



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Aislamiento, Purificación y Caracterización de una Hormona Neurodepresora de la Glándula Sinusal del Camarón

PENAEUS VANNAMEI (BOONE)



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q. F. B. ORIENTACION B'QUIMICO-MICROBIOLOGICO
P R E S E N T A
Carlos Arámburo de la Hoz
MEXICO, D. F. 1978



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS 1978
LAB _____
CDD M. 33 35
FECHA _____
PROG _____



Jurado asignado originalmente según el tema:

Presidente	Profra. GUADALUPE VELEZ PRATT
Vocal	Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA
Secretario	Dr. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN
1er. Suplente	Dra. VICTORIA VALLES DE BOURGES
2o. Suplente	Profra. MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

Sustentante

CARLOS ARAMBURO DE LA HOZ

Asesor


Dr. ALBERTO HUBERMAN W.

AGRADECIMIENTOS.

La realización de este trabajo fue posible gracias a un donativo del Fondo de Fomento Educativo otorgado al Dr. Alberto Huberman en el año de 1977.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Hugo Aréchiga y a Víctor Anaya, del Departamento de Fisiología del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por su valiosa colaboración durante la realización de este proyecto.

Con gratitud y cariño a todos aquellos
que, de una forma u otra, han intervenido
en mi vida para contribuir en la construcción
de mi desarrollo como ser humano.

Porque ellos me han enseñado, con pa-
labras, con hechos, con su vida misma, lo
que significa para el Hombre vivir:

Amar,

Aprender,

Luchar,

Construir.

"¿ De qué están hechas todas las cosas ?"

Tales de Mileto.

INDICE.-

	página
I) INTRODUCCION	1
II) MATERIALES Y METODOS	12
Limpieza del material.....	12
Animales.....	12
Reactivos.....	13
Soluciones amortiguadoras.....	13
Tinciones.....	14
Observación bajo la luz ultravioleta.....	17
Bioensayo.....	17
Obtención de los tallos oculares.....	19
Extracción.....	19
Concentración.....	21
Diálisis.....	23
Cromatografía en Sephadex G-25 fino.....	24
Cromatografía en Sephadex G-15.....	28
Electroforesis en papel.....	28
Extracción a partir del papel.....	30
Electroforesis de alto voltaje.....	30
Electroforesis y cromatografía ascendente en capa del gada.....	34

	página
Cromatografía ascendente unidimensional.....	35
Electroforesis y cromatografía descendente	
en papel.....	36
Dansilación.....	37
Determinación aproximada de peso molecular.....	40
Determinación de actividad de la tripsina.....	41
Digestiones enzimáticas.....	44
Determinación de la composición de	
aminoácidos.....	45
III) RESULTADOS.....	47
IV) DISCUSION.....	108
V) CONCLUSIONES.....	120
VI) BIBLIOGRAFIA.....	124

INTRODUCCION

/ En todos los Metazoarios, tanto el sistema nervioso como el sistema endócrino coordinan de tal manera las actividades de los diferentes órganos y tejidos en el cuerpo, que los animales pueden funcionar como unidades individuales. El sistema nervioso sirve para una comunicación rápida, esencial, por ejemplo, en las contracciones sistemáticas de los músculos durante la locomoción. Para ello, se necesitan complicadas cadenas de neuronas interconectadas para la transmisión de impulsos, junto con la producción, altamente localizada, de sustancias químicas tales como la adrenalina y la acetil-colina, las cuales son destruidas rápidamente después de ejercer su acción. / El sistema endócrino utiliza fluidos corporales circulantes para transportar sus mensajeros químicos a órganos blanco más o menos específicos. / Estas sustancias químicas (las hormonas) toman tiempo en sintetizarse y alcanzar una concentración efectiva, y consecuentemente deben tener una vida biológica más larga que las sustancias químicas del sistema nervioso, antes de que sean eventualmente destruidas o excretadas. Por lo

tanto, las hormonas ejercen sus efectos en períodos largos, y el sistema endócrino controla los procesos a largo plazo dentro del organismo, tales como el crecimiento coordinado de los órganos o el mantenimiento de concentraciones apropiadas de metabolitos en la sangre y los tejidos.

Un animal obtiene información sobre las características químicas y físicas de su ambiente a través de receptores sensoriales. Esta información pasa al sistema nervioso, en donde es organizada e interpretada, y se inician impulsos motores que hacen que el animal reaccione en forma apropiada. Pero tales reacciones no están necesariamente fijadas en forma rígida.

La variación de la conducta es el resultado de complicadas interacciones neuronales dentro del sistema nervioso central.

No debe suponerse que el sistema nervioso funciona en forma independiente del sistema endócrino. Es aceptable pensar que la actividad nerviosa central en la mayoría de los animales se ve afectada por hormonas.

Lo opuesto también es verdadero: la producción de hormonas y su liberación depende de la actividad nerviosa. En los animales, muchas respuestas fisiológicas o de desarrollo son resultado de los cambios en la concentración de hormonas circulantes, causados por impulsos nerviosos que se originan en la estimulación de órganos sensoriales particulares. Los sistemas nervioso y endócrino son estrictamente interdependientes: la actividad normal de cualquiera de ellos requiere la presencia funcional del otro.

Paradójicamente, existen muy pocos órganos endócrinos que se encuentren ricamente inervados. Una excepción es la médula suprarrenal en los verte-

brados. Otros órganos endócrinos pueden contener fibras nerviosas, pero éstas se encuentran asociadas, por lo regular, con el suministro de sangre a las glándulas.

Entonces, ¿cómo puede la actividad nerviosa controlar a la función endócrina? Hace más de 50 años, Stefan Kopec sugirió que el cerebro larvario de la polilla Lymantria dispar producía una hormona que inducía la formación de la pupa. Sin embargo, se puso muy poca atención a los experimentos de Kopec, especialmente cuando se demostró que en otros insectos, las glándulas endócrinas epiteliales en la cabeza, las corpora allata, jugaban un papel importante en el control de la muda y la metamorfosis. En las mariposas y polillas, las corpora allata se encuentran cercanas al cerebro, y se supuso que Kopec había removido sin querer estas glándulas, junto con el cerebro.

Pero durante los últimos 20 años, las opiniones sobre la posible función endócrina del tejido nervioso han cambiado completamente. En la actualidad se acepta generalmente que la mayoría, si no todos, los sistemas nerviosos tienen la habilidad de producir hormonas. Este nuevo concepto resulta de la demostración experimental de que los sistemas nerviosos centrales de los artrópodos y los vertebrados contienen células endócrinas particulares. Estas células son morfológicamente similares a las neuronas, con axones, dendritas, gránulos de Nissl, y neurofibrillas. También son capaces de transmitir impulsos nerviosos, pero difieren de las otras neuronas en dos aspectos importantes: a) sus axones no inervan a órganos efectores tales como los músculos, y tampoco hacen conexiones sinápticas con otras neuronas; y b) producen sustancias, a menudo visibles en secciones teñi-

das de tejido nervioso, las cuales son liberadas de las terminaciones de los axones y ejercen un efecto biológico a cierta distancia. En efecto, las células son neuronas que también producen hormonas y consecuentemente han sido llamadas células neurosecretoras.

En muchos animales, las células neurosecretoras se encuentran a menudo reunidas en grupo. Las terminaciones de los axones de estas células se encuentran ensanchadas por lo regular, y el material sintetizado por la célula se puede almacenar ahí antes de ser liberado. Las terminales del axón se encuentran fuera del sistema nervioso, estrechamente asociadas al sistema circulatorio, el cual transporta las hormonas neurosecretadas a través de todo el organismo. En donde un número de células neurosecretoras se encuentran agrupadas, las terminales de sus axones pueden formar órganos bien desarrollados fuera del sistema nervioso, y ya que estas estructuras están combinadas con los vasos sanguíneos, reciben el nombre de órganos neurohémicos.

Las células neurosecretoras de los invertebrados y los vertebrados son en esencia similares, aunque es posible que las células de los invertebrados carezcan de dendritas y todavía no se ha probado concluyentemente que puedan transmitir impulsos nerviosos. El material elaborado por las células neurosecretoras es, en su mayoría, principalmente proteína, y reacciona en forma similar, tanto histológica como histoquímicamente, sin importar si es producido por células de invertebrados o de vertebrados. Ultraestructuralmente, el parecido es aún más estrecho: las partículas neurosecretadas son, por lo regular, esferas densas de entre 1000-3000 Å de diámetro, rodeadas por una membrana delgada.

Algunas células neurosecretoras, tanto en invertebrados como en vertebrados producen vesículas transparentes. Las esferas densas se originan en el aparato de Golgi, de manera similar a la formación de proteína en otras células endócrinas y glándulas ordinarias. Pero además, la síntesis, o tal vez la reorganización, del material neurosecretado puede llevarse a cabo en los axones de muchas células neurosecretoras. Se considera que las neurofisinas, material proteínico sintetizado en las células neurosecretoras de los vertebrados, son acarreadores de las hormonas. Si esto mismo se puede aplicar a todas las neurosecreciones de los invertebrados constituye aún un punto problemático.

En los animales invertebrados las glándulas endócrinas epiteliales, que son órganos endócrinos que se desarrollaron a partir de ganglios nerviosos transformados, y las células neurosecretoras, están presentes a menudo con órganos neurohémicos bien formados, aunque no necesariamente juntos en el mismo grupo taxonómico. Aún en animales complicados como los artrópodos, el número de glándulas endócrinas epiteliales es mucho menor que en los vertebrados, y en muchos grupos de invertebrados se encuentran ausentes. Consecuentemente, los mecanismos endócrinos en los invertebrados son, por lo regular, más simples que las intrincadas interacciones entre numerosas glándulas endócrinas que producen un número mayor de hormonas que caracterizan a la endocrinología de los vertebrados. Debido a la relativa escasez de glándulas endócrinas epiteliales en los invertebrados, los mecanismos neurosecretores adquieren gran importancia.

Sus propiedades duales, hacen a las células neurosecretoras las más

probables candidatos para transformar la información nerviosa en información endócrina. El significado de los procesos neurosecretores al coordinar los eventos de desarrollo dentro de un animal con las fluctuaciones ambientales, puede demostrarse claramente en donde esta función no se complica por la presencia de otros numerosos mecanismos endócrinos. El sistema neurosecretor hipotálamo-hipofisiario de los vertebrados juega el mismo papel que los sistemas neurosecretores, más simples, en los animales invertebrados; el conocimiento de estos sistemas debe preceder, seguramente, cualquier estudio de los mecanismos mucho más exactos, pero más complicados, que se encuentran en los vertebrados.

Los invertebrados incluyen grupos que poseen glándulas endócrinas epiteliales cuyas funciones pueden elucidarse por las técnicas clásicas de la extirpación y la reimplantación. Un número muy pequeño de hormonas procedentes de tales glándulas han sido purificadas, determinada su composición química, y pueden, ahora, sintetizarse. Esto permite experimentos mucho más sofisticados en los cuales pueden establecerse los efectos de diferentes concentraciones, la forma en que la combinación de hormonas puede interactuar, cómo puede afectar la introducción de hormonas particulares en tiempos no naturales, etc. Los bien desarrollados sistemas neurosecretores de algunos invertebrados permiten investigaciones detalladas sobre los problemas de la producción y liberación de combinaciones de hormonas neurosecretadas (1).

El sistema endócrino de los crustáceos no puede categorizarse tan fácilmente como el de otros invertebrados. Existe un par de órganos Y en la cabeza,

los cuales son glándulas endócrinas epiteliales análogos a las glándulas torácicas de los insectos, y en los crustáceos machos, un par de glándulas androgénicas en la vecindad de los ductos espermáticos. Existen tres principales órganos neurohémicos: la glándula sinusal, en los tallos oculares en los crustáceos pedunculados, y dentro de la cabeza en las formas con ojos sésiles; los órganos postcomisurales, detrás de la comisura tritocerebral; y los órganos pericárdicos, en la vecindad del corazón. La mayor confusión ha sobrevenido sobre la nomenclatura de las células neurosecretoras que proveen a la glándula sinusal. Muchas de las células están dentro del ganglio óptico, y se llaman órganos X, pero al menos se han descrito cuatro órganos X, localizados en segmentos diferentes de los ganglios ópticos. Se han encontrado cinco distintas terminales axónicas que difieren en forma, dimensiones y gránulos que contienen, en la misma glándula, y ya que los diferentes tipos de gránulos no están mezclados dentro de las terminales individuales, se considera que representan a diferentes hormonas (2).

Hormonas neurosecretadas en los crustáceos.-

Presumiblemente, debido a la facilidad de ensayar las hormonas cromatoforotrópicas en los crustáceos, la extracción, purificación e identificación de estas hormonas se ha desarrollado más rápidamente que la de las hormonas de desarrollo. Toda la evidencia disponible sugiere que las cromatoforotropinas y las hormonas adaptadoras a la luz del pigmento distal de la retina son péptidos. Son inactivadas por proteasas y se comportan como péptidos cuando se

les separa por electroforesis y filtración en gel (3). Se han purificado suficientemente dos hormonas que permiten el análisis de su composición de aminoácidos. La hormona adaptadora a la luz del pigmento distal de la retina es un octadecapéptido, con un peso molecular de alrededor de 2000 y los siguientes residuos de aminoácidos: arginina (1), ác. aspártico (2), treonina (1), serina (2), ác. glutámico (1), prolina (1), glicina (2), alanina (1), valina (1), metionina (2), isoleucina (3) y leucina (1) (4).

La hormona concentradora del pigmento rojo de Pandalus ha sido caracterizada aun más: la hormona es un octapéptido con la siguiente secuencia de aminoácidos: ác. piroglutámico-leucina-asparagina-fenilalanina-serina-prolina-glicina-triptofano-NH₂ (5). Se ha sintetizado la molécula y la hormona sintética tiene la misma actividad biológica que la hormona purificada de los tallos oculares. La hormona sintética de Pandalus no puede ser separada por filtración en gel, de las hormonas concentradoras del pigmento rojo de los tallos oculares de Uca y Palaemonetes, lo cual indica que las tres hormonas tienen el mismo o muy similar tamaño molecular. En forma similar, la hormona adaptadora a la luz del pigmento distal de la retina no puede separarse, por filtración en gel, de las hormonas dispersantes del pigmento en los cromatóforos, y estas hormonas aparentan ser péptidos de tamaños similares (6).

Existe alguna evidencia de que la hormona dispersante del pigmento negro en Uca está asociada con un acarreador de naturaleza lipoproteica, y que ambas se encuentran dentro de las células neurosecretoras y en la sangre.

La hormona hiperglucemiante de los crustáceos se ha purificado parcial-

mente y se trata de una proteína. Estudios comparativos sugieren que la estructura molecular de esta hormona difiere entre especies.

La hormona cardioaceleradora, liberada de los órganos pericárdicos de los cangrejos, también es un péptido. En Cancer borealis, se han extraído dos péptidos cardioaceleradores, con pesos moleculares de aproximadamente 1000 y no se sabe aún si se trata de distintas hormonas o si son productos de degradación de una sola hormona. Los experimentos diseñados para revelar la presencia de una proteína acarreadora asociada a la hormona cardioaceleradora en los órganos pericárdicos del cangrejo araña Libinia dubia no han podido mostrar ningún enlace de la hormona a una proteína, y han eliminado por completo la posibilidad de la existencia de una proteína transportadora con propiedades análogas a aquellas de las neurofisinas en los vertebrados.

La evidencia existente en los insectos y los crustáceos apoya fuertemente la noción de que las hormonas neurosecretadas son compuestos de naturaleza proteínica o peptídica. Los mecanismos neurosecretores de los artrópodos caen en paralelo con aquellos de los grupos vertebrados, donde las hormonas neurosecretadas son de una naturaleza química similar (3)

En estudios previos sobre el acocil mexicano Procambarus bouvieri (Ortmann) se ha detectado la existencia de una hormona con actividad neurodepresora, y se ha logrado aislarla, purificarla y caracterizarla (7). Esa especie, sin embargo, presenta un problema para continuar los estudios sobre esta molécula y es el de que es muy difícil obtener grandes cantidades de material en vista de la escasez de estos animales. Este hecho representa un obstá-

culo para proseguir las investigaciones, tanto bioquímicas como fisiológicas, necesarias para acabar de definir la naturaleza y la función de esta hormona en los organismos que la poseen.

En vista de lo anterior se decidió, en nuestro laboratorio, buscar un modelo que eliminara el problema mencionado en el párrafo que precede, y que permitiera, por lo tanto, obtener grandes cantidades de material de estudio; esto se lograría si encontráramos una especie abundante, fácilmente disponible, en donde se pudiera hallar la misma molécula y que se pudiera trabajar y medir con las técnicas con que ya contábamos.

Para conseguir este objetivo se realizaron estudios preliminares sobre varias especies de crustáceos marinos con el fin de averiguar si se encontraba una molécula con la misma propiedad neurodepresora que la que se había descubierto en Procambarus bouvieri.

Se pudo detectar la actividad neurodepresora en dichas especies, medidas con el sistema montado para Procambarus bouvieri.

Esto satisfacía las condiciones que habíamos puesto para cambiar de especie en nuestras investigaciones y nos permitió escoger un modelo adecuado a nuestras necesidades.

El modelo escogido fue el del camarón Penaeus vannamei (Boone), un crustáceo decápodo marino que se localiza en las costas mexicanas del Océano Pacífico.

Por lo tanto, en este estudio se tomó el objetivo de aislar, purificar y caracterizar la hormona neurodepresora de este nuevo modelo con el fin de

conocerla a fondo, comparar los resultados con los obtenidos previamente para Procambarus bouvieri, y tener material suficiente para proseguir estudios que permitirán ampliar el conocimiento sobre las hormonas neurosecretadas y su función en los organismos vivos.

II

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL

a) Limpieza del material.- Todo el material de vidrio utilizado en este trabajo fue lavado previamente en una mezcla sulfonítrica (ácido sulfúrico concentrado : ácido nítrico concentrado, 1:1, v/v), calentando dicha mezcla hasta la emisión de vapores. Después se enjuagó el material con agua bidestilada y desionizada, quedando, así, en condiciones de ser usado.

b) Animales.- Los tallos oculares utilizados fueron obtenidos de camarones blancos del Pacífico, de la especie Penaeus vannamei (Boone), capturados en las costas de Mazatlán, Sinaloa. Son organismos que durante las etapas juveniles de su ciclo biológico ingresan a las zonas laguneras de la costa o esteros, y después salen a mar abierto. Por esta razón, pueden ser

capturados en ambas zonas. Estos animales fueron utilizados sin distinción de sexo ni edad.

c) Reactivos.- Todos los reactivos usados fueron del mejor grado de pureza existentes en el mercado. En la preparación de las soluciones, así como en todos los procesos en general, se usó agua bidestilada y desionizada, a la cual nos referiremos durante la exposición de este trabajo simplemente como agua.

d) Soluciones amortiguadoras.-

1) Solución amortiguadora pH 1.8

Esta solución se preparó utilizando ác. fórmico :...ác. acético glacial : agua, en las proporciones 1:4:45, v/v/v.

2) Solución amortiguadora pH 10.0

Esta solución se preparó usando carbonato de amonio 0.1 M y ajustando a pH 10.0 con amoníaco.

3) Solución amortiguadora pH 3.5

Se prepara utilizando piridina : ác. acético glacial : agua, en las proporciones 1:10:89, v/v/v.

4) Solución amortiguadora pH 6.0

Se prepara mezclando piridina : ác. acético glacial: agua, en las proporciones 46:4:950, v/v/v.

METODOS

a) Tinciones.-

1) Método de la ninhidrina.- Para uso general se emplea como agente localizante ninhidrina al 0.25 % en acetona. Este método es muy sensible y presenta pocas complicaciones. Es un método específico para alfa-aminoácidos que tienen su grupo amino libre, por lo que si la tinción resulta negativa, se puede deber a que el grupo amino terminal se encuentra bloqueado.

La técnica consiste en rociar las tiras de papel con un aspersor que contiene la solución de ninhidrina, hasta que el papel quede bien humedecido. Después se colocan las tiras en el horno a 100°, durante 10 - 15 minutos, con el objeto de desarrollar la coloración.

La mayoría de los aminoácidos dan manchas azul-púrpuras, con excepción de histidina y glicina (gris-rojo); fenilalanina, tirosina y ác. aspártico (azul); triptofano (café); asparagina (amarillo sucio) y prolina (amarillo). La sensibilidad de esta técnica comprende desde 0.2 µg para glicina, hasta 2 µg para histidina (8).

2) Histidina: método de Pauly.- Esta técnica es específica para histidina y otros imidazoles.

Para realizarla se necesita la participación de los siguientes reactivos:

Solución I: ác. sulfanílico al 1% en HCl 1 N.

Solución II: nitrato de sodio al 5% en solución acuosa.

Ambas soluciones deben mantenerse en refrigeración. Se mezclan volúmenes iguales, en frío, 5 minutos antes de usarse. En seguida se rocían sobre las tiras de papel, teniendo cuidado de no arrastrar las manchas por humedecimiento excesivo, pues los aminoácidos son solubles en esta mezcla, y al desplazarse pueden obtenerse resultados falsos.

A continuación se rocían las tiras con una solución de carbonato de sodio al 15% en agua; de inmediato aparecen manchas rojas para la histidina y otros imidazoles.

También se obtiene coloración, pero con una sensibilidad menor, con los siguientes compuestos: histamina (rosa-pardo); tirosina (rosa); xantina, di-yodotirosina (naranja); adenina (rosa mexicano); tiamina, triptofano, hordenina, hidroxiquinurenina (rojo-naranja); guanina (naranja-púrpura); catecol (púrpura); ergotionina (rojo); tiolhistidina (naranja claro) (9).

3) Método del cloro.- Este método es muy útil para el caso de aminoácidos, aminoácidos con el grupo amino bloqueado y para péptidos. Se piensa que esta técnica es específica para el enlace C-N, por lo cual, si se usan solventes como la piridina o la colidina, es necesario lavar antes las tiras de papel con el objeto de que no interfieran. Se puede lavar con éter y luego una mezcla etanol : acetona, 1:1, v/v, solventes en los cuales la mayoría de los aminoácidos son insolubles (10).

Para realizar esta técnica se sigue el método de Rydon-Smith (11, 12), que consiste en introducir las tiras de papel en una cámara saturada previamente con gas cloro (Cl_2), obtenido de la siguiente mezcla de reacción:



el ácido clorhídrico se añade gota a gota por medio de un embudo de separación adaptado a un matraz que contiene el permanganato de potasio.

Una vez saturada la cámara (después de 10 minutos), se cierra la entrada del gas, y se cambia la tapa que posee los dispositivos de llenado y de vacío por la que contiene las tiras de papel que se van a teñir (13).

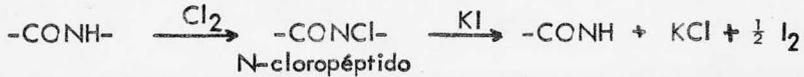
Se deja que la clorinación se lleve a cabo durante veinte minutos. Después de este tiempo, se retira la tapa con las tiras y se prende el extractor de la campana, con el objeto de eliminar el cloro restante.

Una vez que ya no existe cloro en el ambiente, se vuelve a colocar la tapa que tiene el dispositivo de entrada y vacío, y se satura la cámara con vapores de amoníaco (que se obtienen de calentar un matraz que contiene hidróxido de amonio), los cuales servirán para reducir el color del fondo, en las tiras de papel, formando cloruro de amonio. Las tiras se exponen a los vapores de amoníaco durante 15 segundos.

A continuación se sacan las tiras de la cámara y se rocían con una solución saturada de *o*-tolidina en ác. acético al 2% y yoduro de potasio 0.05 M (1:1, v/v).

En este paso se debe tener precaución pues la *o*-tolidina es una sustancia que se ha reportado como carcinogénica.

De inmediato aparecen manchas azul-negras en un fondo de color azul claro. La reacción que se lleva a cabo en esta etapa es la siguiente:



al reaccionar el I_2 liberado con la *o*-tolidina, se forman las manchas azul-negras características.

b) Observación bajo la luz ultravioleta.- Todas las tiras de electroforesis y cromatogramas se observaron antes de hacer cualquier tinción bajo la luz ultravioleta con una lámpara de onda corta de 253.7 nm. Esto se hizo con el fin de poder identificar compuestos que absorbían o fluorescían con la luz ultravioleta y como método para apreciar el grado de purificación.

c) Bioensayo.- La actividad de la hormona neurodepresora (HND) fue probada in vitro, como se ha descrito en detalle previamente (14), por su efectividad en reducir la frecuencia de descarga espontánea de las motoneuronas del ganglio abdominal del acocil Procambarus bouvieri (Ortmann).

Inicialmente se probó la actividad en diferentes neuronas y se observó que el efecto era común a un gran número de ellas. Con el fin de tener resultados confiables y comparables de un experimento a otro, se eligieron los flexores abdominales superficiales ya que son un reservorio de motoneuronas identificadas. Por lo tanto, todas las mediciones de frecuencia de descarga que serán mencionadas como prueba de actividad neuronal neurodepresora, fueron medidas en la motoneurona f-5 del tercer ganglio abdominal, de acuerdo a la

terminología establecida por Wine et al (15).

El procedimiento común fue aislar la cadena abdominal y registrar con un electrodo de succión la actividad de la rama superficial de la tercera raíz del tercer ganglio abdominal. La preparación se irrigó constantemente con una solución salina conocida como Van Harreveld (16), goteada por gravitación desde un recipiente a temperatura ambiente (19° - 21°) y sacada de la cámara de registro por la aplicación de una presión reducida. Las sustancias de prueba fueron introducidas a la cámara de registro por medio de una segunda sonda.

El flujo de la solución salina fue detenido por espacio de dos minutos y se introdujo la sustancia de prueba; posteriormente el flujo normal fue restaurado.

La frecuencia de descarga de las motoneuronas fue medida por alimentación de picos después de una preamplificación (Gras-P-G-12) a un reductor de frecuencia (17) y alternativamente con un multicanal marca TMC. En este caso la forma de la onda de los picos fue modificada por un circuito RC, produciendo un tiempo de elevación de 50 microsegundos, para lograr la señal aceptable por el multicanal. Los picos fueron registrados en papel (polígrafo Grass, modelo 7) y proyectados en un osciloscopio (Tektronix 502) simultáneamente.

La actividad neurodepresora se cuantificó usando una escala arbitraria. La frecuencia de descarga de la neurona f-5 mostró, a temperatura constante, fluctuaciones espontáneas de minuto a minuto, dentro de un límite de 10% del valor promedio. Bajo la sustancia de prueba, cualquier depresión que sobrepasa-

sara ese nivel se tomó como el efecto de la hormona, y cada reducción del 1% en la frecuencia de descarga se consideró como una unidad de actividad neurodepresora. Este bioensayo proporciona una relación logarítmica entre la actividad de HND y la cantidad de tejido nervioso.

d) Obtención de los tallos oculares.- Los tallos oculares fueron obtenidos directamente de camarones recién capturados, cortando con tijeras la extensión del caparazón (rostrum) que existe entre los dos ojos del animal y después cortando los tallos oculares desde su base. Inmediatamente se congelaron para evitar cualquier tipo de degradación y en esas condiciones se trajeron al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, se calentaron a 90° , durante tres minutos, con el fin de inactivar y desnaturalizar a todas las enzimas proteolíticas que pudieran atacar a la hormona neurodepresora, la cual por estudios previos (7) se había determinado que es termoestable.

Después de este paso de calentamiento, se guardaron en el congelador a -70° , hasta el momento de hacer la extracción.

d) Aislamiento.-

1) Extracción.- Los tallos oculares se trituraron con un molino para carne que tenía una criba cuyos orificios medían 2.6 mm de diámetro, el cual se había enfriado a -70° antes de empezar el trabajo. La molienda se llevó a cabo en el cuarto frío, a 4° , utilizando trocitos de hielo seco con el fin

de que sirvieran como abrasivo y además mantuvieran congelados a los tallos oculares.

Una vez obtenido el polvo resultante de la trituración, se procedió a extraer la hormona con agua; esto se hizo así pues en estudios previos con el acocil Procambarus bouvieri se había determinado que la hormona neurodepresora (HND) es una molécula hidrofílica (18). La extracción se hizo de la siguiente manera: al material finamente molido se agregaron 1200 ml de agua bidestilada y desionizada, a 45°, se agitó mecánicamente durante 60 minutos y luego se centrifugó a 2000 RPM (700 x g), por 30 minutos, a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante. Los precipitados de la centrifugación se volvieron a extraer con agua, a 45°, de la misma manera que se explicó en el párrafo anterior. Así, se hicieron 5 lavados en las mismas condiciones, decantándose los sobrenadantes después de cada centrifugación.

Por su parte, los precipitados resultantes fueron tratados para formar "polvos de acetona". Esto se hizo con el fin de disgregar a los lípidos que se encuentran en el tejido nervioso y que podían estar englobando moléculas de hormona. Para obtener los polvos de acetona se procedió así: a aproximadamente 500 ml de masa se añadieron 500 ml de acetona pura, se agitó mecánicamente, manteniendo una temperatura de 40° dentro de la mezcla. Después se evaporó la acetona, por medio de la aplicación de una corriente de aire, hasta sequedad. A continuación se añadieron 500 ml de cloroformo y se realizó la misma operación. Una vez secos, los polvos fueron extraídos con agua, a 45°, durante 60 minutos, con agitación mecánica. Luego

se centrifugó la mezcla a 2000 RPM (700 x g), durante 30 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se unió a los que se habían colectado anteriormente.

Los precipitados se colectaron en un solo recipiente y se congelaron a -70° .

2) Concentración.- Los sobrenadantes obtenidos de las centrifugaciones se concentraron en un evaporador rotatorio marca Buchler, adaptado a una bomba de alto vacío marca SPEEDIVAC, modelo 2SC20; y entre los dos aparatos, se colocaron dos trampas de H_2SO_4 y una de $CaCl_2$. El aparato se montó en la forma en que lo indica la figura (1).

En el matraz del evaporador rotatorio, que contiene el líquido que se va a concentrar, se mantuvo un baño de agua constante a 45° , y en el condensador, un baño de agua con hielo. Al conectar la bomba de vacío se reduce la presión, y esto, aunado al calor, hace que el líquido se evapore. El vapor de agua se condensa en el condensador. Para prevenir que no se escape vapor de agua, se utilizan las trampas de H_2SO_4 y $CaCl_2$, de esta manera, se protege a la bomba de vacío para que no reciba humedad y no se dañe.

De esta forma, pues, se concentró el sobrenadante obtenido. En vista de que se obtenía un precipitado blancuzco al concentrar, probablemente debido a fosfolípidos y lipoproteínas, se hizo una centrifugación a 10 000 RPM (15 000 x g) en una centrifuga MSE, con un cabezal de ángulo fijo, durante 30 minutos, a 10° . Se separó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en agua, para volver a hacer otra centrifugación en las mismas condiciones.

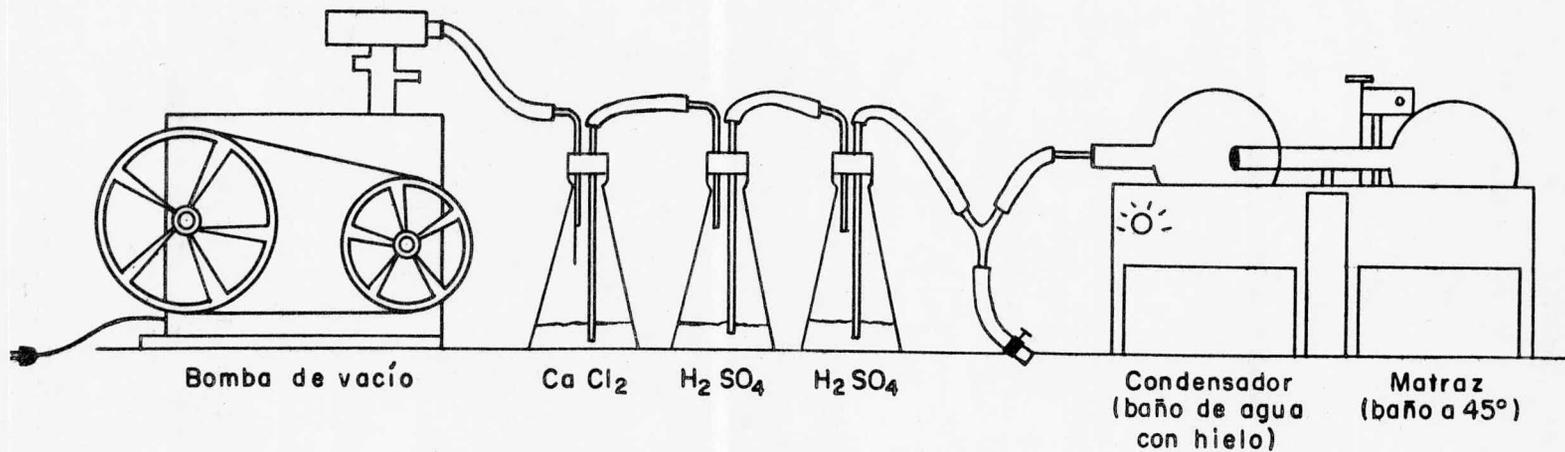


Figura (1).- Esquema que muestra la forma en que se montó el evaporador rotatorio.

Se unieron los sobrenadantes y se concentraron en el evaporador rotatorio, bajo las mismas condiciones ya descritas.

3) Diálisis.- Se dializó el extracto en 3 bolsas de diálisis de 5/8" de diámetro, previamente lavadas con agua con el fin de quitarles la glicerina que contienen. En cada bolsa se hizo un nudo en uno de los extremos y después se introdujo el extracto con una pipeta Pasteur; a continuación se anudó el extremo superior del tubo de diálisis, teniendo la precaución de dejar una burbuja de aire que funcionara como un agitador interno. Luego se colocó la bolsa en una probeta de 100 ml y se llenó con agua, dejando también una burbuja de aire al tapar la probeta con papel Parafilm, así ésta funciona como un agitador externo.

Las probetas se sujetaron a un disco rotatorio que gira a una velocidad de 22 vueltas por minuto, de esta manera se realiza una diálisis acelerada, ayudada también por los agitadores interno y externo antes mencionados. Las diálisis se realizaron en el cuarto frío, a 4^o, haciendo cambios del líquido exterior cada dos horas, hasta que las aguas de diálisis fueran transparentes.

La hormona neurodepresora atraviesa la membrana de diálisis (13, 18), por lo tanto, después de cada dializado se recolectó el líquido que quedó en las probetas.

Después de la diálisis se procedió a concentrar el líquido colectado en el evaporador rotatorio, tal como se describió anteriormente.

Durante la concentración apareció un precipitado blanquecino (probablemente fosfolípidos) que fue eliminado por centrifugación a 10 000 RPM (15 000 x g), 60 minutos, a 10°.

El sobrenadante obtenido de dicha centrifugación constituyó lo que llamamos extracto crudo.

e) Purificación.-

1) Cromatografía en Sephadex G-25 fino.- Con el fin de iniciar la purificación de la HND a partir del extracto crudo, se procedió a cromatografiar la muestra en una columna de Sephadex G-25 fino.

Para realizar esta técnica se procedió de la siguiente forma:

Primeramente se prepara el gel para dejarlo en condiciones de ser usado. El Sephadex debe dejarse hinchar en el amortiguador que se va a utilizar durante la corrida, en este caso agua bidestilada y desionizada. De acuerdo a las indicaciones de los fabricantes, se permite el hinchamiento de este gel durante 3 horas a temperatura ambiente, o bien, una hora en un baño de agua hirviente (19).

Una vez que el gel está perfectamente hinchado, se procede a montarlo en un tubo de vidrio que tiene en la base inferior un soporte de vidrio poroso sobre el cual se coloca el gel.

La suspensión del gel, que no debe ser muy espesa ni muy líquida, se decanta dentro del tubo de vidrio hasta alcanzar el límite superior, y se deja abierto el flujo de la columna, de manera que el gel se vaya empacando ho-

mogéneamente. Se debe tener mucho cuidado de que no se formen burbujas de aire que queden atrapadas dentro de la matriz del gel, pues eso produce un flujo discontinuo y percances durante la corrida cromatográfica. Después se retira el sobrenadante con una pipeta, y con un agitador de vidrio se remueve la parte superior del gel, con el objeto de que al agregar una nueva cantidad de gel no se formen capas sobrepuestas que puedan afectar el desarrollo normal del experimento; entonces se agrega más suspensión y nuevamente se deja empacar. Esto se hace repetidamente, hasta alcanzar la altura del lecho que se desea.

Una vez empacada la columna se la deja fluyendo durante la noche, de manera que se lave por completo con el amortiguador que se va a usar.

Una vez logrado esto, el siguiente paso es determinar el volumen vacío de la columna, es decir, el volumen que saldrá de la columna sin que ninguna partícula se haya incluido dentro de la trama o matriz del gel. A este volumen se le conoce también como volumen de exclusión, y su determinación se utiliza para caracterizar y calibrar a una columna.

La determinación del volumen vacío (V_0) o calibración de la columna, se realiza corriendo una muestra de muy alto peso molecular que, por esa característica, se excluye por completo de la matriz del gel y no penetra en ella. Al conocer el volumen y el tiempo en los cuales se eluye la máxima concentración de esa muestra, se puede saber que nada va a salir antes de ese volumen en una corrida con muestra problema.

En este caso, la calibración de la columna se hizo aplicando 10 ml

de una solución de dextrán azul al 2%, cuyo peso molecular es de aproximadamente 2 000 000 daltones.

Se reguló el flujo de la columna a 26 ml/h y se eluyó la muestra de dextrán azul con agua.

La salida de la columna se acopló a un registrador marca LKB, modelo TYP 6520-4, que tiene una lámpara que produce una longitud de onda fija a 254 nm, y el cual obtiene su energía de una fuente de poder marca LKB, modelo Uvicord 4700; el registrador a su vez, se encuentra acoplado a un colector de fracciones marca LKB, modelo Ultrorac 7000, que va recogiendo la muestra eluída de la columna en diferentes tubos, de acuerdo al tiempo o al volumen que se le programe previamente.

En el registrador se va formando una gráfica de todo lo que vaya saliendo de la columna y que absorba a 254 nm. Con cada cambio de fracción en el colector, el registrador cambia de color de tinta y de esta manera se puede identificar fácilmente el tubo correspondiente a un lugar determinado de la gráfica.

En la figura (2) se muestra un esquema de la manera en que se colocaron y acoplaron la columna, el registrador, la fuente de poder y el colector de fracciones.

Una vez calibrada la columna se procedió a cromatografiar el extracto crudo de los tallos oculares de Penaeus vannamei.

Después de la cromatografía se tomaron alícuotas de 100 μ l cada una, de diferentes fracciones con el fin de localizar la actividad neurodepresora

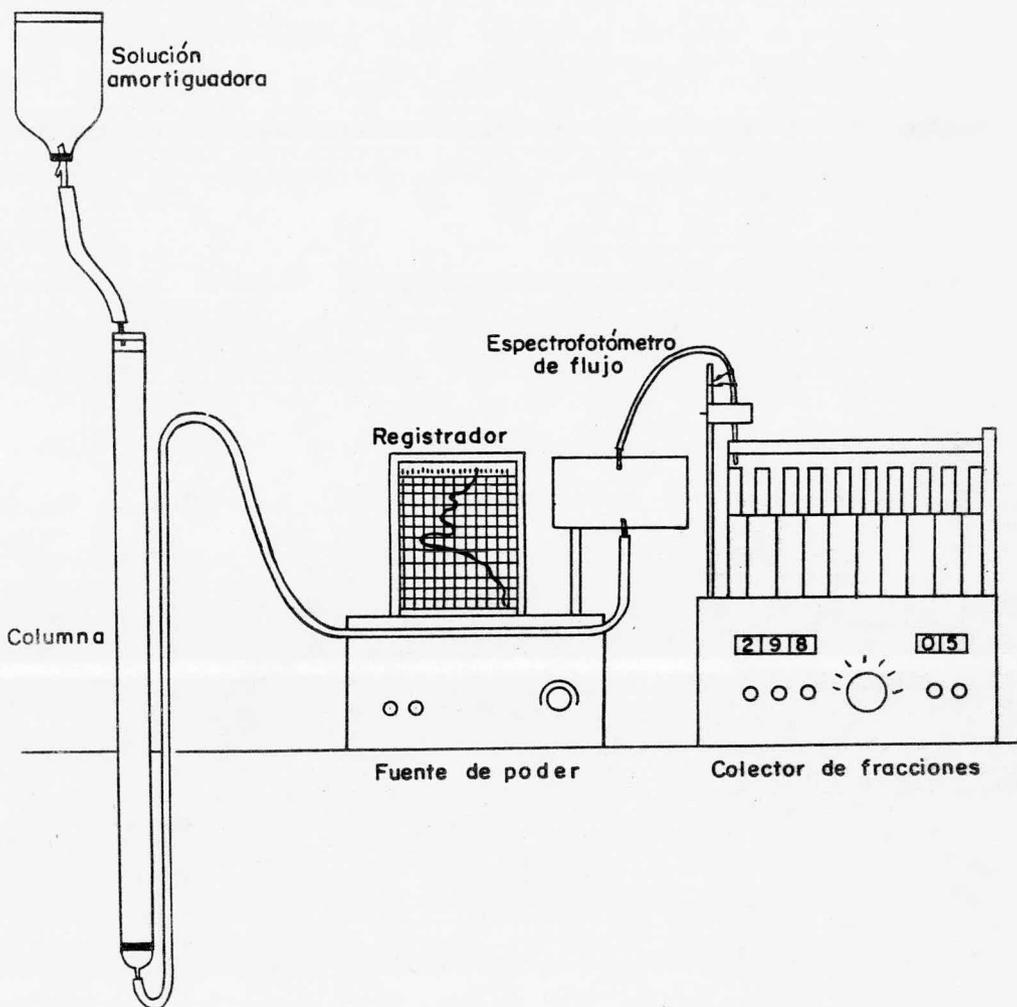


Figura (2).- Esquema que muestra la forma en que se montó la columna, la fuente de poder, el espectrómetro de flujo, el registrador y el colector de fracciones.

por medio del ensayo biológico.

Después de conocer en qué tubos se encontraba la actividad de HND, se colectaron todas esas fracciones activas y se concentraron en el evaporador rotatorio.

2) Cromatografía en Sephadex G-15.- Como otro paso en la purificación de la HND de Penaeus vannamei se procedió a pasar el extracto obtenido de Sephadex G-25 fino, por una columna de Sephadex G-15. Esta fue montada después de haber hinchado el gel con agua, de la misma forma que se describió anteriormente.

Una vez empacada la columna, se procedió a lavarla y luego se le calibró corriendo una muestra de 5 ml de dextrán azul al 2%.

3) Electroforesis en papel.-

1) Electroforesis analítica a mediano voltaje.- Para el caso de la electroforesis a mediano voltaje, se utilizó una celda tipo Durrum, marca Beckman, modelo R. La fuente de poder utilizada fue de marca Beckman, modelo RD-2 Duostat, con la que se pueden trabajar una o dos celdas a la vez.

El soporte empleado en las electroforesis analíticas fue papel Whatman 3 MM. Las dimensiones de las tiras utilizadas fueron: tiras simples de 3 x 31 cm, o tiras dobles de 6 x 31 cm.

Las condiciones en que se llevaron a cabo las electroforesis fueron las que a continuación se mencionan.

Tiempo de saturación de la cámara: 30 minutos

Tiempo de corrida: 80 minutos

Voltaje aplicado: 450 volts (14 v/cm)

Las tiras se secaron en el horno a 100°

Las variantes en las electroforesis fueron las soluciones amortiguadoras usadas en cada caso y la cantidad de muestra aplicada.

En todos los casos las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente.

Las electroforesis analíticas se llevaron a cabo después de cada paso de purificación, con el objeto de observar la manera en que se iban eliminando los contaminantes de la muestra.

En cada caso se observaron las tiras bajo la luz ultravioleta, y se revelaron con el método de Pauly y con el de ninhidrina, y en los últimos pasos de la purificación se añadió también el método de la clorinación.

II) Electroforesis preparativa a mediano voltaje.- Como en el caso de las electroforesis analíticas, en las electroforesis preparativas se usaron el mismo tipo de celdas y fuente de poder.

El soporte empleado en este caso fueron hojas de papel Whatman 3 MM de 29 x 31 cm.

Las condiciones fueron las mismas que para la electroforesis analítica, variando, como en aquel caso, las soluciones amortiguadoras y la cantidad de muestra aplicada.

Después de cada corrida, se cortó un extremo de la hoja y se tiñó por el método de clorinación. Una vez identificadas las manchas, se recortó una tira a lo ancho de la hoja, tal como se muestra en la figura (3), y de ahí se procedió a extraer la hormona para subsecuentes pasos de purificación.

4) Extracción a partir del papel.- Las tiras de papel cortadas de las hojas de electroforesis preparativa se recortaron en pequeños pedacitos, los cuales se colocaron en adaptadores de plástico para tubos de centrifuga (spin thimbles), a los que previamente se había puesto un poco de fibra de vidrio lavada en el fondo, de acuerdo a la forma en que lo ilustra la figura (4). Después se empaparon los pedacitos de papel con 1 ml de agua y se centrifugaron a 2 000 RPM (900 x g), 5 minutos, a temperatura ambiente. Se efectuaron 5 lavados a cada tubo. Como la HND es una molécula hidrofílica, se extrae con el agua y se la localiza en el filtrado.

A continuación se colectaron los filtrados correspondientes a la misma zona electroforética y se concentraron en el evaporador rotatorio hasta un volumen determinado.

f) Criterios de pureza.-

1) Electroforesis de alto voltaje.- En esta técnica se emplea un tanque de electroforesis marca Savant, tipo Michl, modelo LT20A, y una fuente de poder de alto voltaje, también Savant, modelo HV-5000.

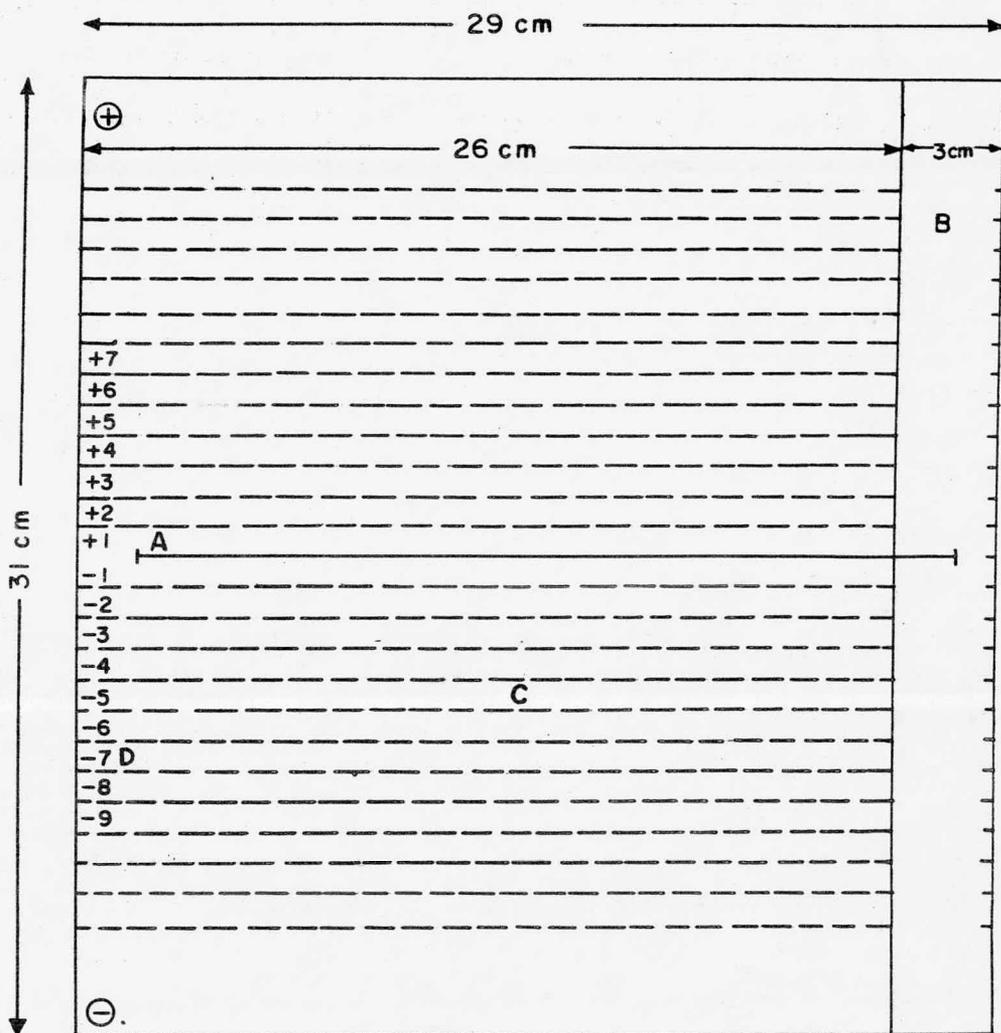


Figura (3).- Hojas utilizadas en la electroforesis preparativa.
 A) Aplicación de la muestra problema a lo largo de 26 cm. B) Tira de 3 cm de ancho por 31 de largo sobre la cual se lleva a cabo la tinción. C) Tiras transversales de 1 cm de ancho por 26 cm de largo. D) Numeración de las tiras transversales con signo "menos" si están del lado catódico o con signo "más" si están del lado anódico.

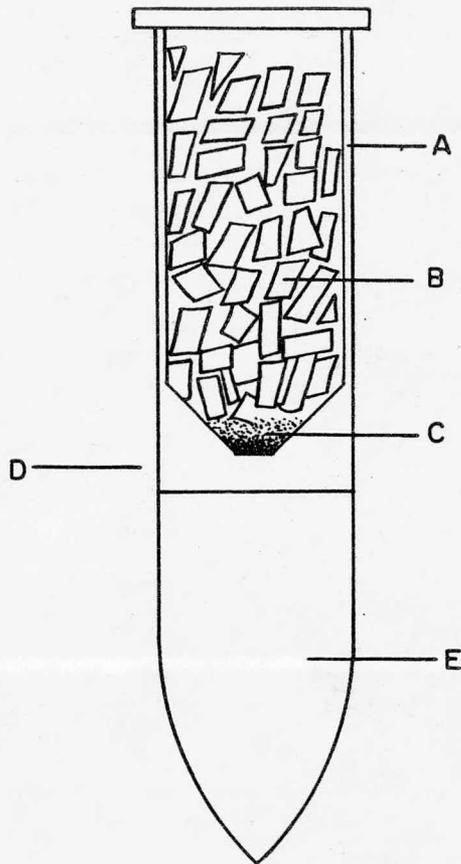


Figura (4).- Esquema que muestra la forma en que se colocaron los pedacitos de papel que contenían la actividad neurodepresora en los tubos de centrifuga, con el fin de extraer la HND. A) Adaptador de plástico. B) Pedacitos de papel recortados de la tira con HND en las hojas de electroforesis preparativa. C) Fibra de vidrio. D) Tubo cónico de centrifuga. E) Filtrado.

El tanque debe enfriarse previamente y, para ello, se hace pasar una corriente de agua fría por el serpentín de acero inoxidable que se encuentra dentro del tanque.

Dentro de la cámara existen dos fases: una superior u orgánica, que contiene Varsol, un producto de la destilación del petróleo, cuya función, en este caso, es difundir el calor que se genera durante la prueba y evitar que se queme el papel; y una fase inferior o acuosa que es la que contiene a la solución amortiguadora que se va a utilizar.

La muestra se aplica en una hoja de papel Whatman 3 MM, de 27 x 76 cm, en el origen (38 cm), secando después de cada aplicación en punto con corriente de aire caliente.

A continuación se satura el papel con la solución amortiguadora, empezando por los extremos, para que por capilaridad llegue el amortiguador al punto de aplicación y de esa manera no se corra la muestra. Luego se seca la hoja con papel Whatman 3 MM de manera que no escurra, sino que sólo quede húmeda. Se monta la hoja en el soporte de acrílico y este se introduce en la cámara.

Las condiciones usadas en este tipo de electroforesis fueron las que a continuación se mencionan.

Tiempo de enfriamiento: 60 minutos

Tiempo de corrida: 60 minutos

Voltaje aplicado: 4500 volts (65 v/cm)

Solución amortiguadora: piridina : ác. acético glacial : agua,
en las proporciones 46:4:950, v/v/v, pH 6.0

Al finalizar la corrida se saca el soporte con la hoja de papel, se prende el extractor de la campana y se deja ahí hasta que esté completamente seca (aproximadamente 3 horas). Después de esto, se puede realizar la tinción deseada.

2) Electroforesis y cromatografía ascendente en capa delgada.-

Este es un método que combina dos técnicas analíticas distintas, la electroforesis y la cromatografía, y por ello tiene una capacidad de resolución muy grande que le permite ser un buen criterio de pureza de una muestra.

Para realizar esta técnica se utilizó una cámara marca Camag (tipo Pastuska), modelo ECF6/TLE-69-E. La muestra se aplicó en punto concentrado sobre placas de celulosa MN300, de 250 micras de espesor, de 20 x 20 cm. La aplicación de la muestra se hizo en la línea central de la placa. Después se saturó la placa, rociándola con la solución amortiguadora en que se iba a correr la electroforesis.

La cámara debe enfriarse previamente con agua. Se coloca la placa dentro de la cámara, se llenan los recipientes que se encuentran a los lados con la solución amortiguadora y a continuación se colocan unas tiras de papel filtro de 7 x 20 cm, entre los recipientes y los extremos de la placa, con el fin de que conduzcan la corriente eléctrica.

Se cierra la cámara y se inicia la electroforesis, conectando a la fuente de poder Beckman. Las condiciones de la corrida son la aplicación de 500 volts durante 45 minutos.

Después de finalizar la electroforesis, se seca la placa con corriente de aire caliente durante 15 minutos, y después se coloca en el horno a 60°, durante 30 minutos. Así queda lista para efectuar la cromatografía ascendente.

Como se trata de una técnica bidimensional, se coloca la placa en posición perpendicular a la dirección de la electroforesis, y se lleva a cabo la cromatografía, utilizando una cámara cromatográfica de Eastman.

La mezcla de solventes usada fue n-butanol : ác. acético glacial : agua, en las proporciones 4:1:5, v/v/v, utilizando únicamente la fase orgánica (superior).

El tiempo de corrida fue de dos horas. Al terminar ésta, se secó con corriente de aire caliente, durante 15 minutos, para evaporar todo el solvente.

A continuación se hace la tinción de la placa por el método que se quiera.

3) Cromatografía ascendente unidimensional.- Como otro criterio de pureza se utilizó la cromatografía ascendente en una sola dimensión.

Para ello, se saturó una cámara de vidrio, rodeada de papel Whatman 3 MM, con la mezcla de solventes por usar, en este caso n-butanol : ác. acético glacial : agua, (4:1:5, v/v/v), utilizando únicamente la fase orgánica, durante 24 horas. Se lavó una placa de celulosa MN300, de 250 micras de espesor, de 20 x 20 cm, con la misma mezcla de solventes.

La muestra se colocó a 2.5 cm del extremo de la placa, en la línea central, por medio de aplicación en punto concentrado. Se introdujo la placa en la cámara previamente saturada y se dejó correr el frente del solvente 15 cm a partir del punto de aplicación.

Después de la corrida se secó la placa con aire caliente, durante 15 minutos y luego en el horno a 60°, 30 minutos.

Luego se tñó la placa por el método del cloro.

4) Electroforesis y cromatografía descendente en papel.- Como un criterio más de demostración de pureza se realizó una electroforesis a mediano voltaje y cromatografía descendente en papel, combinadas.

Para ello necesita saturarse perfectamente una cámara especial para cromatografía descendente con la mezcla de solventes que se va a usar, en este caso n-butanol : ác. acético glacial : agua, (4:1:5, v/v/v), utilizando solamente la fase orgánica.

Primeramente se corre una electroforesis a mediano voltaje en una hoja de papel Whatman 3 MM, de 29 x 31 cm, haciendo la aplicación de la muestra cerca de uno de los extremos de la línea que funciona como origen. Las condiciones del experimento fueron las que a continuación se mencionan.

Tiempo de saturación: 30 minutos

Tiempo de corrida: 80 minutos

Voltaje aplicado: 450 volts (14 v/cm)

Solución amortiguadora: Carbonato de amonio 0.1 M ajustado a

pH 10.0 con amoníaco.

Al finalizar el experimento se seca la hoja de papel en el horno, a 80°.

Después se coloca la hoja de papel en la cámara para cromatografía descendente, en posición perpendicular a la electroforesis, poniendo el extremo en donde se hizo la aplicación dentro de un recipiente que tiene la mezcla de solventes. Se dejó correr el frente del solvente hasta 20 cm a partir del punto de aplicación.

Al finalizar la cromatografía se seca la hoja con corriente de aire caliente.

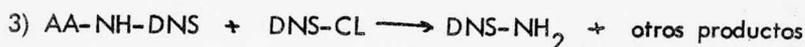
A continuación se reveló por el método del cloro.

5) Dansilación.- La dansilación es una técnica muy sensible, que permite trabajar con cantidades muy pequeñas de material (1 - 10 nanomolas). En este método se utiliza un reactivo no fluorescente (cloruro de 1-dimetilamino naftalén 5-sulfonilo) conocido como cloruro de dansilo y que se abrevia como DNS-Cl, el cual reacciona con el grupo amino de los aminoácidos y péptidos y da una gran fluorescencia, debido a la formación de la sulfonamida.

El primer uso significativo del cloruro de dansilo fue hecho por Weber en 1952. A partir de entonces se ha utilizado muchísimo esta técnica. Quizá una de las aplicaciones más relevantes de esta sustancia es la determinación de grupo amino terminal de proteínas y péptidos, descrita por Gray y Hartley

en 1963 (20).

El cloruro de dansilo reacciona fácilmente con los grupos (-NH₂) alifáticos a un pH alcalino para formar derivados intensamente fluorescentes. Sin embargo, la reacción no es tan simple. Debido a la presencia de agua en la mezcla de reacción, se supone que la dansilación de un aminoácido (AA-NH₂) a un pH alcalino involucra al menos tres reacciones:



Si sólo ocurrieran las reacciones 1) y 2), sería posible obtener un 100% de aminoácidos dansilados. Debe encontrarse un pH óptimo, ya que un aumento en el pH desviará el equilibrio de la reacción 1) y de la reacción 2) hacia la derecha. Además la reacción 2) tiene una cinética dependiente de la concentración de cloruro de dansilo e independiente de la concentración y tipo de aminoácido presente. Sin embargo, la reacción 3) es consecutiva de la reacción 1), resultando por ello en la descomposición del aminoácido dansilado, de manera que un rendimiento del 100% del producto deseado no puede alcanzarse. Así, el rendimiento de la reacción 1) es la suma de los rendimientos de aminoácidos dansilados y de DNS-NH₂. Por esto, es muy importante minimizar la extensión de reacciones colaterales no deseadas, variando los parámetros de reacción.

Con el fin de obtener concentraciones máximas del producto dansilado es esencial tener en cuenta: a) la concentración de DNS-Cl, b) el tiempo

de reacción, c) la temperatura de la mezcla de reacción, y d) el pH de la mezcla de reacción.

Las condiciones óptimas para la dansilación de aminoácidos a 37°, requiere:

- 1) Que las condiciones de la reacción se lleven a pH 10.0
- 2) Que el tiempo de incubación sea de 30 minutos
- 3) La concentración requerida de DNS-Cl debe encontrarse por experimentos de ensayo y error, en forma muy crítica (21).

La técnica utilizada en este trabajo como criterio de pureza fue la modificación hecha por Neuhoff, quien sentó las condiciones para realizar una microtécnica.

La secuencia seguida para la reacción fue la siguiente:

- Cubrir los tubos con papel aluminio.
- Colocar 1 - 10 nanomolas de muestra en solución acuosa.
- Evaporar a sequedad con corriente de nitrógeno.
- Resuspender en 5 ul de NaHCO_3 0.05 M, pH 10.0
- Añadir 5 ul de acetona.
- Añadir 10 ul de DNS-Cl 10 mM en acetona.
- Incubar a 37°, durante 30 minutos.
- Evaporar a sequedad con corriente de nitrógeno.

Con el objeto de identificar los productos dansilados, se llevan a cabo microcromatografías tridimensionales, bajo las siguientes condiciones:

- Resuspender en 5 μ l de acetona: ác. acético, (3:2, v/v).
- Aplicar alícuotas de 0.5 - 1 μ l en placas de poliamida de 5 x 5 cm.
- Correr las microcromatografías:
 - 1a. dimensión: agua : ác. fórmico, (100:3, v/v)
 - 2a. dimensión: benceno : ác. acético, (9:1, v/v)
 - 3a. dimensión (en el mismo sentido que la segunda): acetato de etilo : metanol : ác. acético, (20:1:1, v/v/v)

A continuación se observan las cromatoplasmas bajo luz ultravioleta y se hace la identificación de los productos danilados por comparación con patrones de DNS-aminoácidos apropiados.

g) Caracterización.-

1) Determinación aproximada de peso molecular.- Con el fin de conocer con aproximación el peso molecular de la HND, se procedió a utilizar la técnica de cromatografía por filtración en gel, tomando como referencia patrones de peso molecular conocido.

Por lo tanto, se aplicó una muestra de 20 mg de cianocobalamina (Vit B₁₂) disuelta en 1.5 ml de agua, a una columna de Sephadex G-15 y se eluyó con agua. El peso molecular de la cianocobalamina es de 1355.5 daltones.

Por otra parte, se aplicaron a la misma columna de Sephadex G-15, 10 μ l de LH-RH (³H) disueltos en 1 ml de agua. El factor liberador de la

hormona luteinizante (LH-RH) es un decapeptido bloqueado en ambos extremos, con un peso molecular de 1181. En este caso utilizamos el péptido marcado con tritio, con una actividad específica muy alta.

Después de eluir al péptido de la columna, se procedió a tomar alícuotas de 0.5 ml de cada fracción, las cuales se colocaron en frascos a los que se añadieron 15 ml de líquido de Bray (líquido de centelleo) el que es muy útil para contar radiactividad en muestras que se encuentran en medio acuoso. La composición del líquido de Bray es la siguiente:

naftaleno		60 g
2,5-difeniloxazol (PPO)		4 g
1,4-bis-2,5-feniloxazolilbenceno (MSB)		0.2 g
metanol		100 ml
etilenglicol		20 ml
1,4-dioxano	cbp	1000 ml

Los frascos se colocaron en un espectrómetro de centelleo líquido, marca Packard, Tricarb, modelo 3330, y se contaron en el canal de tritio durante un minuto.

2) Determinación de actividad de la tripsina.- Se siguió la técnica descrita en el manual de enzimas de Worthington (22) con las siguientes modificaciones: el sustrato usado fue α -N-benzoil-arginil-etil-éster·HCl (BAEE), de Sigma; el pH fue de 7.6; el volumen final de reacción fue de 3.2 ml; y la longitud de onda utilizada de 253 nm.

Enzima: Tripsina DCC (1 mg/ml en HCl 1 mM). Esta solución es estable durante varias semanas a 5°. Antes de usar, se diluye en HCl 1 mM hasta tener una concentración de 1 - 2 µg por 100 ul.

Sustrato: BAEE 0.01 M

Solución amortiguadora: Tris-HCl 0.046 M, CaCl₂ 0.0115 M, pH 7.6

Procedimiento: Pipetear 0.1 ml de HCl 1 mM, 0.3 ml de sustrato y 2.8 ml de solución amortiguadora en una celda de 1 cm. Mezclar y ajustar a cero el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 253 nm. En otra celda, colocar 0.3 ml de sustrato, 2.8 ml de solución amortiguadora, y al tiempo cero añadir 0.1 ml de enzima diluida. Mezclar y leer la absorbencia cada 30 segundos, durante 5 minutos.

Graficar la absorbencia vs. tiempo, y de la parte recta de la pendiente, con A menor de 0.320, determinar A/min. Se debe obtener una línea recta por al menos 3 minutos. Si no sucede así, repetir el experimento usando menor cantidad de enzima.

También se determinó la actividad de la tripsina utilizando un sustrato natural, de acuerdo a la metodología descrita por V.M. Ingram para obtener las huellas digitales de la hemoglobina (23).

Se desnaturaliza una solución de hemoglobina bovina al 2.2% añadiendo NaOH hasta alcanzar pH 8.0 y luego calentando a 90° durante 4 minutos. Se toma una alícuota de 4 ml de la solución desnaturalizada, libre de sales y se agita en un baño a 38°. Se agregan 100 µl de una solución de tripsina

al 0.5 % en HCl 1 mM al tiempo cero. Se mantiene una atmósfera de nitrógeno durante el proceso de digestión. La relación enzima : sustrato es de 1:175.

Debido a que el rompimiento de enlaces peptídicos libera hidrogeniones, se añade NaOH 0.5 N para que el pH se mantenga entre 7.95 y 8.0.

Después de dos horas de digestión, se ajusta el pH a 6.5 con HCl 1 N y el precipitado se elimina por centrifugación a 2 000 RPM (900 x g), 15 minutos.

Se toman 100 µl del sobrenadante y se evaporan a sequedad con corriente de nitrógeno. Luego se resuspenden en 20 µl de agua.

Se corre una electroforesis a mediano voltaje bajo las condiciones que se indican adelante.

Tiempo de saturación: 30 minutos

Tiempo de corrida: 150 minutos

Voltaje aplicado: 500 volts (16v/cm)

Solución amortiguadora: piridina : ác. acético glacial : agua,
(10:0.4:90, v/v/v), pH 6.4

Soporte: hoja de papel Whatman 3 MM, 29 x 31 cm.

La muestra se aplica en punto concentrado en uno de los extremos del origen. Al finalizar la corrida se seca la hoja en el horno.

A continuación se corre una cromatografía ascendente, en una segunda dimensión, utilizando la siguiente mezcla de solventes, n-butanol : ác. acético glacial : agua, (4:1:5, v/v/v) (fase superior).

Se seca el cromatograma en el horno y luego se tiñe con ninhidrina.

3) Digestiones enzimáticas.- Se incubaron alícuotas de la solución de HND con las siguientes enzimas:

tripsina DCC (Sigma)

quimotripsina tipo I (Sigma)

pronasa grado B (Calbiochem)

Además, se hizo una incubación con inhibidor de tripsina (de soya) (Sigma).

Se preparó una solución de tripsina DCC al 1% en amortiguador de Tris-HCl 0.01 M, pH 8.0, y se dializó contra el mismo amortiguador x 3, una hora cada vez, con el fin de eliminar a los aminoácidos libres. Se preparó una solución de quimotripsina al 1% en Tris-HCl 0.01 M, pH 8.3. La pronasa se preparó en una solución al 1% en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5. También se preparó una solución de inhibidor de tripsina al 1% en Tris-HCl 0.01 M, pH 8.3.

El esquema general de trabajo para cada una de las incubaciones fue el siguiente:

a) Mantener un pH inicial óptimo.

I) pH 8.0 para tripsina

II) pH 8.3 para quimotripsina

III) pH 7.5 para pronasa

IV) pH 8.3 para el inhibidor de tripsina

b) Incubar a 30° durante dos horas.

c) Aforar a 50 μ l con agua

d) Detener la reacción inactivando con calentamiento a 75°, durante 60 segundos.

e) Enfriar inmediatamente en agua con hielo, para precipitar la proteína desnaturalizada.

f) Centrifugar a 2 000 RPM (900 x g), 30 minutos.

g) Recoger los sobrenadantes y evaporar a sequedad.

En todos los casos se determinó el efecto de la digestión enzimática sobre la HND utilizando el bioensayo.

4) Determinación de la composición de aminoácidos.- Con el fin de conocer en forma cualitativa qué aminoácidos componen a la hormona neurodepresora se llevó a cabo un experimento en el que se combinó una hidrólisis ácida de la hormona, previamente a su dansilación.

Como control para el método se realizó un experimento utilizando el péptido S de la ribonucleasa, cuya composición de aminoácidos ya es conocida (24), y es la siguiente: Lys (2), His (1), Arg (1), Asp (1), Thr (2), Ser (3), Glu (3), Ala (5), Met (1), Phe (1).

La hidrólisis ácida (25) se llevó a cabo colocando 5 nanomolas de péptido S de la ribonucleasa (PM 2129.6) en una ampollita, se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió en 100 μ l de HCl 5.7 N. Se selló la ampollita a la flama y se incubó a 110°, durante 24 horas en un baño de aceite.

Después de transcurrido el tiempo de hidrólisis, se abrió la ampolleta y se evaporó su contenido con corriente de nitrógeno. A continuación se realizó una dansilación de acuerdo al siguiente esquema:

- Agregar 15 μ l de NaHCO_3 0.2 M, pH 10.0
- Evaporar a sequedad
- Añadir 15 μ l de agua
- Agregar 10 μ l de DNS-Cl 10 mM en acetona
- Incubar 30 minutos a 37°
- Evaporar a sequedad
- Resuspender en 5 μ l de etanol absoluto

Luego se aplican alícuotas de 0.5 - 1 μ l a placas de poliamida, de 3 x 3 cm, y se corren cromatografías bidimensionales utilizando las siguientes mezclas de solventes:

1a. dimensión: ác. fórmico : agua, (1.5:100, v/v)

2a. dimensión: 1-butanol : heptano : ác. acético, (3:3:1, v/v/v)

La identificación de los aminoácidos se lleva a cabo observando las placas bajo luz ultravioleta, por comparación con patrones conocidos.

Una vez probado el método, se procedió a hidrolizar y dansilar una alícuota de la solución de HND y determinar su composición de aminoácidos.

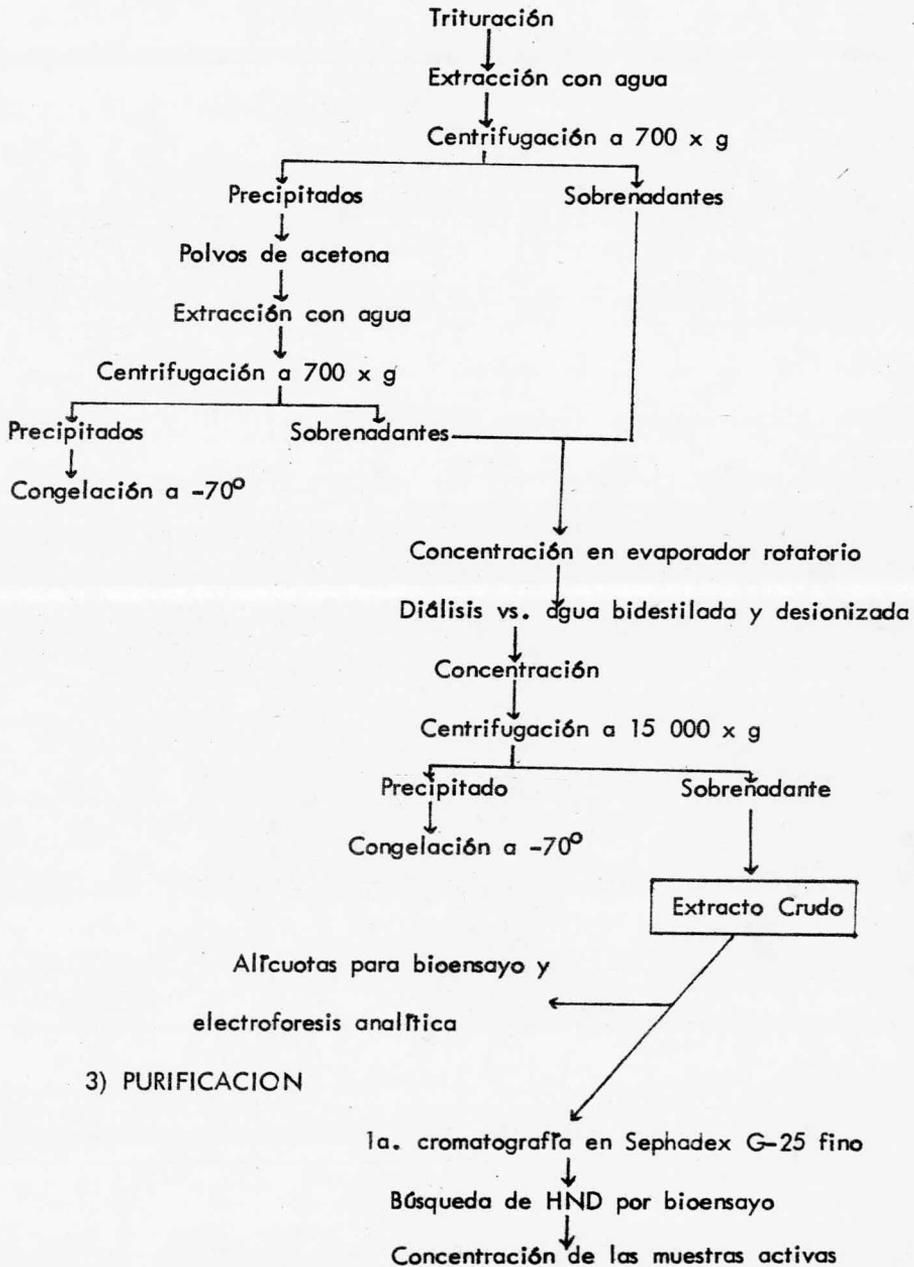
III.

RESULTADOS

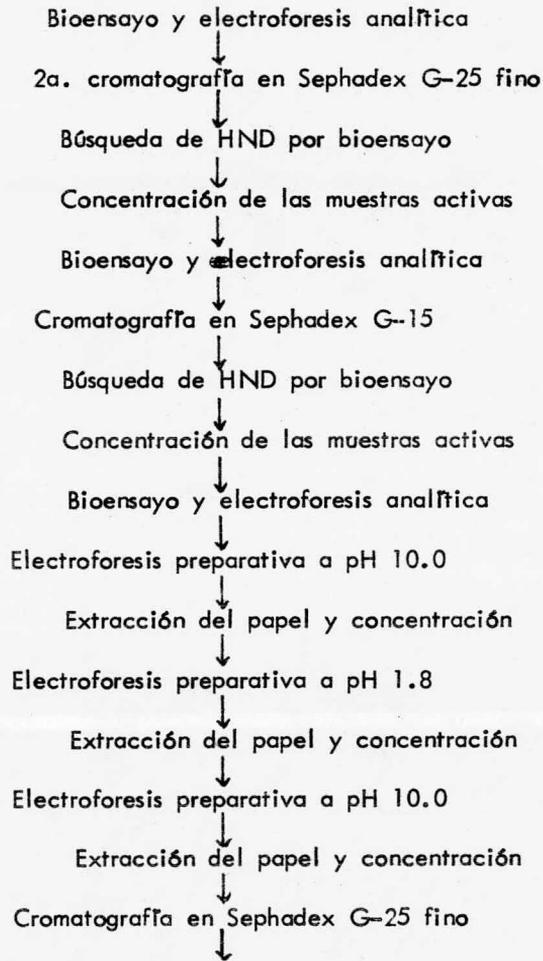
Con el fin de aclarar el procedimiento que se siguió a lo largo de este trabajo, y explicarlo en forma secuencial, a continuación se presenta un esquema resumido de los pasos efectuados:

1) Obtención de los tallos oculares de Penaeus vannamei (Boone)

2) AISLAMIENTO



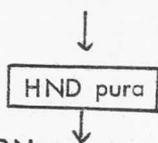
3) PURIFICACION



3 a) CRITERIOS DE PUREZA

- I) Electroforesis de alto voltaje
- II) Electroforesis y cromatografía ascendente en capa delgada
- III) Cromatografía ascendente unidimensional
- IV) Electroforesis y cromatografía descendente en papel
- V) Dansilación
- VI) Electroforesis analítica a mediano voltaje pH 1.8, pH 3.5,

pH 6.0, pH 10.0



4) CARACTERIZACION

- a) Determinación aproximada de peso molecular
- b) Incubaciones con:
 - i) tripsina
 - ii) quimotripsina
 - iii) pronasa
 - iv) inhibidor de tripsina
- c) Determinación de la composición de aminoácidos

a) AISLAMIENTO.-

1) Sabiendo que 10 g de material biológico correspondían a aproximadamente 100 tallos oculares, supimos que iniciábamos el trabajo con alrededor de 6150 tallos oculares puesto que partimos de 615 g de material, que fue tratado en la forma que se describió anteriormente (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 19).

2) Concentración.- El volumen ocupado por los sobrenadantes obtenidos de las centrifugaciones a 700 x g fue de aproximadamente 8 lts. Por lo tanto se concentraron en un evaporador rotatorio (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 21) hasta un volumen de 100 ml.

3) Diálisis.- En cada tubo de diálisis se colocaron 35 ml del extracto concentrado. Se efectuaron las diálisis en la forma que se describió previamente (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 23). Se realizaron en total, 14 cambios de agua de diálisis. El líquido colectado presentó una coloración amarilla, y el volumen ocupado fue de aproximadamente 2 lts. Este volumen se concentró hasta 20 ml, presentando la muestra una coloración café muy intensa y una viscosidad muy grande.

En este paso se tomaron dos alícuotas correspondientes a 60 tallos oculares cada una, empleándose una para análisis por bioensayo, para saber la actividad total recuperada en el proceso de aislamiento; y otra para análisis electroforético, con el fin de conocer el patrón inicial de manchas

de lo que se denominó extracto crudo.

Se debe aclarar que en todos los bioensayos realizados a lo largo de este estudio, se utilizaron neuronas obtenidas de ganglios de Procambarus bouvieri (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 17) y que los controles de actividad se hicieron con extractos frescos de tallos oculares pertenecientes a Procambarus bouvieri, por lo tanto, los resultados de la actividad neurodepresora de la hormona de Penaeus vannamei están medidos en relación a la actividad de la misma hormona en Procambarus bouvieri.

Los resultados obtenidos sobre la actividad neurodepresora del extracto crudo de los tallos oculares de Penaeus vannamei revelaron que existía un 18% más de actividad con respecto a la misma cantidad de tallos en P. bouvieri, es decir que se había recuperado, durante el proceso de aclimatación, el equivalente a aproximadamente 7250 tallos oculares de Procambarus bouvieri.

Por su parte, el análisis electroforético de 5 μ l del extracto, efectuado a pH 1.8, observado bajo la luz ultravioleta y revelado con las tinciones de Pauly y ninhidrina (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 14), mostró el patrón inicial de manchas contaminantes que se encontraban en la muestra antes de empezar la purificación. Dicho patrón se encuentra esquematizado en la figura (5).

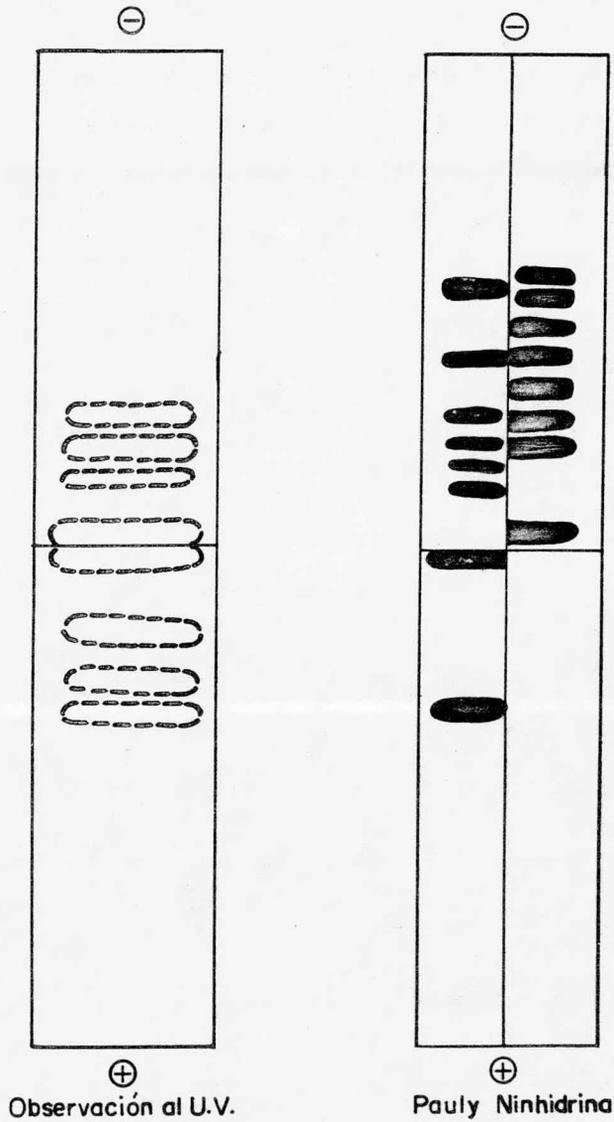


Figura (5).- Electrofóresis analítica a pH 1.8 del extracto crudo. Tiras dobles de papel Whatman 3 MM de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: ác. fórmico : ác. acético glacial : agua, (1:4:45, v/v/v).

b) PURIFICACION.-

1) Primera cromatografía en Sephadex G-25 fino.- Al finalizar la corrida de dextrán azul al 2% (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 24), se pudieron conocer los parámetros de la columna. Dimensiones: 1.9 x 111 cm; volumen total del lecho: 315 ml; flujo: 26 ml/h; volúmenes vacíos obtenidos: $V_0 = 107$ ml, $V_0' = 132$ ml, $V_0'' = 252$ ml.

V_0 , V_0' y V_0'' corresponden respectivamente al volumen en que empieza a salir el dextrán azul, al volumen de máxima concentración de dextrán azul, y al volumen en que deja de salir el colorante de la columna.

El volumen vacío tomado en cuenta en este caso fue el de mayor concentración de dextrán azul, o sea el correspondiente a 132 ml.

Una vez calibrada la columna se procedió a cromatografiar el extracto crudo.

Debido a que el extracto crudo se encontraba muy viscoso y con el objeto de cromatografiar un volumen similar al utilizado durante la calibración de la columna, se aplicaron 10 ml (correspondientes a 3000 tallos oculares) a la columna de Sephadex G-25 fino y se empezó a graficar y coleccionar desde el momento en que toda la muestra había penetrado en el gel. La muestra se eluyó con agua.

Las condiciones en que se efectuó este experimento fueron las que a continuación se mencionan. Dimensiones: 1.9 x 111 cm; volumen total del lecho: 315 ml; flujo: 26 ml/h; volumen de cada fracción: 11 ml.

Después de la corrida se tomaron alícuotas de 100 μ l c/u, de cada quinto tubo, para determinar por medio del bioensayo en cuales existía actividad neurodepresora. Se encontró actividad de HND en las fracciones 24 - 37. La gráfica correspondiente a esta prueba se puede observar en la figura (6).

Después de lavar durante toda la noche la columna con agua, se procedió a pasar otra parte del extracto crudo por la columna. Se reguló nuevamente el flujo a 26 ml/h.

Se tomaron 8 ml del extracto crudo (equivalentes a 2400 tallos oculares) y se diluyeron a 10 ml con agua, se aplicaron a la columna y se cromatografiaron en las mismas condiciones que la corrida anterior.

Al finalizar la cromatografía se tomaron alícuotas de 100 μ l c/u, de cada tercer tubo, y se determinó por medio del bioensayo en qué fracciones se encontraba actividad neurodepresora.

Esta se halló en las fracciones 30 - 37. La gráfica correspondiente a este experimento se muestra en la figura (7).

Una vez más, se lavó exhaustivamente la columna y se procedió a aplicar el remanente del extracto crudo. Los 2 ml restantes (600 tallos oculares) se diluyeron a 10 ml con agua y se colocaron en la columna; la cromatografía se llevó a cabo en las mismas condiciones que las veces anteriores.

Como la cantidad de muestra aplicada en esta ocasión fue menor que en las anteriores, se debía obtener un perfil cromatográfico mucho más

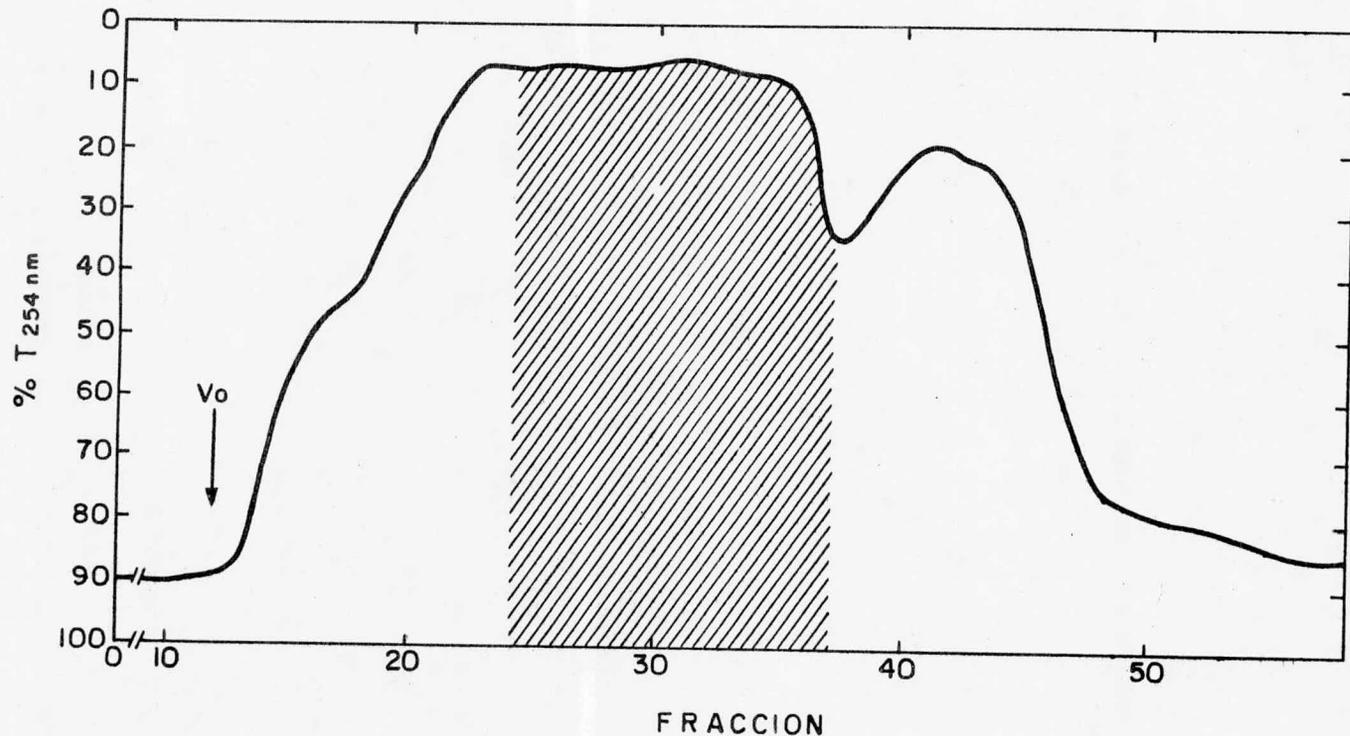


Figura (6).- Primera cromatografía en Sephadex G- 25 fino correspondiente a 3000 tallos oculares del extracto crudo. Dimensiones; 1.9 x 111 cm; volumen total del lecho; 315 ml; flujo; 26 ml/h; volumen de cada fracción; 11 ml. Eluyente; agua bidestilada y desionizada. La zona sombreada corresponde a las fracciones que presentaron actividad neurodepresora.

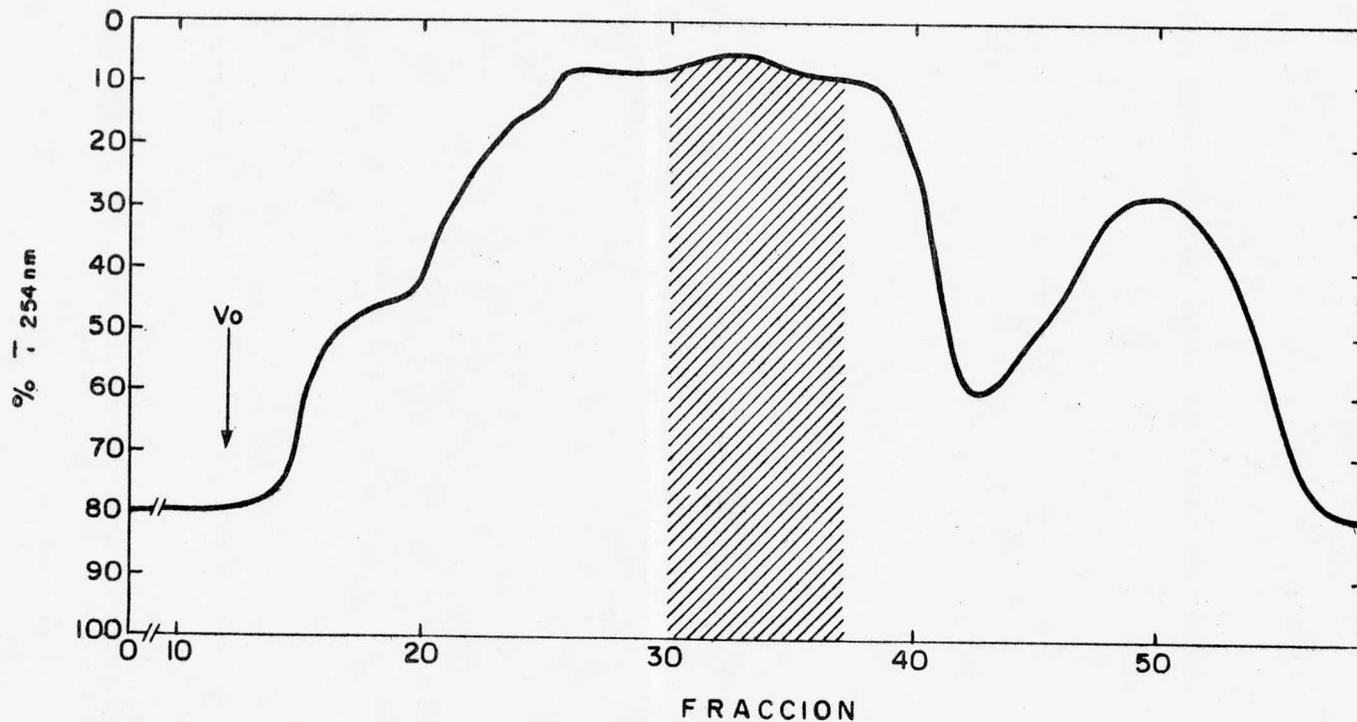


Figura (7).- Primera cromatografía en Sephadex G-25 fino correspondiente a 2400 tallos oculares del extracto crudo. Dimensiones: 1.9 x 111 cm; volumen total del lecho: 315 ml; flujo: 26 ml/h; volumen de cada fracción: 11 ml. Eluyente: agua bidestilada y desionizada. La zona sombreada corresponde a las fracciones que presentaron actividad neurodepresora.

claro y limpio.

Después de buscar la actividad hormonal en alícuotas tomadas cada tercer tubo, se localizó la HND en las fracciones 29 - 37. La gráfica que corresponde a esta corrida se muestra en la figura (8).

Después de conocer en qué tubos se encontraba actividad de HND, se colectaron todas las fracciones activas de las tres corridas cromatográficas y se concentraron en el evaporador rotatorio hasta un volumen de 10 ml. Como se formó un pequeño precipitado durante la concentración, se centrifugó la muestra a 2000 RPM (900 x g), 30 minutos, a temperatura ambiente.

Se tomaron dos alícuotas, correspondientes a 35 tallos oculares c/u (50 μ l), una destinada a análisis electroforético y otra para análisis por bioensayo.

Se hizo la electroforesis analítica de 5 μ l de este extracto, a pH 1.8, y se observó bajo la luz ultravioleta y reveló con ninhidrina y Pauly, para ver si habían disminuído los contaminantes que se tenían originalmente en el extracto crudo. El patrón de manchas obtenido se muestra en la figura (9).

2) Segunda cromatografía en Sephadex G-25 fino.- Después de haber lavado perfectamente la columna con agua, se procedió a recromatografiar el extracto obtenido de las corridas anteriores (fracciones activas) en Sephadex G-25 fino, sólo que en esta ocasión se disminuyó el

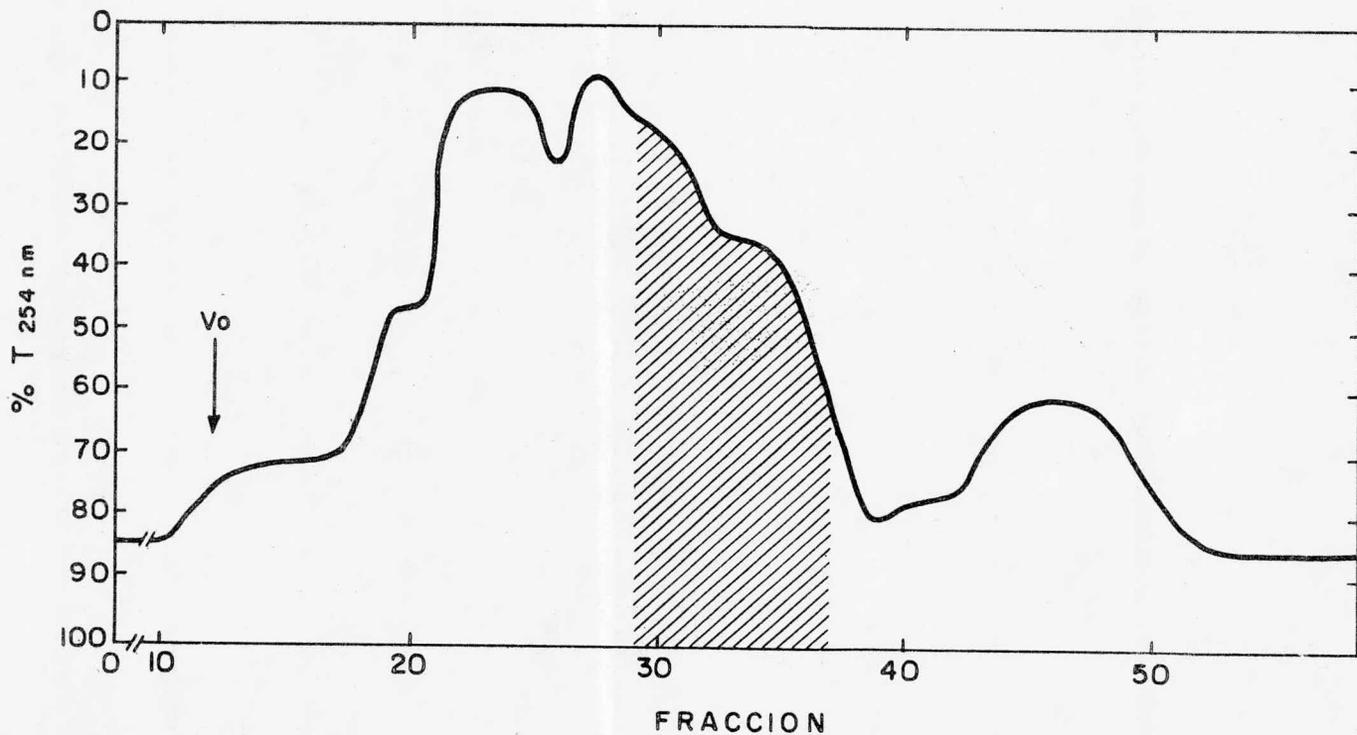


Figura (8).- Primera cromatografía en Sephadex G-25 fino correspondiente a 600 tallos oculares del extracto crudo. Dimensiones: 1.9 x 111 cm; volumen total del lecho: 315 ml; flujo: 26 ml/h; volumen de cada fracción: 11 ml. Eluyente: agua bidestilada y desionizada. La zona sombreada corresponde a las fracciones que presentaron actividad neurodepresora.

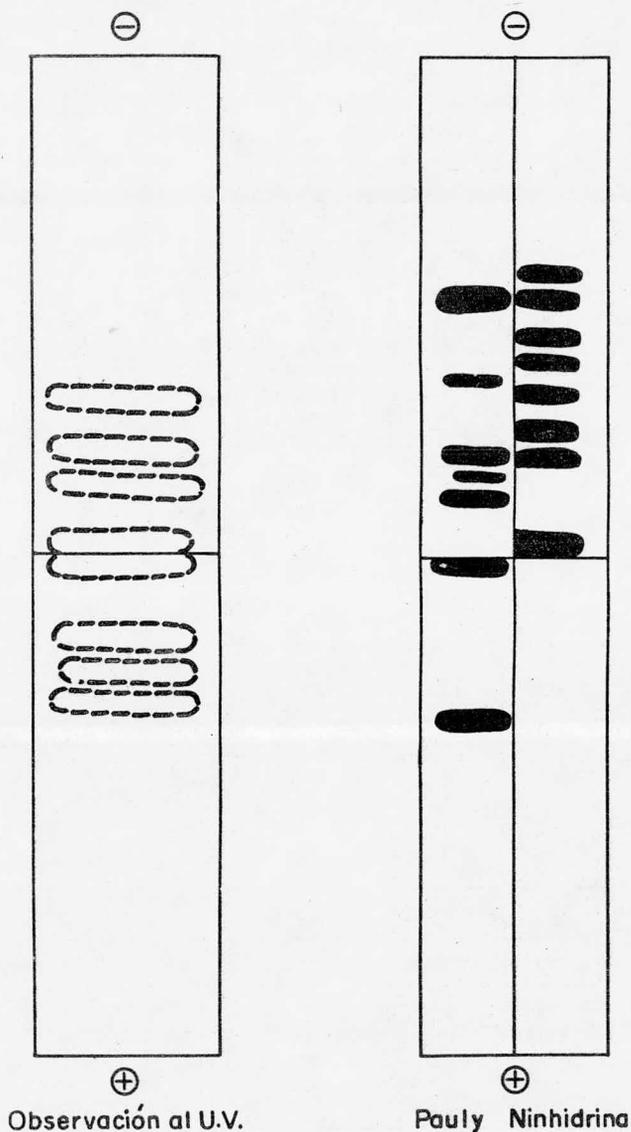


Figura (9).- Electroforesis analítica a pH 1.8 del extracto obtenido de la primera cromatografía en Sephadex G-25 fino. Tiras de papel Whatman 3 MM de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: ác. fórmico : ác. acético glacial : agua, (1:4:45, v/v/v).

flujo a 17.5 ml/h, lo cual debía permitir una mejor resolución de la muestra en la columna. Las condiciones de este experimento se mencionan a continuación. Dimensiones: 1.9 x 111 cm; volumen total del lecho: 315 ml; flujo: 17.5 ml/h; volumen de cada fracción: 5.5 ml.

Al finalizar la corrida se tomaron alícuotas de 100 μ l, de cada quinto tubo, para encontrar la actividad de HND por bioensayo. Esta se ubicó en las fracciones 50 - 59.

La gráfica que corresponde a esta corrida se encuentra en la figura (10).

Las fracciones activas se reunieron y concentraron en el evaporador rotatorio hasta un volumen de 5 ml.

Se tomaron alícuotas de 50 μ l (equivalentes a 68 tallos oculares) para análisis por bioensayo y para análisis electroforético.

La electroforesis analítica de 5 μ l de este extracto concentrado a pH 1.8, después de observarla al U.V. y revelarla con Pauly y ninhidrina, mostró un patrón de manchas que se esquematiza en la figura (11).

3) Cromatografía en Sephadex G-15.- La corrida de dextrán azul al 2% (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 28) dió como resultado la obtención de los siguientes volúmenes vacíos: $V_0 = 115$ ml, $V_0' = 138$ ml, $V_0'' = 169$ ml. El volumen vacío tomado en cuenta en este caso fue el de 138 ml.

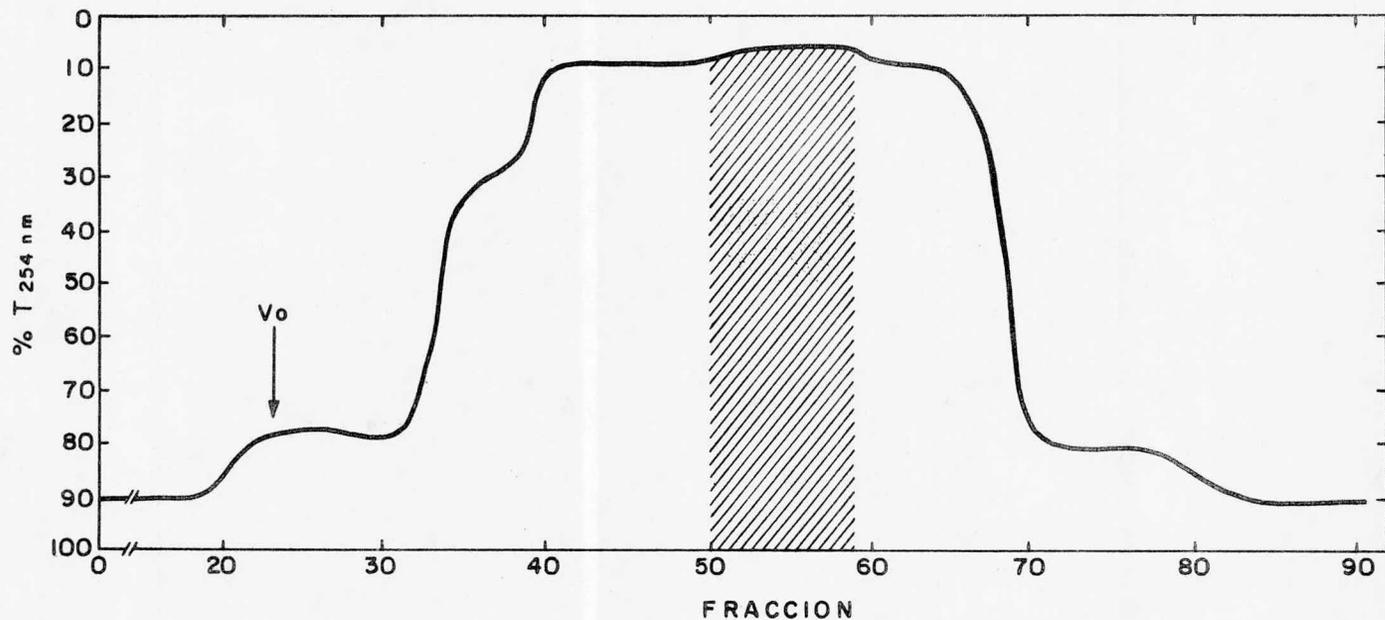


Figura (10).- Segunda cromatografía en Sephadex G-25 fino correspondiente a 6000 tallos oculares del extracto obtenido de la primera cromatografía en la misma columna. Dimensiones: 1.9 x 111 cm; volumen total del lecho: 315 ml; flujo: 17.5 ml/h; volumen de cada fracción: 5.5 ml. Eluyente: agua bidestilada y desionizada. La zona sombreada corresponde a las fracciones que presentaron actividad neurodepresora.

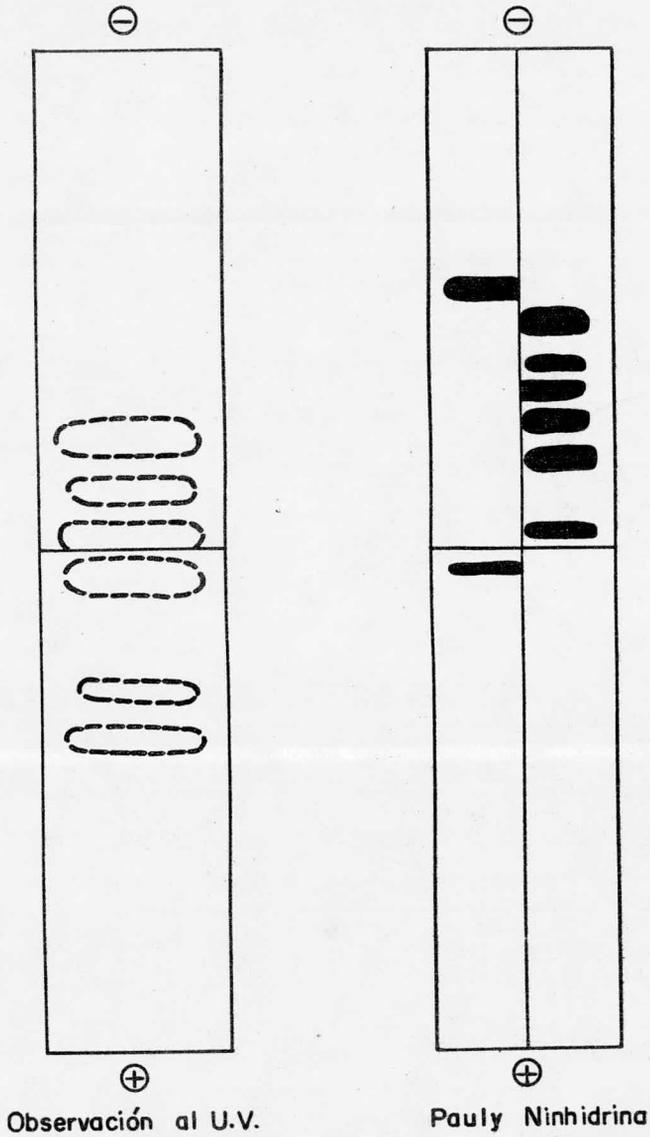


Figura (11).- Electroforesis analítica a pH 1.8 de 5 μ l del extracto obtenido de la segunda cromatografía en Sephadex G-25 fino. Tiras de papel Whatman 3 MM de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: δ c. fórmico : δ c. acético glacial : agua, (1: 4:45, v/v/v)

Las demás condiciones de la columna fueron las que a continuación se indican. Dimensiones: 1.9 x 117 cm; volumen total del lecho: 331 ml; flujo: 12 ml/h; volumen de cada fracción: 6 ml.

Una vez calibrada la columna y después de lavarla perfectamente; se procedió a pasar una tercera parte del extracto correspondiente al paso de purificación anterior; por lo tanto, se tomaron 1.6 ml (equivalentes a 2000 tallos oculares), se diluyeron a 5 ml con agua y se aplicaron a la columna de Sephadex G-15. Se empezó a graficar y coleccionar cuando la muestra penetró totalmente en el gel. Las condiciones de la prueba fueron las mismas que durante la calibración.

Se buscó por bioensayo la actividad neurodepresora en alícuotas de 100 μ l c/u, de cada tercer tubo, y se encontró en las fracciones 38 - 43. La gráfica que corresponde a esta corrida se puede observar en la figura (12).

Se lavó la columna durante toda la noche. Los restantes dos tercios del extracto (equivalentes a 4000 tallos oculares) se diluyeron a 5 ml con agua y se aplicaron a la columna, para cromatografiarlo en las mismas condiciones que la corrida anterior.

De igual manera que en veces anteriores, se tomaron alícuotas de 100 μ l c/u, de cada tercer tubo, para localizar la actividad neurodepresora por medio del bioensayo. Las fracciones activas fueron 37 - 44. La gráfica correspondiente a esta corrida se puede observar en la figura (13).

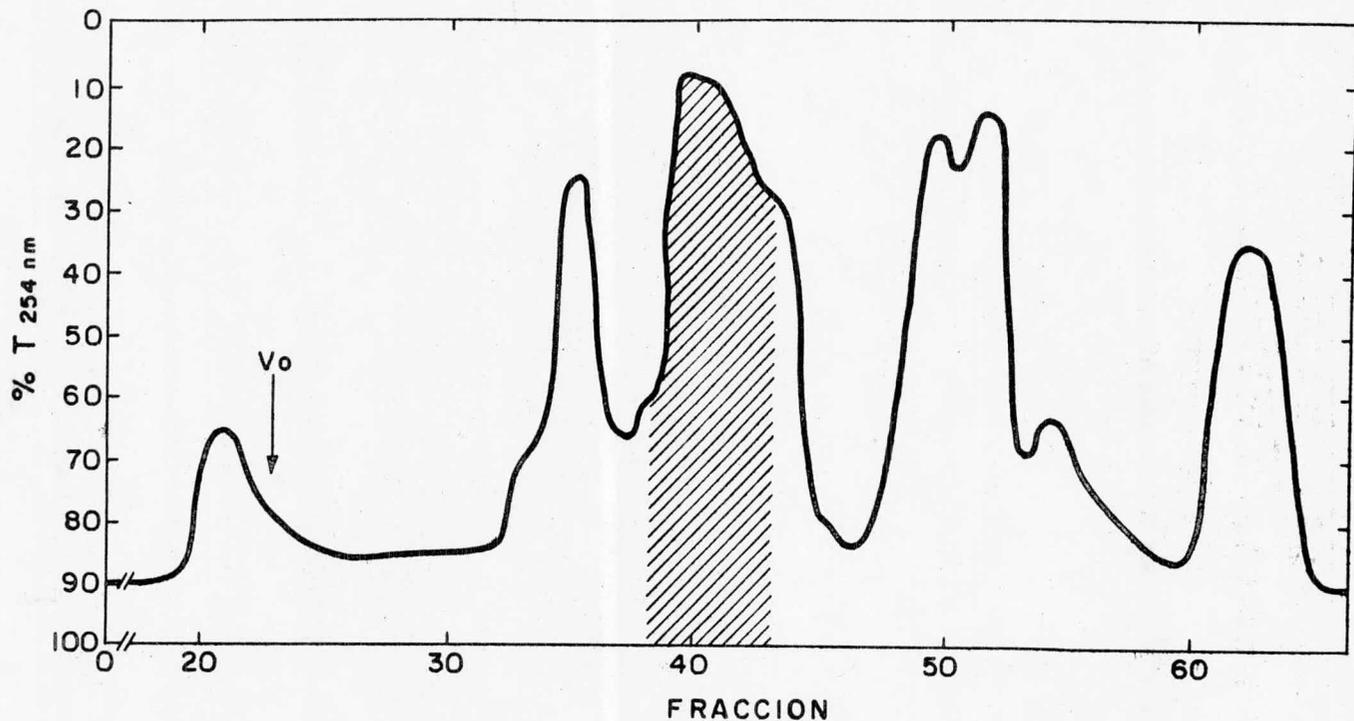


Figura (12).- Cromatografía en Sephadex G-15 correspondiente a 2000 tallas oculares del extracto obtenido de la segunda cromatografía en Sephadex G-25 fino. Dimensiones: 1.9 x 117 cm; volumen total del lecho:331 ml; flujo: 12 ml/h; volumen de cada fracción; 6 ml. Eluyente: agua bidestilada y desionizada. La zona sombreada corresponde a las fracciones con actividad neurodepresora.

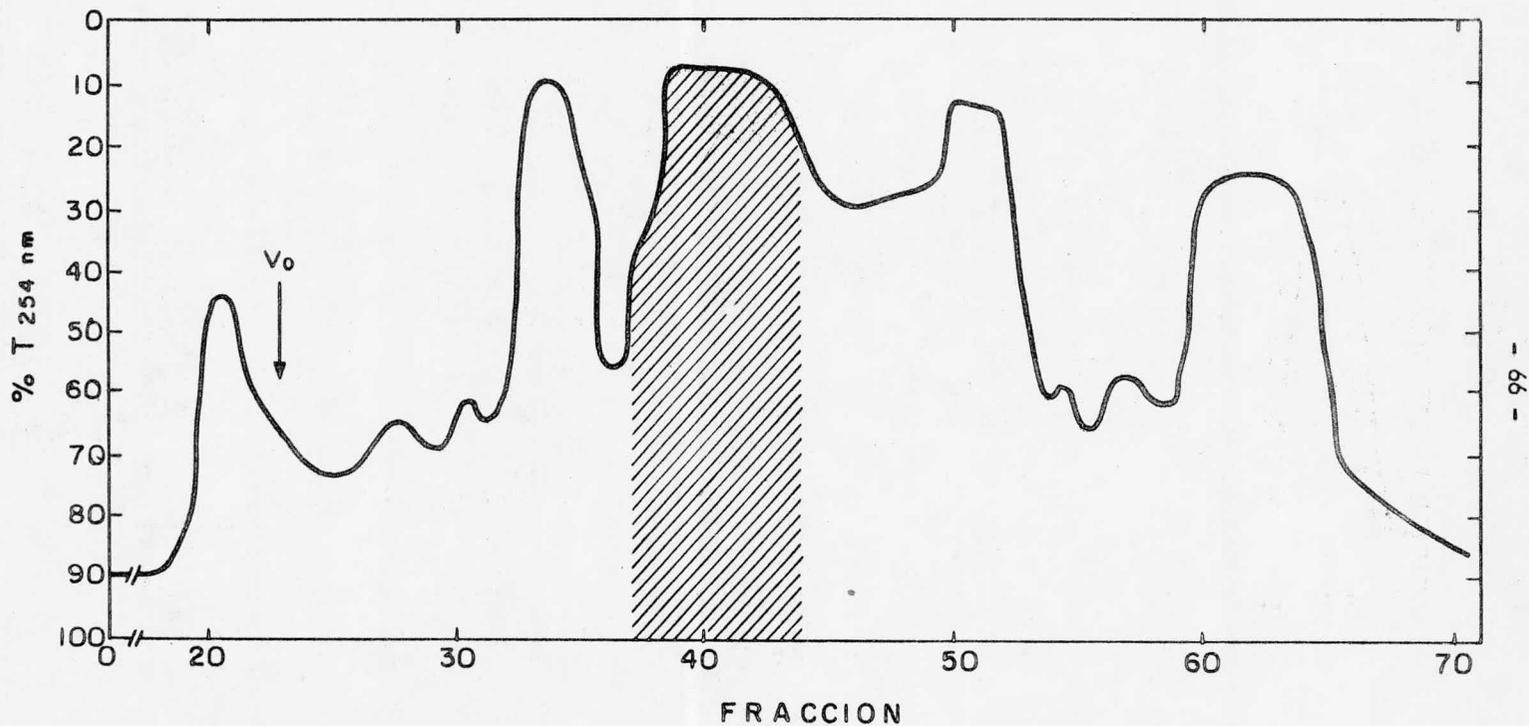


Figura (13).- Cromatografía en Sephadex G-15 correspondiente a 4000 tallos oculares del extracto obtenido de la segunda cromatografía en Sephadex G-25 fino. Dimensiones: 1.9 x 117 cm; volumen total del lecho: 331 ml; flujo: 12 ml/h; volumen de cada fracción: 6 ml. Eluyente: agua bidestilada y desionizada. La zona sombreada corresponde a las fracciones que presentaron actividad neurodepresora.

Una vez localizadas las fracciones que contenían HND, se reunieron y concentraron en el evaporador rotatorio, hasta un volumen final de 2 ml.

Se tomaron dos alícuotas de 15 μ l c/u (50 tallos oculares) para análisis por bioensayo y análisis electroforético.

La electroforesis analítica a pH 1.8, observada al ultravioleta, y revelada por los métodos de Pauly, ninhidrina y cloro, mostró el patrón de manchas que se indica en la figura (14).

Por su parte, los datos obtenidos por bioensayo del extracto resultante de Sephadex G-15 revelaron que se había recuperado el 100% de actividad hasta esta etapa de la purificación.

También se hizo una electroforesis analítica a pH 10.0 (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 13) utilizando 10 μ l del extracto. Se observó bajo la luz ultravioleta y se reveló con los métodos de ninhidrina, Pauly y cloro. En la figura (15) se aprecian los patrones de manchas obtenidos en esta electroforesis.

Como se puede observar, los resultados de la electroforesis a pH 10.0 mostraron una sola mancha en el centímetro -1 con las siguientes características: cloro (+), Pauly (+) y ninhidrina (-). Por datos anteriores (13), sabemos que la HND es una molécula neutra y que no se mueve del origen cuando se le aplica un campo eléctrico. Por lo tanto se decidió seguir la purificación de la hormona por métodos electroforéticos.

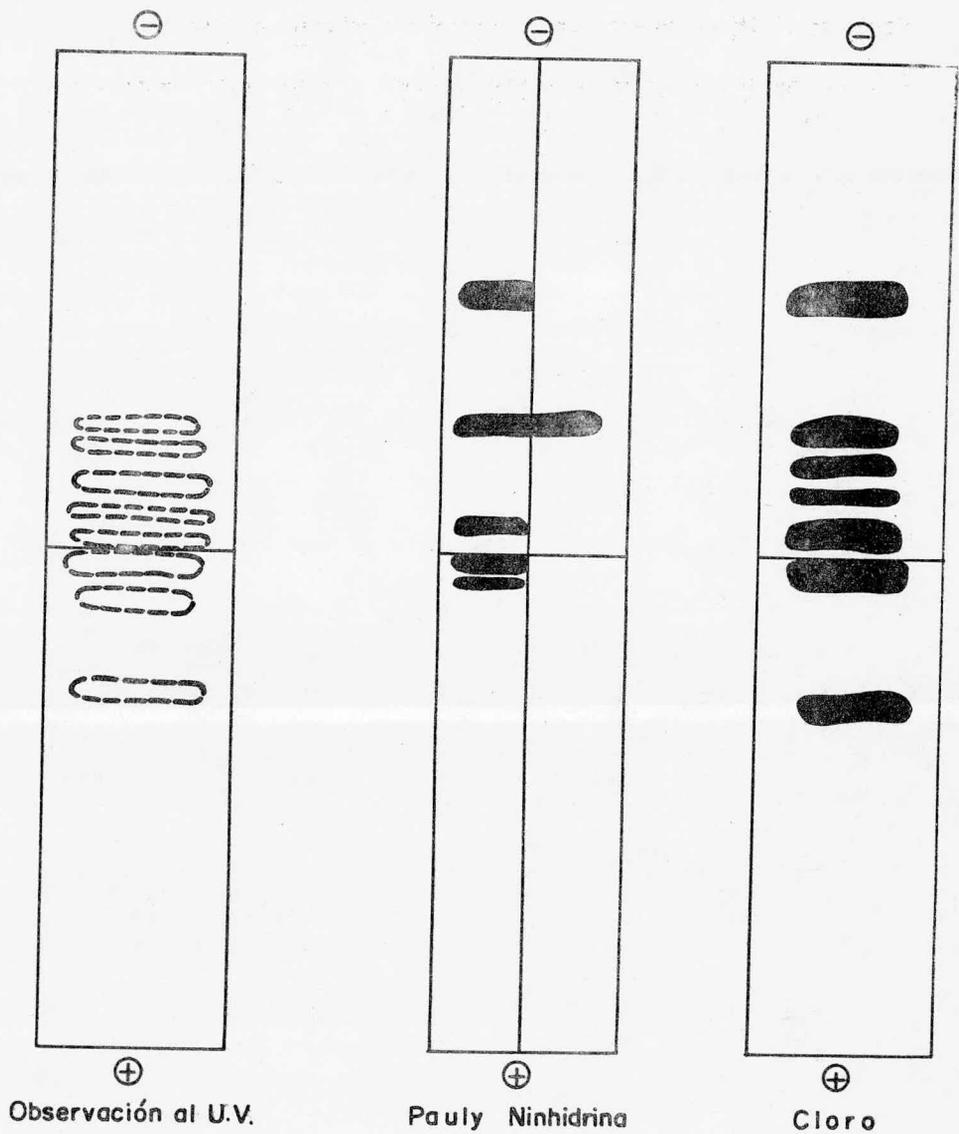


Figura (14).- Electroforesis analítica a pH 1.8 de 10 μ l del extracto obtenido de la cromatografía en Sephadex G-15. Tiras de papel Whatman 3 MM de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: δ c. fórmico : δ c. acético glacial : agua, (1:4:45, v/v/v).

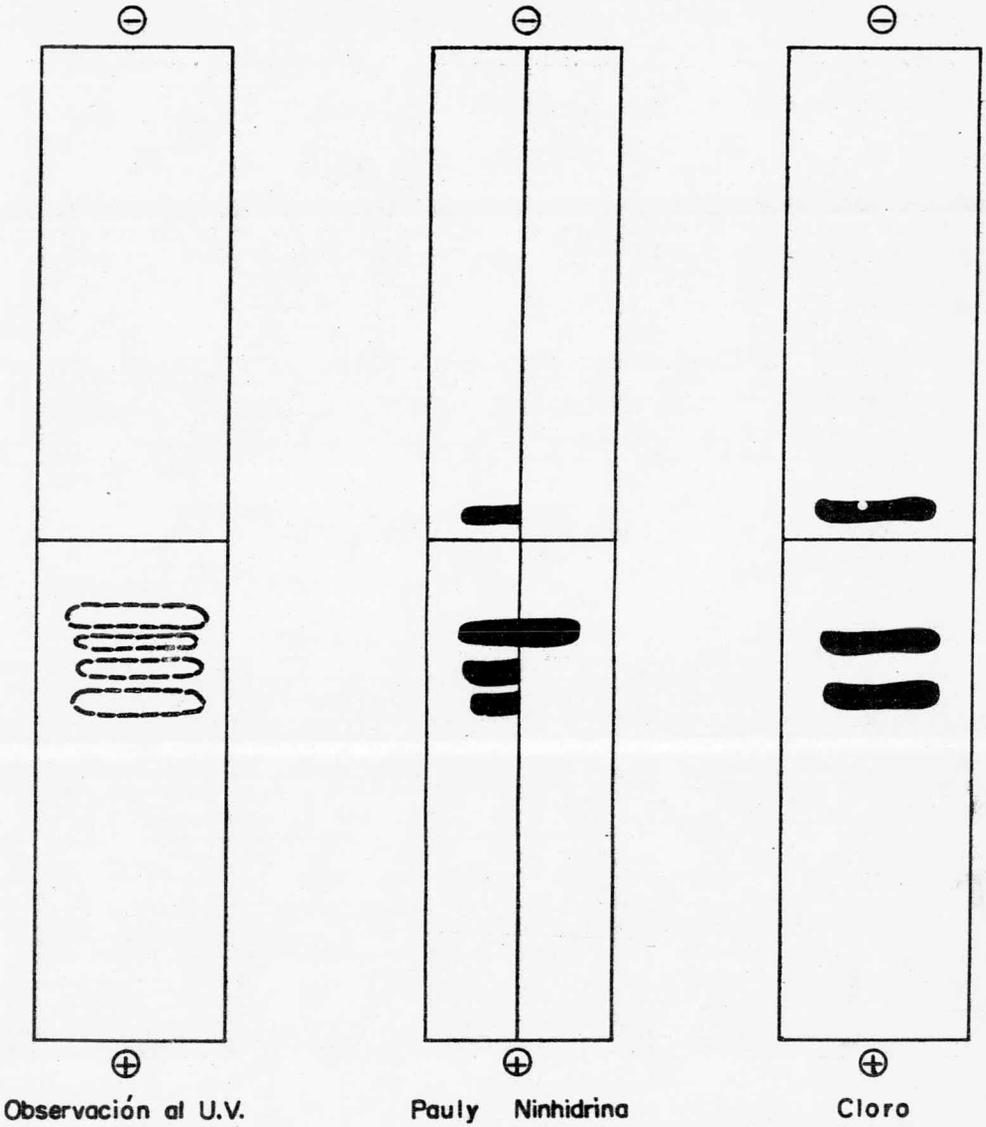


Figura (15),- Electroforesis analítica a pH 10.0 de 10 μ l del extracto obtenido de la cromatografía en Sephadex G-15. Tiras de papel Whatman 3 MM de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: carbonato de amonio 0.1 M ajustado a pH 10.0 con amoníaco.

Se procedió a concentrar el extracto obtenido de la columna de Sephadex G-15 hasta 1.5 ml, utilizando para ello, una corriente de nitrógeno. Al hacerlo se formó un pequeño precipitado que fue eliminado al centrifugar la muestra a 2000 RPM (900 x g), 15 minutos, a temperatura ambiente. El volumen final fue de 1.4 ml.

4) Se hicieron electroforesis preparativas (cinco en total) a pH 10.0, aplicando 300 μ l de muestra en cada hoja (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 29). Al finalizar las electroforesis, y después de secar las hojas en el horno, se cortó un extremo de cada hoja y se tiñeron por los métodos de Pauly y cloro. Como se observa en la figura (16) nuevamente se obtuvo una mancha cloro (+), Pauly (-) en -1. Por lo tanto, se procedió a cortar tiras a lo ancho de la hoja, desde el origen hasta -1.5 cm, con el propósito de extraer la hormona de ahí (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 30).

Después de la extracción se tuvo un volumen de 30 ml, el cual se concentró en el evaporador rotatorio hasta un volumen final de 700 μ l.

El siguiente paso fue correr una electroforesis analítica a pH 1.8, y revelar con cloro y ninhidrina, con el fin de observar el grado de purificación alcanzado con la electroforesis a pH 10.0.

Como se puede observar en la figura (17), en el origen apareció una mancha ninhidrina (-) y cloro (+), en tanto que en -9 se vió una mancha ninhidrina (+) y cloro (+).

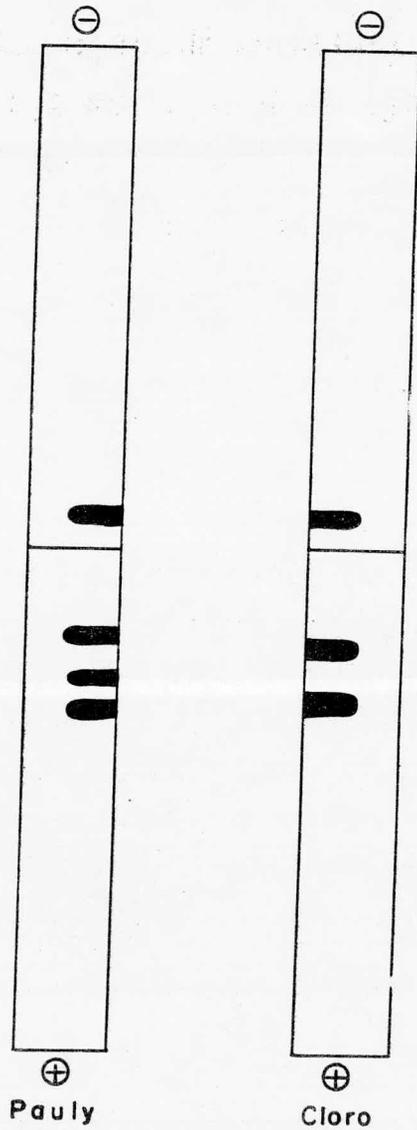


Figura (16).- Extremos de las hojas de electroforesis preparativa a pH 10.0 del extracto obtenido de Sephadex G-15. 450 v; 80 min; amortiguador: carbonato de amonio 0.1 M ajustado a pH 10.0 con amoníaco.

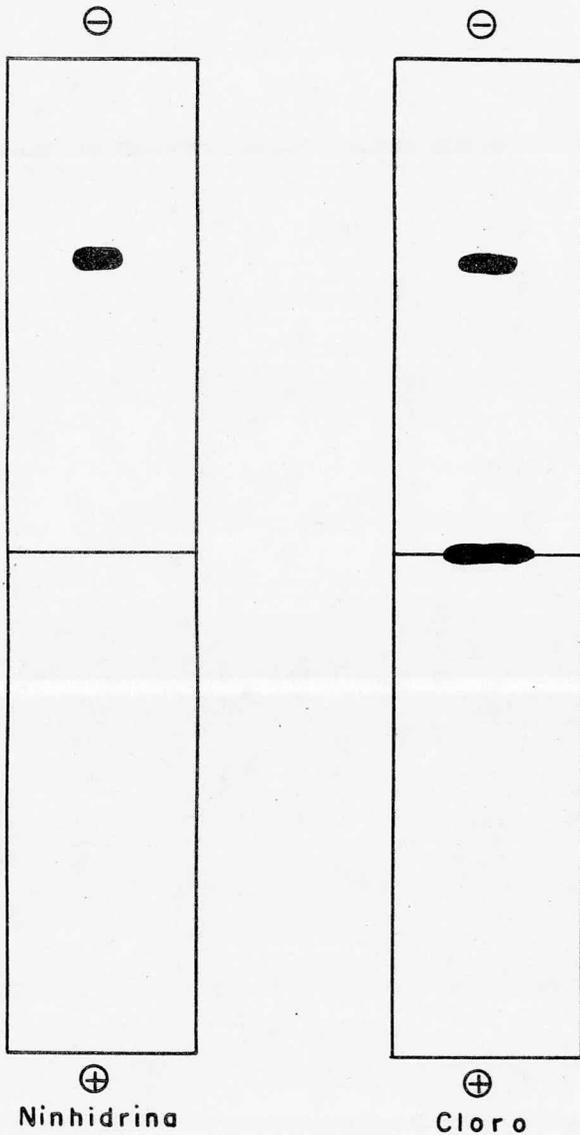


Figura (17).- Electroforesis analítica a pH 1.8 del extracto obtenido a pH 10.0. Tiras de papel Whatman de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: ác. fórmico : ác. acético glacial : agua, (1:4:45, v/v/v).

5) Por lo tanto, se decidió hacer una electroforesis preparativa a pH 1.8 con el fin de eliminar el contaminante de -9. Al finalizar la corrida se tiñó un extremo de la hoja por el método del cloro; el resultado se aprecia en la figura (18). Como se ve, aparecieron manchas positivas en -1, -5, -7, y -9. Se procedió a cortar de +0.5 hasta -1.5 y se extrajo la hormona en la forma que se ha descrito anteriormente. Los filtrados obtenidos se concentraron hasta un volumen final de 300 μ l.

Para saber el grado de purificación obtenido, se decidió hacer una electroforesis analítica a pH 3.5 (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 13). Los resultados, que se observan en la figura (19) fueron los siguientes: apareció una sola mancha en el origen, ninhidrina (+), cloro (+), Pauly (-), lo cual fue muy raro, pues la muestra obtenida de la electroforesis a pH 1.8 no era positiva a la ninhidrina. La explicación a este fenómeno se encontró al saber que el papel utilizado como soporte tanto como el ácido acético comercial están contaminados con glicina y acetilglicina, y que este aminoácido no presenta movilidad electroforética al pH utilizado en esta electroforesis (26). Para comprobarlo se corrió un patrón de glicina (50 μ g), además de muestras del extracto de pH 1.8, a pH 3.5 bajo las mismas condiciones que la electroforesis anterior. Al finalizar la corrida, y después de teñir con ninhidrina, se pudo observar que en efecto la glicina se mantiene en el origen. De esta manera, pudimos saber que nuestra muestra se había contaminado en la electroforesis a pH 1.8 con los reactivos usados.

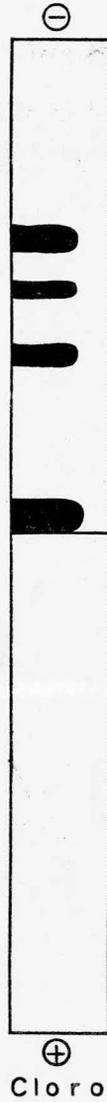


Figura (18).- Extremo de la hoja de electroforesis preparativa a pH 1.8 del extracto obtenido a pH 10.0. 450 v; 80 min; amortiguador: ác. fórmico : ác. acético glacial : agua, (1:4:45, v/v/v).

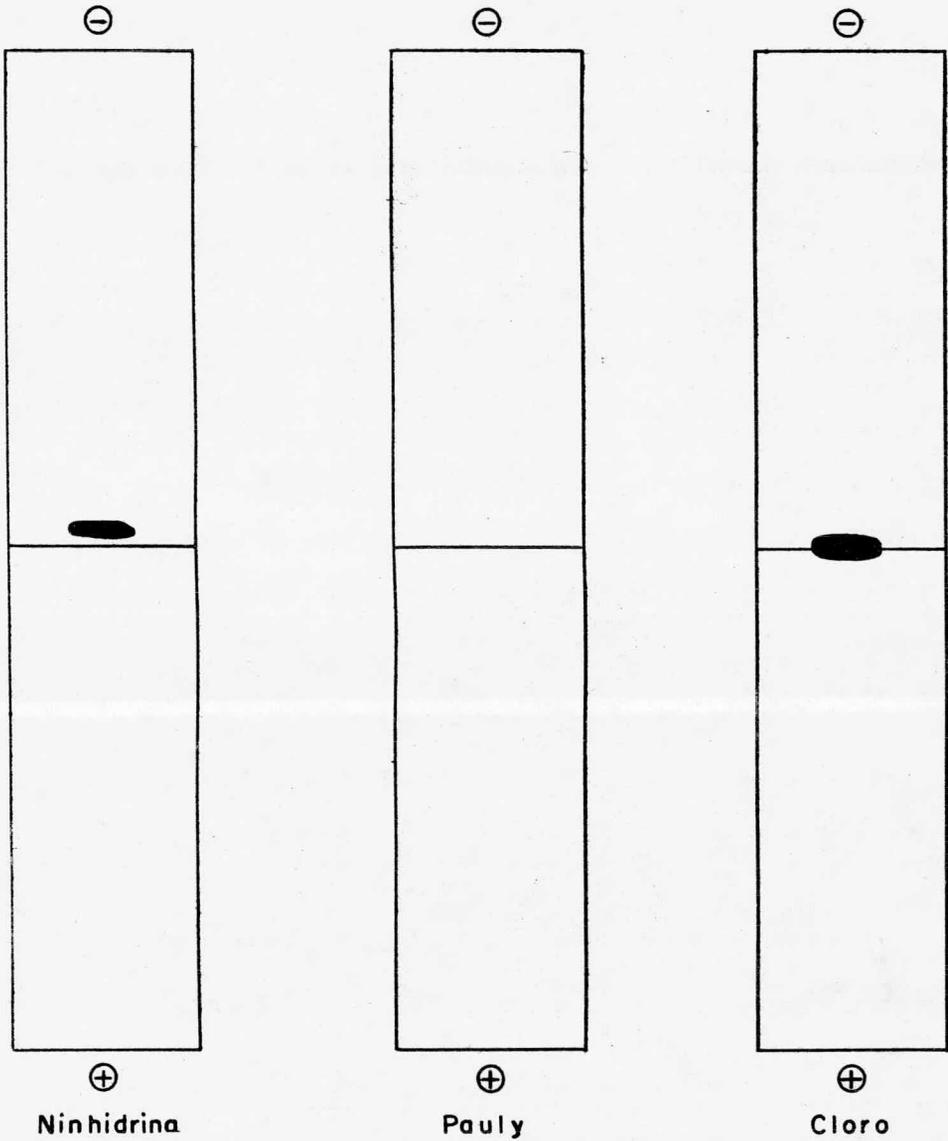


Figura (19).- Electroforesis analítica a pH 3.5 del extracto obtenido de pH 1.8. Tiras de papel Whatman de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: piridina : ác. acético glacial : agua, (1:10:89, v/v/v).

6) Para deshacernos de esa contaminación, se decidió volver a correr la totalidad de la muestra en una electroforesis preparativa a pH 10.0, en donde la composición de la solución amortiguadora no requiere de ácido acético para su preparación. Al finalizar la electroforesis se tiñó un extremo de la hoja con cloro y se observaron dos manchas positivas, una en el origen y la otra en +4. Se corrieron controles de glicina y acetil-glicina en tiras simples de papel, bajo las mismas condiciones y se revelaron con cloro; se observó que en efecto aparecían manchas positivas en +4. Por lo tanto, se procedió a extraer la hormona, cortando la hoja desde +0.5 hasta -1.5. Después se concentró hasta 500 μ l.

7) Como siguiente paso se procedió a correr la muestra en electroforesis analíticas a distintos pH (1.8, 3.5, 6.0 y 10.0) para ver el grado de purificación alcanzado. En cada tira simple de papel se aplicaron 5 μ l del extracto obtenido de pH 10.0. También se corrió un patrón de glicina.

I) Electroforesis analítica a pH 1.8.- Como se observa en la figura (20), apareció una mancha cloro (+), ninhidrina (-) y Pauly (-) en el origen; y otra Pauly (+), ninhidrina (-) y cloro (-) en -12. La glicina apareció en -7.

II) Electroforesis analítica a pH 3.5.- La figura (21) muestra una mancha cloro (+), Pauly (-), ninhidrina (-) en -1; y una mancha Pauly (+), cloro (-), ninhidrina (-) en -7. La glicina apareció en

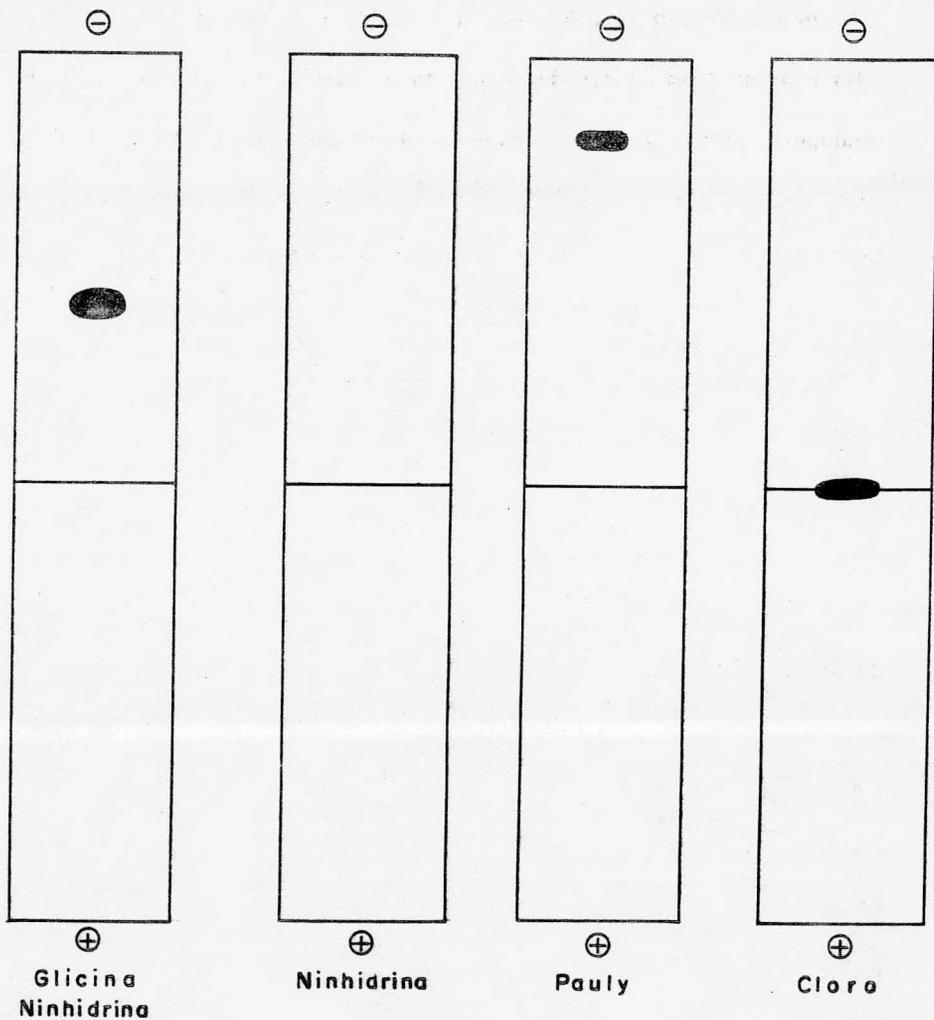


Figura (20).- Electroforesis analítica a pH 1.8 del extracto obtenido a pH 10.0. Tiras de papel Whatman de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: ác. fórmico : ác. acético glacial : agua, (1:4:45, v/v/v).

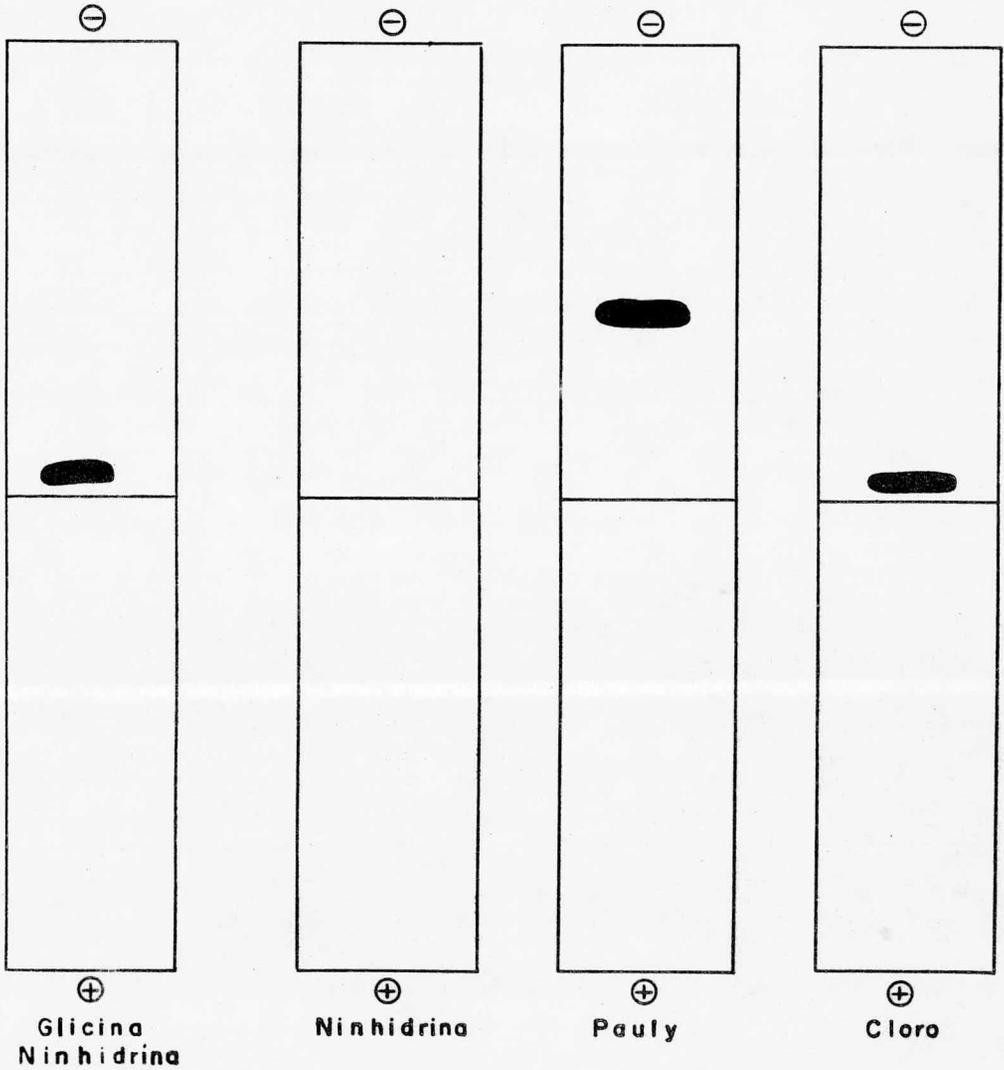


Figura (21).- Electroforesis analítica a pH 3.5 del extracto obtenido a pH 10.0. Tiras de papel Whatman de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: piridina : ác. acético glacial : agua, (1:10:89, v/v/v).



-1.

III) Electroforesis analítica a pH 6.0.- Como se puede observar en la figura (22), en esta electroforesis se vió una mancha cloro (+), ninhidrina (-), Pauly (-) en el origen; y una mancha Pauly (+), ninhidrina (-), cloro (-) en -9. La glicina se mantuvo en el origen.

IV) Electroforesis analítica a pH 10.0.- En este caso se obtuvo una mancha cloro (+), ninhidrina (-), Pauly (+) en el origen, tal como se muestra en la figura (23). La glicina se movió hacia 4.

Estas pruebas nos indicaron que existía todavía un pequeño contaminante Pauly (+) que probablemente se introdujo en la electroforesis a pH 10.0. Para comprobar esta hipótesis se tiñó una tira de papel que no contenía muestra alguna, utilizada como blanco en la electroforesis, y efectivamente apareció una mancha Pauly (+) en el origen. Además, por su migración a pH 1.8, 3.5, y 6.0, se supuso que se trataba de un contaminante de bajo peso molecular.

8) Con estos datos en mente, se decidió pasar la muestra por la columna de Sephadex G-25 fino, con el fin de que ese contaminante (si efectivamente tenía bajo peso molecular) se separara de la hormona.

Las condiciones de la columna fueron las siguientes. Dimensiones:

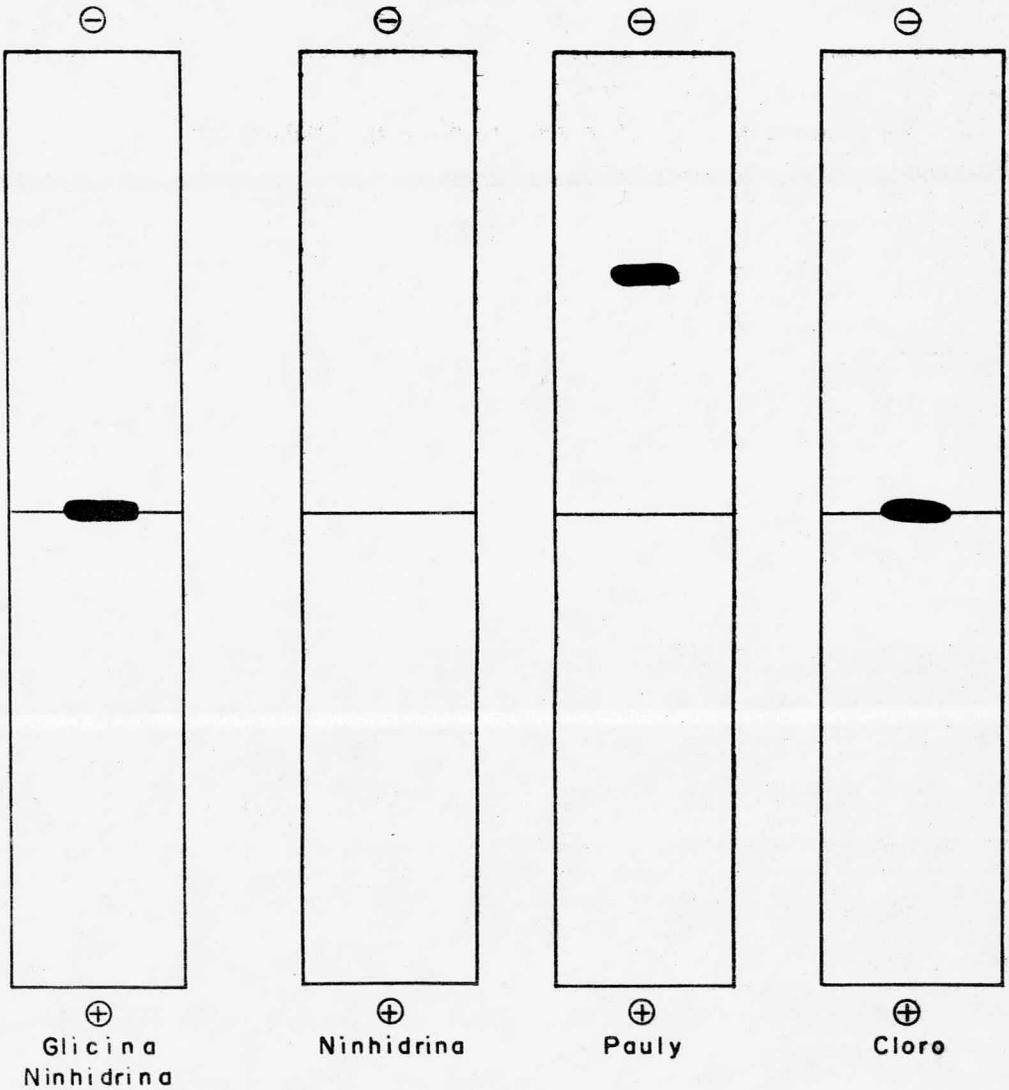


Figura (22).- Electroforesis analítica a pH 6.0 del extracto obtenido de pH 10.0. Tiras de papel Whatman 3 MM de 6 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: piridina : ác. acético glacial : agua, (46:4:950, v/v/v).

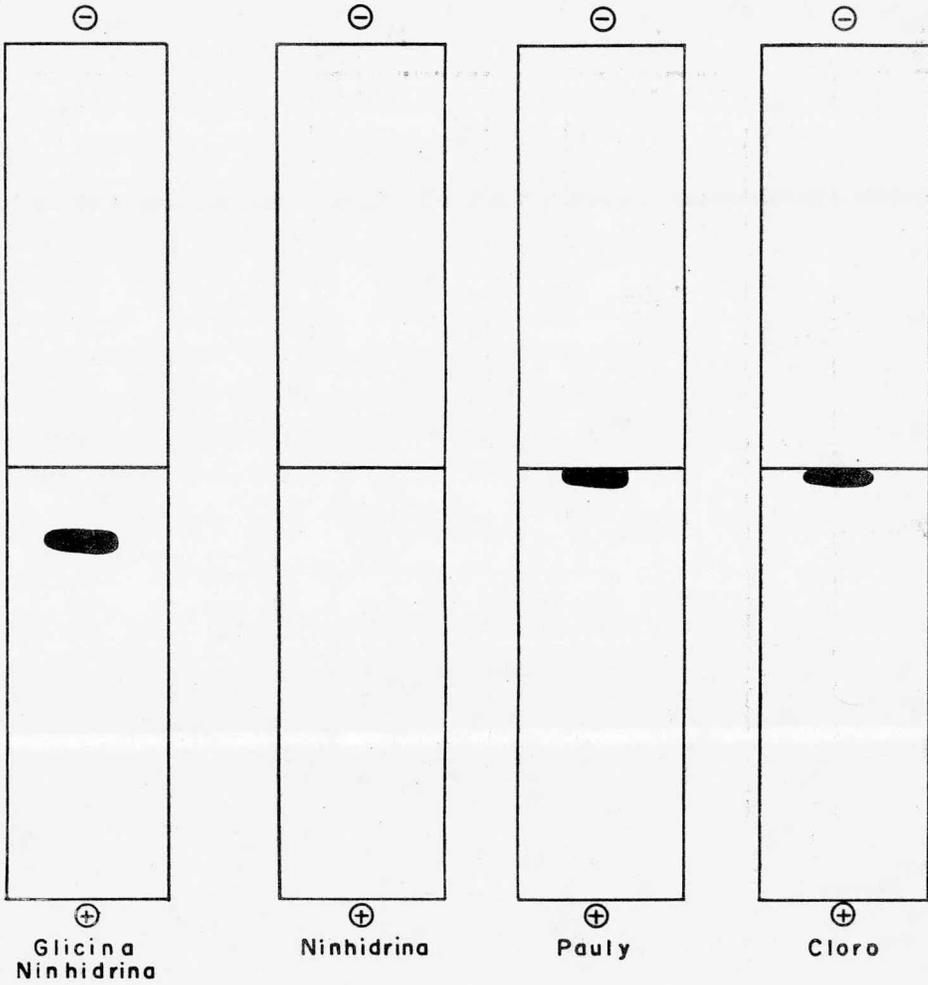


Figura (23).- Electroforesis analítica a pH 10.0 del extracto obtenido de la electroforesis preparativa de pH 10.0. Tiras de papel Whatman 3 MM de 6 x 31 cm; 450 volts; 80 min; amortiguador: carbonato de amonio 0.1 M ajustado a pH 10.0 con amoníaco.

1.9 x 108 cm; volumen total del lecho: 306 ml; flujo: 16 ml/h; volumen de cada fracción: 5 ml.

Se diluyó la muestra a 1 ml y se aplicó a la columna, se lavó con 4 ml de agua y una vez que penetraron éstos, se empezó a graficar y recolectar. Como en los casos anteriores, en esta ocasión también se eluyó con agua.

Como se puede observar en la figura (24), no hubo ninguna absorbencia a 254 nm. Por lo tanto, para saber en donde quedó la hormona después de la cromatografía, se procedió a leer la absorbencia de las fracciones a 206 nm, que es la zona en donde absorbe la unión peptídica. Se encontró un pico de absorbencia en las fracciones 50 - 60.

Se reunieron estas fracciones y se concentraron en el evaporador rotatorio hasta un volumen final de 1 ml.

9) Nuevamente, se hizo una electroforesis analítica a pH 1.8 y se tñieron las tiras por los tres métodos. En esta ocasión, tal como se muestra en la figura (25), sólo apareció una mancha cloro (+), ninhidrina (-) y Pauly (-) en el origen. Con esto comprobamos que el contaminante Pauly (+) había sido eliminado.

Después de este paso, concluimos que cuando menos a un nivel macroscópico, la hormona neurodepresora se encontraba pura. Sin embargo, había que demostrarlo y asegurarse de que así era.

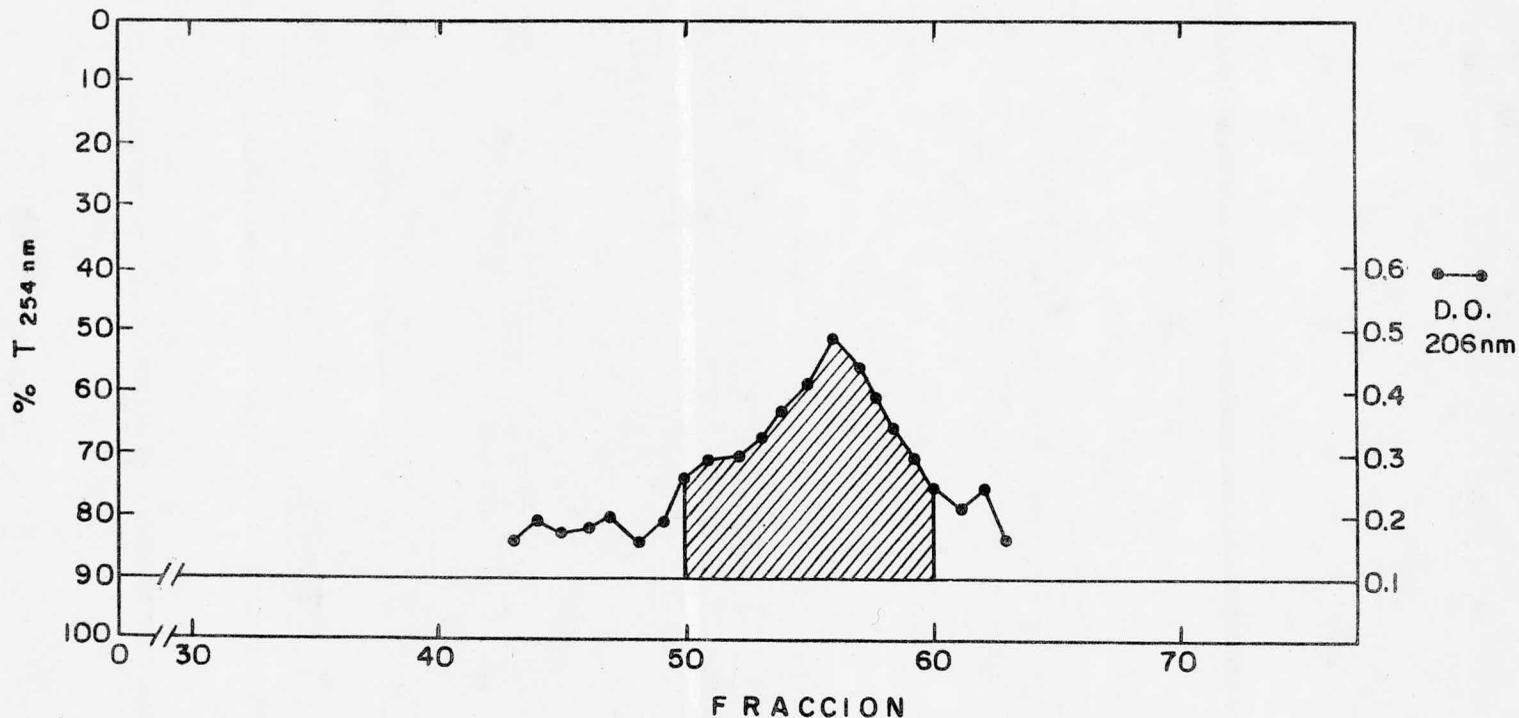


Figura (24).- Cromatografía en Sephadex G-25 fino del extracto obtenido de pH 10.0. Dimensiones: 1.9 x 108 cm; volumen total del lecho: 306 ml; flujo: 16 ml/h; volumen de cada fracción: 5 ml. La zona sombreada corresponde a las fracciones que presentaron actividad neurodepresora.

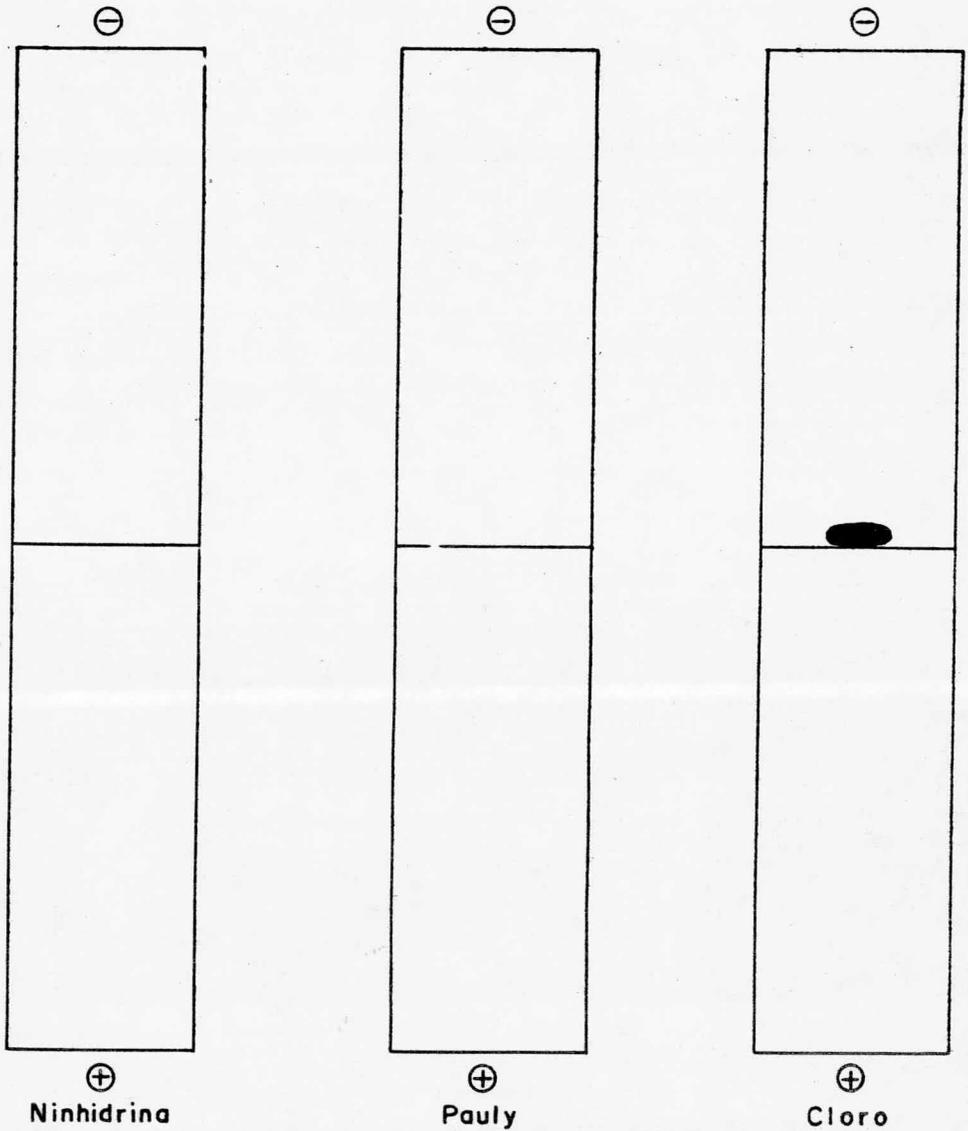


Figura (25).- Electroforesis a pH 1.8 del extracto obtenido de la cromatografía en Sephadex G-25 fino. Tiras de papel Whatman 3 MM de 3 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: ác. fórmico : ác. acético : agua, (1:4:45, v/v/v).

c) DEMOSTRACIONES DE PUREZA.-

1) Electroforesis y cromatografía ascendente en capa delgada.-

Las condiciones utilizadas para esta técnica están descritas en la sección anterior (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 34). Se aplicó la muestra (5 μ l) a la placa de celulosa y se saturó con la solución amortiguadora de ác. fórmico : ác. acético glacial : agua, (1:4:45, v/v/v), pH 1.8. Se corrió la electroforesis. Después de secar la placa, se corrió una cromatografía ascendente en otra dimensión, bajo las condiciones ya descritas. Al finalizar ésta se secó la placa y se tiñó por el método del cloro. Como se puede observar en la figura (26), apareció una mancha positiva en el centro de la placa y una más en el extremo izquierdo; del lado del polo negativo.

Con el fin de investigar si esta segunda mancha se debía a contaminación de la solución amortiguadora, se hizo un experimento en idénticas condiciones que el anterior, pero sin poner muestra, es decir se corrió un blanco. Después de teñir con cloro apareció una mancha positiva en la misma posición que en el experimento anterior. Este experimento nos mostró que la mancha que se encontraba en el extremo izquierdo de la placa era un contaminante del sistema y no de la muestra de hormona. La figura (27) muestra un esquema de este resultado.

Entonces, los resultados de esta prueba mostraron que se obtuvo una sola mancha correspondiente a la HND, con las siguientes características:

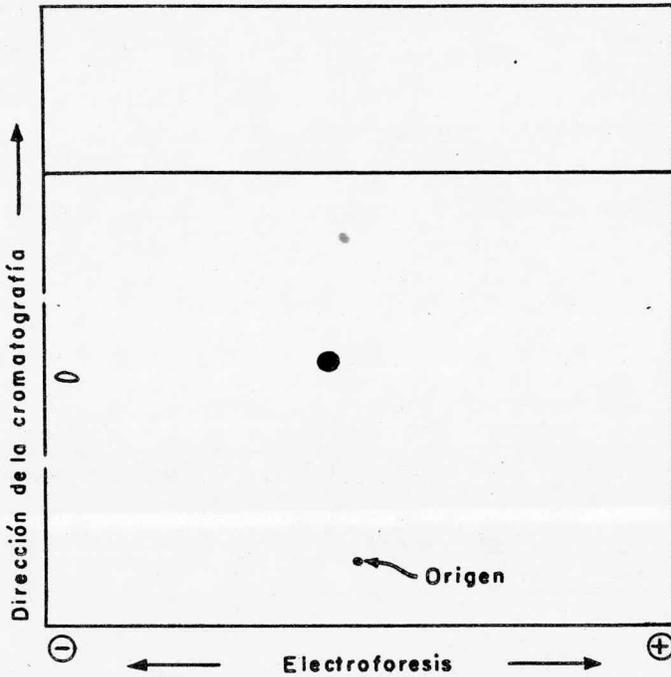


Figura (26).- Análisis electroforético y cromatográfico de la HND en capa delgada. Placas de celulosa MN 300, de 250 micras de espesor, de 20 x 20 cm. Electroforesis: 500 v; 45 min; amortiguador: ác. fórmico : ác. acético : agua, (1:4:45, v/v/v). Cromatografía ascendente: colocando la misma placa a 90 grados con respecto a la electroforesis. Solvente: n-butanol : ác. acético : agua, (4:1:5, v/v/v) utilizando la parte superior. Tiempo de análisis: 2 horas. Cantidad de muestra aplicada: 5 μ l. Revelada con cloro.

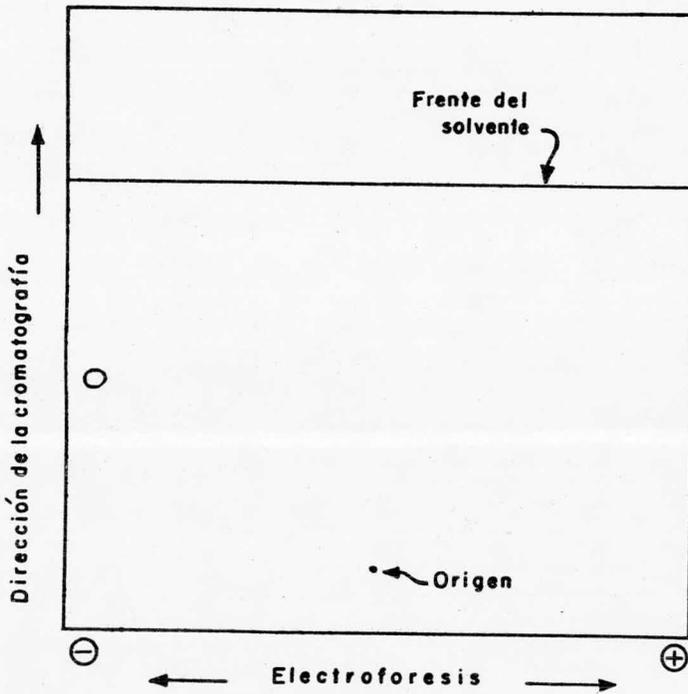


Figura (27).- Análisis electroforético y cromatográfico de un blanco sin HND_7 en capa delgada. Placa de celulosa MN 300, de 250 micras de espesor, de 20 x 20 cm. Electroforesis: 500 v; 45 min; amortiguador: ác. fórmico : ác. acético : agua, (1:4:45, v/v/v). Cromatografía ascendente: colocando la misma placa a 90 grados con respecto a la electroforesis; solvente: n-butanol : ác. acético : agua, (4:1:5, v/v/v) utilizando la fase superior. -Tiempo de análisis: 2 horas. Muestra: no se puso. Revelado con cloro.

Movilidad electroforética: 7 mm hacia el polo negativo a partir del origen.

Movilidad cromatográfica: 6.5 cm

Distancia recorrida por el solvente: 12.6 cm

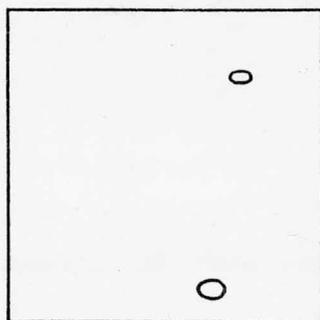
Rf cromatográfico: 0.515

2) Dansilación.- Como otro criterio de pureza se realizó una dansilación (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 37) de 20 μ l del extracto purificado de HND. Como control positivo se dansiló 1 μ l de alani na 0.05 M y como control negativo se hizo un blanco de reactivos.

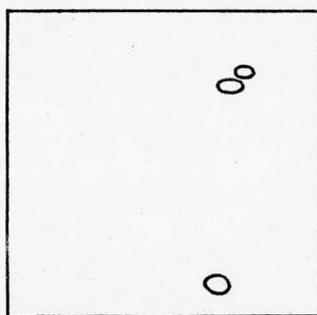
De acuerdo a estudios previos sobre la HND de Procambarus bou-
vieri se había determinado que ésta se encontraba bloqueada en ambos extremos (18). Esto significa que no existe un grupo $-NH_2$ terminal susceptible de reaccionar con el cloruro de dansilo. Por lo tanto, si la hormona neurodepresora de Penaeus vannamei poseía la misma característica, entonces no debería dansilarse; y si existía algún aminoácido contaminante, éste debería formar un producto dansilado que se podría observar por este método.

En la figura (28) se muestran los resultados de este experimento. Como se puede apreciar, en la placa que contenía HND sólo aparecieron los subproductos característicos de la dansilación, es decir DNS-OH y DNS-NH₂, al igual que en el blanco de reactivos (control negativo).

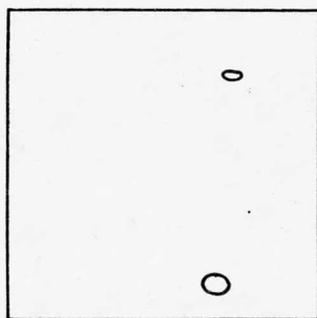
Por su parte, el control positivo reveló la presencia de DNS-OH, DNS-NH₂



A



B



C

Figura (28).- Análisis por dansilación de la pureza del extracto de HND.
A) Control negativo: blanco de reactivos. B) Control positivo: dansilación de $1 \mu\text{l}$ de alanina 0.05 M. C) Dansilación de $20 \mu\text{l}$ de la solución de HND. Microcromatografías en placas de poliamida, 3×3 -cm. 1a. dimensión: agua : ác. fórmico, (100:3, v/v). 2a. dimensión: benceno: ác. acético, (9:1, v/v). 3a. dimensión: acetato de etilo : metanol : ác. acético, (20:1:1, v/v/v).

y DNS-Ala en su posición característica de acuerdo a la mezcla de solventes empleados en las microcromatografías.

Así pues, este experimento mostró que no existía ningún aminoácido contaminante en la muestra de HND.

3) Cromatografía ascendente unidimensional.- En esta técnica, descrita en la sección anterior (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 35), se utilizaron 5 μ l de la solución de HND. Después de teñir con el método del cloro se obtuvo el resultado que se observa en la figura (29): una sola mancha con las características que abajo se mencionan.

Movilidad cromatográfica: 7.75 cm

Distancia recorrida por el solvente: 15 cm

Rf cromatográfico: 0.516

4) Electroforesis y cromatografía descendente en papel.- Esta técnica (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 36) se utilizó también para determinar el estado de pureza de la HND.

El resultado se muestra en la figura (30). Este experimento dio los datos que a continuación se señalan.

Movilidad electroforética: 9 mm hacia el polo negativo.

Movilidad cromatográfica: 9 cm

Distancia recorrida por el solvente: 20 cm

Rf cromatográfico: 0.45

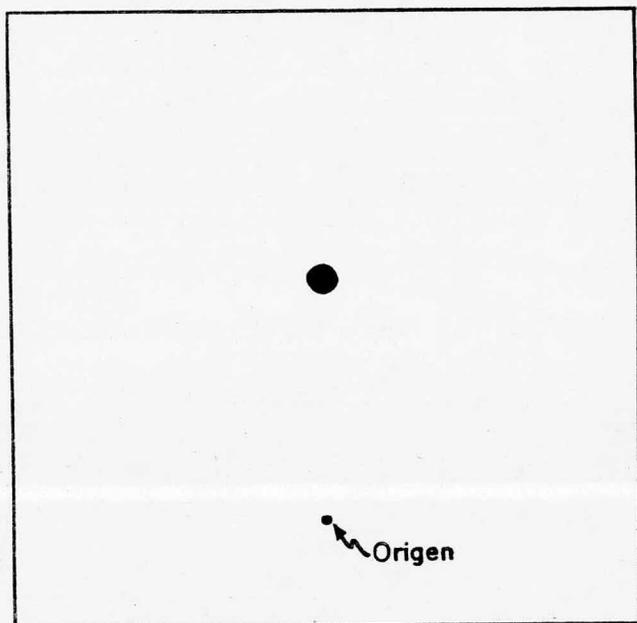


Figura (29).- Cromatografía ascendente unidimensional de 5 μ l de HND. Placa de celulosa MN 300, de 250 micras de espesor, de 20 x 20 cm; solvente: n-butanol : ác. acético : agua, (4:1:5, v/v/v) utilizando únicamente la fase superior. Se dejó correr el frente del solvente 15 cm a partir del punto de aplicación. Revelado con cloro.

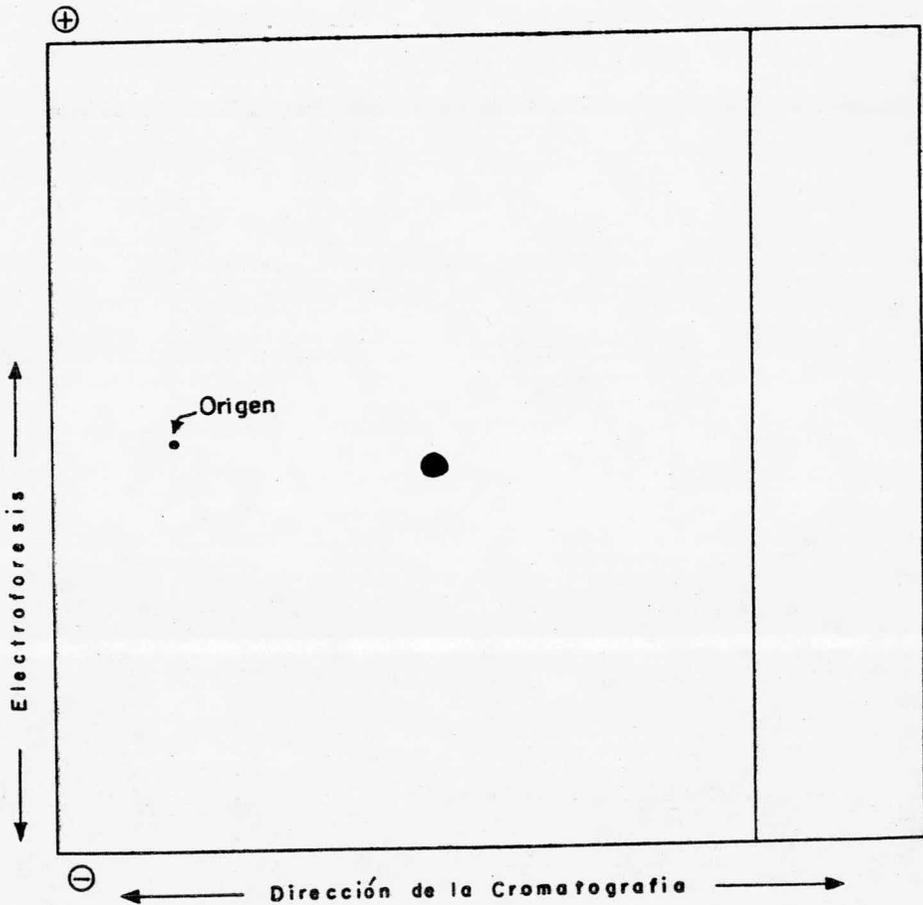


Figura (30).- Electroforesis y cromatografía descendente en papel de 5 μ l de la solución de HND. Electroforesis: hojas de papel Whatman 3 MM de 29 x 31 cm; 450 v; 80 min; amortiguador: carbonato de amonio 0.1 M ajustado a pH 10.0 con amoníaco. Cromatografía: colocando la hoja a 90 grados con respecto a la electroforesis; solvente: n-butanol : ác. acético : agua, (4:1:5, v/v/v) sólo la fase superior. Se dejó correr el frente del solvente 20 cm. Revelado con cloro.

5) Electroforesis de alto voltaje.- Las condiciones de este experimento se mencionaron anteriormente (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 30). Debido al voltaje empleado en esta técnica, cualquier partícula con carga, por pequeña que ésta sea, es atraída hacia los polos, y por lo tanto se puede obtener la separación de los integrantes de una mezcla.

Tal como se observa en la figura (31), este experimento mostró la presencia de una sola mancha en el centímetro -3. Este corrimiento de la muestra puede explicarse por el fenómeno de electroendósmosis, ya que durante el procedimiento de purificación por métodos electroforéticos nos habíamos percatado que la HND es una molécula eléctricamente neutra.

Así pues, después de llevar a cabo todas estas demostraciones de pureza, pudimos concluir que la solución de hormona neurodepresora se encontraba razonablemente pura y que el método escogido para su purificación había logrado su objetivo.

d) CARACTERIZACION.-

1) Determinación aproximada de peso molecular.- Las características de la columna de Sephadex G-15 que se utilizó para la determinación de peso molecular de la HND, con la ayuda de los patrones cianocobalamina y LH-RH (^3H) fueron las que a continuación se mencionan. Dimensiones: 1.9 x 117 cm; volumen total del lecho: 331 ml; flujo: 12 ml/h; volumen de cada fracción: 5 ml.

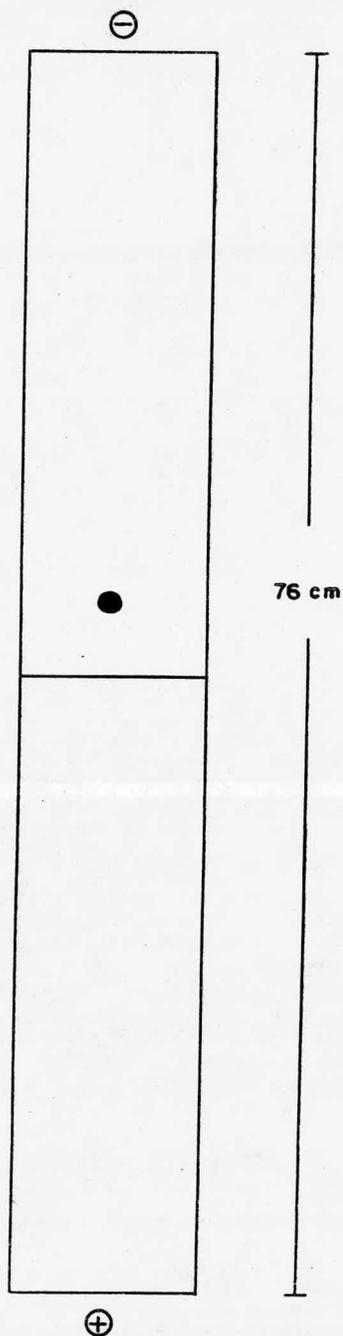


Figura (31).- Electroforesis de alto voltaje a pH 6.0 de 5 μ l de la solución de HND. Tira de papel Whatman de 27 x 76 cm; 4500 v; 60 min; amortiguador: piridina : ác. acético : agua, (46:4:950, v/v/v) pH 6.0.

La gráfica que muestra la corrida de cianocobalamina se observa en la figura (32). El volumen de elución de la máxima concentración de Vit B₁₂ fue de 212 ml.

Por lo que respecta a la corrida de LH-RH (³H), para determinar en qué fracción se encontraba el péptido radiactivo, se procedió a contar la radiactividad de las distintas fracciones en un espectrómetro de centelleo líquido, tal como se mencionó anteriormente (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 40). En la figura (33) se observa la gráfica que muestra los resultados de este experimento.

Como se puede apreciar, el pico más alto de radiactividad se encuentra en las fracciones 55 - 56, correspondiendo a un volumen de elución de 270 ml.

La interpolación de ambos volúmenes de elución en la gráfica donde se corrió el extracto de HND en Sephadex G-15 se muestra en la figura (34); como se puede apreciar la zona de actividad neurodepresora se encuentra entre las que corresponden a 1355.5 y 1181 de peso molecular.

De este experimento concluimos que nuestra hormona tiene un peso molecular aproximado de 1200 daltones.

2) Determinación de actividad de la tripsina.- La actividad triptíca sobre un sustrato artificial fue determinada en la forma que se describió previamente (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 41).

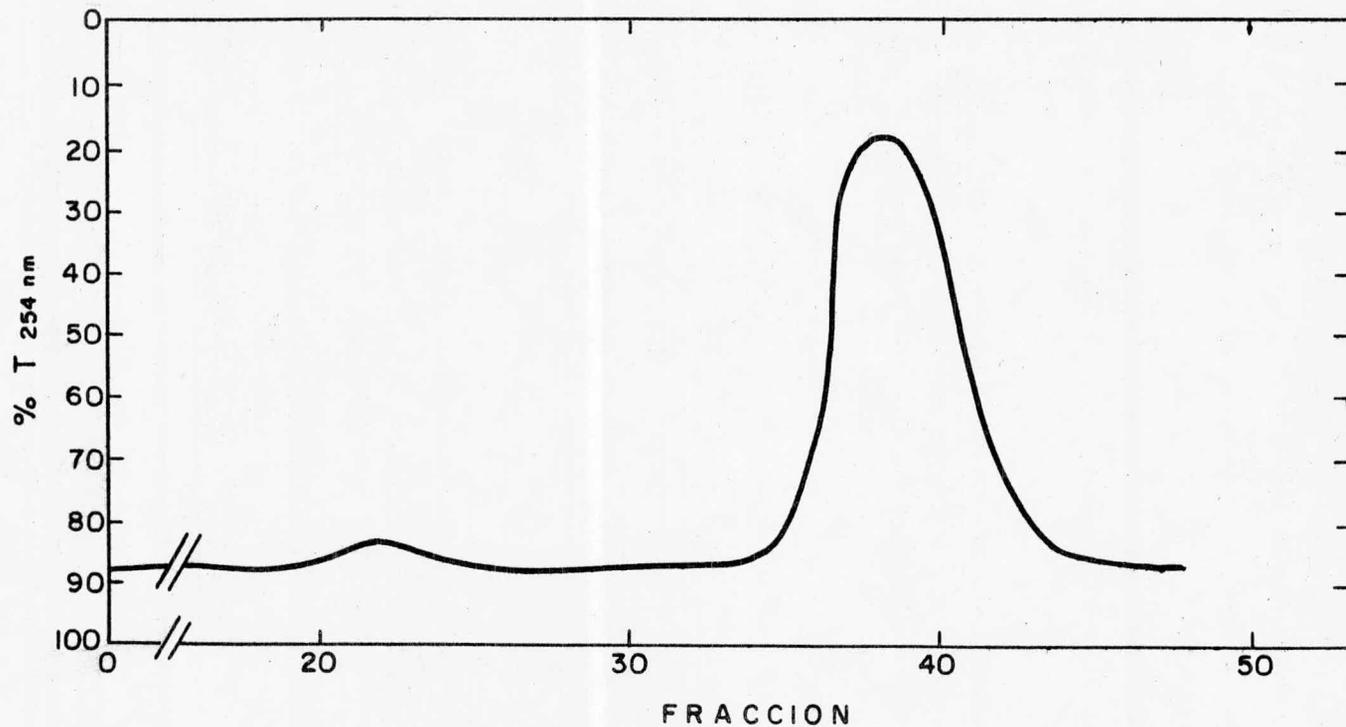


Figura (32).- Cromatografía en Sephadex G-15 de 20 mg de cianocobalamina. Dimensiones: 1.9 x 117 cm; volumen total del lecho: 331 ml; flujo: 12 ml/h; volumen de cada fracción: 5 ml.

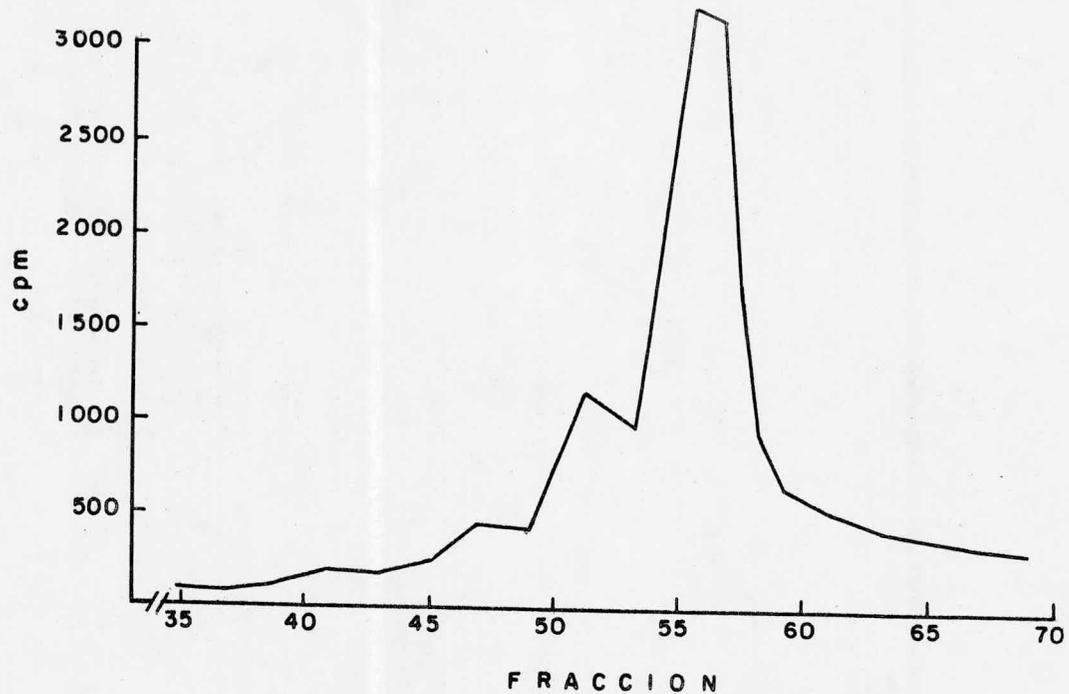


Figura (33).- Cromatografía en Sephadex G-15 de 10 μ l de LH-RH (³H). Dimensiones: 1.9 x 117 cm; volumen total del lecho: 331 ml; flujo: 12 ml/h; volumen de cada fracción: 5 ml.

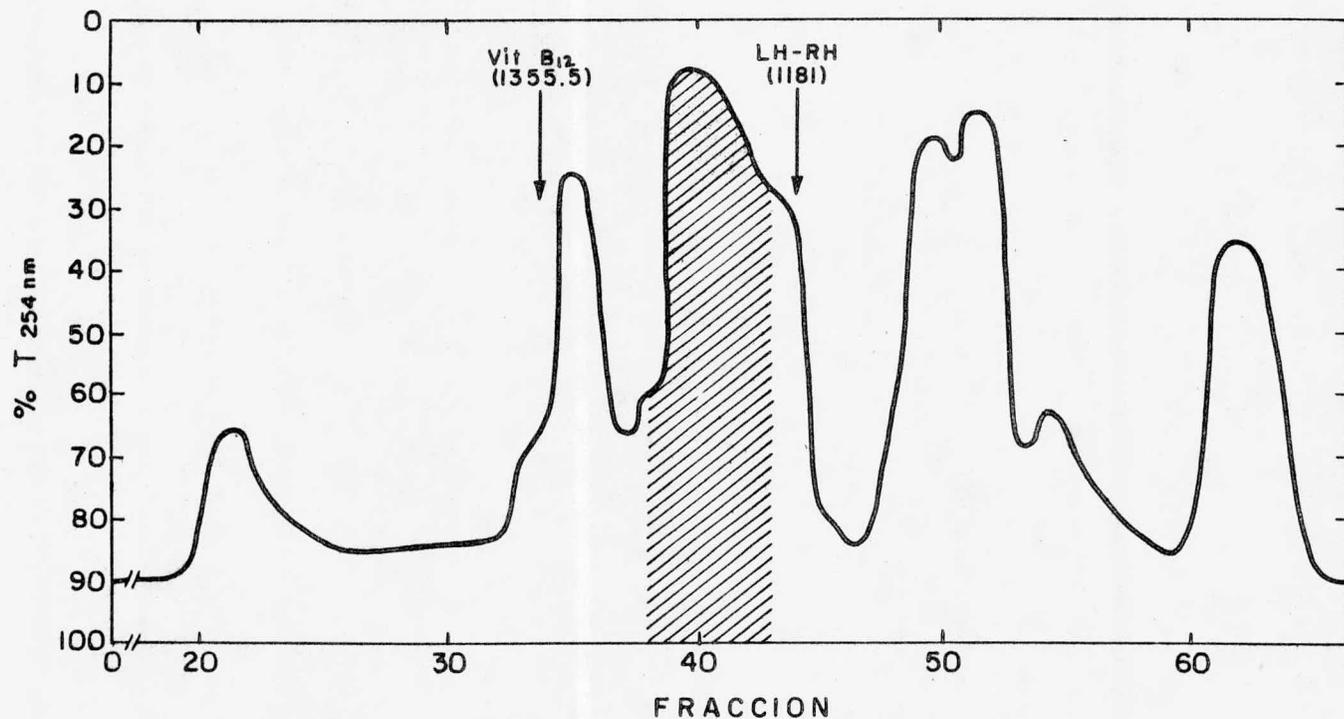


Figura (34).- Interpolación de los volúmenes de elución de cianocobalamina y LH-RH (³H) en Sephadex G-15, en el volumen de elución de la HND, también en Sephadex G-15. Dimensiones: 1.9 x 117 cm; volumen total del lecho: 331 ml; flujo: 12 ml/h. La zona sombreada corresponde a las fracciones que presentaron actividad de HND.

En la figura (35) se puede observar la gráfica de las lecturas obtenidas a 253 nm. Este experimento demostró que la tripsina DCC sí funcionaba cuando se le ponía un sustrato artificial.

Por lo que respecta a la actividad de la tripsina frente a un sustrato natural, tal como lo es la hemoglobina bovina, (Ver MATERIALES Y METODOS, pag.42), en la figura (36) se puede observar un esquema de las "huellas digitales" obtenidas para esa proteína. Como se puede apreciar aparecieron 20 manchas sensibles a la tinción con ninhidrina, correspondientes a otros tantos péptidos, en los cuales fue hidrolizada la proteína original.

3) Digestiones enzimáticas.- Por lo que respecta a las incubaciones de HND con diversas enzimas se obtuvieron los siguientes resultados en el bioensayo:

1er. experimento

Tubo	Actividad biológica
1	5 μ l HND *
	3 μ l tripsina DCC 1% (-)
2	5 μ l HND
	3 μ l tripsina DCC 1% (-)
3	5 μ l HND
	3 μ l solución amortiguadora (+)

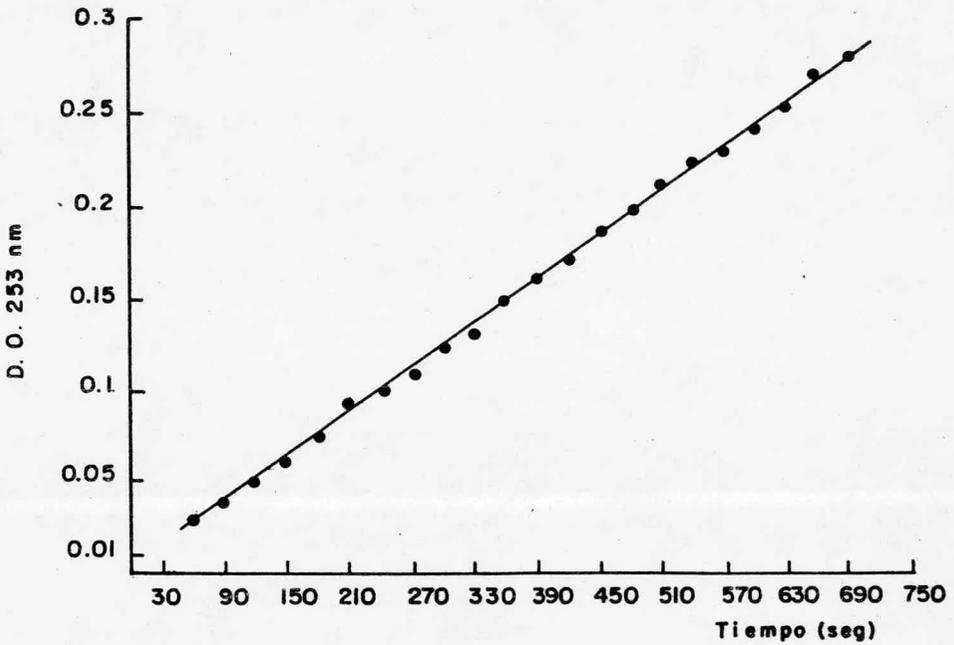


Figura (35).- Determinación de actividad de la tripsina sobre BAEE.
Enzima: tripsina DCC en HCl 1 mM (1 - 2 ug/100 μ l);
Sustrato: α -N-benzoil-arginil-etil-éster-HCl 0.01 M;
Amortiguador: Tris-HCl 0.046 M, CaCl₂ 0.0115 M, pH 7.6

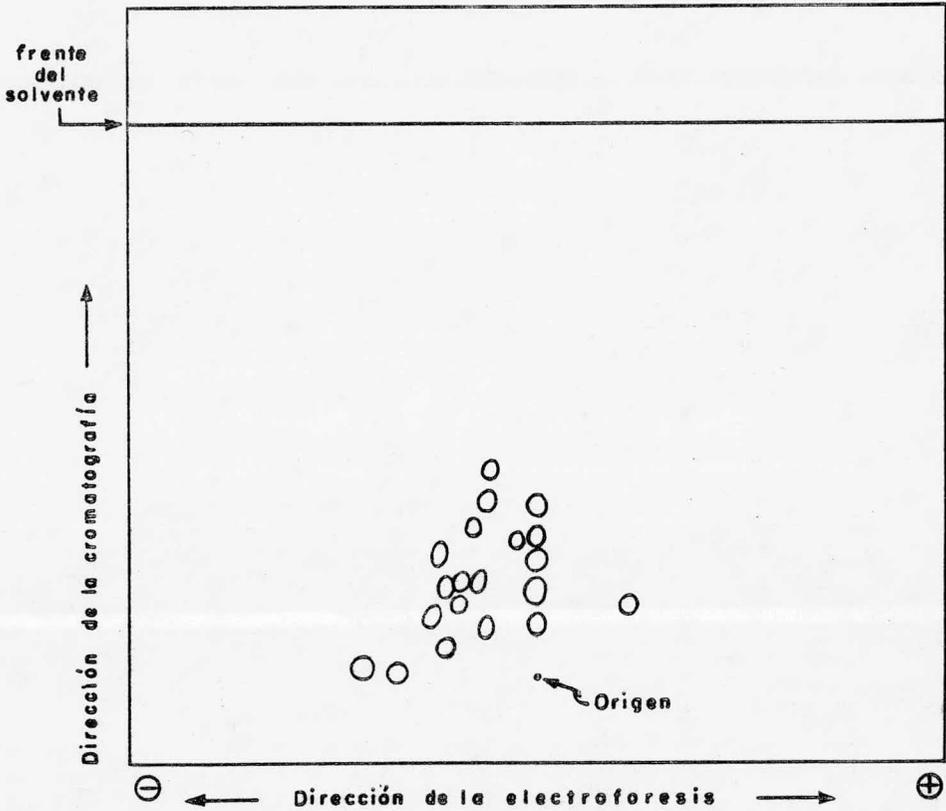


Figura (36).- Determinación de la actividad de la tripsina sobre la hemoglobina bovina por medio de "huellas digitales". Sustrato: hemoglobina bovina al 2% desnaturalizada. Enzima: tripsina DCC al 0.5% en HCl 1 mM. Electroforesis: hoja de papel Whatman 3 MM de 29 x 31 cm; 500 v; 150 min; amortiguador: piridina : ác. acético : agua, (10:0.4:90, v/v/v) pH 6.4. Cromatografía: a 90 grados con respecto a la electroforesis; solvente: n-butanol: ác. acético : agua, (4:1:5, v/v/v) (fase superior). Tinción con ninhidrina.

Tubo		Actividad biológica
4	3 μ l tripsina DCC 1% inactivada	
	5 μ l HND	(+)

*correspondientes a 20 tallas oculares

2o. experimento

A	5 μ l HND	
	3 μ l quimotripsina tipo II 1%	(-)
B	5 μ l HND	
	3 μ l quimotripsina tipo II 1%	(-)
C	5 μ l HND	
	3 μ l solución amortiguadora	(+)
D	3 μ l quimotripsina 1% inactivada	
	5 μ l HND	(+)

3er. experimento

I	5 μ l HND	
	3 μ l pronasa, grado B 1%	(-)
II	5 μ l HND	
	3 μ l pronasa, grado B 1%	(-)
III	5 μ l HND	
	3 μ l solución amortiguadora	(+)
IV	3 μ l pronasa 1% inactivada	
	5 μ l HND	(+)

Tubo		Actividad biológica
4o. experimento		
1	5 μ l HND	
	3 μ l inhibidor de tripsina 1%	(-)
2	5 μ l HND	
	3 μ l inhibidor de tripsina 1%	(-)
3	5 μ l HND	
	3 μ l solución amortiguadora	(+)

Para proseguir con el análisis de la HND, ahora por medio de la técnica de dansilación, se procedió a dansilar, uno por uno, a los siguientes aminoácidos: Leu, Pro, Val, Ile, Ala, Glu, Gln, Asp, Asn, Ser, Thr, His, Lys, Phe, Met, Gly, Arg; con el fin de tenerlos como patrones de identificación. En la figura (37) se puede observar un mapa general de la posición en que cromatografían estos aminoácidos. Las cromatografías se realizaron por el sistema de dos dimensiones (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 46).

4) Determinación de la composición de aminoácidos.- Como se mencionó previamente (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 45), la composición de aminoácidos de la hormona neurodepresora se determinó por medio de hidrólisis y dansilación, probando antes el método con un control

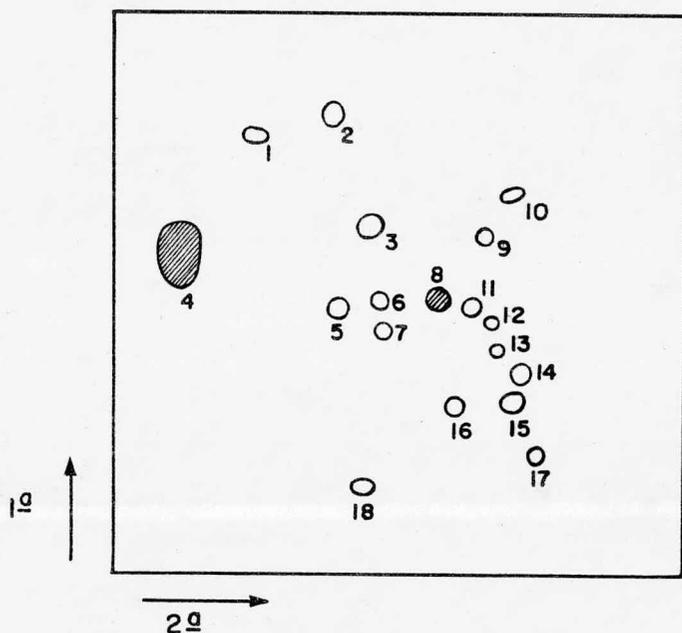


Figura (37).- Mapa general de DNS-aminoácidos. 1) Histidina, 2) Arginina, 3) Ac. Glutámico, 4) DNS-OH, 5) Ac. Aspártico, 6) Glutamina, 7) Glicina, 8) DNS-NH₂, 9) Asparagina, 10) Treonina, 11) Alanina, 12) Prolina, 13) Valina, 14) Fenilalanina, 15) Leucina e Isoleucina, 16) Serina, 17) Metionina, 18) Lisina. Cromatografía en placas de poliamida (3 x 3 cm); 1a. dimensión: ác. fórmico : agua, (1.5:100, v/v); 2a. dimensión: 1-butanol : heptano : ác. acético, (3:3:1, v/v/v).

conocido.

Los resultados de la hidrólisis y dansilación del péptido S de la ribonucleasa se observan en la figura (38). Como se puede apreciar se observan, además de los contaminantes DNS-OH y DNS-NH₂, 10 manchas correspondientes a los DNS-aminoácidos siguientes: Lys, Glu, Thr, Ala, Phe, Arg, His, Met, Asp, Ser, y tres contaminantes no identificados.

Para la HND, se tomaron 80 μ l y se trataron de acuerdo a la metodología ya descrita. El resultado aparece en la figura (39). Los DNS-aminoácidos que se observaron fueron los siguientes: Pro, Val, Leu, Ile, Gly, Thr, Glu, Ser, Ala, Lys (?).

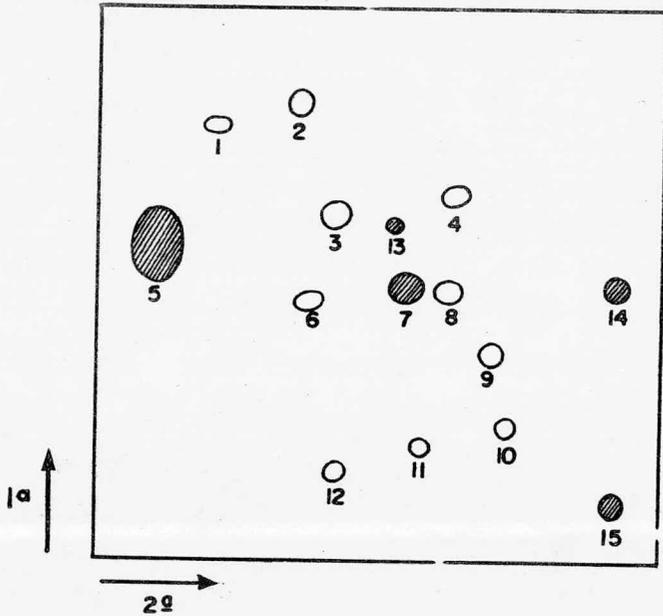


Figura (38).- Hidrólisis y dansilación del péptido S de la ribonucleasa. Cromatografía en placa de poliamida (3 x 3 cm); 1a. dimensión: ác. fórmico : agua, (1.5:100, v/v); 2a. dimensión: 1-butanol : heptano : ác. acético, (3:3:1, v/v/v). 1) DNS-His, 2) DNS-Arg, 3) DNS-Glu, 4) DNS-Thr, 5) DNS-OH, 6) DNS-Asp, 7) DNS-NH₂, 8) DNS-Ala, 9) DNS-Phe, 10) DNS-Met, 11) DNS-Ser, 12) DNS-Lys, 13); 14) y 15) contaminantes no identificados.

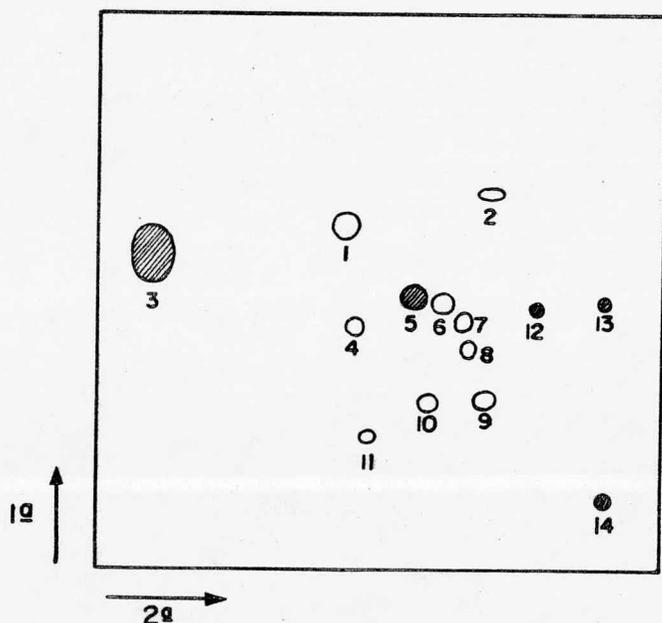


Figura (39).- Hidrólisis y dansilación de 80 μ l de la solución de HND. Cromatografía en placa de poliamida (3 x 3 cm); 1a. dimensión: ác. fórmico : agua, (1.5:100, v/v); 2a. dimensión: 1-butanol : heptano : ác. acético, (3:3:1, v/v/v). 1) DNS-Glu, 2) DNS-Thr, 3) DNS-OH, 4) DNS-Gly, 5) DNS-NH₂, 6) DNS-Ala, 7) DNS-Pro, 8) DNS-Val, 9) DNS-Leu y DNS-Ile, 10) DNS-Ser, 11) DNS-Lys (?), 12), 13) y 14) contaminantes no identificados.

IV

DISCUSION

El interés primordial de esta investigación fue el aislamiento, purificación y caracterización de una hormona neurodepresora que se localiza principalmente en la glándula sinusal de los tallos oculares del camarón Penaeus vannamei (Boone).

Desde 1941, Roberts (27) y Schallek (28) supusieron la existencia en los crustáceos de alguna sustancia con esta propiedad.

En 1974, los doctores Huberman, Aréchiga y Naylor describieron el hallazgo de esta actividad neurodepresora en el cangrejo Carcinus maenas (L.) (29), y demostraron que se trataba de una hormona peptídica, de bajo peso molecular y termoestable.

Más tarde, en nuestro laboratorio se logró el aislamiento, purificación (13) y caracterización (18) de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del acocil mexicano Procambarus bouvieri (7). Dicha hormona presenta las siguientes características:

Es una molécula de naturaleza peptídica, termoestable, dializable y por lo tanto de bajo peso molecular, sensible a la digestión con tripsina, es neutra a cualquier pH cuando se le aplica un campo eléctrico, se encuentra bloqueada tanto en el extremo $-NH_2$ como en el $-COOH$, probablemente con una estructura cíclica. Tiene la siguiente composición probable de aminoácidos: Gln, Asn, His, Gly, Ala, Pro, Val, Leu, Ile, Ser y Thr, con un peso molecular aproximado de entre 1000 y 1500 daltones.

Por otra parte, también se ha demostrado que esta sustancia se comporta como una hormona, pues se la ha localizado en la hemolinfa de Procambarus bouvieri (30), y que además parece secretarse en forma circadiana, pues se ha descrito una mayor concentración durante el día y una concentración menor durante la noche en la hemolinfa del acocil (31). Otras evidencias sugieren que también se trata de una molécula que modula la excitabilidad neuronal a lo largo del nictámero (32).

Sin embargo, como se mencionó previamente (ver INTRODUCCION, pag. 9), el estudio de esta hormona en Procambarus bouvieri presenta muchas dificultades para trabajarla, debido principalmente a la baja concentración de HND en los tallos oculares de este animal (aproximadamente 10 ng/tallo) y a la escasez del crustáceo.

Se pensó, en nuestro laboratorio, que la HND era una molécula que, por sus importantes características fisiológicas, debía encontrarse en otras especies relativamente cercanas en la evolución, y que por ello debería encontrarse en otros crustáceos decápodos. Aunque el acocil Procambarus bouvieri es un crustáceo de aguas continentales, se intentó identificar la misma actividad neurodepresora en crustáceos decápodos marinos, y se logró tener éxito al hallar actividad de HND en Penaeus vannamei, Penaeus californiensis, Machrobrachium americanus, Panulirus sp., y Calinectes sapidus.

Algunas de estas especies, entre ellas Penaeus vannamei, son especies comerciales, que se pueden conseguir fácilmente y en abundancia en las costas mexicanas del Océano Pacífico.

En nuestro caso, se logró encontrar un método rápido, efectivo y adecuado para aislar y purificar grandes cantidades de hormona neurodepresora a partir de miles de tallos oculares de Penaeus vannamei, que rindiera materia suficiente para poder seguir los estudios que se veían obstaculizados por los problemas que presenta Procambarus bouvieri.

Tal como se ha hecho con otras hormonas neurosecretadas de crustáceos (4,5,6,), se escogió un método de purificación que combina técnicas de filtración en gel y técnicas electroforéticas. Anteriormente, para purificar la HND del acocil se habían escogido únicamente métodos electroforéticos (13), los cuales, aunque alcanzaban el objetivo planeado, no permitían trabajar con grandes cantidades de materia prima, y por lo tanto

el rendimiento final obtenido era muy limitado. Además, dicho procedimiento resulta más lento, más laborioso y más caro cuando se quiere purificar mucho material, que el que se propone en este trabajo.

Para poder identificar la actividad neurodepresora en las distintas fracciones obtenidas de las diferentes cromatografías utilizadas, nos valimos de la técnica del bioensayo. En este punto, hay que hacer notar la importancia de que exista un cruzamiento fisiológico entre la actividad de la HND de Penaeus vannamei y el receptor neuronal de esta hormona en Procambarus bouvieri, que fue el que nos dió la posibilidad de seguirle la pista a la hormona a lo largo de la purificación y que nos hizo pensar que estábamos en presencia de una molécula muy similar a la descrita para Procambarus bouvieri. Por este mismo método de bioensayo se pudo detectar la misma actividad neurodepresora en otros crustáceos decápodos marinos, lo que nos abre un gran horizonte para la realización de un estudio evolutivo con respecto a la hormona neurodepresora, a través de un gran número de especies, separadas, unas de otras, por millones de años en la escala biológica, con el fin de investigar las modificaciones que esta molécula ha sufrido a través del tiempo.

En cuanto al proceso de aislamiento, son de importancia los siguientes pasos:

A.- La inactivación de las enzimas proteolíticas por medio del calentamiento y enfriamiento rápidos, para impedir la degradación del péptido en estudio.

B.- La formación de polvos de acetona mostró ser un método efectivo para evitar pérdida de hormona que pudiera estar englobada por lípidos.

C.- La extracción adecuada del péptido utilizando agua, aprovechando sus características hidrofílicas.

D.- El paso de la diálisis es muy importante, pues de su buena realización dependerá la recuperación de hormona en el extracto crudo.

E.- El método de concentración utilizado mostró ser igualmente efectivo que la liofilización, pero mucho más rápido y más económico.

Con respecto al procedimiento de purificación se puede hacer notar lo siguiente:

A.- La filtración en gel permite la aplicación de volúmenes relativamente grandes en una columna, y la separación de los componentes de una mezcla de acuerdo a su tamaño molecular. Por lo tanto, se pueden procesar por este método extractos correspondientes a una gran cantidad de tallos, en poco tiempo y a bajo costo, ya que los geles se pueden volver a utilizar.

B.- Se aprovechó la característica hidrofílica de la hormona

para eluirla con agua en todas las cromatografías utilizadas.

C. Como se puede observar en la sección de RESULTADOS (ver pag. 53 y 60), aparentemente no se nota disminución del patrón de manchas entre el extracto crudo y el extracto obtenido de la primera cromatografía en Sephadex G-25 fino, sin embargo debe mencionarse que la intensidad de las manchas disminuyó, y que por lo tanto la concentración relativa de los contaminantes fue menor en el extracto obtenido de esta cromatografía.

D. En el caso de la segunda cromatografía en Sephadex G-25 fino se pudo apreciar que además de disminuir la concentración de los contaminantes, también fue menor el número de éstos al hacerse el análisis electroforético.

E.- Por lo que respecta a la cromatografía en Sephadex G-15 se pudo observar una resolución cromatográfica muy grande (ver figuras 12 y 13) que mostró la presencia de varios picos correspondientes a muchos contaminantes y de donde se pudo obtener la actividad neurodepresora con un número menor de contaminantes, tanto en cantidad como en concentración.

Con los resultados de esta cromatografía tal vez podría pensarse que no son necesarias las dos cromatografías anteriores, pues es en Sephadex G-15 donde se nota una disminución importante de las manchas con respecto al extracto crudo. Sin embargo, la resolución obtenida en este paso no se hubiera logrado si se hubiera colocado el extracto crudo direc-

tamente en esta columna, pues es tanta la cantidad de proteínas y contaminantes que tiene éste último, que los picos seguramente se hubieran imbricado y la separación no hubiera sido tan buena.

F.- Debido a que el extracto obtenido de Sephadex G-15 se encontraba bastante disminuido en la concentración de contaminantes y a que se le pudo concentrar hasta un volumen muy pequeño, se decidió cambiar de táctica y, aprovechando el conocimiento que se tenía sobre el comportamiento electroforético de la hormona, se utilizó la electroforesis de mediano voltaje en papel para finalizar la purificación de la HND.

G.- Se utilizaron solventes volátiles para evitar la formación de sales que pudieran afectar los ensayos biológicos por acción directa sobre las neuronas del acocil.

H.- El método de extracción del papel mostró ser igualmente efectivo que el utilizado por Cimet, A. (13), pero con las ventajas de ser más rápido y de no dejar pelusa.

I.- El último paso de purificación, es decir la cromatografía en Sephadex G-25 fino, después de la utilización de métodos electroforéticos, mostró ser muy adecuado para la eliminación de aminoácidos libres que se introducen como contaminantes con el uso de algunos reactivos comerciales durante las electroforesis (33).

J.- Las diferentes técnicas utilizadas como criterios de pureza de la hormona, revelaron una sola mancha correspondiente a la HND.

Por lo tanto, podemos estar razonablemente seguros de que purificamos a homogeneidad a la hormona neurodepresora de Penaeus vannamei.

Por lo que respecta a la caracterización de esta molécula, se obtuvieron datos para señalar lo siguiente:

A.- Se trata de una molécula termoestable, puesto que resiste el calentamiento a 80°, durante 3 minutos, sin perder su actividad biológica.

B.- Se trata de una molécula que presenta una gran absorbencia a 206 nm, longitud de onda a la que absorben, entre otras, sustancias que contienen enlaces peptídicos. Además, para apoyar la sugerencia de que la HND contiene enlaces peptídicos, se encuentra el hecho de que cuando se la trata con pronasa (mezcla de enzimas proteolíticas de Streptomyces griseus) la hormona pierde por completo sus características biológicas.

C.- La hormona neurodepresora de Penaeus vannamei tiene un peso molecular aproximado de 1200 daltones, de acuerdo a la comparación que se hizo con patrones de peso molecular conocido, por medio de la técnica de filtración en gel, en donde la HND se situó entre la cianocobalamina (PM 1355.5) y la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH, PM 1181).

El peso molecular exacto, sin embargo, será conocido con certeza cuando se determine la estructura y secuencia de aminoácidos de la molécula.

D.- Se trata de una molécula sensible a las digestiones con tripsina, quimotripsina y pronasa. Por estas características, se pueden utilizar estas enzimas con el fin de conocer la estructura y la secuencia del péptido, empleándolas como herramientas para dividir a la molécula en péptidos más pequeños que se puedan secuenciar por diversas técnicas que incluyen, entre otras: degradación de Edman, tratamiento con carboxipeptidasas A, B o Y, tratamiento con aminopeptidasas, determinaciones de grupo amino terminal, etc.

Además, la hormona neurodepresora pierde sus características biológicas cuando se la incuba en presencia del inhibidor de la tripsina (de soya). Este ha sido un hallazgo casual cuyo significado y mecanismo se encuentran bajo investigación en nuestro laboratorio.

E.- De acuerdo a las tinciones efectuadas tenemos que la HND es una molécula cloro (+), ninhidrina (-) y Pauly (-). El que sea cloro (+) está indicando que existen uniones C-N, las cuales presumiblemente se deben a enlaces peptídicos. Por lo que respecta a la característica de que sea ninhidrina negativa, ésta nos habla de que no existe un grupo $-NH_2$ terminal libre, sino que se encuentra bloqueado. Por último, el resultado negativo de la tinción de Pauly nos indica que no existen ni histidina ni tirosina, como aminoácidos integrantes del péptido.

F.- De acuerdo a su comportamiento electroforético, se observa que la hormona neurodepresora carece de cargas, es decir, se trata de una molécula neutra, que por lo tanto carece de aminoácidos car-

gados y que además se encuentra bloqueada en ambos extremos terminales. El bloqueo del grupo amino se confirma por su negatividad a la ninhidrina y además por la falta de movilidad electroforética a pH ácido. En cuanto al bloqueo del grupo carboxilo, éste se infiere por la carencia de movilidad electroforética a pH alcalino.

En la naturaleza, se conocen varios tipos de bloqueo para proteínas y péptidos; para el grupo amino suelen existir bloqueadores orgánicos del tipo de un grupo acetilo o formilo unidos al $-NH_2$ terminal; otro tipo de bloqueo se lleva a cabo por medio de un grupo piroglutámico, el cual se forma por la ciclización del ácido glutámico que se encuentra en la posición amino terminal.

Por lo que respecta al extremo carboxilo terminal, un tipo de bloqueo muy frecuente se lleva a cabo con la formación de la amida del grupo carboxilo del residuo de aminoácido $-COOH$ terminal.

Una forma de bloqueo que incluye a ambos extremos a la vez, y que también se encuentra en la naturaleza, es la existencia de un péptido cíclico, en el cual no existan grupos ni $-NH_2$ ni $-COOH$ terminal.

G.- Para conocer la composición de aminoácidos del péptido se recurrió a una microtécnica como lo es la dansilación posterior a una hidrólisis ácida; este método es muy sensible para trabajar con cantidades pequeñas de material (1 - 10 nanomolas). Esta técnica puede aumentar su sensibilidad alrededor de 1000 veces si se utiliza como reactivo DNS-Cl radiactivo (34).

El resultado de este experimento fue un mapa de 9 aminoácidos, que fueron los siguientes: Pro, Val, Leu, Ile, Gly, Thr, Glu, Ser, Ala; Lys (?).

El ácido glutámico debe encontrarse como glutamina, puesto que el péptido nativo carece de carga. Su aparición como ácido glutámico se debe a la hidrólisis ácida.

En este experimento se obtuvieron datos únicamente cualitativos y por lo tanto, de aquí no se puede inferir cuántos residuos existen de cada especie.

H.- Fisiológicamente, en las neuronas del acocil, la hormona neurodepresora de Penaeus vannamei presenta un 18% más de actividad en relación a la misma cantidad de tallos oculares provenientes de Procambarus bouvieri. Esto puede deberse a un incremento en la cantidad de hormona por tallo en el camarón con respecto al acocil, o bien a que el proceso de recuperación fue mejor en este caso.

I.- Se puede mencionar que a la par con este trabajo, se realizó una purificación similar de hormona neurodepresora de 2000 tallos oculares de Procambarus bouvieri, y es de hacer notar que el comportamiento tanto cromatográfico como electroforético, fue igual al que se ha descrito aquí para Penaeus vannamei; como también lo fueron las tinciones, la susceptibilidad enzimática y la determinación de su peso molecular aproximado.

Estos datos, los obtenidos previamente para Procambarus bouvieri (13, 18), y los resultados de aminogramas preliminares de ambos péptidos, realizados en colaboración con el Dr. Paul Fletcher, de la Universidad de Yale, en los Estados Unidos, señalan que la hormona neurodepresora de Penaeus vannamei es idéntica o muy similar a la reportada para Procambarus bouvieri.

Los pasos siguientes en relación con este proyecto serán determinar la estructura y secuencia de aminoácidos de la hormona, para luego continuar con su síntesis química, y con ello poder ampliar su estudio a distintos niveles.

V

CONCLUSIONES

1.- Se logró aislar, purificar a homogeneidad y caracterizar parcialmente una hormona neurodepresora encontrada en la glándula sinusal del tallo ocular del camarón Penaeus vannamei (Boone).

2.- Se consiguió obtener un método de aislamiento adecuado, que consta de los siguientes puntos:

- a) Obtención de los tallos oculares
- b) Inactivación de enzimas proteolíticas por calentamiento
- c) Congelamiento
- d) Trituración
- e) Formación de "polvos de acetona"
- f) Extracción con agua bidestilada y desionizada
- g) Centrifugación

- h) Concentración
- i) Diálisis
- j) Concentración

3.- Se logró purificar la hormona por medio de la combinación de las técnicas de cromatografía por filtración en gel y electroforesis en papel, a mediano voltaje, de acuerdo al siguiente orden:

- a) Cromatografía en Sephadex G-25 fino
- b) Cromatografía en Sephadex G-15
- c) Electroforesis a pH 10.0
- d) Electroforesis a pH 1.8
- e) Electroforesis a pH 10.0
- f) Cromatografía en Sephadex G-25 fino

En cada paso se determinó en dónde se encontraba la actividad neurodepresora por medio del bioensayo, y solamente la fracción activa se sometió al siguiente paso de purificación.

4.- Se determinó el grado de pureza de la hormona con pruebas tales como:

- a) Electroforesis de alto voltaje
- b) Electroforesis y cromatografía descendente en papel
- c) Electroforesis y cromatografía ascendente en capa delgada
- d) Cromatografía ascendente unidimensional
- e) Electroforesis a mediano voltaje a

1) pH 1.8

II) pH 3.5

III) pH 6.0

IV) pH 10.0

En todas estas pruebas se obtuvo una sola mancha cloro (+), ninhidrina (-) y Pauly (-).

f) Dansilación. No se obtuvieron manchas correspondientes a DNS-aminoácidos contaminantes.

5.- Por los datos obtenidos en las pruebas señaladas en el punto anterior, estamos razonablemente seguros de haber purificado a homogeneidad la hormona neurodepresora de Penaeus vannamei.

Otros datos obtenidos durante la realización de este estudio nos permiten concluir que:

6.- Se trata de una molécula termoestable.

7.- Es una molécula dializable.

8.- Es hidrofílica, ya que en el proceso de purificación fue extraída y eluida de las columnas únicamente con agua.

9.- Se trata de un péptido, puesto que pierde sus características hormonales cuando se la trata con pronasa.

10.- Es una molécula neutra y además se encuentra bloqueada en ambos extremos, puesto que no posee movilidad electroforética a ningún pH.

11.- Pierde sus características biológicas cuando se la incuba con tripsina, quimotripsina y el inhibidor de la tripsina (de soja).

12.- Se trata de una molécula con un peso molecular aproximado de 1200 daltones, pues se sitúa entre la cianocobalamina (PM 1355.5) y LH-RH

(PM 1181) cuando se cromatografía en Sephadex G-15.

13.- Al danilar los productos de la hidrólisis ácida de la hormona se obtienen las siguientes manchas identificables: Pro, Val, Leu, Ile, Gly, Thr, Ser, Glu, Ala; en donde Glu corresponde en realidad a Gln.

Después de analizar cuidadosamente todos los datos obtenidos en este estudio podemos concluir, en forma razonable, que la hormona neurodepresora de Penaeus vannamei (Boone) es igual o muy similar a la hormona neurodepresora de Procambarus bouvieri (Ortmann).

VI

BIBLIOGRAFIA

- 1) Highnam, K. and Hill, L. The comparative endocrinology of the invertebrates, 2d. Edition, Edward Arnold, Ltd., London, 1977, pp 1 - 8.
- 2) Ibid., pp 26 - 27.
- 3) Ibid., pp 264 - 266.
- 4) Fernlund, P. Chromactivating hormones of Pandalus borealis, isolation and purification of a light adapting hormone; Biochim. Biophys. Acta, 237: 519 - 529 (1971).

- 5) Fernlund, P. and Josefsson, L. Chromactivating hormones of Pandalus borealis, isolation and purification of the 'red-pigment-concentrating hormone'; Biochim. Biophys. Acta, 158: 262 - 273 (1968).

- 6) Kleinholz, L.H. A progress report on the separation and purification of crustaceans neurosecretory pigmentary-effector hormones; Gen. Comp. Endocrinol, 14: 578 - 588 (1970).

- 7) Huberman, A., Aréchiga, H., Cimet, A., De la Rosa, J. and Arámburo, C. Isolation, purification and characterization of a neurodepressing hormone from the sinus gland of the crayfish Procambarus bouvieri (Ortmann); Proceedings of the International Union of Physiological Sciences, Volume XIII, pp 336, Paris (1977).

- 8) Dawson, Elliot, Elliot, Jones. Data for biochemical research, 2d. Edition, Oxford University Press, London, pp 526 -527 (1969).

- 9) Ibid., pp 530.

- 10) Ibid., pp 528.

- 11) Rydon, H.N. and Smith, P.W.G. A new method for the detection of peptides and similar compounds on paper chromatograms, *Nature*, 169: 922 - 923 (1952).
- 12) Schmid, O.J. Zur technik des nachweises von peptiden auf papier mit hilfe von chlor und o-tolidin; *J. Chromatogr.*, 3: 499 - 500 (1960).
- 13) Cimet Ralsky, A. Aislamiento y purificación de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del acocil Procambarus bouvieri (Ortmann); Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM (1977).
- 14) Aréchiga, H., Huberman, A. and Martínez-Palomo, A. Release of a neurodepressing hormone from the crustacean sinus gland; *Brain Research*, 128: 93 - 108 (1977).
- 15) Wine, J.J., Mittenthal, J.E. and Kennedy, D. The structure of tonic flexor motoneurons in crayfish abdominal ganglia; *J. Comp. Physiol.* 93: 315 - 336 (1974).
- 16) Van Harreveld, A. A physiological solution for freshwater crustaceans; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y.* 34: 428 - 432 (1936).

- 17) Aréchiga, H. and Bailey, H. An accurate and simple method to analyse neuronal activity over long periods of time; *Behav. Physiol.* 2: 307 - 310 (1974).

- 18) De la Rosa Vélez, J. Caracterización de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del acocil Procambarus bouvieri (Ortamnn); Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM (1977).

- 19) Fischer, L. in: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* (Work, T. and Work, E. Eds.), Vol. I, North-Holland, Amsterdam, pp 182 - 183 (1969).

- 20) Gray, W. B. and Hartley, B. S. A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides, *Biochem. J.* 89: 59 (1963).

- 21) Osborne, N. *Microchemical analysis of nervous tissue*, 1st. Edition, Pergamon Press, Oxford, pp 58 - 121 (1974).

- 22) *Manual de enzimas*. Worthington.

- 23) Ingram, V. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobin by "fingerprinting"; *Biochim. Biophys. Acta*, 28: 539 - 545 (1958).

- 24) Richards, F. M. and Vithayathil, P. J. The preparation of subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components; *J. Biol. Chem.* 234: 1459 - 1465 (1959).

- 25) Needleman, S. B. (Ed) *Protein sequence determination*, Chapman and Hall, London, pp 92 - 95 (1970).

- 26) Meister, A. *Biochemistry of the aminoacids*, 2d, Edition, Vol. I, Academic Press, New York, pp 30 (1965).

- 27) Roberts, T. W. Evidences that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish Cambarus virilis, Hagen. *Anal. Rec. (Suppl.)* 81: 46 - 47 (1941).

- 28) Schallek, W. Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish; *J. Exp. Zool.* 91: 155 - 156 (1942).

- 29) Aréchiga, H., Huberman, A. and Naylor, E. Hormonal modulation of circadian neural activity in Carcinus maenas (L.); Proc. R. Soc. Lond. B. 187:299 - 313 (1974).

- 30) Aréchiga, H., Huberman, A. and Martínez-P., A. Hormonal modulation of neuronal activity in the crayfish; Proceedings of the International Union of Physiological Sciences, Vol. XIII, pp 31, Paris (1977).

- 31) Cabrera-P., C., Aréchiga, H. and Huberman, A. Circadian rhythm of NDH in the crayfish; (en preparación).

- 32) Aréchiga, H. y Anaya, V. Ritmo circádico en la secreción de la hormona neurodepresora del acocil Procambarus bouvieri, XIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Durango, pp 46 (1976).

- 33) St. Onge, L. M., Kittle, S. L. and Hamilton, P. B. The identification of N-acetylglycine as a contaminant of glacial acetic acid; Anal. Biochem. 71:156 - 162 (1976).

- 34) Burzynski, S. R. Sequential analysis in subnanomolar amounts of peptides. Determination of the structure of a habituation-induced brain peptide (ameletin); Anal. Biochem. 70:359 - 365 (1976).