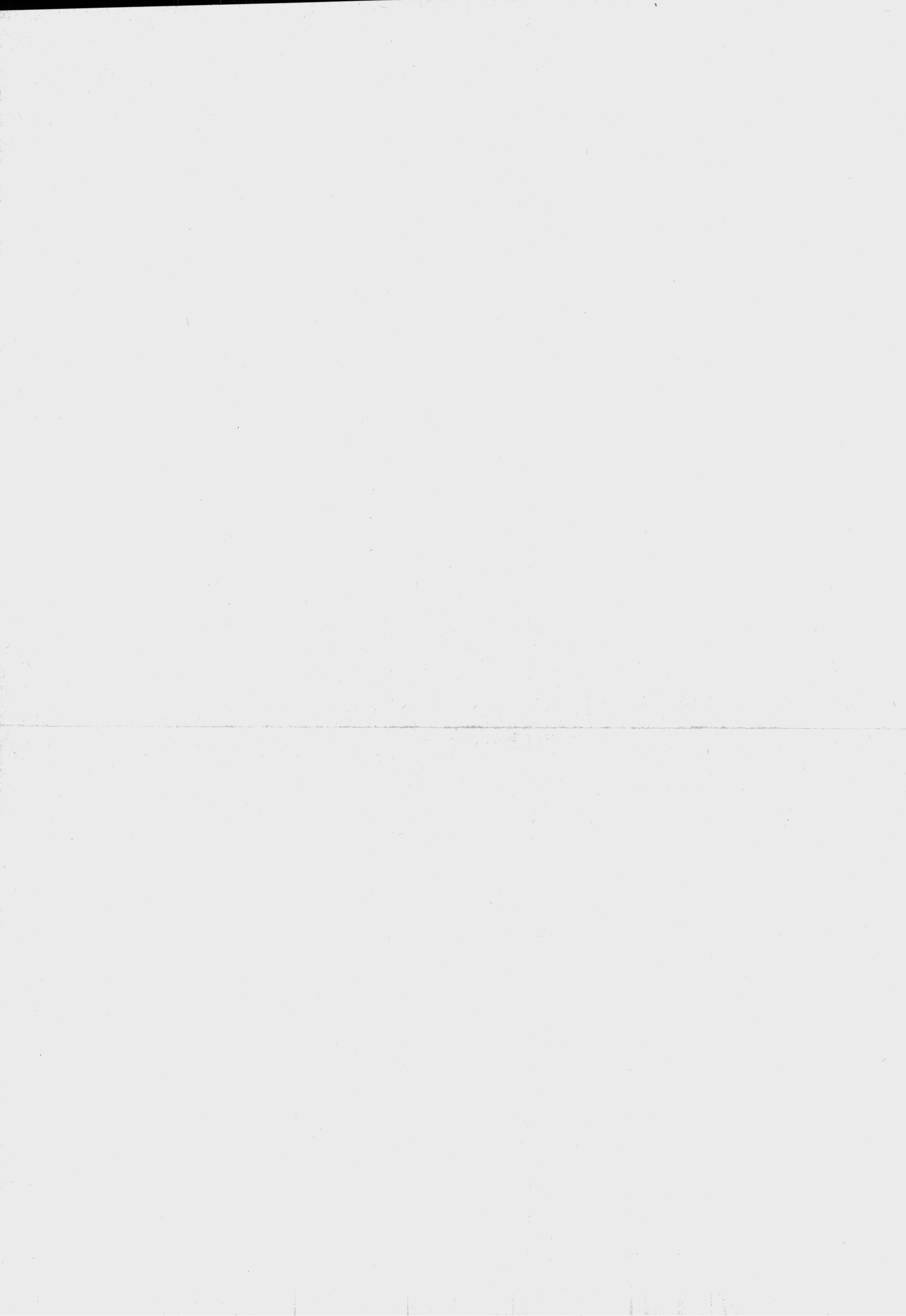


TABLA N°42

Absorbancia a 250 nm, 260 nm y 280 nm de filtrados libres de proteínas y nucleótidos totales de leche de oveja. Las proteínas se expresan en % en peso y los nucleótidos totales en $\mu\text{moles}/100\text{ ml}$. Los valores de cada parámetro se dan como media seguida del error estándar de la media. n representa el número de muestras analizadas.

| Periodo de lactación | 0-24 horas | 24-48 horas | 48-120 horas | 5-10 días | 10-20 días | 2 meses | 3 meses |
|----------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| n | 4 | 6 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 |
| D.O. 250 | 16.242±3.287 | 43.130±1.542 | 27.598±0.510 | 20.499±1.880 | 16.423±0.608 | 12.020±0.499 | 8.823±0.359 |
| D.O. 260 | 19.975±4.099 | 53.026±1.760 | 34.674±0.522 | 25.229±2.535 | 19.543±0.852 | 14.021±0.874 | 9.981±0.431 |
| D.O. 280 | 10.575±2.212 | 24.858±1.520 | 17.484±0.697 | 12.888±1.224 | 10.412±0.686 | 8.952±0.286 | 6.473±0.394 |
| Proteínas | 6.32±1.13 | 6.10±1.17 | 6.91±0.15 | 6.05±0.25 | 6.24±0.28 | 6.46±0.39 | 5.89±0.30 |
| N _t | 354.00±94.70 | 1107.87±54.22 | 674.15±8.76 | 493.72±44.94 | 270.52±11.52 | 211.26±9.54 | 157.49±7.88 |

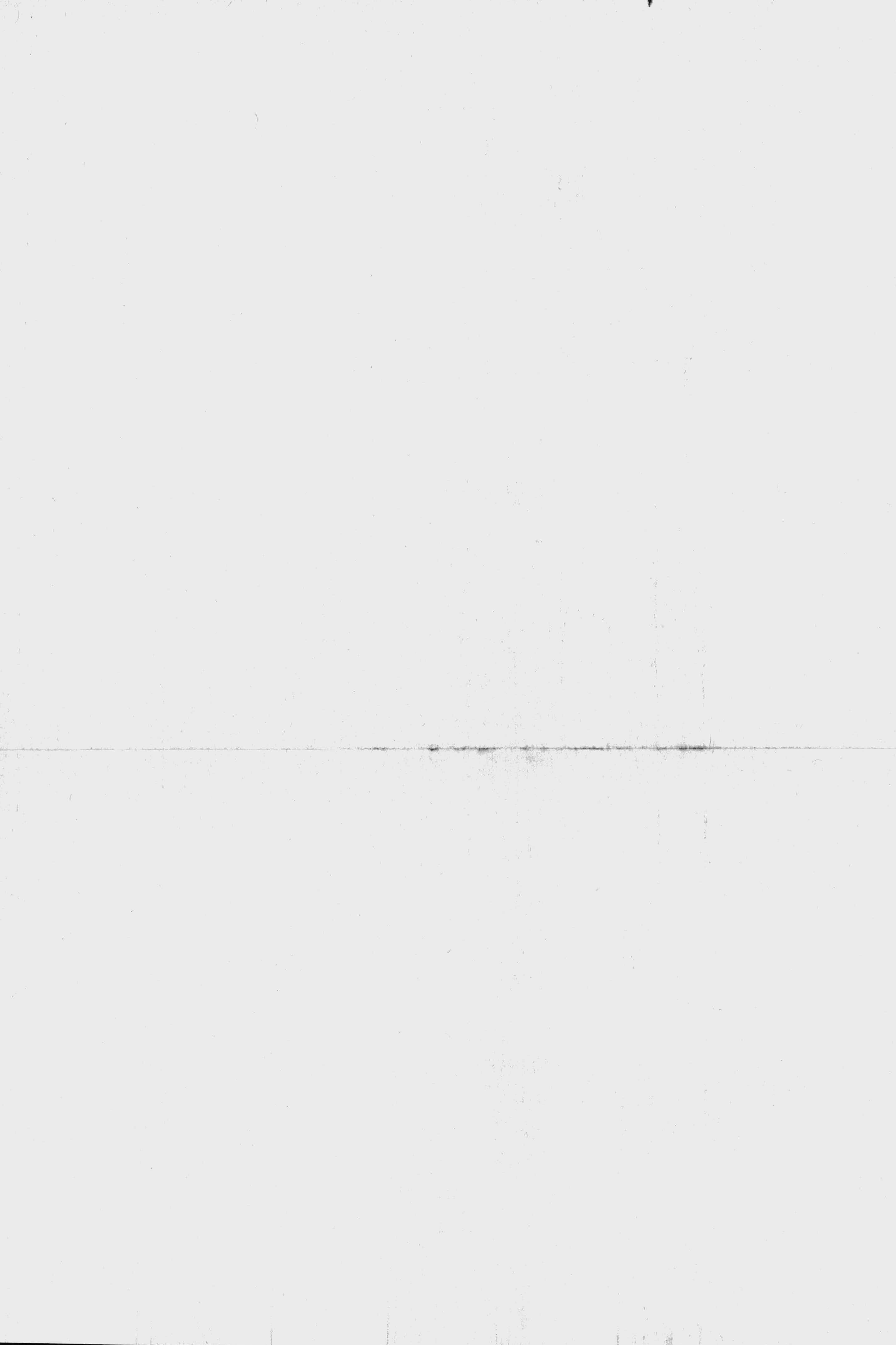


TABLA N°43

Absorbancia a 250 nm, 260 nm y 280 nm de filtrados libres de proteínas y nucleótidos totales de leche de cabra. Las proteínas se expresan en % en peso y los nucleótidos totales en μ moles/100 ml. Los valores de cada parámetro se dan como media seguida del error estándar de la media. n representa el número de muestras analizadas.

| Periodo de lactación | 0-24 horas | 24-48 horas | 48-120 horas | 5-10 días | 10-20 días | 1 mes | 2 meses |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| n | 6 | 5 | 6 | 6 | 7 | 6 | 7 |
| D.O. 250 | 7.885±0.286 | 18.325±1.282 | 12.806±0.387 | 11.967±0.587 | 10.257±0.516 | 9.083±0.356 | 7.450±0.387 |
| D.O. 260 | 9.120±0.406 | 23.580±1.431 | 17.066±0.291 | 15.083±0.784 | 12.200±0.392 | 9.340±1.567 | 8.660±0.369 |
| D.O. 280 | 7.142±0.220 | 11.840±0.501 | 8.964±0.548 | 7.917±0.495 | 6.086±0.589 | 5.600±0.347 | 4.893±0.264 |
| Proteínas | 3.57±0.35 | 3.52±0.38 | 4.17±0.13 | 4.26±0.28 | 3.96±0.15 | 3.65±0.08 | 3.74±0.15 |
| Nucleótidos | 110.01±12.96 | 167.03±8.47 | 178.50±3.81 | 171.76±3.25 | 156.17±3.04 | 139.96±3.82 | 120.00±5.78 |

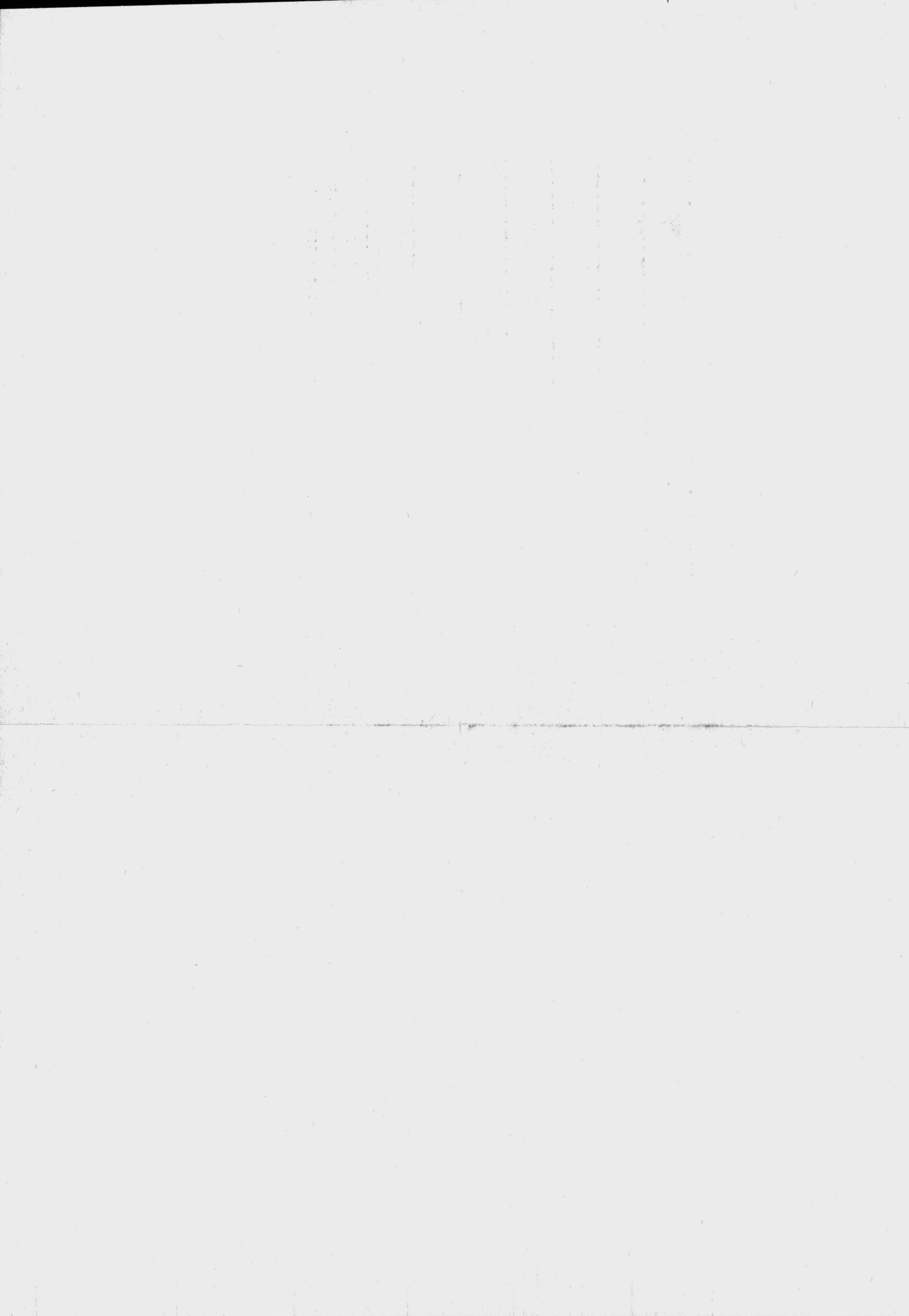


TABLA Nº44

Absorbancia a 250 nm, 260 nm y 280 nm de filtrados libres de proteínas y nucleótidos totales de leche humana. Las proteínas se expresan en % en peso y los nucleótidos totales en $\mu\text{moles}/100\text{ ml}$. Los valores de cada parámetro se dan como media seguida del error estándar de la media. n representa el número de muestras analizadas.

| Período de lactación | 36-48 horas | 48-120 horas | 5-10 días | 10-20 días | 1 mes | 2 meses | 3 meses |
|----------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| D.O. 250 | 2.742±0.214 | 2.392±0.084 | 2.090±0.160 | 1.892±0.059 | 1.804±0.060 | 1.693±0.075 | 1.590±0.065 |
| D.O. 260 | 3.165±0.254 | 2.530±0.088 | 2.300±0.068 | 2.046±0.056 | 1.858±0.060 | 1.730±0.063 | 1.712±0.064 |
| D.O. 280 | 3.027±0.380 | 2.310±0.098 | 2.180±0.227 | 1.852±0.139 | 1.724±0.095 | 1.540±0.097 | 1.584±0.076 |
| Proteínas | 1.39±0.08 | 1.53±0.14 | 1.62±0.11 | 1.53±0.13 | 1.60±0.10 | 1.55±0.08 | 1.44±0.12 |
| N _t | 16.68±0.57 | 14.14±0.61 | 12.51±0.34 | 11.40±0.30 | 10.52±0.23 | 9.95±0.24 | 9.65±0.32 |

3.8.-Efecto de los tratamientos térmicos industriales sobre la concentración de nucleótidos de leche de vaca.

En anteriores apartados de esta memoria se han descrito las diferencias existentes tanto cualitativas como cuantitativas entre los nucleótidos de leche de vaca y humana.

La posibilidad de adición de 5²nucleótidos a leche de vaca nos ha llevado a iniciar un estudio del efecto de los tratamientos térmicos industriales, (pasteurización, esterilización convencional, esterilización UHT por inyección directa de vapor (Uperización^R) y secado por concentración y atomización de estos productos en leche de vaca.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas N°46 a N°49 y Gráficas N°45 a N°47.

Como puede observarse, salvo en el caso de la esterilización UHT por inyección directa de vapor, todos los procesos térmicos afectan significativamente a la concentración de nucleótidos y/ó orotato de leche de vaca.

TABLA N°46

Contenido en nucleótidos de leche pasteurizada de vaca

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 0.13 | 0.32 |
| AMP, A.URICO | 1.15 | 2.83 |
| OROTATO | 39.28 | 96.84 |

TABLA N°47

Contenido en nucleótidos de leche esterilizada de vaca

| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 0.77 | 2.14 |
| AMP, A.URICO | 1.34 | 3.74 |
| OROTATO | 33.75 | 94.11 |

TABLA N°48

Contenido en nucleótidos de leche de vaca desnatada en polvo.

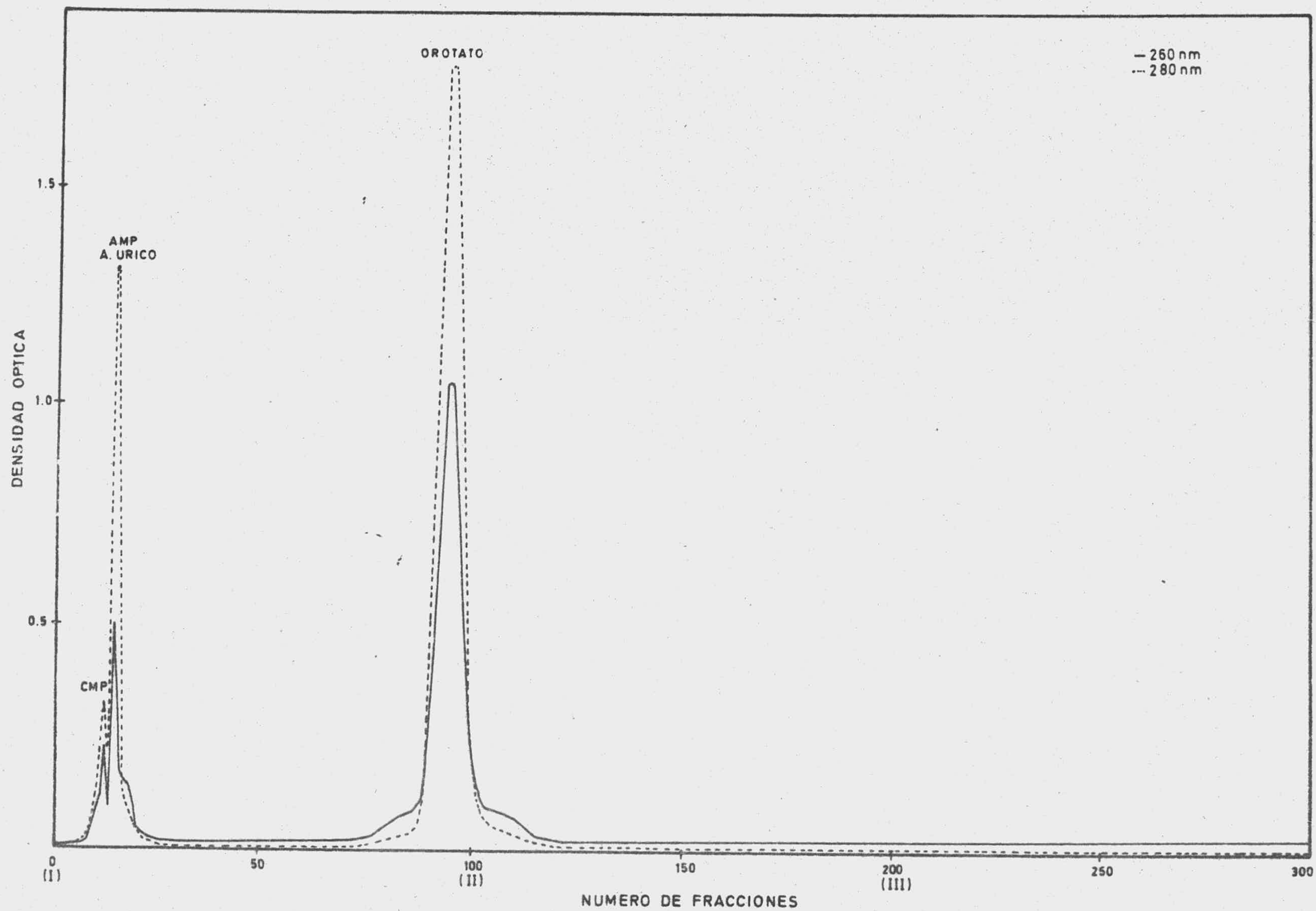
| Compuesto | $\mu\text{moles}/100\text{ml}$ | % μmoles totales |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|
| CMP | 2.4 | 0.87 |
| AMP, A.URICO | 3.5 | 1.27 |
| OROTATO | 26.78 | 97.84 |

TABLA N°49

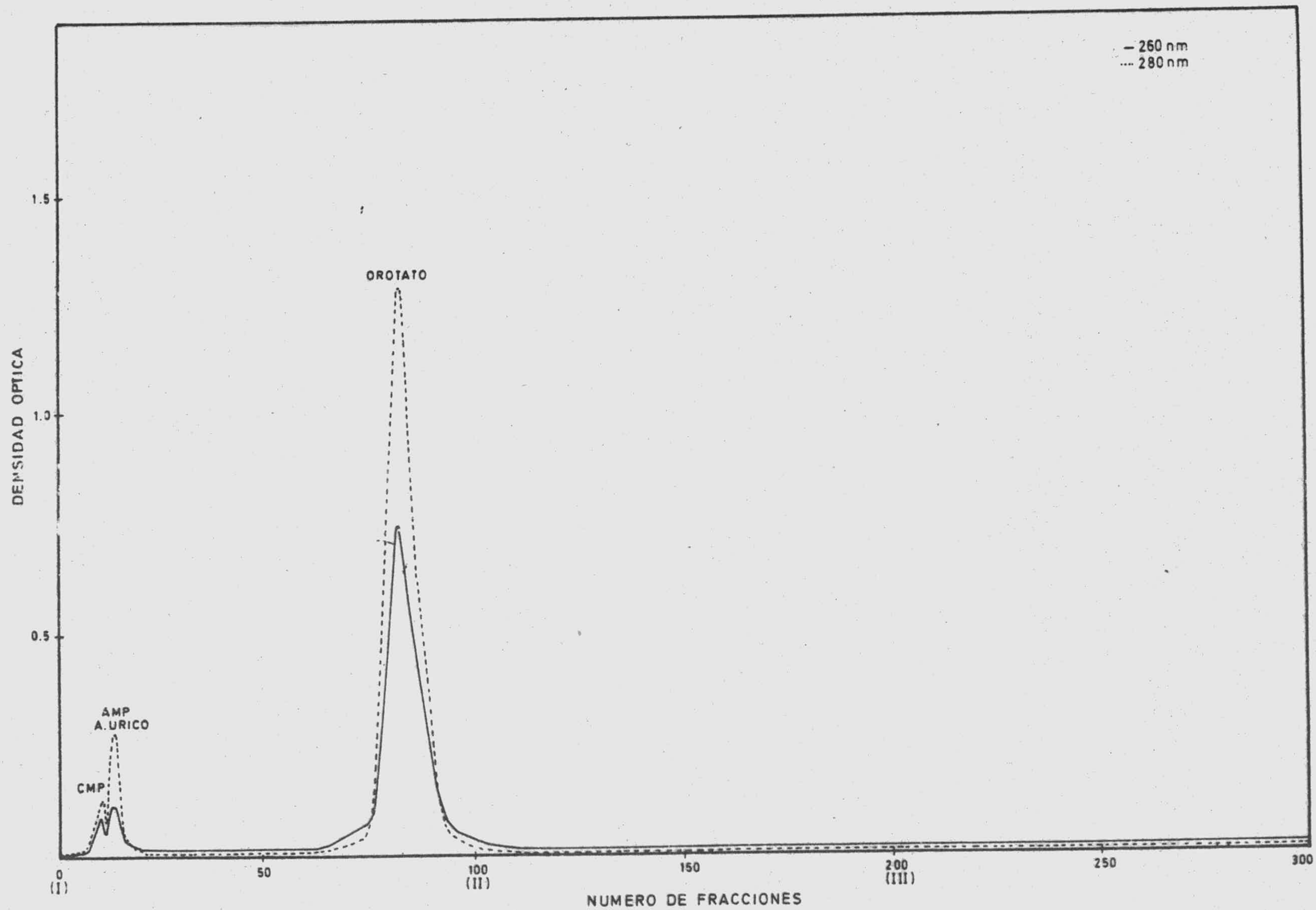
Contenido en nucleótidos de leche de vaca cruda de gran mezcla, pasteurizada, esterilizada, uperizada y en polvo. Los nucleótidos se expresan como valores medios en $\mu\text{moles}/100\text{ ml}$ de leche seguidos del error estándar de la media. P significa la probabilidad de que no existan diferencias significativas entre los valores de nucleótidos obtenidos para leche cruda y la leche sometida a diferentes procesos térmicos de higienización. n representa el número de muestras analizadas.

| | Leche cruda | leche pasteurizada | P | Leche esterilizada | P | Leche uperizada | P | Leche polvo | P |
|---------|-------------|-----------------------|-------|-----------------------|--------|--------------------|------|----------------|--------|
| n | 8 | 6 | | 6 | | 6 | | 6 | |
| OROTATO | 38.94±1.32 | 38.41±0.95 | >0.25 | 36.42±0.56 | <0.01 | 38.01±0.67 | >0.1 | 31.54±1.16 | <0.005 |
| CMP | 2.06±0.16 | 1.58±0.14 | <0.05 | 1.09±0.17 | <0.005 | 1.87±0.06 | >0.1 | 1.23±0.15 | <0.005 |
| AMP | 1.95±0.12 | 1.37±0.18 | <0.01 | 1.18±0.09 | <0.005 | 1.67±0.14 | >0.1 | 1.17±0.15 | <0.005 |

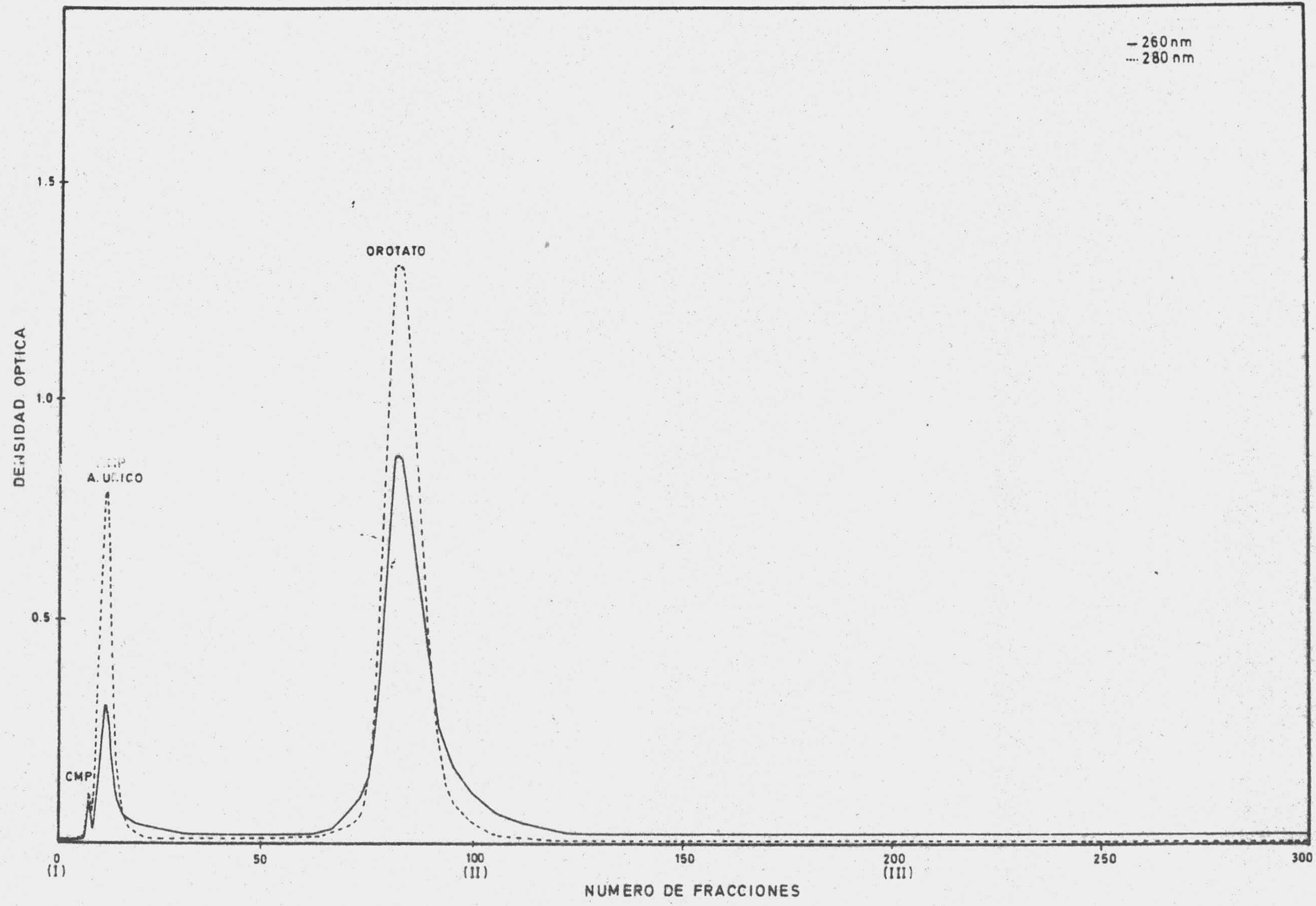
GRAFICA Nº45



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche de vaca pasteurizada.



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche de vaca esterilizada.



Cromatografía de los nucleótidos correspondientes a 40 ml de leche reconstituida al 10% (p/v) a partir de leche de vaca desnatada en polvo.

3.9.-Efecto de los nucleótidos sobre el crecimiento de B.bifidum Ti.

3.9.1.-Crecimiento de B.bifidum Ti en un medio de cultivo mínimo suplementado con nucleótidos

Al medio MB, descrito en el apartado 2.2.2.3 de esta memoria se adicionaron diversos nucleótidos hasta una concentración de 100 µg/ml de medio de cultivo. El crecimiento de B.bifidum Ti se determinó por medida de la acidez y turbidez desarrolladas durante la incubación.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas N°50 y N°51 y en la Gráfica N°48.

Como puede observarse, la adición de cualquiera de los nucleótidos ensayados (AMP, CMP, GMP, UMP e IMP) al medio de cultivo, estimula significativamente el crecimiento de B.bifidum Ti con un nivel de confianza que oscila de 90% a 99.5%.

En las experiencias realizadas en nuestro Departamento se han contemplado las adiciones de nucleótidos dos a dos, tres a tres, cuatro a cuatro y cinco al medio de cultivo pero muchos de los resultados se han omitido en las tablas al objeto de simplificar su comprensión.

TABLA Nº50

Efecto de la adición de AMP, CMP, GMP, UMP e IMP (concentración final 100 µg/ml) al medio de cultivo MB sobre el crecimiento de *B. bifidum* Ti. La acidez representa el número de mililitros de NaOH 0.1 N necesarios para neutralizar 10 ml de medio de cultivo inoculado e incubado durante 36 horas. D.O. 525 es la densidad óptica del medio de cultivo medida espectrofotométricamente a 525 nm. Los resultados se expresan como valores medios de cuatro experiencias seguidos del error estándar de la media. P representa la probabilidad de que no existan diferencias significativas entre los valores obtenidos en el medio MB y el mismo medio adicionado de nucleótidos.

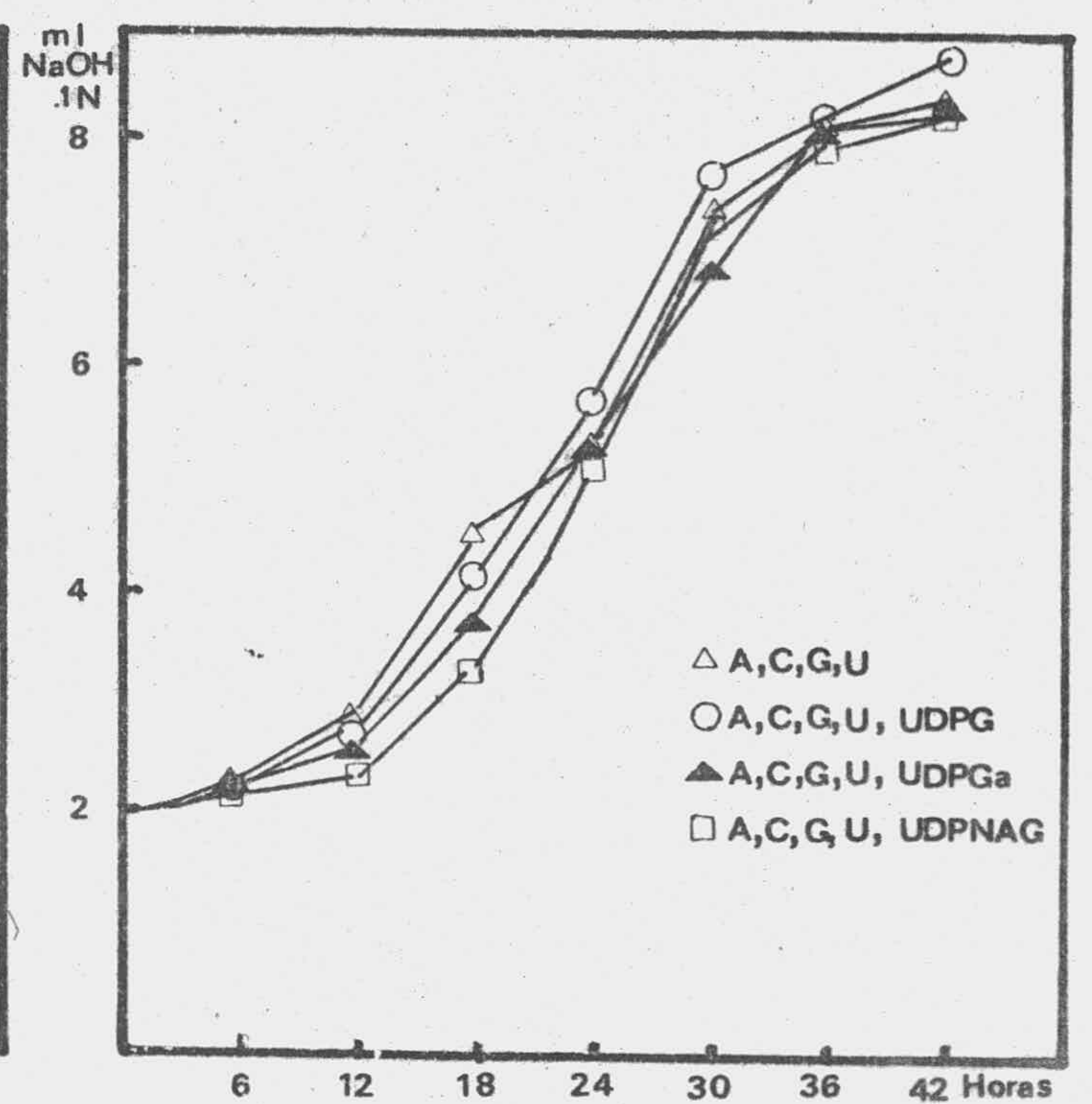
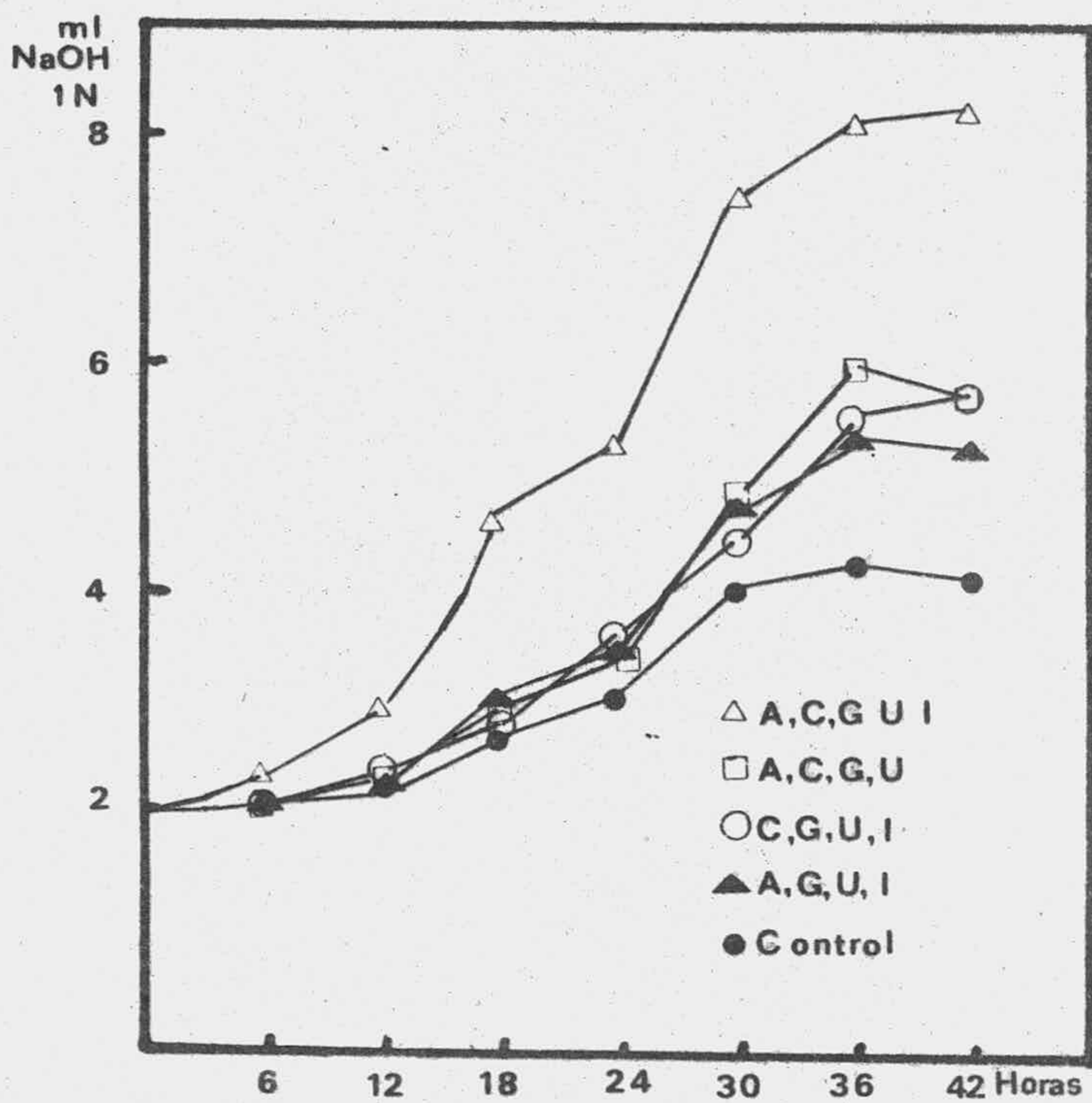
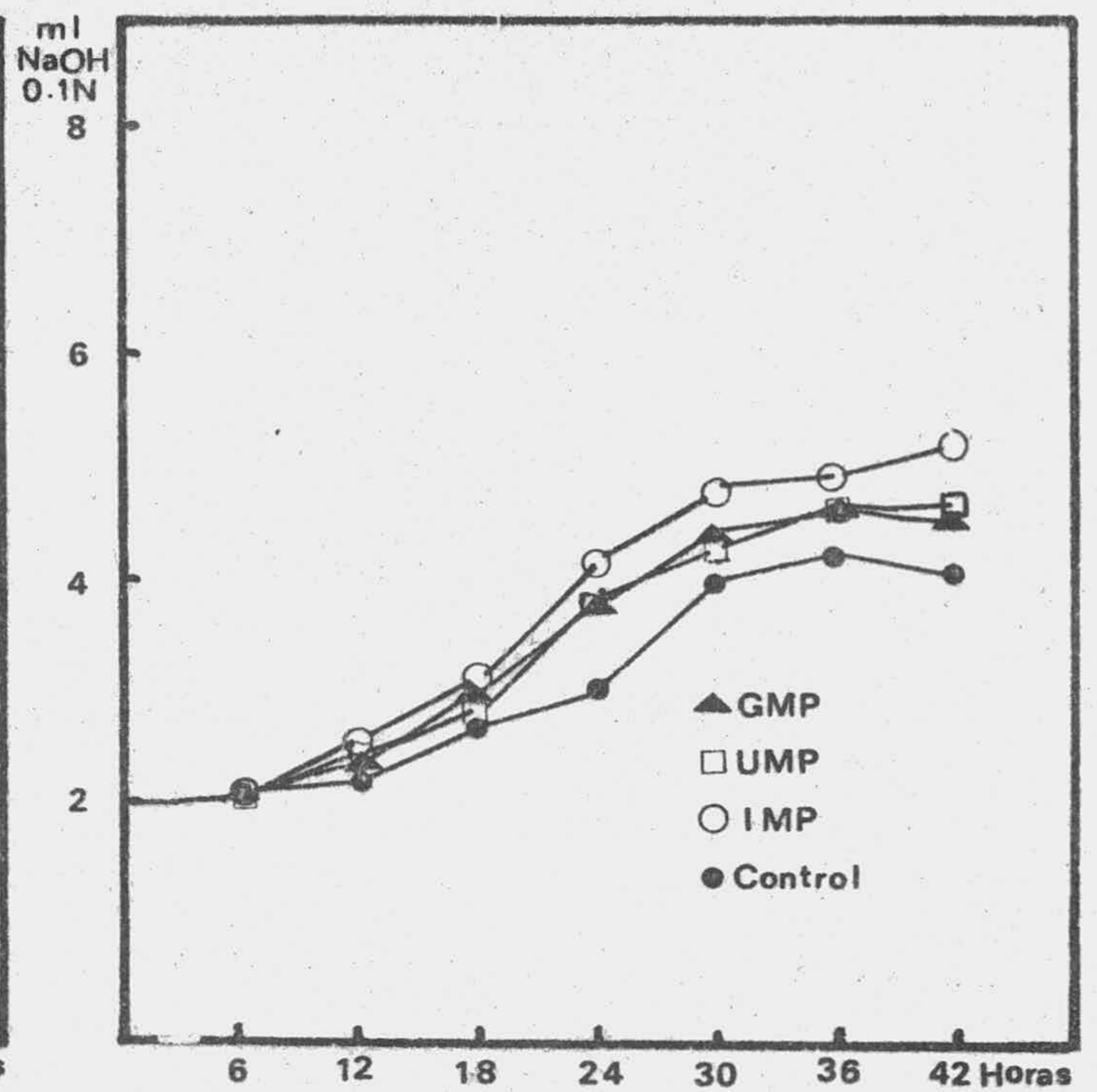
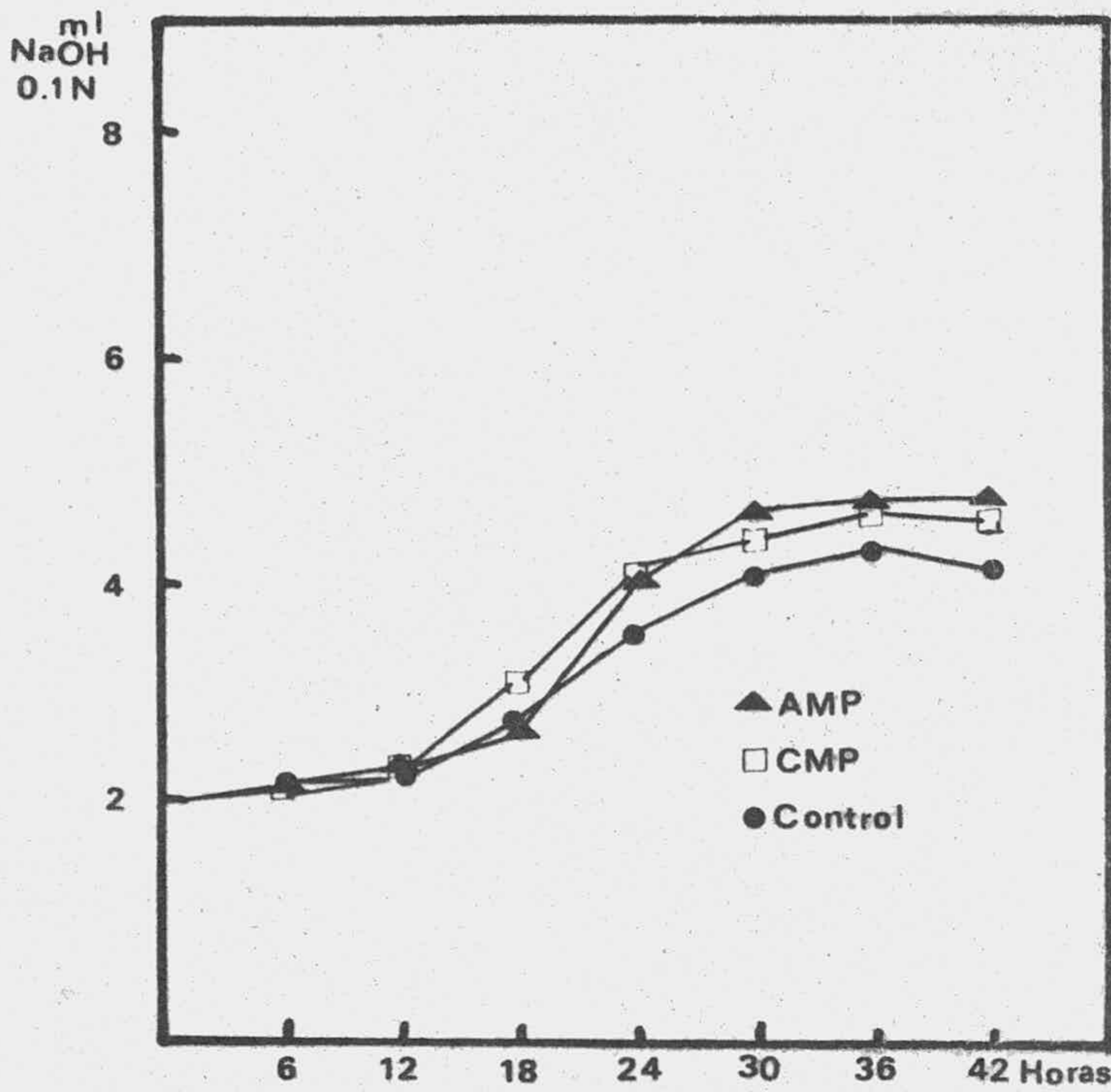
| Nucleótidos adicionados | ---- | AMP | P | CMP | P | GMP | P | UMP | P | IMP | P |
|-------------------------|-----------|---------------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| Acidez | 4.4±0.1 | 4.8±0.2 | <0.1 | 4.6±0.1 | >0.1 | 4.7±0.1 | <0.1 | 4.7±0.1 | <0.1 | 5.0±0.2 | <0.02 |
| D.O. 525 | 0.33±0.03 | 0.55±0.02 | <0.005 | 0.43±0.02 | <0.01 | 0.58±0.01 | <0.005 | 0.43±0.03 | <0.05 | 0.62±0.03 | <0.005 |
| Nucleótidos adicionados | ---- | AMP, CMP GMP, UMP | P | AMP, CMP GMP, IMP | P | AMP, CMP UMP, IMP | P | AMP, GMP UMP, IMP | P | CMP, GMP UMP, IMP | P |
| Acidez | 4.4±0.1 | 5.3±0.2 | <0.005 | 5.9±0.2 | <0.005 | 5.5±0.2 | <0.005 | 6.0±0.3 | <0.005 | 5.6±0.2 | <0.005 |
| D.O. 525 | 0.33±0.03 | 0.61±0.07 | <0.005 | 0.79±0.05 | <0.005 | 0.70±0.08 | <0.005 | 0.88±0.07 | <0.005 | 0.74±0.05 | <0.005 |
| Nucleótidos adicionados | ---- | AMP, CMP, GMP UMP, IMP | P | | | | | | | | |
| Acidez | 4.4±0.1 | 8.1±0.1 | <0.005 | | | | | | | | |
| D.O. 525 | 0.33±0.03 | 1.04±0.05 | <0.005 | | | | | | | | |

TABLA N°51

Efecto de la adición de UDPG,UDPGa,UDP-N-AG y UDPGA (concentración final 100 µg/ ml) al medio de cultivo MB suplementado previamente con AMP,CMP,GMP,UMP e IMP,sobre el crecimiento de B.bifidum Ti.La acidez representa el número de mililitros de NaOH 0.1 N necesarios para neutralizar 10 ml de medio de cultivo inoculado y cultivado durante 36 horas.D.O.525 es la densidad óptica del medio de cultivo medida espectrofotométricamente a 525 nm.Los resultados se expresan como valores medios seguidos del error estándar de la medición.P representa la probabilidad de que no existan diferencias significativas entre los valores obtenidos en el medio MB suplementado con nucleótidos monofosfato y el mismo medio adicionado de UDPG,UDPGa,UDP-N-AG y UDPGA.N expresa la adición simultánea de AMP,CMP,GMP,UMP e IMP.El número de experiencias realizadas para la obtención de los valores medios han sido 4.

| Nucleótidos adicionados | N | N UDPG | P | N UDPGa | P | N UDP-N-AG | P | N UDPGA | P |
|-------------------------|-----------|-----------|------|------------|------|---------------|------|------------|------|
| Acidez | 8.1±0.1 | 8.3±0.2 | >0.2 | 8.2±0.2 | >0.2 | 8.4±0.2 | >0.1 | 8.0±0.2 | >0.2 |
| D.O.525 | 1.04±0.05 | 1.09±0.03 | >0.2 | 0.99±0.03 | >0.1 | 1.13±0.05 | >0.1 | 0.98±0.04 | >0.1 |

GRAFICA N°48



Efecto de la adición de diversos nucleótidos al medio de cultivo MB sobre el crecimiento de *B. bifidum* Ti. Las iniciales A,C,G,U,I corresponden respectivamente a AMP,CMP,GMP,UMP e IMP.

3.9.2.-Crecimiento de B.bifidum Ti en leche humana y leche de vaca suplementada con nucleótidos.

A un medio que contiene leche de vaca, cisteína y diversas vitaminas (LAV), descrito en el apartado 2.2.2.3 de esta memoria, se han adicionado distintos nucleótidos (AMP, CMP, GMP, UMP, IMP, UDPG, UDPGa, UDP-N-AG y UDPGA) hasta concentraciones de 100 µg/ ml de medio de cultivo con el fin de observar la respuesta de B.bifidum Ti a estas sustancias.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en las Tablas N°52 y N°53 y en la gráfica N°49.

Como puede observarse, la adición de GMP, UMP e IMP al medio LAV estimula significativamente el crecimiento de B.bifidum Ti con un nivel de confianza que oscila entre 98% y 99.5%. Por otra parte, existen diferencias significativas con un error menor que 0.005 ($P < 0.005$) entre la acidez desarrollada en el medio de cultivo adicionado de un sólo nucleótido y el mismo medio que contiene todos los nucleótidos monofosfato ensayados.

En leche humana recogida asépticamente e inoculada con B.bifidum Ti se alcanza una acidez equivalente a 9.1 ± 0.3 ml. de NaOH 0.1 N después de 36 horas de incubación (n=3).

Durante el desarrollo de estas experiencias se ha podido constatar que el aminoácido cisteína resulta imprescindible para el desarrollo de B.bifidum Ti. En efecto, la acidez desarrollada por esta bacteria en leche de vaca estéril es equivalente tan sólo a 2.9 ± 0.1 ml de NaOH 0.1N (n=4).

TABLA N° 52.

Efecto de la adición de AMP, CMP, GMP, UMP e IMP (concentración final 100 µg/ml) al medio de cultivo LAV sobre el crecimiento de *B. bifidum* T1. La acidez representa el número de mililitros de NaOH 0.1 N necesarios para neutralizar 10 ml de medio de cultivo inoculado e incubado durante 36 horas. Los resultados se expresan como valores medios de cuatro experiencias seguidos del error estándar de la media. P representa la probabilidad de que no existan diferencias significativas entre los valores obtenidos en el medio LAV y el mismo medio suplementado con nucleótidos.

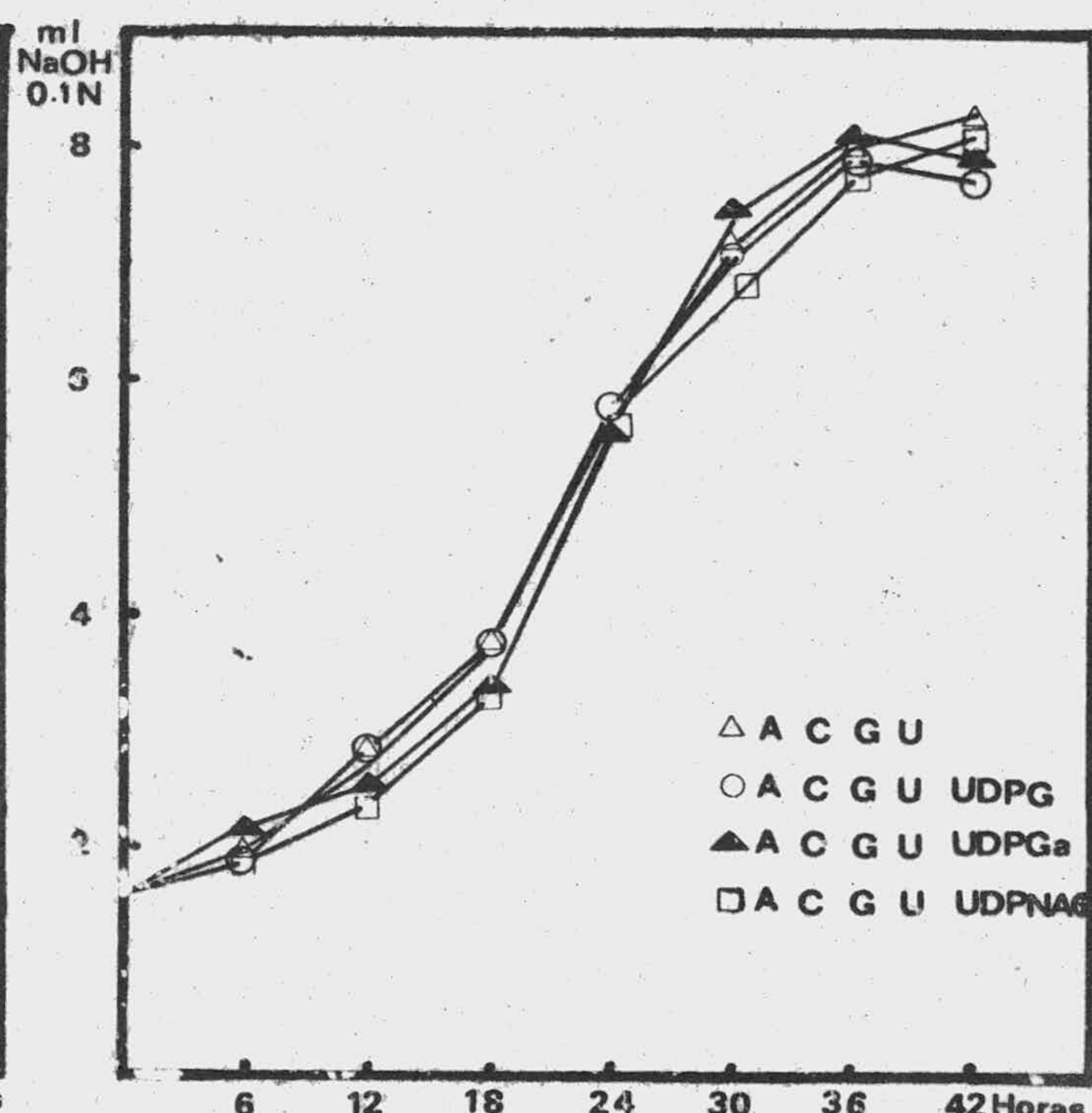
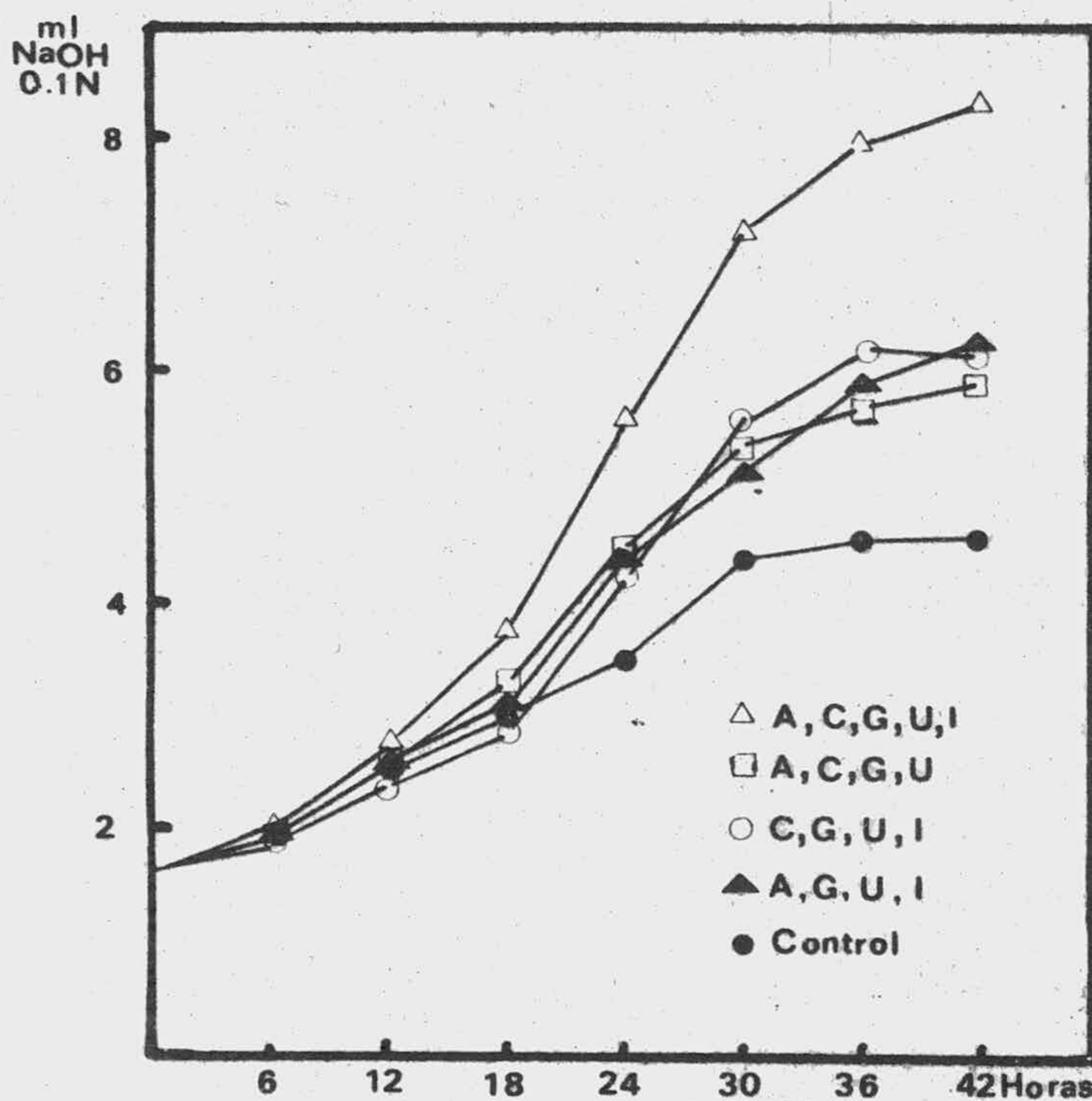
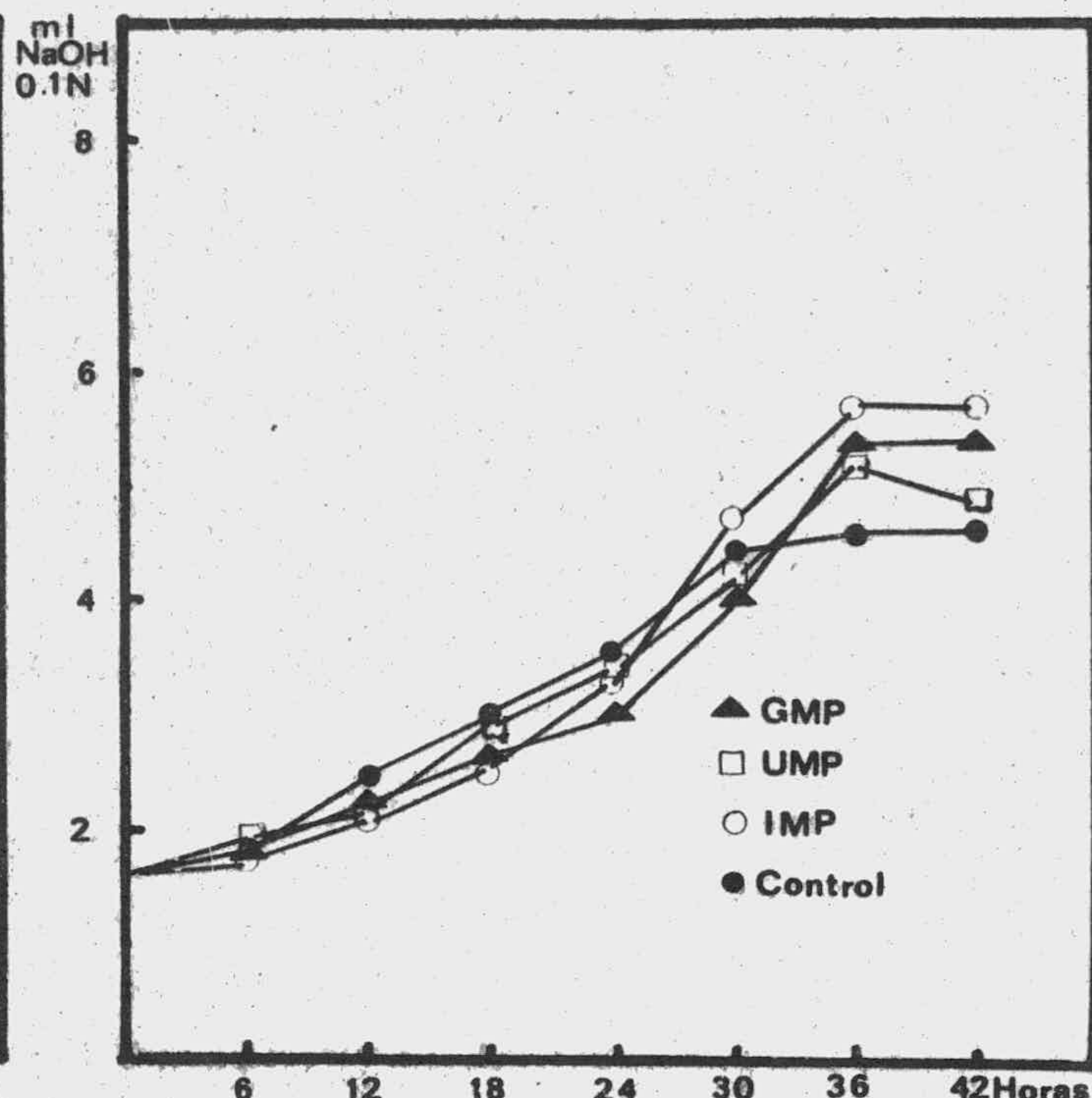
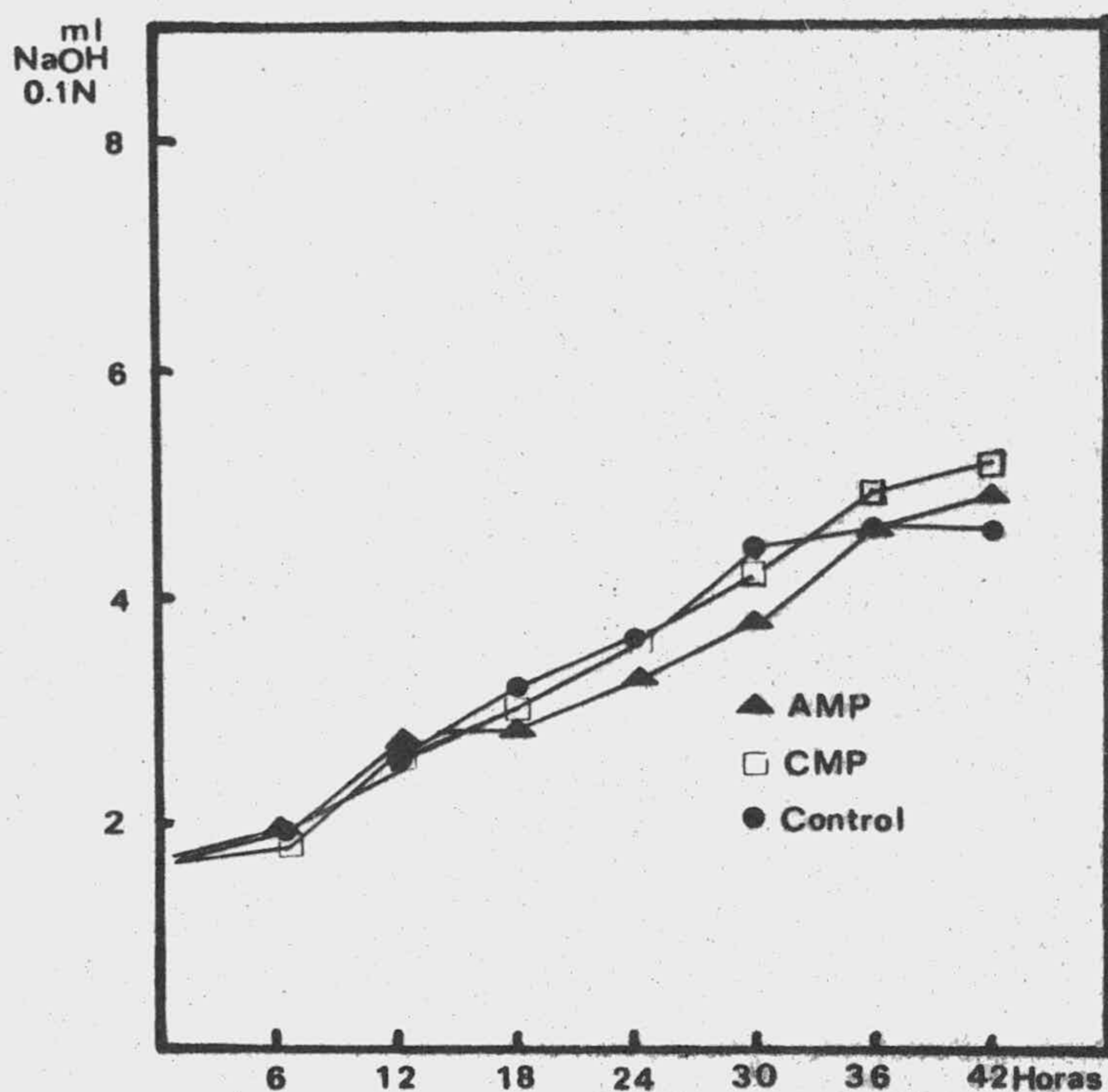
| Nucleótidos adicionados | --- | AMP | P | CMP | P | GMP | P | UMP | P | IMP | P |
|-------------------------|---------|---------------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| Acidez | 4.7±0.1 | 4.6±0.1 | >0.2 | 4.9±0.2 | >0.1 | 5.4±0.2 | ≤0.01 | 5.2±0.1 | ≤0.02 | 5.7±0.1 | ≤0.005 |
| Nucleótidos adicionados | --- | AMP, CMP GMP, UMP | P | AMP, CMP GMP, IMP | P | AMP, CMP UMP, IMP | P | AMP, GMP UMP, IMP | P | CMP, GMP UMP, IMP | P |
| Acidez | 4.7±0.1 | 5.7±0.2 | ≤0.005 | 6.1±0.1 | ≤0.005 | 6.0±0.2 | ≤0.005 | 5.9±0.1 | ≤0.005 | 6.2±0.2 | ≤0.005 |
| Nucleótidos adicionados | --- | AMP, CMP, GMP UMP, IMP | P | | | | | | | | |
| Acidez | 4.7±0.1 | 8.0±0.1 | ≤0.005 | | | | | | | | |

TABLA N°53

Efecto de la adición de UDPG,UDPGa,UDP-N-AG y UDPGA (concentración final 100 µg/ml)al medio de cultivo LAV suplementado previamente con AMP,CMP,GMP,UMP e IMP,sobre el crecimiento de B.bifidum Ti.La acidez representa el número de mililitros de NaOH 0.1 N necesarios para neutralizar 10 ml de medio de cultivo inoculado y cultivado durante 36 horas.Los resultados se expresan como valores medios de cuatro experiencias seguidos del error estándar de la media.P representa la probabilidad de que no existan diferencias significativas entre los valores obtenidos en el medio LAV suplementado con nucleótidos monofosfato y el mismo medio adicionado de UDPG,UDPGa,UDP-N-AG y UDPGA.N expresa la adición simultánea de AMP,CMP,GMP,UMP e IMP.

| Nucleótidos adicionados | N | | | P | | | N | | |
|----------------------------|---------|---------|------|---------|-------|----------|------|---------|------|
| | N | UDPG | P | UDPGa | P | UDP-N-AG | P | UDPGA | P |
| Acidez | 8.0±0.1 | 7.9±0.2 | >0.3 | 8.1±0.1 | >0.25 | 7.8±0.1 | >0.2 | 8.0±0.1 | >0.5 |

GRAFICA N°49



Efecto de la adición de diversos nucleótidos al medio de cultivo LAV sobre el crecimiento de *B.bifidum* Ti. Las iniciales A,C,G,U,I corresponden respectivamente a AMP,CMP,GMP,UMP e IMP.

3.9.3.-Efecto de los aminoazúcares glucosamina, galactosamina, N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina sobre el crecimiento de B.bifidum Ti

Giorgy y col. demostraron que B.bifidum var.pennsylvanicus requería N-acetil-lactosamina o, en su defecto, determinados derivados de N-acetil-glucosamina para crecer, al menos en los aislamientos primarios (120).

Nos ha parecido oportuno ensayar el efecto de algunos aminoazúcares sobre el crecimiento de la raza tipo de B.bifidum Ti ya que, por una parte, la concentración de aminoazúcares en leche humana es mucho más elevada que en leche de vaca (136), y por otra, ya que B.bifidum Ti supone el 80% de las cepas, aisladas de heces de lactantes, correspondientes a la especie mencionada (139).

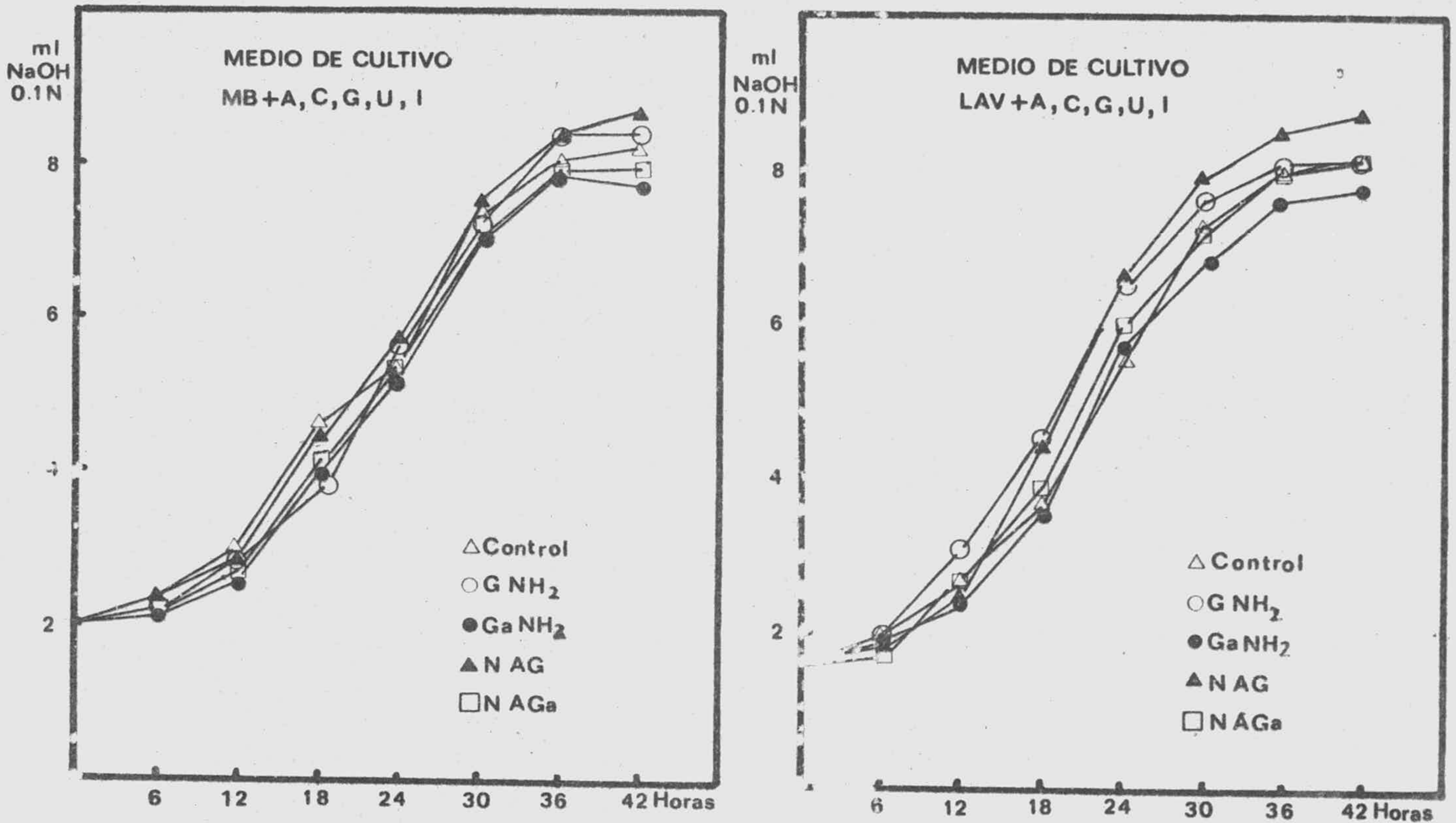
Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla N° 54 y Gráfica N° 50.

TABLA N° 54

Efecto de la adición de glucosamina, galactosamina, N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina (concentración final 1 mg/ml) a los medios de cultivo MB y LAV sobre el crecimiento de B. bifidum Ti. La acidez representa el número de mililitros de NaOH 0.1 N necesarios para neutralizar 10 ml de medio de cultivo inoculado y cultivado durante 36 horas. D.O. 525 es la densidad óptica del medio de cultivo medida espectrofotométricamente a 525 nm. Los resultados se expresan como valores medios de cuatro experiencias seguidas del error estándar de la media. P representa la probabilidad de que no existan diferencias significativas entre los valores obtenidos en los medios MB y LAV suplementados previamente con nucleótidos monofosfato y los mismos medios adicionados de aminoazúcares.

| Medio de cultivo MB adicionado de | N | N G-NH ₂ | P | N Ga-NH ₂ | P | N NAG | P | N NAGa | P |
|------------------------------------|-----------|------------------------|------|-------------------------|-------|-----------|-------|-----------|------|
| Acidez | 8.1±0.1 | 8.3±0.1 | >0.1 | 7.9±0.1 | ≤0.1 | 8.4±0.1 | ≤0.1 | 8.0±0.2 | >0.3 |
| D.O. 525 | 1.04±0.05 | 1.10±0.04 | >0.1 | 0.84±0.03 | ≤0.05 | 1.19±0.03 | ≤0.02 | 1.05±0.04 | >0.5 |
| Medio de cultivo LAV adicionado de | N | N G-NH ₂ | P | N Ga-NH ₂ | P | N NAG | P | N NAGa | P |
| Acidez | 8.0±0.1 | 8.1±0.2 | >0.3 | 7.6±0.1 | ≤0.05 | 8.5±0.1 | ≤0.02 | 8.0±0.1 | >0.5 |

GRAFICA N°50



Efecto de la adición de glucosamina, galactosamina, N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina a los medios de cultivo MB y LAV sobre el crecimiento de *B. bifidum* Ti. Los medios de cultivo fueron suplementados previamente con AMP, CMP, GMP, UMP e IMP los cuales corresponden a las iniciales A, C, G, U e I.

IV. -DISCUSSION

V.- DISCUSION

El contenido nucleotídico de la secreción calostrál es muy amplio y cualitativamente similar en todas las leches estudiadas. Algo semejante ocurre con la leche a excepción de la de vaca. En ésta última, el orotato se acumula en grandes cantidades y la presencia de nucleótidos, es mucho menor.

La evolución de la composición nucleotídica en leche de vaca, oveja y cabra durante la lactación, se caracteriza por un rápido incremento en la concentración de nucleótidos desde el parto hasta 48-120 horas después. Una vez alcanzado el máximo se inicia un descenso suave, variable para la leche de cada una de estas especies, que dura entre 15 y 30 días. Por el contrario, en la leche humana el contenido nucleotídico permanece constante durante toda la lactación.

En leche de vaca resultan particularmente abundantes los derivados de la uridina, que llegan a suponer el 85 - 90 % de los nucleótidos totales, durante las 24 - 48 horas que siguen al parto. Los uridín-nucleótidos presentes en mayor cantidad son UDP-N-AG, UDP-N-AGa, UDPG y UDPGa. Como acabamos de señalar todos los componentes nucleotídicos de la leche de vaca, excepto orotato, sufren un fuerte incremento en su concentración desde el momento del parto hasta 48 horas después. Posteriormente CMP y AMP disminuyen muy lentamente hasta el final de la lactación y el contenido en uridín-derivados desciende rápidamente hasta desaparecer al mes de lactación. Los nucleótidos derivados de la guanina resultan cuantitativamente poco importantes en la leche de vaca y su evolución durante la lactación sigue un curso similar al de los uridín derivados.

El contenido en orotato durante el transcurso de la lactación llega a suponer el 90 % del total de los nucleótidos.

La leche de oveja contiene un elevado número de nucleótidos siendo la concentración de estos del orden de 5 - 7 veces mayor que en la leche de vaca. Los uridín derivados, fundamentalmente los unidos a restos glucídicos tales como glucosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina y ácido glucurónico, son los compuestos predominantes. Existe, por otra parte, un elevado contenido de derivados de la guanina, entre los que destacan GDP-Man y GDP-Fuc. CMP y AMP están regularmente presentes en leches de oveja y su contenido es aproximadamente 4 veces mayor que en la leche de vaca. Todos los nucleótidos en leche de oveja aumentan rápidamente su concentración desde el momento del parto hasta 48 horas transcurrido el mismo. El contenido en nucleótidos desciende posteriormente, hasta alcanzar un valor más o menos estable alrededor del 15 º a 30 º día de lactación.

En leche de cabra los nucleótidos totales - suponen 2 a 3 veces los de leche de vaca y aproximadamente la mitad de los presentes en leche de oveja, en periodos similares de lactación. Los nucleótidos derivados de la guanina son abundantes durante este periodo y su concentración resulta bastante similar a la encontrada para leche de oveja. Dentro de los derivados de la citosina y adenina, CMP y AMP son los nucleótidos mayoritarios en leche de cabra durante toda la lactación. El orotato está también presente en leche de cabra pero en proporciones tres veces menores que en leche de vaca y por otra parte su concentración no se afecta bruscamente con el transcurso de la lactación.

La leche humana presenta una composición nucleotídica cualitativamente similar a la secreción calostrál de vaca y a las leches de oveja y cabra, siendo, sin embargo, muy diferente de la de vaca. Por lo que se refiere a los aspectos cuantitativos, existen diferencias notables con las leches de oveja y cabra ya que el contenido en nucleótidos es solo de 20 μ moles/100 ml. Los uridín derivados (UMP, UDP-N-AG, UDP-N-AGa, UDPG y UDP) suponen la mayor parte de los nucleótidos presentes en leche humana. Los nucleótidos derivados de la guanina están regularmente presentes aunque su concentración es baja. No se puede demostrar la presencia de GDP-Fuc, nucleótido frecuente en leches de cabra y oveja. Por el contrario el GMP resulta un compuesto típico de la leche humana durante todo el periodo de lactación. Los citidín y adenosín derivados de leche humana representan alrededor del 25 % de los nucleótidos totales. Estos compuestos por tanto, resultan relativamente mucho más abundantes que en la leche de las restantes especies analizadas en este trabajo.

Es de destacar que la leche humana se diferencia claramente de las leches de vaca, oveja y cabra por la ausencia de cantidades detectables de orotato. De este modo se confirma lo reflejado en la bibliografía (18) (26).

El contenido nucleotídico de leche de cerda no difiere sensiblemente del patrón cualitativo de las leches de oveja, cabra y humana. Hay que señalar, sin embargo, que el número de muestras analizadas fué escaso, por lo que esta aseveración debe realizarse con ciertas reservas.

El análisis estadístico comparativo de los resultados obtenidos para la composición nucleotídica de leche de diferentes especies y en distintos periodos de lactación ha mostrado que las diferencias encontradas para cada una de las fuentes de variación no se deben al azar y resultan muy significativas. -- Ello invalida las generalizaciones que se han realizado en ocasiones con relación a los hallazgos encontrados en una especie para las demás como por ejemplo en el caso del orotato. En efecto, la acumulación de este precursor de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos en leche de vaca se había generalizado al resto de los rumiantes (6) (28), lo que no es correcto a la luz de nuestros resultados.

Las diferencias fundamentales encontradas en la composición nucleotídica de los diversos tipos de leche analizados podrían estar ligadas a la naturaleza específica de los fenómenos secretores de cada especie o a las evoluciones de origen enzimático del contenido nucleotídico de la leche acumulada en la glándula mamaria. Esta última hipótesis parece menos probable ya que la leche de cerda obtenida con oxitocina presenta un mismo patrón nucleotídico que la obtenida mediante ordeño.

Conviene indicar que existe una diferencia notable entre el contenido nucleotídico de la glándula mamaria y el de la leche segregada para todas las especies estudiadas. Sin embargo, los datos bibliográficos para la glándula mamaria son muy escasos (9) (10). Se refieren concretamente a un estudio cualitativo de la composición nucleotídica en vaca durante la lactación y a un estudio cuali y cuantitativo de los nucleótidos de las glándulas mamarias de oveja y cabra durante la última parte de la gestación y todo el periodo de lactación, siendo en ambos casos muy -

pequeño el número de muestras biológicas analizadas.

En el caso de la oveja los nucleótidos derivados de la adenina son diez veces más abundantes en el tejido mamario que en la leche segregada mientras que los derivados de la uridina son tres veces más abundantes en la leche que en la glándula mamaria. En la leche de oveja el 80 % de los nucleótidos están ligados a azúcares mientras que en la glándula mamaria estos nucleótidos representan tan solo el 15 % del total. Por otra parte, la relación UDPGa/UDPG, que en la leche de oveja es cercana a 1, oscila entre 1/3 y 1/20 en la glándula mamaria. El contenido nucleotídico de la leche producida durante 24 horas representa de 2 a 5 veces el de la glándula mamaria en lactación, por tanto, ésta debe ser la sede de una síntesis activa de nucleótidos necesarios para satisfacer las necesidades de coenzimas y precursores de ácidos ribonucleicos - cuyo contenido aumenta desde el parto (19) - y para compensar las pérdidas importantes de nucleótidos que se producen al ser retirada la leche de la glándula.

La composición nucleotídica cualitativa y cuantitativa de la leche de cabra difieren también sensiblemente de la encontrada en la glándula mamaria (10). Como en la leche de oveja y la secreción calostrál de vaca la relación UDPGa/UDPG se mantiene alrededor de 1 en contraposición a 0.05 - 0.2 para la glándula mamaria en lactación. De nuevo hay que presuponer una síntesis activa de nucleótidos por la glándula mamaria y una acumulación selectiva en la leche segregada.

Resulta difícil interpretar desde un punto de vista dinámico el contenido nucleotídico de la leche puesto que carecemos de datos bioquímicos sufi-

cientes. Ello solo será posible cuando se realicen los oportunos estudios enzimáticos y metabólicos en la glándula mamaria y en la leche de las especies consideradas. A este respecto resultan claras las funciones de los nucleótidos UDPG y UDPGa en la biosíntesis de lactosa. No ocurre igual con los UDP-N-acetil hexosaminas y GDP-hexosas cuyo papel en la biosíntesis de leche no está dilucidado, aunque la presencia de hexosaminas en las glucoproteínas de las membranas de los glóbulos grasos de la leche se ha reconocido desde hace ya algunos años (140).

El estudio de la evolución de los nucleótidos de leche de vaca, oveja, cabra y cerda y de leche humana durante la lactación ha sido posible por la puesta a punto de una metodología adecuada. De ella resaltamos las determinaciones enzimáticas de AMP, CMP, GMP y UMP, A_t , C_t , G_t , y U_t , y UDPG y UDPGa que han sido aplicadas por primera vez a este material biológico. Por otra parte, la eliminación del ácido tricloroacético para la desproteínización de la leche y la absorción sobre carbón activo de los filtrados libres de proteínas han supuesto una ganancia sensible de tiempo a la hora de la realización del análisis cromatográfico de los nucleótidos de leche.

Se han establecido las relaciones existentes entre densidades ópticas medidas a 250 nm, 260nm, y 280nm y el contenido en nucleótidos de los filtrados libres de proteínas correspondientes a leches de vaca, oveja, cabra y humana. En todos los casos se ha obtenido una relación lineal con coeficientes de correlación cercanos a 1. Estas relaciones permiten estimar con un error menor del 5 % el contenido en nucleótidos en los diversos tipos de leche estudiados.

De igual forma se ha podido constatar que los niveles de nucleótidos en leches de vaca, oveja, cabra y humana son independientes de la concentración de proteínas.

El estudio del efecto de los tratamientos térmicos industriales sobre la concentración de nucleótidos de leche de vaca ha revelado que existen diferencias significativas en las concentraciones de orotato entre leche cruda, leche esterilizada convencionalmente y leche en polvo. Por otra parte las concentraciones de AMP y CMP resultan significativamente menores en leche pasteurizada, esterilizada y en polvo que en las obtenidas para leche cruda. El proceso higienizador de esterilización UHT por inyección directa de vapor a la leche (Uperización^R) parece ser el que menos afecta al contenido nucleotídico de la leche de vaca. La disminución en las concentraciones de nucleótidos de leche de vaca de acuerdo con los resultados obtenidos parece estar relacionada con el tiempo de permanencia a la temperatura de proceso más que con la temperatura en sí misma.

4.2.- Efecto de los nucleótidos sobre el crecimiento de B. bifidumTi

Parecen bien establecidas la presencia e importancia numérica de las bifidobacterias en la flora intestinal de los lactantes lo cual da lugar a efectos beneficiosos tanto en la fisiología digestiva como en la prevención de enfermedades que se desarrollan en el intestino del niño (110)(111)(112)(113).

La mayoría de los trabajos realizados para determinar las sustancias estimuladoras del crecimiento de las bifidobacterias se han circunscrito a B.bifidum var. pennsylvanicus, mutante que ha perdido la capacidad de -



sintetizar glucosamina. La presencia de esta bacteria en heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna o con una alimentación mixta, es sin embargo, minoritaria (137) (138). El 80 % de las cepas de B.bifidum aisladas de heces de lactantes pertenecen al tipo Ti. (139). Los requerimientos nutritivos de esta bacteria han sido estudiados por Gyllenberg (121) y por Raynaud (139) pero no de una forma completa. En efecto, dichos autores han investigado la influencia de ciertos aminoácidos, vitaminas y factores peptídicos derivados de la caseína, utilizando medios de crecimiento complejos que incluían xantina, uracilo, adenina y guanina. Por ello, aunque no hay estudios del efecto de los nucleótidos sobre el crecimiento de B. bifidum en ninguna de sus variedades, parece claro que era preferible realizarlos sobre la raza tipo Ti.

Los aminoazúcares glucosamina y N-acetilgalactosamina no estimulan el crecimiento de B.bifidum Ti mientras que la galactosamina parece inhibirlos - - aunque ligeramente. La adición de N - acetil - glucosamina a los medios de cultivo tiene como resultado un aumento escaso de la acidez desarrollada por B.bifidum Ti. Estos resultados contrastan con los obtenidos en la variedad pennsylvanicus por otros autores (119) (130) (131) pero son lógicos ya que la cepa Ti al contrario que la pennsylvanicus no ha perdido la capacidad de sintetizar aminoazúcares.

El aminoácido cisteína resulta imprescindible para el crecimiento de B. bifidum Ti. La acidez desarrollada por esta bacteria en leche de vaca estéril supone tan solo el 59 % de la alcanzada en este mismo medio suplementado con cisteína. Se confirman así los resultados obtenidos por Gyllenberg en distintas especies de bifidobacterias. (121).

La adición individual de AMP, CMP, GMP, UMP, ó IMP a un medio de cultivo mínimo estimula ligera pero significativamente el crecimiento " in vitro" de B. bifidum Ti. El mismo efecto se obtiene cuando la adición de estos nucleótidos se efectúa sobre un medio de cultivo constituido por leche de vaca estéril, cisteína y diversas vitaminas. AMP y CMP no presentan un efecto activador en este medio, lo cual resulta lógico ya que la leche de vaca contiene estos nucleótidos.

La adición simultánea a los medios de cultivos mínimos de todos los nucleótidos monofosfato en ensayos estimula el crecimiento de B. bifidum Ti con un nivel de confianza mayor que 99.5 %. Por otra parte existen diferencias significativas con un error menor que 0.005 entre la acidez y/o turbidez desarrolladas en los medios de cultivo suplementados con un sólo nucleótido y los mismos medios que contienen todos los nucleótidos ensayados. Por el contrario, UDPG, UDPGa, UDP-N-AG y UDP-N-AGa no estimulan el crecimiento " in vitro" de B. bifidum Ti si previamente el medio de cultivo contiene los nucleótidos monofosfato derivados de la adenina, citosina, guanina, uracilo e inosina.

La acidez desarrollada por B. bifidum Ti en leche humana difiere significativamente de la alcanzada en leche de vaca estéril adicionada de cisteína y vitaminas y de este mismo medio suplementado con nucleótidos. No obstante, la acidez desarrollada por B. bifidum Ti en este último medio resulta también significativamente mayor que la obtenida para el crecimiento de B. bifidum Ti en el medio de cultivo sin nucleótidos.

Se deduce, por tanto, que la leche humana resulta insustituible en cuanto que da lugar al máximo desarrollo de B. bifidum Ti. No obstante, los nucleó-

tidos presentes en leche humana y ausentes en leche de vaca (UMP y GMP) pueden contemplarse como sustancias que potencian el crecimiento de B. bifidum Ti, sugiriendo la conveniencia de su adición a leches humanizadas fabricadas a partir de leche de vaca para mejorar la adaptación.

V.-CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

1^a.- Se ha puesto a punto una metodología adecuada para el análisis de los nucleótidos presentes en leche que permite obtener resultados múltiples susceptibles de ser tratados estadísticamente, y - que se ha aplicado por primera vez a este material biológico.

2^a.- Las secreciones calostrales de todas las especies estudiadas tienen una composición nucleotídica semejante. Resultan particularmente abundantes los uridín derivados UMP,UDPG,UDPGa,UDP-N-AG y UDP-N-AGa y están presentes CMP, AMP y algunos guanósín derivados unidos a restos glucídicos.

3^a.- El contenido nucleotídico de las leches de cabra, oveja y humana resulta cualitativamente similar. Desde un punto de vista cuantitativo la leche de oveja contiene de una a dos veces más nucleótidos que la leche de cabra y ésta cinco veces más - que la humana.

4^a.- La composición nucleotídica de la leche de vaca difiere de la de otras especies por sus altos niveles en orotato y su carencia en uridín y guanósín derivados.

5^a.- La evolución del contenido nucleotídico durante la lactación es muy similar en leches de vaca, oveja y cabra. Se caracteriza por un fuerte incremento desde el parto hasta 48 - 120 horas después, seguido -- de un rápido descenso y posterior estabilización - - entre el 15^o y 30^o día de lactación.

- 6^a.- La composición nucleotídica en leche humana permanece constante cualitativamente y cuantitativamente durante toda la lactación. En este periodo el orotato está ausente mientras que el GMP aparece en pequeñas cantidades como un compuesto típico de la leche humana.
- 7^a.- El contenido total de nucleótidos en la leche de las especies estudiadas es independiente de la concentración de proteínas.
- 8^a.- Se han establecido las ecuaciones de dependencia lineal entre las densidades ópticas medidas a 250 nm, 260 nm y 280 nm de los filtrados libres de proteínas y el contenido total de nucleótidos para las leches de vaca, oveja, cabra y humana, lo que permite la estimación directa de dicho contenido.
- 9^a.- Los tratamientos térmicos industriales de higienización afectan significativamente el contenido de nucleótidos de leche de vaca. La esterilización UHT por inyección directa de vapor, sin embargo, no produce ningún cambio significativo en la concentración de dichos nucleótidos.
- 10^a.- El crecimiento "in vitro" de B. bifidum Ti no depende de la presencia de glucosamina en los medios de cultivo y se estimula por la adición simultánea de los nucleótidos CMP, AMP, GMP, UMP e IMP.
- 11^a.- La adición de nucleótidos a la leche de vaca estimula el crecimiento de B. bifidum Ti aunque dicho crecimiento es mayor en leche humana.

RESUMEN Y CONCLUSION GENERAL

Una vez puesta a punto la metodología adecuada se ha estudiado la evolución de la composición nucleotídica de leches de vaca, oveja, cabra y humana durante la lactación. Se ha puesto de manifiesto que la leche de vaca carece de algunos nucleótidos característicos de la leche humana. Dado que los nucleótidos estimulan el crecimiento de B. bifidum T_i, su adición a leches maternizadas, fabricadas a partir de leche de vaca, puede influir favorablemente en la fisiología digestiva del recién nacido.

VI.-BIBLIOGRAFIA

VI BIBLIOGRAFIA

- 1.-ABRAHAM, S., HIRSCH, P.F. y CHIKOFF, I., J.Biol Chem., 211, 31, (1954).
- 2.-FOLLEY, S.J., Dairy Sci. Abstr., 23, 511, (1961).
- 3.-WOOD, H.G., GILLESPIE, R., HANSEN, R.E. WOOD, W.A. y HARDENBROOK, H.J., Biochem.J., 73, 694, (1959).
- 4.-LARSON, B.L., J.Dairy Sci., 52, (5), 737 (1971).
- 5.-BARRY, J.M. en " The Mammary Gland an its Secretion ". Vol. I, Ac. Press. Nueva York.(1961)
- 6.-MING - HUNG CHEN y LARSON, B.L. Dairy Sci., 54 (6) 842, (1971).
- 7.-RUTTER, W.J. y HANSEN, R.G., J.Biol.Chem., 202, 323, (1953).
- 8.-SMITH, E.B. y HILLS, G.T., Biochim.Biophys. Acta, 13, 587, (1954).
- 9.-MANSON, W., Biochim. Biophys. Acta, 19, 398,(1956).
- 10.-DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G. y GUNTZ, G., C.R. Acad. Sci., 248, 2531, (1959).
- 11.-Mc LEAN, P., Biochim. Biophys. Acta, 30, 316,(1958)
- 12.-DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G. y GUNTZ, G., C.R. Acad. Sci. 246, 652 , (1958).
- 13.-DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G. y GUNTZ, G., C.R. Acad. Sci., 246, 2820 (1958)
- 14.-DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G. y GUNTZ, G., Rev. Esp. de Fisiol., 15, (4), 301, (1959).
- 15.-DEUTSCH, A. y MATTSON, S., Milk and Dairy Research, Alnarp. Sweden, Report. 63, (1960).

- 16.-DEUTSCH, A. y NILSSON, R., XVII International Dairy Congress, 125 (1966)
- 17.-JOHKE, T. y GOTO, T., J. Dairy Sci., 45, 735,(1962)
- 18.-RASHID, R., Die Nahrung., 17, (5), 559 (1973)
- 19.-DAVIS, J.W.,LIN. T.M.Y. y EDDINGTON, C.L., Federation Proc., 25, 348, (1966)
- 20.-GISCARO, G. Y BELLONY, E., Ann. Soc. Chim. Milano 11, 18, (1904).
- 21.-BUCKL, A., Diss.Tech. Hochschule, Munich, (1967).
- 22.-ADACHI, T., TANIMURA, A. y ASAHINA, M., Vitamino-logy, 9, 217, (1963).
- 23.-HALLANGER, L.E., LAAKSO, J.W. y SCHULZE, M.O., J. Biol.Chem., 202, 83 (1953).
- 24.-TSUGO, T.M., IWAIDA, M. y SAITO, Y., Proc.Int.Dairy Congr., XVII, B, 2, 245, (1966).
- 25.-KIERMEIER, F., y BUCKL, A. Zeitschr. fuer Lebensmit. und Forsch. 138, (5), 284, (1968).
- 26.-MUENCHBERG, F., TSOMPANIDOU, G., y LESKOVA, R. Milch wissenschaft, 26, (4), 210, (1971).
- 27.-LARSON, B.L. y HEGERTY, H.M., American Dairy Science Association. 72nd Annual Meeting, D-62,60, (1977)
- 28.-LARSON,B.L. y HAGEMAN, C.C.,Federation Proc.,29,(2), 445, (1970)
- 29.-YATES, R.A., y PARDEE, A.B.,J.Biol. Chem., 221, 743, (1956).
- 30.-LOTZ, M., FALLON, H.J., y SMITZ, L.H., Nature, 197, 194, (1963).
- 31.-LARSON,B.L., J. Dairy Sci. 59, (11), 1881, (1976).
- 32.-LIEBERMAN, I., KORNBERG, A. y SIMMA, E.S., J. Biol. Chem. 215, 403, (1953).
- 33.-SMITZ, L.H., HUGULEY, D.M. y BAIN, J.A., en "The Me- tabolic Basis of Inherited Diseases". Stanbury, J.B. Wyngaarden, J.B., y Fredrickson, D.S., Mc.Graw-Hill, New York, 2^a Edición, (1966).

- 34.-NEUMAN, J., y JONES, M.E., Arch. Biochem. Biophys. 104, 438, (1964).
- 35.-GERHART, J.C., y PARDEE, A.B., J. Biol.Chem., 237, 891, (1962)
- 36.-HAGER, S.E. y JONES, M.E., J. Biol. Chem., 242, 5674, (1967).
- 37.-BLAIR, D.G.R., y POTTER, V.R., J.Biol. Chem., 236 2503, (1961)
- 38.-CREASEY, W.A. y HANDSCHUMACHER, J., J.Biol. Chem. 236, 2058, (1961)
- 39.-APPEL, S.H., J. Biol.Chem., 243, 3924, (1968)
- 40.-ROBINSON, J.L. y LARSON, B.L., J. Dairy Sci., 57 (11), 1410, (1974).
- 41.-FORREST, R.J. y HANSEN, R.G., Quart. Bull. Mich. Agri. Expt. Sta. East. Lansing, MI, 47, 24, (1964).
- 42.-BURUIANA, L.M. y GERANIOU, A., Le Lait, XXXI, 134 (1951).
- 43.- FREEDLAND, R.A., M.S. Thesis, University of Illinois, Dept. Dairy Sci. Urbana, (1955).
- 44.-SWITZER, R.L., J. Biol. Chem., 244, 2854, (1969)
- 45.-VEKICH, A.J., ROBINSON, J.L. y LARSON, B.L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 1298, (1973).
- 46.-LARSON, B.L., J. Dairy Sci., 48, 133, (1965)
- 47.-ROSE, D., BRUNNER, J.R. KALAN, E.B., LARSON, B.L. MELNYCHYN, R.S., SWAISGOOD, H.E. y WAUGH, D.F., J. Dairy Sci., 53, 1, (1970).
- 48.-BARRY, J.M., Biol. Rev., 39, 194, (1964).
- 49.-SHAKANI, K.M., y SOMMER, H.H., J. Dairy Sci. 34 1010, (1951).
- 50.-MEPHAM, T.B., y LINZELL, J.L., Biol.Chem. J., 101, 76 (1966).
- 51.-VERBEKE, R. y PEETERS, G., Biochem. J. 94, 183(1965).
- 52.-VERBEKE, R., PEETERS, G., MASSART, LEEN, A.M. y COCQUYT, G. Biochem. J. 106, 719, (1968).

- 53.-SCHINGOTHE, D.J., HAGEMAN, E.C. y LARSON, B.L.,
Biochim. Biophys. Acta, 148, 469, (1967).
- 54.-LIPPMANN, F., Progr. in Nucleic Acid Res., 1,
247, (1962)
- 55.-LELOIR, L.F. y CARDINI, C.E. en Milk:The Mammary
Gland and its Secretion, Vol.I, New York, Academic
Press, (1961).
- 57.-FOLLEY, S.J., WOOD, H.G., PEETERS, G.J., JACOBSON,
B. y WILKEN, J., J. Biol. Chem., 237, 1034, (1962).
- 58.-CARUBELLI, R., TAHA, B. TRUCCO, R.E. y CAPPUTO, R.,
Biochim. Biophys. Acta, 83, 224, (1964).
- 59.-BARTLEY, J.C., ABRAHAM, S. y CHAIKOFF, I.L., J.Biol.
Chem., 241, 1132, (1966) .
- 60.-BRODBECK U., DENTON, W.L., TANAHASHI, N. y EBNER,
K.E., J. Biol. Chem., 242, 1391 (1967).
- 61.-BREW, K., VANAMAN, T.C. y HILL, R.L., Proc. Natl.
Acad. Sci., 59, 491, (1968).
- 62.-EBNER, K.E. y BRODBECK, U., J.Dairy Sci., 51, 317,
(1968).
- 63.-KUHN, N.J., Biochem. J.,106, 743, (1968).
- 64.-BALDWIN, R.L., J. Dairy Sci., 49, 1533, (1966).
- 65.-HEITZMAN, R.J., J. Endocrinolog., 40, 81 (1968).
- 66.-JONES, E.A., Biochem. J., 103, 420, (1967).
- 67.-TURKINGTON, R.W., y HILL, R.L., Science, 163, 1458
(1969).
- 68.-JACK, E.L. y SMITH, L.M., J. Dairy Sci., 39, 1
(1956).
- 69.-HILDIRCH, A., y WILLIAMS, S., en " The Chemical
Composition of Fats ", 4^a Ed. New York, John Wiley,
(1964).
- 70.-BARRY, J.M., Outlook on Agriculture, 5, 129,(1966).
- 71.-BARRY, J.M., BARTLEY, W., LINZELL, J.L. y ROBINSON,
D.S., Biochem. J., 89, 6, (1963).
- 72.-ANNISON, E.F., LINZELL, J.L., FAZAKERLEY, S., y
NICHOLS, B.W., Biochem. J., 102, 637, (1967).

- 73.-RIIS, P.M., LUICK, J.R. y KLEIBER, M., Amer. J. Physiol., 198, 45, (1960).
- 74.-BARRY, J.M., Biol. Rev., 39, 194, (1964).
- 75.-GROVES, T.D. y LARSON, B.L., Biochim.Biophys. Acta., 104, 462, (1965).
- 76.-LINZELL, J.L., MEPHAM, T.B., ANNISON, E.F. y WEST, C.E., Biochem. J., 103, 42, (1967).
- 77.-HARDWICK, D.C., Biochem. J., 99, 228, (1966).
- 78.-WEST, C.E., ANNISON, E.F. y LINZELL, J.L., Biochem. J., 104, 59, (1967).
- 79.-POPJAK, G., FRENCH, T.H. y FOLLEY, S.J., Biochem. J., 48, 411, (1951).
- 80.-ANNISON, E.F. y LINZELL, J.L., J.Physiol., 175, 372, (1964).
- 81.-GARTON, G.A., J. Lipid. Res., 4, 237, (1963).
- 82.-LACHANCE, J.P. y MARAIS, R., Biochem.Biophys. Res. Comm., 20, 269, (1965).
- 83.-LUICK, J.R. y KAMEOKA, K.K., J. Dairy Sci., 49, 98 (1966).
- 84.-KINSELLA, J.E. y Mc. CARTHY, R.D., Biochim. Biophys. Acta., 164, 518, (1968).
- 85.-DILS, R. y POPJAK, G., Biochem. J. 83, 41, (1962).
- 86.-BU'LOCK, J.D. y SMITH, G.N., Biochem. J., 96, 495 (1965).
- 87.-GERSON, T., SHORLAND, F.B.; WILSON, G.F. y REID, C.W.S., J. Dairy Sci., 51, 356, (1968).
- 88.-SMITH, L.M., FREEMAN, C.P. y JACK. E.L., J. Dairy Sci., 48, 531, (1965).
- 89.-KUHN, N.J., Biochem. J., 105, 213, (1967).
- 90.-EBNER, K.E., HAGEMAN, E.C. y LARSON, B.L., Exptl. Cell Res., 25, 555, (1961).
- 91.-LEVY, H.R., Biochim. Biophys. Acta, 84, 229, (1964).
- 92.-TWAROG, J.M. y LARSON, B.L., Exptl. Cell Res., 34 88, (1964) .

- 93.-EBNER, K.E., HOOVER, C.R., HAGEMAN, E.C., y
 73.-RITTS, P.M., QUICK, J.P., y KLEIBER, M. Ann. N.Y. Acad. Sci., 109, 467, (1965).
- 94.-LARSON, B.L., Exptl. Cell Res., 23, 373 (1961)
- 94.-LARSON, B.L. en " 20 Annual Symposium on funda-
 74.-BARRY, J.M., Biol. Rev., 39, 194, (1964)
- 75.-CROOYS, T.D., y LARSON, B.L., Biochim. Biophys.
 (1967).
- 95.-KUHN, N.J., en " Biochemistry of Lactogenesis",
 76.-LINZELL, J.L., MEPHAM, T.B., ANNISON, E.F., y WEST,
 New York, Ac. Press, (1971).
- 96.-NELSON, W.L., HEYTLER, P.G. y CIACCIO, E.I.,
 77.-HARDWICK, D.C., Biochem. J., 99, 228, (1965)
- 78.-WEST, C.E., ANNISON, E.F., y LINZELL, J.L., Bio-
 chem. J., 104, 55, (1967)
- 97.-DENAMUR, R., C.R. Acad. Sci. 256, 4748, (1963)
- 98.-STRICKER, P. y GRUETER, F., C.R. Soc. Biol.
 79.-POPIAK, G., FRENCH, T.H., y FOLLEY, S.J., Biochem.
 (Paris), 99, 1978, (1928).
- 99.-FOLLEY, S.J. en " The Physiology and Biochemistry
 80.-ANNISON, E.F., y LINZELL, J.L., J. Physiol., 173
 of Lactation", Edinburg, Oliver y Boyd, (1956).
- 100.-KILPATRICK, R., ARMSTRONG, D.T. y GREEP, R.V.
 81.-CARTON, G.A., J. Lipid Res., 4, 237, (1963).
- 82.-LACHANCE, J.P., y MARAIS, R., Biochem. Biophys. Res.
 101.-RIVERA, E.M., y BERN, H.A., Endocrin., 69, 340
 (1961)
- 83.-LITICK, J.B., y KAMEOKA, K.K., J. Dairy Sci., 49, 93
 (1966)
- 102.-COWIE, A.T., en " Milk: The Mammary Gland and its
 Secretion", Vol. I. New York, Ac. Press, (1961).
- 84.-KINSELLA, J.F., y McARTHUR, B.D., Biochem. Biophys.
 103.-MEITES, J., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 100, 750
 (1950).
- 85.-RITTS, R., y POPJAK, G., Biochem. J., 83, 41, (1962)
- 86.-BULLOCK, J.D., y SMITH, G.N., Biochem. J., 96, 445
 (1965)
- 104.-MEITES, J., en " Neuroendocrinology" Vol. I, New
 87.-GEPSON, T., SHORLANE, F.B., y WALSON, G.F., y RITTS,
 York, Ac. Press. (1966).
- 105.-YOKOYAMA, A. y OTA, K., J. Endocrinol., 33, 341,
 (1965).
- 88.-COWIE, A.T., J. Dairy Sci., 51, 356, (1968)
- 106.-MEITES, J. en " The Mammary Gland and its Secre -
 89.-SMITH, I.M., FREEMAN, P., y JACK, E.L., J. Dairy
 tion", Vol. I. New York, Ac. Press. (1961).
- 107.-COWIE, A.T., J. Endocrinol., 44, 437, (1969)
- 90.-CHEN, M.L., Biochem. J., 105, 213, (1967)
- 108.-BAUMGARTEL, T., Med. Klin., 51, 476, (1956).
- 91.-FRMBA, K.L., HAGEMAN, E.C., y LARSON, B.L., Exptl.
 109.-BAUMGARTEL, T., Heilkunst, 70, N° 3, (1957).
- 92.-SEELIGER, H.P.R., y WERNER, H., Ann. Inst. Pasteur,
 110.-SEELIGER, H.P.R., y WERNER, H., Ann. Inst. Pasteur,
103, 911, (1963).
- 93.-TWAROG, J.M., y LARSON, B.L., Exptl. Cell Res., 88
 111.-ZUBRYCKI, L. y SPAULDING, E.H., J. Bact., 83, 968
 (1962).

- 112.-HERMANN, W., Zentbl. Bakt. Parasitenk. (Abt. I. Orig.), 170, 316, (1957).
- 113.-DEHNERT, J., Zentbl. Bakt. Parisitenk. (Abt.I. Orig.), 169, 66, (1957).
- 114.-BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 8^a edic., R.E. BUCHANAN & N.E. GIBBONS Editores (1974)
- 115.-WEISS, N., J.E. y RETTGER, L.F., J. Bacteriol, 28, 501, (1934).
- 116.-WEISS, N., J.E. y RETTGER, L.F., J. Bacteriol, 35, 17 (1938).
- 117.-REUTER, G., Zentbl. Bakt. Parasitenk. (Abt. I. Orig.) 191, 486, (1963).
118. SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., ZANI, G., CROCIANI, F., y MATTEUZZI, D., Int. J. Syst. Bacteriol., 21 (4), 276, (1971).
- 119.-GYORGY, P., Pediatrics., 11, 98, (1951).
- 120.-GYORGY, P., NORRIS, R.F. y ROSE, C.S., Arch. Biochem. and Biophys., 48, 193, (1954).
- 121.-SUNDMAN, V., BJORKSTEN, K.A.F. y GYLLENBERG, H. J., J. Gen. Microb., 21, 371, (1959).
- 122.-WERNER, H., J. Appl. Bact., 29, (1), 138, (1966).
- 123.-ORLA-JENSEN, S., OLSEN, E. y GEILL, T. en " Senility and intestinal flora". K. Danske. Vidensk. Selsk. Biol. Skrif., III, 44, (1945).
- 124.-HAENEL, H., Zentbl. Bakt. Parasitenk. (Abt. I. Orig.), 170, 323, (1957).
- 125.-PETUELY, F., y LINDNER, G., Zentbl. Bakt. Parasitenk. (Abt. I. Orig.), 195, 347, (1965).
- 126.-NISSLE, A., Med. Klinik, 51, 635, (1956).
- 127.-NEGISHI, A. y BILLY, C., Ann. Inst. Pasteur, 102, 235 (1962).
- 128.-JAO, B.Y.C., MIKOLAJEIK, E.M. y HANSEN, P.N.T., American dairy Science Association, 72nd Annual Meetin (1977).
- 129.-TOMARELLI, R.M., NORRIS, R.F., GYORGY, P., HASSINEN, J.B. y BERNHART, F.W., J. Biol. Chem., 181, 879, (1949).

- 130.-TOMARELLI, R.M., HASSINEN, J.B., ECKHARDT, E.R., CLARK, R.H. y BERNHART, F.W., Arch. Biochem. and Biophys., 48, 225, (1954).
- 131.-NORRIS, R.F., FLANDERS, T., TOMARELLI, R.M. y GYORGY, P., J. Bact., 60, 681, (1950).
- 132.-KOJIMA, M., SUDA, S., MOTTA, S. HAMADA, K., J.Bact. 95, (2), 710, (1968).
- 133.-YOSHIOKA, Y., IDUASAKI, T. y KANAUCI, T., J. Agr. Chem. Soc. Japan., 42, 651, (1968).
- 134.-ZILLIKEN, F., ROSE, C.S., BRAUN, G. y GYORGY, P. Arch. Biochem. and Biophys., 54, 392, (1955).
- 135.-POPE, R.M., TOMARELLI, R.M. y GYORGY, P., Arch. Biochem. and Biophys., 68, 362, (1957).
- 136.-CABEZAS, J.A., CARRION, A. y VAZQUEZ-PORTO, J., Rev. Esp. de Fisiol., 24, 2, 85, (1968).
- 137.-O'BRIEN, P.J., GLICK, M.C. y ZILLIKEN, F., Biochim. Biophys. Acta, 37, 357, (1960)..
- 138.-GLICK, M.C., CHEN, I.W.. y ZILLIKEN, F., J. Biol. Chem., 237, 981, (1962).
- 139.-LEVESQUE, J., GEORGES - JANET, L. y RAYNAUD, M., Arch. Péd., 17, 553, (1960).
- 140.-THOMSON, M.D., y BRUNNER, J.R., J. Dairy, Sc., 42 369, (1959).
- 141.-DE MAN, J.C., ROGOSA, M. y SHARPE, M.E., J. Appl. Bact., 23, 130, (1960).
- 142.-BREWER, J. Bact., 39, 10, (1940).
- 143.-VERA, J. Bact., 47, 59, (1944)
- 144.-HURLBERT, R.B., SCHMITZ, H., BRUM. A.F. y POTLER, V. R., J. Biol. Chem., 209, 23, (1954).
- 145.-CHERRY, J.H., y HAGEMAN, R.H., Plant. Physiol., 35 343, (1960).
- 146.-COHN, W.E. en "Methods of Enzymology" Vol. III., (107) 724, (1957).
- 147.-PALADINI, A.C., y LELOIR, L.F., Biochem. J., 51 , 426, (1952).

- 148.-KREBS, H.A. y HEMS, R., Biochim. Biophys. Acta, 12, 172, (1953).
- 149.-PARTRIDGE, S.M., Biochem. J, 42, 238, (1948).
- 150.-MARKHAM, R. y SMITH, J.D., Biochem., J, 45, 249 (1949).
- 151.-KEPPLER, D., en " Methods of Enzymatic Analysis", Vol. 4, 2088, 2^a Edición, (1974).
- 152.-MOELLERING, H en " Methods of Enzymatic Analysis", Vol. 4, 1959, 2^a Edición, (1974).
- 153.-KEPPLER, D. y DECKER, K. en " Methods of Enzymatic Analysis", Vol. 4, 2221, 2^a Edición (1974)
- 154.-A/S N. FOSS ELECTRIC. Manual de instrucciones de PRO-MILK - II. (1967).
- 155.-CHING CHUN LI, Introducción a la estadística experimental, Ed. OMEGA, (1969).