

03466

2
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Aislamiento y caracterización de Péptidos Neuroactivos en Molusco Bivalvo

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

AURORA ANTONIA CANDELARIO MARTINEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

A.....	Alanina
Ach.....	Acetil colina
AMPC.....	Adenosin monofosfato cíclico
ARC.....	Músculo accesorio de cierre de la rúdula
BSA.....	Albúmina sérica bovina
CMC.....	Células metacerebrales
DMSO.....	Dimetil sulfóxido
F.....	Fenilalanina
FAB.....	Bombardeo atómico de masas
5-HT.....	5-Hidroxitriptamina
I.....	Isoleucina
L.....	Leucina
M.....	Metionina
N.....	Asparagina
P.....	Prolina
Q.....	Glutamina
R.....	Arginina
S.....	Serina
SCPs.....	Péptidos pequeños cardioactivos
TFA.....	Acido trifluoroacético
TFMSA.....	Acido trifluorometanosulfónico
Y.....	Tirosina

INDICE DE FIGURAS.

fig 1. Curva estándar del RIA.....	24
fig 2. Perfil de inmunorreactividad de <i>Mercenaria mercenaria</i> ...	29
Fig 3. Perfil de absorbencia e inmunorreactividad del pico Q en la última etapa de purificación.....	31
Fig 4. Bombardeo atómico de masa y microsecuenciación de la fracción 29 de la fig 3.....	32
Fig 5. Perfil de absorbencia e inmunorreactividad en el paso final de purificación del pico R.....	34
Fig 6. Bombardeo atómico de masa y microsecuenciación de la fracción 25 de la fig 5.....	35
Fig 7. Perfil de absorbencia e inmunorreactividad del pico S en la última etapa de purificación	37
Fig 8. Bombardeo atómico de masas y microsecuenciación de la fracción 44 de la fig 7.....	38
Fig 9. Distribución de los péptidos relacionados a SCPs en órganos periféricos en <i>Mercenaria mercenaria</i>	40
Fig 10. Distribución de los péptidos relacionados a SCPs en el sistema nervioso y recto de <i>Mercenaria mercenaria</i>	41
Fig 11. Inmunocitoquímica del ganglio visceral.....	45
Fig 12. Inmunocitoquímica del ganglio cerebral.....	47
Fig 13. Inmunocitoquímica del ganglio pedio.....	48

Fig 14. Efecto de los péptidos relacionados a SCPs en el recto de <i>Mercenaria mercenaria</i>	54
Fig 15. Efecto de los péptidos relacionados a SCPs en presencia de benzoquinonio.....	55
Fig 16. Efecto del péptido YFAFPRQamida en el incremento de tono producido por 5-HT en el recto de <i>Mercenaria mercenaria</i>	57

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Distribución de los péptidos relacionados a SCPs en diferentes tejidos de <i>Mercenaria mercenaria</i>	43
Tabla II. Distribución de los SCPs en moluscos bivalvos.....	51
Tabla III. Distribución de los SCPs en moluscos.....	66

INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

INTRODUCCION.....	1
Antecedentes.....	1
Actividad de los SCPs en el corazón de los gasterópodos.....	5
Modulación de la actividad intestinal por SCPs en <i>Aplysia</i>	6
Regulación de los músculos bucales por SCPs en <i>Aplysia</i>	9
Acciones de los SCPs en otros gasterópodos.....	12
OBJETIVO.....	15
MATERIALES Y METODOS.....	17
Animales.....	17
Preparación de extractos	17
Purificación de SCPs.....	18
Caracterización de los péptidos relacionados con SCPs.....	19
Detección de los péptidos relacionados con SCPs por radioinmunoensayo (RIA).....	21

Curva estándar RIA.....	22
Inmunocitoquímica.....	23
Bioensayo.....	26
RESULTADOS.....	28
Purificación y caracterización de péptidos relacionados con SCPs en <i>Mercenaria mercenaria</i>	28
Distribución.....	36
Otras especies analizadas.....	49
Bioensayo.....	52
DISCUSION.....	58
CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

INTRODUCCION

La comunicación de tipo químico en el sistema nervioso, es mediada por una multiplicidad de moléculas de diferentes tipos como aminoácidos, aminas biogénicas, y péptidos. La acción de un mensajero químico específico en la célula postsináptica no depende de la naturaleza química del transmisor, sino de las propiedades del receptor al cual el neurotransmisor se une. Así los receptores para los neurotransmisores químicos se dividen en dos clases, basadas en si éstos abren a los canales iónicos en forma directa o indirecta. En los receptores de apertura directa la unión del neurotransmisor produce cambios conformacionales que abren el canal iónico. Mientras que los receptores de apertura indirecta están acoplados a una proteína G y por lo tanto a segundos mensajeros que actúan en el canal iónico en forma directa o activan a una proteína cinasa que puede fosforilar al canal o, a una proteína que actúa sobre el canal (Schwartz H. J. 1991).

Por otro lado el estudio de los péptidos relacionados con la actividad neuronal ha mostrado que la acción de los neuropéptidos difiere de los neurotransmisores clásicos. La principal diferencia es que la acción de los péptidos es más duradera. La significancia de esta clase de compuestos, que alteran las funciones del cerebro pero no se comportan como neurotransmisores

clásicos fue reconocida por Barchas et al. en 1978, quien propuso el nombre de **neuroreguladores** para estas moléculas neuroactivas.

Líneas independientes de investigación han mostrado un papel importante de los péptidos en el funcionamiento del sistema nervioso. El descubrimiento de células neurosecretoras peptidérgicas en vertebrados por Ernst Scharrer en 1928 llevó a proponer el concepto de "neurona peptidérgica". Inicialmente este término fue empleado para referirse a aquellas células neurosecretoras en el hipotálamo, que liberan oxitocina y vasopresina directamente a la circulación desde sus terminales nerviosas, situadas en el lóbulo posterior de la hipófisis.

Las neuronas peptidérgicas se encuentran distribuidas en todo el reino animal. En los invertebrados inferiores, como los anélidos, casi el 50 % del ganglio cerebral está compuesto de dicho tipo de neuronas (Scharrer 1978). En los crustáceos tres péptidos bien caracterizados se encuentran en la glándula sinusal. Uno la hormona hiperglucemiante es sintetizada primordialmente en la médula terminal del órgano X y es el péptido principal en la glándula sinusal. Otro, la hormona dispersadora de pigmento, se encuentra en otras partes del sistema nervioso central y es liberada probablemente de los órganos postcomisurales así como de la glándula sinusal. Muy poco se sabe sobre la síntesis y distribución del tercer péptido, la hormona concentradora de pigmento (Price D. A. 1983). En insectos

también se han descrito varios neuropéptidos. La hormona adipocinética que es similar en estructura a la hormona concentradora de pigmento y varios péptidos relacionados con FMRFamida (Holman G. M. 1990). A pesar de esto hasta el momento se conocen sólo unas cuantas estructuras primarias de la gran variedad de neuropéptidos que se encuentran presentes en invertebrados (Greenberg y Price 1983).

Por otra parte, una de las áreas de mayor interés en el estudio de los neuropéptidos es la biología comparada de los mismos dado que péptidos de vertebrados han sido detectados en invertebrados y viceversa, lo que sugiere una conservación evolutiva a lo largo de la filogenia modulando funciones similares mediante una secuencia de aminoácidos clave en un amplio grupo de animales (Brownstein 1981).

Para llevar a cabo el estudio de los neuropéptidos, los invertebrados y especialmente el Phylum Mollusca ofrecen ventajas para estudiar la función de estas moléculas debido a la relativa accesibilidad y a la simplicidad de su SNC de organización ganglionar, con cada ganglio más o menos especializado para una función principal como la regulación visceral o motora. Además, frecuentemente los sistemas peptidérgicos de estos organismos incluyen una población homogénea de neuronas o bien neuronas de gran tamaño fácilmente identificables. Por otro lado, una de las mayores desventajas de este modelo de estudio es que son muy

pocos los neuropéptidos que han sido completamente caracterizados en estos especímenes. Por ello, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en el estudio de los neuropéptidos presentes en este Phylum (Lloyd 1982; Greenberg y Price 1983). Algunos de los péptidos más interesantes que han surgido a raíz de estos estudios son los Péptidos Cardioactivos Pequeños SCPs (del inglés Small Cardioactive Peptide), que se denominaron originalmente en esta forma debido a su bajo peso molecular (< 2,000 daltones) así como a su actividad cardioexcitadora (Lloyd 1978, 1982).

Los SCPs son una familia de neuropéptidos que se encuentran en muchos gasterópodos. Hasta el momento los péptidos mejor estudiados son SCPa y SCPb. El primero en ser aislado y secuenciado a partir del sistema nervioso central de *Aplysia brasiliana* fue SCPb. Su secuencia fue obtenida por bombardeo atómico de masas (FAB) (Morris et al, 1982). El segundo en ser aislado y secuenciado fue SCPa y se obtuvo a partir del sistema digestivo de *Aplysia californica* . Este último fue secuenciado por una combinación de degradación de Edman y análisis de los derivados PTH-aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Lloyd et al, 1984, 1897). En estos péptidos los siete aminoácidos de la región carboxilo terminal se encuentran conservados (-YLAFPRMamida). Por otro lado la secuencia de aminoácidos del precursor de SCPa y SCPb fue

determinada por el análisis de las clonas de ADNc obtenidas a partir del ARNm de las neuronas bucales B1 y B2 de *Aplysia*. El precursor tiene 136 aminoácidos y contiene la secuencia de ambos SCPs. La región amino terminal del precursor tiene 20 aminoácidos hidrofóbicos seguidos inmediatamente de una sola copia de SCPb seguida de una de SCPa. La región carboxilo terminal de cada péptido termina con la secuencia Met-Gli-Arg. Estos residuos son procesados para dar la metionina amidada observada en la región carboxilo terminal de los péptidos maduros. (Mahon et al 1985).

Los dos SCPs tienen actividad biológica idéntica en *Aplysia*: incrementan la amplitud y la frecuencia del latido del corazón aislado (Lloyd et al., 1985), regulan la motilidad intestinal (Lloyd et al., 1988), y realzan la amplitud en la contracción del músculo accesorio que cierra la rádula involucrado en los movimientos de mordida (Lloyd et al ., 1984). Por otra parte SCPa y SCPb son equipotentes en varias preparaciones fisiológicas en *Aplysia* lo que sugiere que la región conservada entre los dos péptidos es también el sitio de la actividad biológica (Abrams et al., 1984; Lloyd et al.,1985).

ACTIVIDAD DE SCPs EN EL CORAZON DE GASTEROPODOS

Los SCPs fueron caracterizados inicialmente debido a su actividad excitadora en el corazón de *Helix aspersa* (Lloyd 1980). A diferencia de lo que ocurre en el intestino, SCPa y SCPb

tienen acciones en el corazón muy similares a las producidas por la serotonina. Tanto SCPa como SCPb incrementan la frecuencia y la amplitud de las contracciones en el corazón aislado de *Aplysia*. Sin embargo, estos péptidos son aproximadamente 20 veces más potentes que 5-HT. Mientras que para SCPb el umbral es de $6.1 \pm 1.5 \times 10^{-12}$ M, el umbral para la serotonina es de $1.1 \pm 0.6 \times 10^{-10}$ M. Por otra parte los SCPs desensibilizan al tejido mucho más rápido que la serotonina. La marcada diferencia en la cinética de desensibilización entre SCPs y serotonina en la preparación de órgano aislado sugiere que los SCPs y la serotonina, a pesar de tener el mismo efecto, se unen a receptores diferentes. Al igual que para la serotonina, la actividad cardioexcitadora de los SCPs en el corazón de *Aplysia* esta mediada por un aumento en los niveles de AMPc (Lloyd et al., 1985a; Cawthorpe et al., 1985).

MODULACION DE LA ACTIVIDAD INTESTINAL POR SCPs EN APLYSIA.

La presencia de los SCPs en los elementos neurales en la porción anterior del intestino, así como en el ganglio bucal relacionado con el control de la motilidad intestinal ha sido ampliamente demostrada (Lloyd et al 1988). La localización y distribución de los SCPs en el sistema nervioso de *Aplysia* determinada por inmunocitoquímica con un anticuerpo policlonal contra SCPb, muestra que los SCPs están concentrados en el

ganglio bucal, el cual controla los musculos bucales durante la alimentación (Lloyd et al 1985). En este ganglio existen tres grupos principales de neuronas inmunorreactivas a SCPb; un grupo comprende neuronas relativamente pequeñas agrupadas en la superficie caudal del ganglio cerca de la salida del nervio esofágico. El segundo grupo consiste de neuronas más grandes que las anteriores y espaciadas en la superficie rostral. El tercer grupo comprende las neuronas más grandes de este ganglio y se localizan tanto en la superficie caudal como rostral del ganglio. Dentro de este grupo se encuentran las neuronas denominadas B1 y B2. Estas y otras neuronas inervan el intestino a través del nervio esofágico (Lloyd et al., 1985b). Estudios inmunocitoquímicos en el intestino de *Aplysia* han demostrado que los SCPs están presentes en numerosas fibras y varicosidades que se ramifican profusamente dentro del plexo, y en la superficie del músculo intestinal (Lloyd et al 1988). La estimulación eléctrica intracelular de las neuronas B1 y B2 tienen efectos diversos en el intestino. La estimulación de B1 causa contracciones de gran amplitud en las regiones anterior y posterior del buche. Las contracciones inducidas por la neurona B1 son posteriores al movimiento peristáltico lo cual podría servir para arrastrar el contenido de la parte posterior del buche a la parte anterior de la molleja. Una actividad similar fue producida por la perfusión de la misma región del intestino

con bajas concentraciones de SCPs (10^{-9} - 10^{-10} M) (Lloyd et al 1988). Todo esto sugiere que B1 podría regular la motilidad intestinal a través de la liberación de SCPs.

Aunque la estimulación de B2 no produce cambios significativos en la motilidad intestinal, su estimulación produce contracciones en la región posterior del esófago, que se propagan hacia el buche (Lloyd et al 1988). Estos movimientos podrían arrastrar el alimento en dirección posterior durante la deglución.

Al igual que en el corazón, los SCPs produjeron incrementos substanciales en los niveles de AMPC en los segmentos de intestino aislado incubados con los SCPs. Además, la forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, mimetizó las acciones de SCPs en la mayoría de las regiones del intestino (Lloyd et al 1988). Así, todo indica que las acciones de SCPs en el intestino son también mediadas por un incremento en el AMPC. Cabe señalar que el intestino es el único tejido periférico donde se ha encontrado que las acciones de serotonina y SCPs son diferentes, ya que mientras los SCPs estimulan la motilidad intestinal, la serotonina la inhibe (Lloyd et al 1989).

Existe evidencia de que los SCPs son liberados durante la alimentación. Por un lado se ha demostrado la liberación de SCPs dependiente de Ca^{++} , durante la estimulación intracelular de las neuronas B1 y B2 en cultivos primarios (Lloyd et al., 1986). Por

el otro, el registro extracelular en el nervio esofágico de la actividad de las neuronas B1 y B2 en animales íntegros y ambulatorios, ha demostrado que las neuronas B1 y B2 disparan potenciales de acción durante la deglución. No se produjeron potenciales de acción por la sola presencia de alimento, la mordida de éste o por su rechazo (Lloyd et al .,1988a). Estas evidencias sugieren que los SCPs tienen un papel central en la regulación intestinal durante la alimentación.

REGULACION DE LOS MUSCULOS BUCALES POR SCPs EN *Aplysia*

La conducta de alimentación (mordida y deglución) es llevada a cabo por la masa bucal, un sistema muscular que mueve un órgano especializado, la rádula, que es capaz de arrancar e ingerir el alimento. Uno de los musculos bucales más estudiado es el músculo accesorio de cierre de la rádula ARC (del inglés Accesory Radula Closer). La contracción del músculo junta las mitades de la rádula durante la alimentación . Este músculo es inervado por tres o cuatro neuronas motoras localizadas en el ganglio bucal. Dos de estas neuronas la B15 y la B16, son fácilmente identificables y han sido ampliamente caracterizadas (Cohen et al 1978). La modulación de las contracciones del músculo ARC iniciadas por las neuronas motoras del ganglio bucal, parece ser uno de los componentes de la conducta de alimentación. Parte de la regulación motora de estos musculos es dada por las

neuronas serotoninérgicas denominadas Células Meta Cerebrales (CMC), localizadas en el ganglio cerebral. La estimulación eléctrica de estas células o la aplicación de serotonina al músculo bucal producen un incremento en la amplitud de las contracciones inducidas por la motoneurona B16 (Weiss et al., 1978) Así las CMC tienen el papel de regular las contracciones que han sido iniciadas por las neuronas motoras del ganglio bucal.

Algunas de estas acciones regulatorias en el músculo bucal son llevadas a cabo también por los SCPs. Estudios cromatográficos e inmunocitoquímicos han mostrados que los músculos bucales de *Aplysia* contienen grandes cantidades de SCPs presentes en numerosas fibras y varicosidades (Lloyd et al 1984; Richmond et al., 1986).

La síntesis de los SCPs se realiza en la motoneurona B15, la cual inerva al músculo ARC (Cropper et al., 1987). La movilización de estos péptidos desde el ganglio bucal a los músculos bucales es llevada a cabo por un transporte axonal rápido. Esto ha sido determinado por la incubación de este ganglio en presencia de precursores proteínicos radioactivos (³⁵S-metionina) e inhibidores del transporte axonal como la colchicina (Lloyd et al., 1988).

Los efectos de SCPs en los músculos bucales son similares a los producidos por la serotonina y la estimulación de las CMC. La

amplitud de las contracciones del músculo bucal ARC inducidas por las motoneuronas B15 y B16 son incrementadas por SCPs, hasta en un 222 % con un umbral de 10^{-9} M de SCPs (Richmond et al., 1986; Lloyd et al., 1984).

La potenciación en las contracciones del músculo bucal ARC parece ser mediada por AMPc ya que la exposición del músculo a la serotonina, los SCPs o la estimulación de la motoneurona B15 produce un incremento en los niveles de este nucleótido en el músculo (Weiss et al., 1979; Lloyd et al., 1984 Whim y Lloyd ., 1989; Cropper et al., 1990).

El mecanismo mediante el cual el AMPc incrementa la magnitud de las contracciones del músculo bucal ARC no ha sido determinado. Sin embargo se ha observado la fosforilación de tres proteínas en el músculo ARC (300 Kd, 57Kd y 41 Kd) posterior a la aplicación de los SCPs (Hooper et al., 1991).

Existen pruebas de que los SCPs son liberados durante la alimentación. Por un lado la estimulación eléctrica de B15 causa la disminución de los niveles de SCPs en las terminales de las motoneuronas (Cropper et al., 1990). Por otra parte hay datos recientes que muestran la presencia de SCPs y bucalinas, en perfusados del músculo ARC, en respuesta a la estimulación eléctrica de la motoneurona B15 (Vilim et al., 1991). La liberación de los SCPs depende de la frecuencia de estimulación, la duración del tren de disparos y del período entre disparos. La

liberación de SCPs desde la motoneurona B15 ocurre específicamente cuando la neurona dispara a alta frecuencia y con un intervalo corto entre dos o más disparos (Whim y Lloyd., 1989). En el sentido conductual, esto podría ocurrir cuando el animal inicia su actividad alimenticia. Este es el momento en el que las contracciones del músculo bucal son máximas, y también es el período en el que las CMC son activas. Aparentemente las CMC liberan serotonina que junto con los SCPs incrementan los niveles de AMPc en el músculo ARC y así modulan sus contracciones. Esto sugiere que los efectos de los SCPs pueden predominar en la parte inicial de la conducta de alimentación.

ACCIONES DE LOS SCPs EN OTROS GASTEROPODOS

En *Helix aspersa* los SCPs tienen una actividad importante sobre el corazón, el intestino y el Músculo Retractor de la Faringe (MRF). Las acciones de los SCPs en el corazón e intestino de *Helix aspersa* son similares a la presentadas en *Aplysia* (Lloyd., 1978; Morris et al., 1982), mientras que el efecto de los SCPs sobre la contracción del MRF producida por la estimulación tanto eléctrica como mecánica del nervio motor, es similar al descrito para el músculo ARC en *Aplysia*. Los SCPs incrementan la tasa de relajación del MRF después de la contracción producida por la estimulación del nervio motor. Asimismo en los músculos bucales de *Aplysia*, la serotonina tiene

un efecto idéntico en el MRF (Lloyd., 1980a, 1980c). Probablemente el mecanismo de acción que media estos efectos en el MRF de *Helix* sea similar al mecanismo observado para el músculo ARC de *Aplysia*.

Por otra parte , en los caracoles pulmonados, los SCPs parecen estar involucrados también en otras funciones durante la alimentación. Por un lado, en *Helisoma*, la aplicación de SCPs a una preparación en la que el ganglio bucal se mantuvo unido a la glándula salival produce una facilitación en la transmisión sináptica y un incremento en la amplitud de los potenciales excitadores postsinápticos (Coates y Bulloch 1985). Por el otro en *Helix* los SCPs producen un incremento en la actividad peristáltica del conducto salival. Así los SCPs podrían aumentar la secreción de saliva durante la alimentación (Lloyd 1989).

En el ganglio bucal de *Tritonia diomedea*, la neurona motora denominada B11, parece ser homóloga a la neurona B2 de *Aplysia*. Ambas neuronas se localizan en la misma región del ganglio bucal y envían axones a través del nervio esofágico para inervar la parte anterior del intestino. Cuando B2 o B11 son estimuladas eléctricamente, producen contracciones de latencia corta en la parte anterior del intestino. Tanto B11 como B2 contienen SCPb y un segundo SCP con un comportamiento cromatográfico diferente a SCPa y SCPb. Además igual que B2, la naturaleza colinérgica de la neurona B11 ha sido demostrada por medición radioenzimática

(Lloyd y Willows., 1988; Lloyd et al., 1988a). *Tritonia* y *Aplysia* pertenecen a dos órdenes diferentes de la subclase de los Opisthobranchios. La conservación de estas propiedades en estos dos animales sugiere que la coexistencia de SCPs y Ach en estas neuronas puede ser importante fisiológicamente. Esta evidencia, junto con la reportada para *Aplysia*, sugiere que los SCPs modulan varios aspectos de la alimentación en otros gasterópodos.

OBJETIVOS

A pesar del amplio conocimiento sobre la función y estructura de los SCPs en *Aplysia* y otros Gasterópodos, es poco lo que se sabe sobre la distribución y función de estos péptidos en el Phylum molusca y en otros Phyla. Masinovsky et al en 1988 utilizando un anticuerpo monoclonal contra SCPb encontró neuronas inmunorreactivas en varias especies de gasterópodos opistobranquios y pulmonados, así como en los insectos *Acheta domesticus*, *Thermobia domestica* y el crustáceo *Semibalanus cariosus*. Estos datos sugieren la existencia de una secuencia de aminoácidos conservada en una diversidad de invertebrados. El descubrimiento de células inmunoreactivas en otros moluscos gasterópodos, insectos y crustáceos aumentó las investigaciones para caracterizar a la familia de péptidos relacionados con SCPs y su papel en la regulación de la conducta animal en diversos Phyla entre ellos el Phylum molusca.

Por lo antes mencionado, el objetivo del presente trabajo es determinar si la estructura y función de los SCPs en bivalvos es igual a la descrita en los moluscos gasterópodos. Hasta el momento sólo han sido analizadas dos especies de moluscos bivalvos *Mercenaria campechiensis* (AMSFYFPRMamida) y *Mytilus edulis* (APNFLAYPRLAamida) (Price et al 1989; Muneoka comunicación personal). El tema tiene interesantes aspectos

filogenéticos dado que los bivalvos son un grupo de moluscos que divergieron de los gasterópodos desde el Cámbrico temprano, hace 540-570 millones de años (Pojeta et al., 1973).

Para cubrir los objetivos del presente trabajo se planteó

- 1.- La purificación y caracterización de péptidos relacionados con SCPs en el molusco bivalvo *Mercenaria mercenaria* .
- 2.- Determinar la distribución de dichos péptidos en los diferentes tejidos de *Mercenaria*, mediante el empleo de técnicas radioinmunológicas e inmunocitoquímicas.
- 3.- Caracterizar las posibles funciones que los péptidos relacionados con SCPs tienen en *Mercenaria mercenaria*.

MATERIALES Y METODOS.

ANIMALES.

Los espécimenes de *Mercenaria mercenaria* utilizados en este trabajo fueron colectados en las aguas intercostales cercanas a Marineland, Florida (EUA). Y fueron mantenidos en estanques con reflujos de agua de mar en el acuario del laboratorio Whitney. Los animales fueron utilizados para experimentación siempre dentro de las dos o tres semanas posteriores a la recolección. En los experimentos de inmunocitoquímica, se emplearon animales recién colectados.

PREPARACION DE EXTRACTOS DE PROTEINA

Para preparar los extractos de proteína, en algunos experimentos se emplearon animales completos (6 animales /lote) y en otros se realizó la disección de branquias, palpos labiales, manto, pie, corazón, músculo aductor y masa visceral (estómago, gónadas y riñón), o distintos ganglios (cerebral, visceral y pedio). Las preparaciones fueron homogenizadas su volumen medido y se adicionaron cuatro volúmenes de acetona al 100%. El homogenado fue mantenido en el congelador (-20 °C) toda la noche (Price et al., 1990). Al día siguiente, la acetona fue centrifugada a 10,000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes fueron recuperados y evaporados en un rotoevaporador hasta que la acetona fue totalmente descartada.

PURIFICACION DE SCPs

Los extractos proteínicos fueron diluidos con un volumen de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % en agua, y aplicados a una columna (C8) semipreparativa (Brownlee Labs.) de fase reversa de cromatografía de alta presión (HPLC), y eluida con gradiente lineal de acetonitrilo/agua (ACN/H₂O) del 16 al 40%, en presencia de 0.1% de TFA. Las fracciones colectadas (2ml) fueron ensayadas por radioinmunoensayo con un anticuerpo policlonal contra SCPb para la detección de péptidos relacionados con SCPs. Las fracciones correspondientes a un pico de actividad se juntaron, y se aplicaron a una columna de HPLC analítica de fase reversa C-18 (Brownlee Labs.), y se eluyeron con un gradiente lineal de ACN/H₂O (24-40%) en presencia de 0.1% de TFA. Las fracciones inmunorreactivas de la columna C18, fueron oxidadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 50 µl/ml, durante 15 min a temperatura ambiente y aplicadas a una columna HPLC de fase reversa RP300 (Brownlee Labs.). Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de isopropanol/agua (10-30%) en presencia de 0.1% de TFA. Las fracciones que presentaron actividad fueron aplicadas a la misma columna, pero esta vez fueron eluidas con un sistema ACN/H₂O (16-40%) en presencia de 0.1% TFA. Si después de estos pasos de purificación los péptidos no se encontraban puros, entonces las fracciones activas fueron

reducidas como a continuación se describe: el solvente fue retirado de las muestras mediante vacío y al residuo se le añadieron 30 μ l de dimetil sulfóxido (DMS), 50 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) y 10 μ l de ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA) se incubaron durante 3 hr. a 4 °C (Protocolo de Applied Biosystems modificado por Price 1989). Posteriormente la muestra se aplicó al último sistema de HPLC descrito.

CARACTERIZACION DE LOS PEPTIDOS RELACIONADOS CON SCPs

El peso molecular de los péptidos, fue determinado en la División de Inmunología del Instituto de Investigaciones Beckman por bombardeo atómico de masas, el cual se describe a continuación: El bombardeo atómico de masas (FAB del inglés fast atom bombardment) fue desarrollado por Barber et al en 1981 y es considerado una variante de la espectrometría de masas. En el FAB los átomos son acelerados y golpean a las moléculas del péptido a analizar impulsándolos fuera de la matriz líquida en que se encuentran (la matriz puede ser glicerol). Las moléculas de péptido se ionizan y son entonces accleradas por el voltaje aplicado a través de un campo magnético. El campo magnético actúa moviendo los iones y los obliga a seguir una ruta curva. Una fuerza dada del campo magnético provocará que iones de una cierta relación masa/carga (m/z) lleguen al detector. Cuando la fuerza

del campo magnético se incrementa iones, de una masa mayor a la anterior llegarán al detector. Por lo tanto al modificar la fuerza del campo magnético se puede obtener un barrido múltiple del rango de pesos moleculares en la muestra.

La secuenciación y síntesis de los péptidos purificados fue hecha en el Laboratorio de Química de Proteínas del Centro Interdisciplinario para la Investigación Biotecnológica de la Universidad de Florida. Los péptidos fueron secuenciados por el método de Edman en un secuenciador automático de Applied Biosystems Inc, modelo 470A, los PTH aminoácidos liberados en cada ciclo fueron analizados en forma automática por HPLC; (para detalles ver Price et al 1990).

La síntesis de los péptidos se hizo en un sintetizador automático de Applied Biosystems . La síntesis comenzó con la resina 4-metil-benzidril-amina y protegiendo los grupos químicos recomendados por Applied Biosystems con ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA). En el Laboratorio Whitney, los péptidos fueron desprotegidos y liberados de la resina con TFMSA de acuerdo al protocolo de Applied Biosystem. Los péptidos fueron purificados por HPLC y cuantificados por análisis de aminoácidos (analizador Hitachi modelo 835).

DETECCION DE PEPTIDOS RELACIONADOS CON SCPs POR RADIOINMUNOENSAYO (RIA).

Para este ensayo se empleó un anticuerpo policlonal contra SCPb obtenido en conejo y el cual presenta una reacción cruzada prácticamente nula para péptidos no relacionados. El anticuerpo fue gentilmente donado por el Dr. H.R. Morris del Depto. de Bioquímica del Colegio Imperial de Londres . La marca radioactiva empleada fue el péptido SCPb yodado por el método de cloramina T (Price et al., 1982), para lo cual 1 μ l de una solución 1 mM de SCPb, se diluyó en 9 μ l de amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7, a esta mezcla se añadieron 1-1.5 milicuries (mCi) de yodo radiactivo (I^{125}) y 5 μ l de cloramina T (2 mg/ml) . Esta mezcla fue incubada por 15-30 segundos a temperatura ambiente, después de este tiempo, 100 μ l de una solución de metabisulfito de sodio (5mg/ml) fueron añadidos y se incubó durante 1 min para detener la reacción. La mezcla de reacción fue transferida a una columna SepPak C18 (Waters), para separar la marca libre del péptido yodado. La columna fue lavada con 15-20 ml de agua destilada para eliminar la radioactividad libre. El péptido radioactivo fue eluído con 5 ml de ACN/H₂O 80%/20% en presencia de 0.1% de TFA. El eluído fue colectado en 5 tubos (1 ml/tubo). El péptido radioactivo fue almacenado en el congelador. Para el ensayo el péptido yodado (I^{125} SCPb) fue diluido 1:1000 en el

amortiguador de RIA (fosfato de sodio 0.01 M pH7, 1% de albúmina sérica bovina, 0.9% de cloruro de sodio, 0.01% de mertiolate, 0.025 M de EDTA). Esta dilución es estable en refrigeración al menos por una semana.

El ensayo se realizó de la manera siguiente: de las fracciones procedentes de HPLC en cada etapa de purificación, una alícuota de 2 μ l fue transferida a un tubo de vidrio y se adicionaron 48 μ l de amortiguador de RIA para tener un volumen de muestra de 50 μ l. El péptido marcado (SCPb) fue añadido en un volumen de 100 μ l (10,000 cpm) y posteriormente 100 μ l del anticuerpo diluido (1:5,000). Todos los tubos fueron incubados a 4°C durante toda la noche. Al siguiente día se añadió 1 ml de solución de carbón activado (fosfato de sodio 0.1 M pH7, carbón activado 0.25%, dextran 0.025%, mertiolate 0.01%) a cada tubo y se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente, después de este tiempo los tubos fueron centrifugados a 2,000 rpm durante 15 min para separar la marca unida de la libre. Los sobrenadantes fueron decantados y contados por 1 min en un contador LKB-Wallac MiniGama 1275. La cantidad de péptido unido fue comparada con una curva estándar de SCPb.

Curva estándar

Para construir la curva estándar empleada en el RIA se

utilizó el péptido SCPb con una concentración mínima de 0.3 fmol y máxima de 5000 fmol. La curva estándar es derivada por mínimos cuadrados de la transformación log/logit de los datos. En la fig. 1 se presenta una curva tipo.

INMUNOCITOQUIMICA

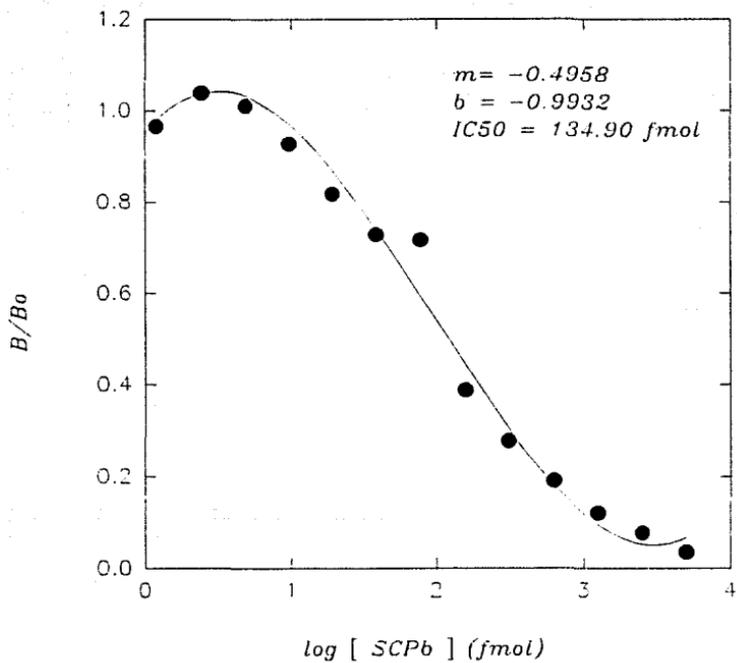
Fijación

Para el análisis inmunocitoquímico, los ganglios visceral, pedio y cerebral, así como el recto, fueron disecados de animales recién capturados. Una vez disecados, los tejidos fueron fijados en solución de Bouin (añadir 2 g de ácido pícrico, 20 g de paraformaldehído y 5ml de ácido acético glacial a 500 ml de agua desionizada, calentar a 60°C hasta disolver, enfriar y añadir 500ml de PBS 2X) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, los tejidos fueron deshidratados sumergiéndolos secuencialmente en soluciones de concentraciones crecientes de alcohol etílico (50, 70, 85 y 95 %), durante 20 min en cada una de ellas y finalmente alcohol etílico al 100% durante 2 hr.

Aclaramiento.

Inmediatamente después de la fijación, los tejidos fueron transferidos a una solución de metil salicilato y anilina (50-50%) durante 1.5 h. Después de este tiempo, se transfirieron a metil salicilato durante 1.5h o bien, toda la noche.

Fig 1.- Curva estándar del RIA . Curva estándar donde la respuesta se mide como unión al anticuerpo de concentraciones crecientes del péptido. Los datos fueron linealizados por la transformación logit/log.



Posteriormente el tejido fue colocado en parafina y metil salicilato (50-50%) por 1.5h.

Infiltración.

Después del aclaramiento, el tejido fue colocado en parafina durante 2h (con dos cambios), si en este punto el tejido no era transparente se continuaba la infiltración con parafina. En algunas ocasiones fue necesario dejar el tejido en parafina durante toda la noche. Posterior a la infiltración, el tejido fue embebido en parafina y cortado en secciones de 6 μm , las cuales fueron colocadas sobre portaobjetos cubiertos de gelatina (grenetina 1 %, sulfato de potasio 0.1%).

Tinción.

Antes de proceder a la tinción, la parafina fue retirada de las secciones con xilol y posteriormente rehidratadas en amortiguador de fosfatos durante dos horas. Una vez hidratadas, las secciones fueron incubadas por 12-18 hr a 4 °c en una cámara húmeda con un anticuerpo monoclonal contra SCPb (anticuerpo primario) (Masinovsky et al., 1988) gentilmente donado por A.O. Dennis Willows del Depto. de Zoología de la Universidad de Washington. El anticuerpo fue diluido 1:50 en una solución de amortiguador de fosfatos, tritón X-100 1% y suero normal de cabra 3%. Al finalizar la incubación, el exceso de anticuerpo primario

fue lavado con amortiguador salino de fosfatos pH 7.4 por 30 min (80 g de cloruro de sodio, 2 g de cloruro de potasio, 11.5 g de fosfato monobásico de sodio, 2.4 g de fosfato dibásico de potasio) y las secciones fueron teñidas durante 2 hr, a temperatura ambiente con un anticuerpo (IgG - IgM) de chivo contra ratón (anticuerpo secundario) conjugado con isotiocianato de fluoresceína, diluido 1:50 en la solución antes mencionada (Humason 1967; Beltz y Burd 1989). Para realizar las tinciones control, el anticuerpo primario fue preadsorbido con un exceso (10^{-3} M) de los péptidos AMSFYFPRMa (péptido endógeno de *Mercenaria mercenaria*), SCPb y FMRFa durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente la mezcla fue centrifugada a 100,000 g durante 30 min. El sobrenadante fue colectado y empleado como anticuerpo primario.

BIOENSAYO

Los péptidos relacionados con SCPs aislados de *M. mercenaria*, fueron sintetizados como se ha descrito anteriormente y sus acciones fueron estudiadas usando el segmento transcárdíaco del recto (Greenberg y Jegla 1963). Este segmento se obtiene fácilmente al remover el ventrículo, que está unido al recto sólo en los puntos en donde éste entra y sale. Una vez expuesto, el recto fue ligado justo antes del bulbo

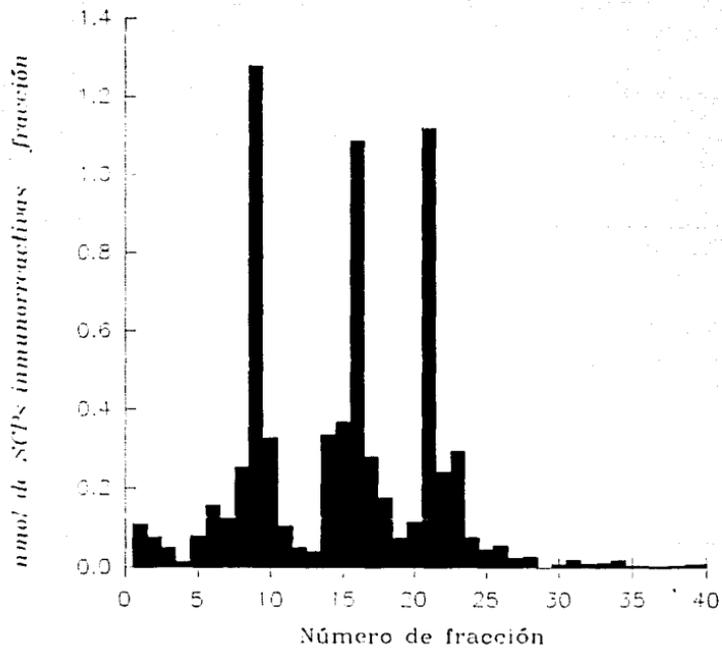
arterioso y posterior a la glándula digestiva, y cortado en la región distal de las ligaduras. El segmento aislado, fue entonces sumergido en un baño de órgano aislado con capacidad de 5 ml unido en la parte inferior a un gancho de acero inoxidable y en la parte superior a un transductor de fuerza (Grass FT.03 C). El tejido fue perfundido con agua de mar natural y aireada. Los cambios de tensión se registraron en un polígrafo (Grass modelo 7). Las drogas fueron añadidas directamente al baño y la concentración utilizada en los ensayos fue expresada como concentración molar en el baño.

RESULTADOS

Purificación y caracterización de péptidos relacionados con SCPs en *M. mercenaria*

Para la purificación de los péptidos relacionados con SCPs en *M. mercenaria*, se partió de un extracto de acetona de 6 animales completos. Este extracto fue resuelto por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa, como se describe en material y métodos. En el perfil de elución a 280 nm obtenido en este extracto, no fue posible distinguir algún pico de elución debido a la gran cantidad de proteína aplicada al sistema. Para poder localizar a los péptidos relacionados con SCPs en las fracciones colectadas, una alícuota de estas fracciones fue analizada por radioinmunoensayo empleando un anticuerpo policlonal contra SCPb. En esta fase inicial se detectaron tres picos inmunorreactivos principales (fig 2). El primero de ellos (Q) eluyó en la fracción número 9, el segundo (R) en la fracción 16 y el tercero (S) en la fracción 22. Después de esta fase las fracciones correspondientes a cada pico fueron procesadas por separado en los pasos subsecuentes. En forma general se siguió el esquema de purificación descrito en material y métodos.

Fig 2.- Perfil inmunorreactivo de *Mercenaria mercenaria*.
Extractos de acetona de seis especímenes fueron resueltos por HPLC en una columna C8 de fase reversa. Los péptidos fueron eluidos con un gradiente lineal de acetonitrilo/agua (16-40%) en presencia de TFA, con un flujo de 4 ml/min. Fracciones de 2ml fueron colectadas y ensayadas por RIA con un anticuerpo policlonal contra SCPb.



En la figura 3 se observa el perfil de elución a 210 y 280 nm y el perfil de inmunorreactividad correspondiente al pico Q. Para la purificación de este péptido fue necesario llevar a cabo el proceso de purificación completo descrito en material y métodos. En esta figura se observan tres picos: el primer pico con un tiempo de retención de 13.55 min (correspondiente a la fracción 29) al ser analizado por bombardeo atómico de masas, muestra un compuesto con un peso molecular de 927.45 daltones. Su secuencia determinada por microsecuenciación es YFAFPRQamida (Fig. 4). Los picos restantes con tiempo de retención de 16.41 y 18.82 min. contienen especies con un peso molecular de 946.47 y 962.52 daltones que corresponden a la secuencia -SFYFPRMamida en su forma reducida y oxidada. Como se verá más adelante esta secuencia corresponde a productos de degradación de los péptidos de mayor tamaño.

Para la purificación del pico R se hizo una modificación en la tercera etapa. En esta etapa el péptido oxidado fue aplicado a una columna C18 en vez de una RP300. Mientras que la columna RP300 fue empleada como cuarto y último paso de purificación. La fig 5 muestra el perfil de elución (210 y 280 nm) y el perfil de inmunorreactividad del pico R. En el perfil de elución se observa un solo pico con un tiempo de retención de 12.03 min en el cual la absorbencia a las dos longitudes de onda coinciden.

Fig 3.- Perfil de absorbencia e inmunorreactividad del pico Q en el último paso de purificación. A) Absorbencia en UV a 210 nm (---) y 280 nm (···) de la etapa final de purificación por HPLC del péptido Q reducido y aplicado a una columna RP300. El péptido fue eluido con un gradiente lineal de acetonitrilo/agua (16-40 %) en presencia de TFA, con un flujo de 1.5 ml/min (la línea continua indica el gradiente de ACN). Se colectaron fracciones de 0.75 ml/0.5 min. Los tiempos de retención se indican sobre cada pico. B) Las fracciones colectadas fueron analizadas por RIA con un anticuerpo policlonal contra SCPb.

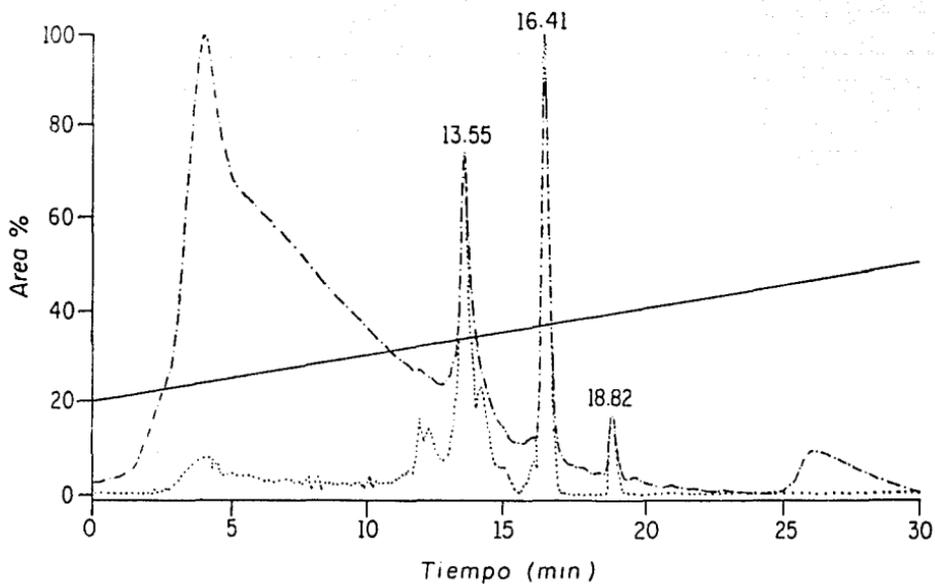
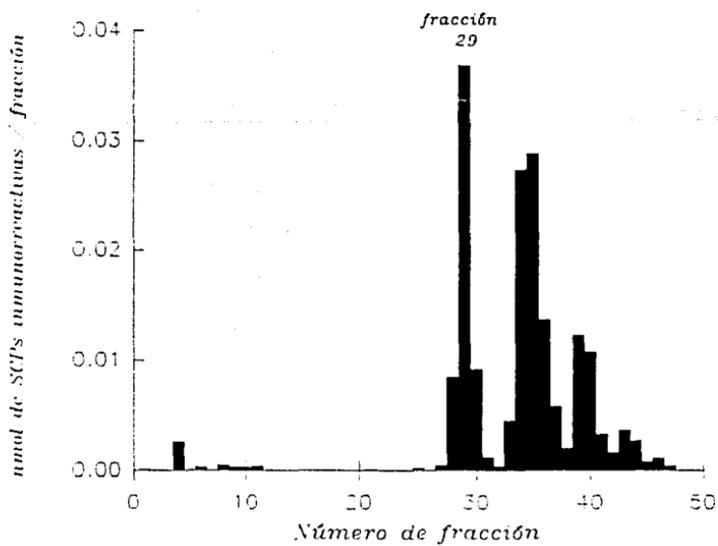
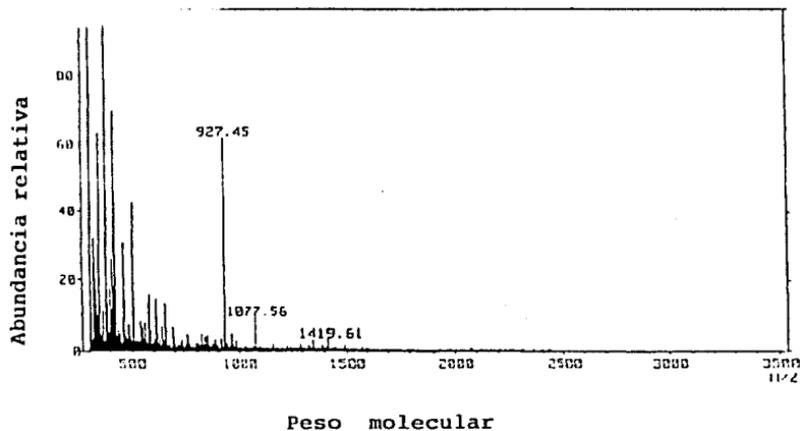
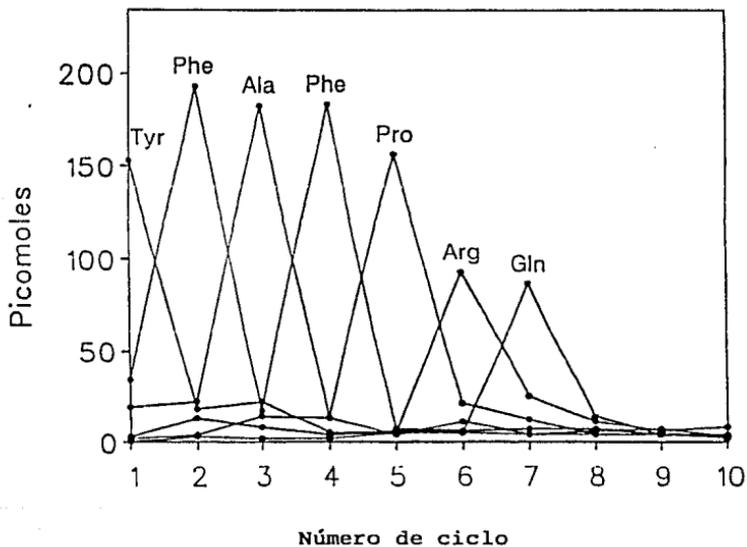
A**B**

Fig 4.-Bombardeo atómico de masa y microsecuenciación de la fracción 29 de la fig 3. A) Se muestra un ion positivo, prominente a 927.45. B) Presenta las concentraciones de cada aminoácido en cada uno de los ciclos de secuenciación.

A**B**

Además la simetría de este pico indica un buen grado de pureza. Con respecto al perfil de inmunorreactividad presenta también un solo componente concentrado prácticamente en la fracción número 25. El análisis de esta fracción por bombardeo atómico de masas, mostró un péptido con un peso molecular de 1180 daltones y cuya secuencia es AMSFYFPRMamida (fig. 6). Debe hacerse notar que en la gráfica correspondiente a la secuencia del péptido el residuo de Met del extremo carboxilo terminal no aparece, esto se debe a que este tipo de residuos son difíciles de recuperar durante los procesos de secuenciación.

Para el pico S al igual que para el pico Q, sus fracciones activas fueron oxidadas primero y reducidas después para completar su purificación. Su perfil de elución e inmunorreactividad se muestra en la figura 7. En el perfil de elución se observan tres picos simétricos, con una buena correspondencia de absorbencia a las dos longitudes de onda registradas, mientras el perfil de inmunorreactividad muestra que estos tres picos son inmunorreactivos. Los tiempos de retención para los picos antes mencionados son: para el primero 14.64 min (fracción 31) para el segundo, 18.67 min (fracción 39) y para el tercero 21.17 min (fracción 44). El peso molecular determinado para el primer pico fue de 1180.43 daltones, que corresponde a la forma oxidada del péptido AMSFYFPRMa ya antes

Fig 5.- Perfil de absorbencia e inmunorreactividad en el paso final de purificación del pico R.A) Absorbencia en UV a 210 nm (-.-) y 280 nm (···), después de 5 etapas de purificación el péptido R oxidado y aplicado a una columna RP300. El péptido fue eluído con gradiente de isopropanol (10-30 %) en presencia de TFA, con un flujo de 1.5 ml/min (la línea continua señala el gradiente de ACN). Los tiempos de retención se indican sobre cada pico. B) Fracciones de 0.75 ml/0.5 min fueron colectadas y analizadas por RIA con un anticuerpo policlonal contra SCPb.

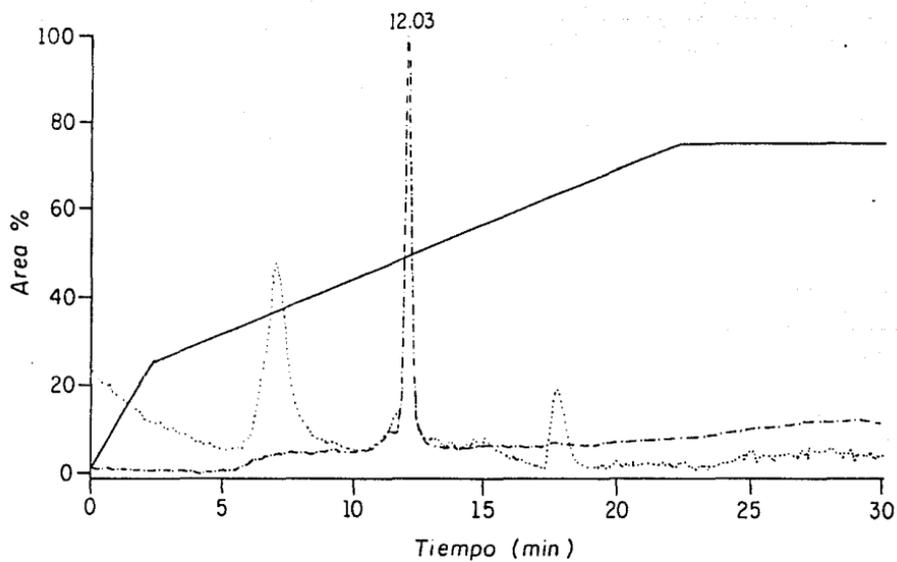
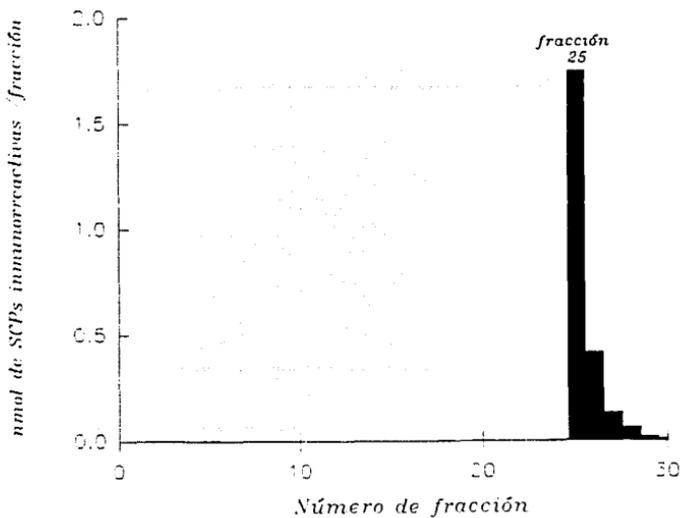
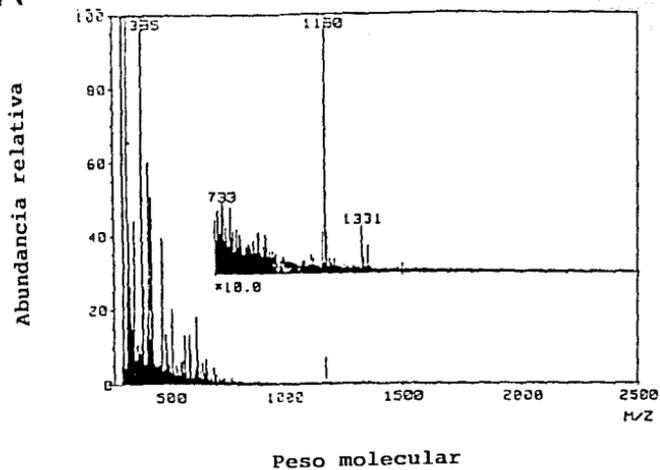
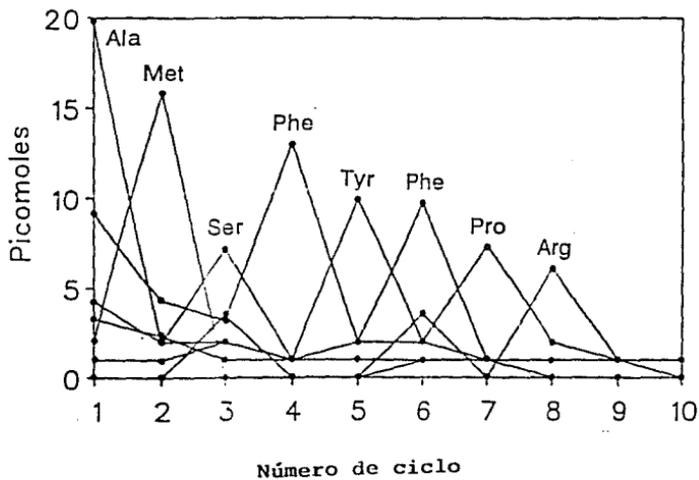
A**B**

Fig 6.- Bombardeo atómico de masas y microsecuenciación de la fracción 25 de la fig 5. A) El bombardeo atómico de masas muestra una señal positiva a 1180 que corresponde a la forma molecular oxidada de AMSFYFPRMa. B) Se muestra la concentración de cada aminoácido en los ciclos de secuenciación.

A



B

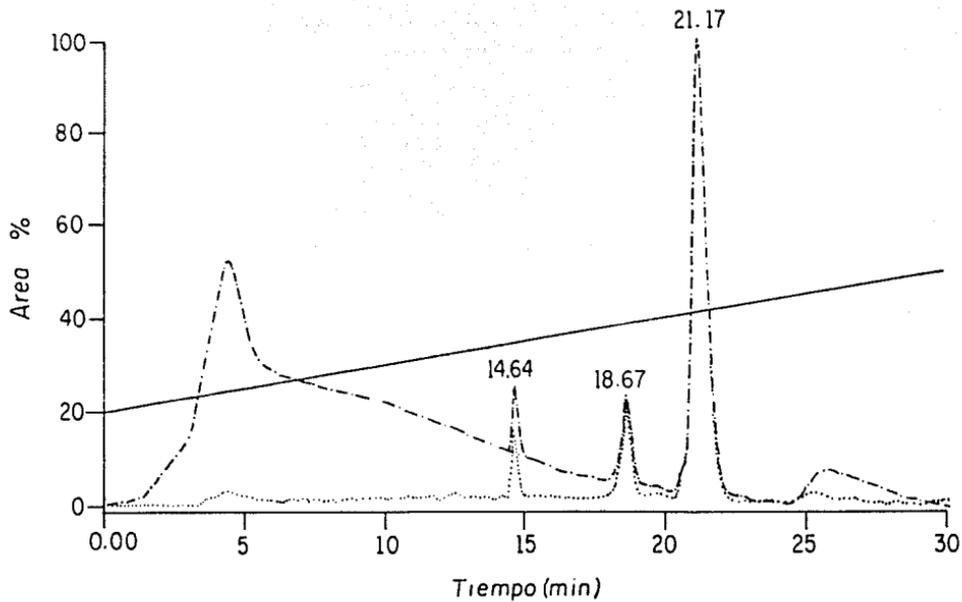


secuenciado (fig 6A). El segundo pico tiene un peso de 1277.78 daltones (datos no mostrados), y el pico número tres un peso molecular de 1261.77 daltones (fig.8). Dado que el análisis computacional indicó que estos dos últimos (pico 1 y 2) podrían ser el mismo péptido en sus formas oxidada y reducida, entonces, se procedió a enviar para su secuenciación el tercer pico pues es el que tiene una concentración mayor de proteína. La secuencia de este péptido es IAMSFYFPRMa y por su peso molecular sabemos que se encuentra en su forma reducida, mientras el pico número dos debe corresponder al mismo péptido pero en su forma semireducida (un solo O₂). Esto concuerda con el hecho de que la muestra fue reducida en la última etapa de purificación.

DISTRIBUCION.

El conocimiento de la distribución de los péptidos relacionados con SCPs en *M. mercenaria*, puede dar evidencias acerca de su sitio de acción y papel fisiológico. Por lo antes mencionado la distribución de los péptidos relacionados con SCPs en *M. mercenaria* fue determinada por radioinmunoensayo e inmunocitoquímica. Varios tejidos como: músculo abductor, manto, pie, palpos labiales, branquias y masa visceral (principalmente estómago, gónadas y riñón) de 6 animales, fueron disecados y los péptidos extraídos con acetona. Los extractos obtenidos de cada tejido fueron resueltos por HPLC y las fracciones obtenidas analizadas por RIA.

fig 7.- Perfil de absorbencia e inmunorreactividad del pico 8 en la última etapa de purificación. A) Absorbencia en UV a 210 nm (---) y 280 nm (···), después de cuatro etapas de purificación del pico 8 aplicado a una columna RP300 y eluído con un gradiente lineal de acetonitrilo/agua (16-40%) en presencia de TFA, con un flujo de 1.5 ml/min (la línea continua indica el gradiente de ACN). Los tiempos de retención se indican sobre cada pico. B) Fracciones de 0.75 ml/0.5 min fueron colectadas y analizadas por RIA con un anticuerpo policlonal contra SCPb.



B

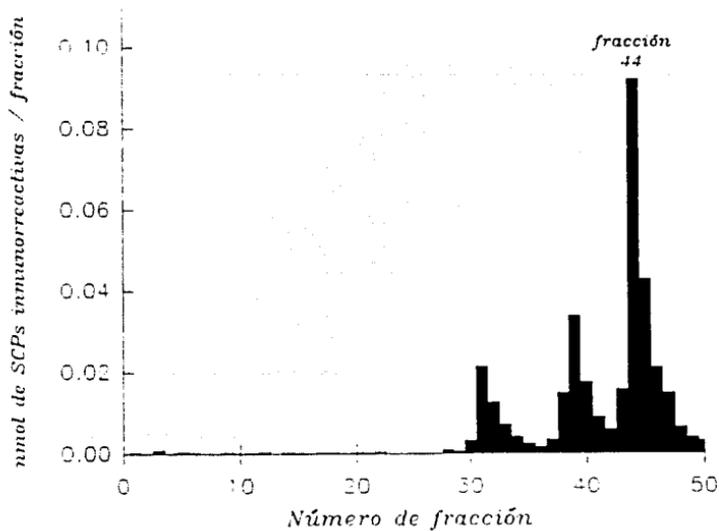


fig 8.- Bombardeo atómico de masas y microsecuenciación de la fracción 44 de la fig 7. A) El bombardeo atómico de masas muestra un prominente ion positivo a 1261.77 que corresponde a la forma reducida de IAMSFYFPRMa. B) Se muestra la concentración de cada aminoácido en cada ciclo de secuenciación

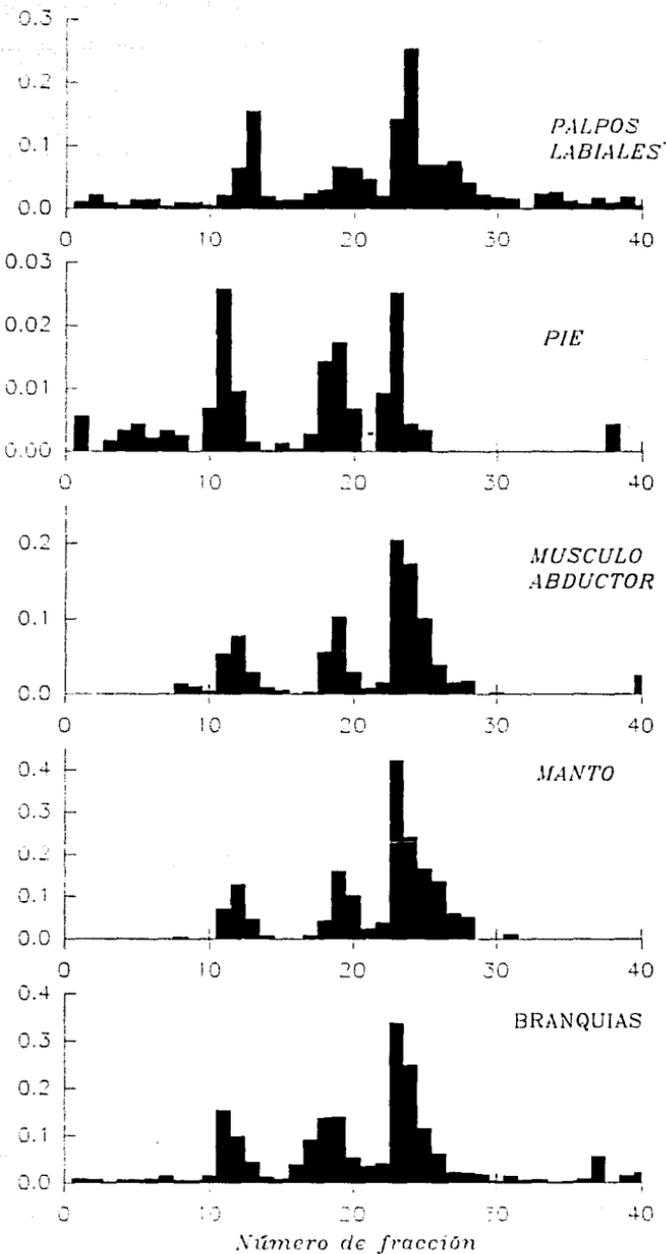
El mismo perfil de inmunorreactividad fue encontrado para cada tejido después del primer paso de purificación (fig. 9). Este perfil es el mismo que el encontrado en los animales completos (picos Q, R y S) y las fracciones en las que estos picos eluyen son aproximadamente iguales . Debido al bajo contenido de proteína, para el análisis del recto, corazón y los ganglios visceral, cerebral y pedio , fue necesario partir de 20 animales. Además los extractos obtenidos fueron resueltos en una columna de dimensiones inferiores que la empleada para los tejidos anteriores.

Al igual que en los otros tejidos, el perfil de inmunorreactividad de estos, es igual al obtenido en los extractos de los animales completos. En este caso, las fracciones en las que los picos Q, R y S eluyen varían considerablemente con respecto a los encontrados anteriormente debido a las dimensiones de la columna (fig 10).

Para identificar cada uno de estos picos se tomaron las fracciones correspondientes a cada pico y se purificaron siguiendo el mismo esquema de purificación que para los extractos de los animales completos. El análisis por bombardeo atómico de masas de los picos purificados indicó para el pico Q un peso molecular de 927 daltones correspondiente a YFAPPRQamida y para el pico R y S un peso de 1180 daltones que corresponde a AMSFYFPRMamida así como otros pesos que corresponden a productos de degradación de este péptido.

Fig 9.- Distribución de los péptidos relacionados con SCPs en órganos periféricos en *Mercenaria mercenaria*. El músculo abductor, manto, pie, branquias y palpos labiales de seis animales fueron disecados y colocados en acetona durante toda la noche. Al día siguiente la acetona fue descartada y los extractos aplicados a una columna C8 de HPLC y eluidos con un gradiente lineal de acetonitrilo/agua (16-40%) en presencia de TFA, con un flujo de 4 ml/min. Fracciones de 2ml/0.5 min fueron colectadas y analizadas por RIA con un anticuerpo policlonal contra SCPb.

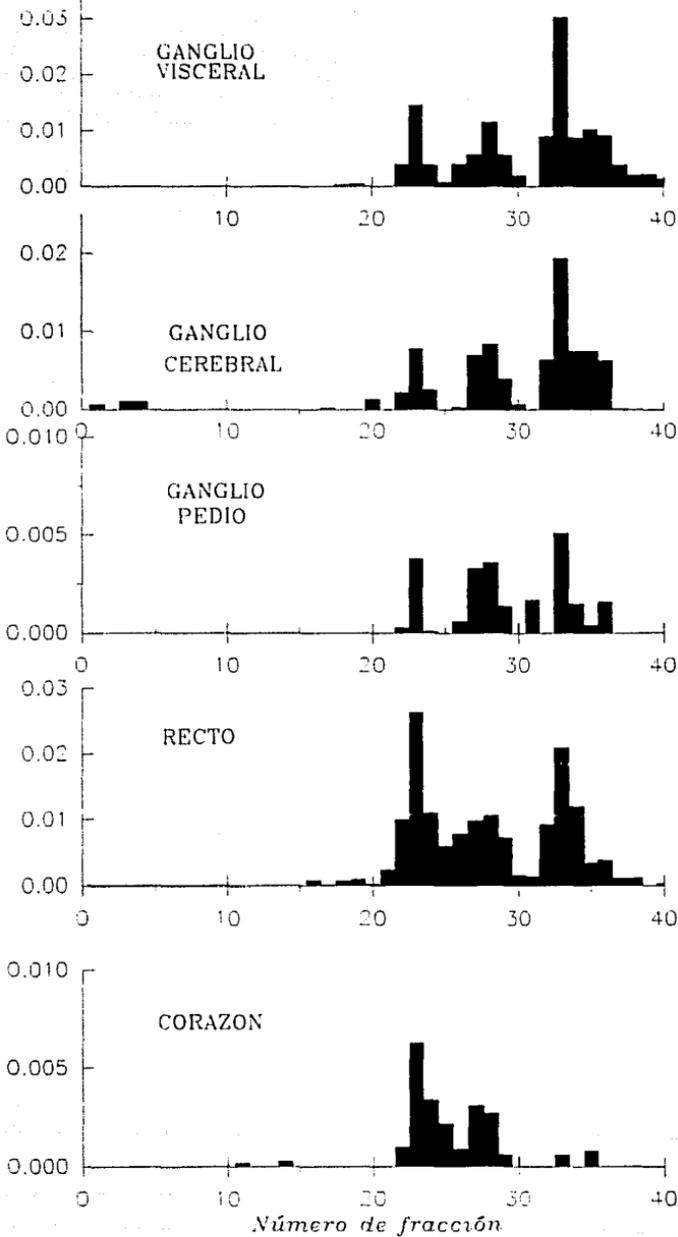
nmol de SCPs inmunorreactivas / fracción



Número de fracción

Fig 10.- Distribución de los péptidos relacionados con SCPs en el sistema nervioso y recto de *Mercenaria mercenaria*. El recto y los ganglios visceral, cerebral y pedio de 20 animales fueron colocados en acetona durante toda la noche. Al día siguiente la acetona fue descartada y los extractos aplicados a una columna RP-300 y eluidos con un gradiente lineal de acetonitrilo/agua (16-40%) en presencia de TFA, con flujo de 1.5 ml/min. Fracciones de 0.75 ml fueron colectadas y analizadas por RIA con un anticuerpo policlonal contra SCPb.

nmol de SCPs inmunorreactivas / fracción



Sin embargo estándares de estos nuevos péptidos, resueltos bajo las mismas condiciones que los tejidos, presentan tiempos de retención que corresponden a los picos Q, R y S.

Por otra parte, también se analizó el contenido de péptidos relacionados con SCPs en cada tejido. La tabla I muestra que los tejidos pueden ser divididos por su contenido en alto, medio y bajo. Los órganos que presentan un mayor contenido de SCPs son: los palpos labiales los cuales tienen un papel importante durante la alimentación; y el ganglio visceral, que inerva las branquias, parte del sistema digestivo e inclusive el recto. Dentro de los órganos con un contenido medio se encuentran el ganglio cerebral (que también inerva la parte anterior del sistema digestivo y los palpos labiales) , ganglio pedio, branquias (que participan en la alimentación), recto, manto y pie. Mientras los tejidos con un contenido bajo son el músculo abductor, la masa visceral y el corazón.

Además de ser analizados por RIA, el sistema nervioso y el recto de *M. mercenaria* también fueron analizados por inmunocitoquímica.

Ganglios centrales.

Ganglio visceral. El ganglio visceral presenta un número importante de células inmunorreactivas en la periferia de la región anterior. Estas células tienen un diámetro aproximado de 12 μm . Además se observa una red de fibras inmunorreactivas en

**TABLA I. DISTRIBUCION DE LOS PEPTIDOS RELACIONADOS
A SCPs EN DIFERENTES TEJIDOS**

TEJIDO	n mol/g PESO HUMEDO
* PALPOS LABIALES	0.138
♦ GANGLIO VISCERAL	0.134
♦ GANGLIO CEREBRAL	0.082
GANGLIO PEDIO	0.051
* BRANQUIAS	0.057
RECTO	0.056
MANTO	0.027
PIE	0.018
MUSCULO ABDUCTOR	0.008
MASA VISCERAL	0.007
VENTRICULO	0.002

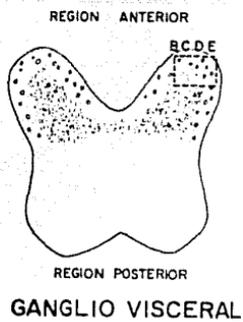
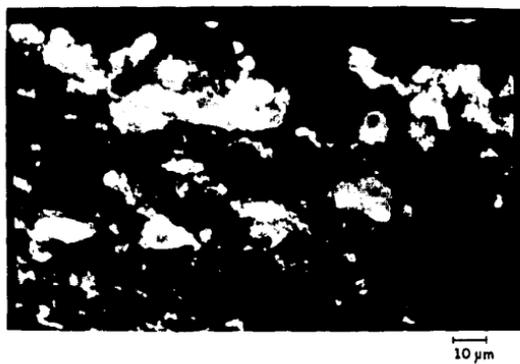
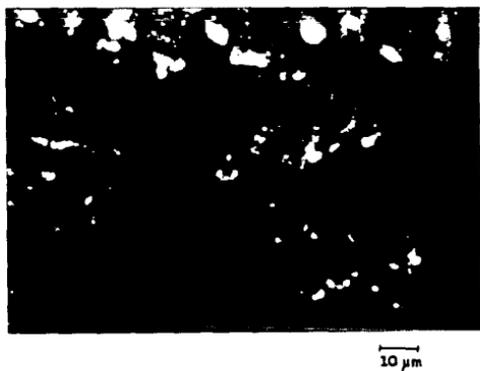
* Los palpos labiales y branquias son órganos para la alimentación en *Mercenaria mercenaria*

♦ El ganglio visceral inerva las branquias y la parte posterior del sistema digestivo, inclusive el recto. El ganglio cerebral inerva la parte anterior del sistema digestivo y palpos labiales.

la neuropila central (fig. 11 b). Los elementos de color amarillo que se observan corresponden a fluorescencia natural emitida por el tejido. Este tipo de fluorescencia es encontrada frecuentemente en animales marinos y es vista aún cuando el tejido no haya sido tratado con ningún anticuerpo (Beltz y Burd., 1989). Para establecer la especificidad de la tinción obtenida, el anticuerpo primario fue preadsorbido con un antígeno no relacionado, el péptido FMRFa. Este péptido fue aislado del molusco bivalvo *Macrocallista nimbosa* y es ubicuo en el Phylum Molusca (Price y Greenberg 1977; Price et al 1987). FMRFamida tiene acciones diversas en varios tejidos de moluscos, incluyendo corazón, músculos no cardíacos y órganos contráctiles complejos (como las branquias y el intestino) (Greenberg et al 1983). Cuando el anticuerpo primario fue preadsorbido con el péptido FMRFamida la tinción fue similar a la obtenida con el anticuerpo no tratado (fig. 11c). En la periferia se observan cuerpos celulares inmunorreactivos de gran tamaño, mientras que las fibras inmunorreactivas de la neuropila presentan una ligera disminución en la fluorescencia. Sin embargo la preabsorción del anticuerpo con los antígenos relacionados SCPb o AMSFYFPRMa bloquea completamente la tinción y sólo se observa la fluorescencia natural antes mencionadas (11 d y e).

Ganglios cerebral y pedio. A diferencia del ganglio visceral, en los ganglios cerebral y pedio, se encuentran

Fig 11.-Inmunocitoquímica del ganglio visceral. El ganglio visceral fue fijado y embebido en parafina. Rebanadas de 6 μm de grosor fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal contra SCPb. Los elementos inmunorreactivos fueron revelados con un segundo anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína. A) Esquema del ganglio visceral que muestra las zonas inmunorreactivas a SCPs, los recuadros muestran las áreas fotografiadas en cada caso. B) Células inmunorreactivas a SCPs en el ganglio. C) Control. El anticuerpo primario fue preadsorbido con un exceso del péptido FMRFa (10^{-3} M) antes de llevar a cabo la incubación. D) Control. El anticuerpo contra SCPb fue preadsorbido con el péptido AMSFYFPRMa (10^{-3} M) . E) Control. El anticuerpo fue preadsorbido con un exceso del péptido SCPb (10^{-3} M).

A**B****C****D****E**

cuerpos celulares escasos y pequeños (3 μm) distribuidos en la neuropila, así como fibras varicosas inmunorreactivas (fig. 12b y 13b). En ambos casos cuando el anticuerpo fue preabsorbido con el péptido FMRFa (10^{-3}M) la tinción fue similar a la obtenida con el anticuerpo no tratado (fig. 12c y 13c). Sin embargo cuando el anticuerpo fue preabsorbido con los péptidos SCPb y AMSFYFPRMa (10^{-3}M) la tinción fue completamente bloqueada (figs 12 d, e y 13 d). Al igual que en el ganglio visceral, también en estos ganglios se observan fluorescencia natural en la periferia.

Estructuras periféricas. Dado que los péptidos relacionados con SCPs tienen un efecto importante sobre el recto de *M. mercenaria* se decidió analizar este tejido por técnicas inmunocitoquímicas. En la musculatura de este tejido se localizaron pequeñas fibras inmunorreactivas en baja densidad algunas de ellas varicosas (datos no mostrados).

Fig 12.- Inmunocitoquímica del ganglio cerebral. Este ganglio fue procesado de modo idéntico al anterior. A) Esquema del ganglio cerebral que muestra las zonas inmunorreactivas a SCPs, los recuadros indican las zonas fotografiadas en cada caso. B) Fibras inmunorreactivas a SCPs en el ganglio cerebral C) Control. El anticuerpo contra SCPb fue preabsorbido con un exceso del péptido FMRFa (10^{-3} M) antes de la incubación. D) Control. El anticuerpo contra SCPb fue preabsorbido con el péptido AMSFYFPRMA (10^{-3} M). E) El anticuerpo contra SCPb fue preabsorbido con el péptido SCPb (10^{-3} M).

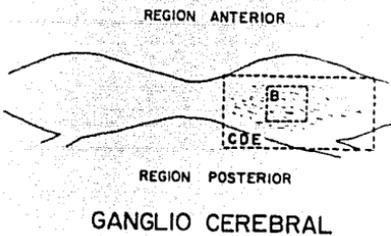
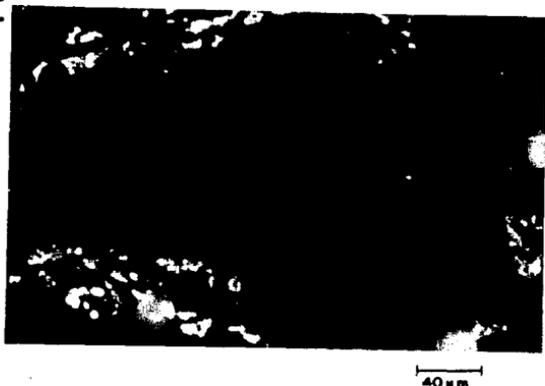
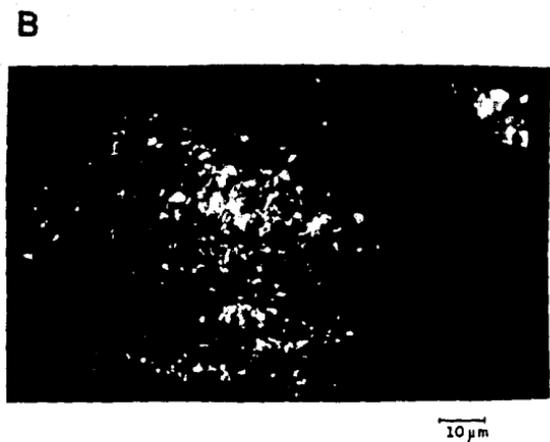
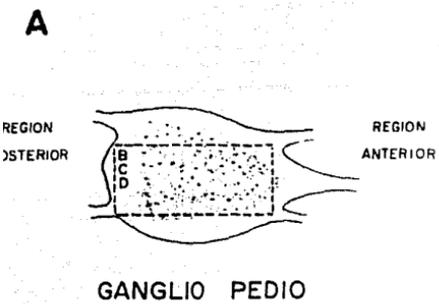
A**B****C****D****E**

Fig 13 .- Inmunocitoquímica del ganglio pedio. Este ganglio fue procesado de modo idéntico a los anteriores. A) Esquema del ganglio pedio que muestra las zonas inmunorreactivas a SCPs, los recuadros indican las zonas fotografiadas en cada caso. B) Inmunofluorescencia del ganglio incubado con el anticuerpo monoclonal contra SCPb. C) El anticuerpo primario fue preabsorbido con un exceso del péptido FMRFa ($10^{-3}M$). D) Control. El anticuerpo primario fue preabsorbido con el péptido AMSFYFPRMa ($10^{-3} M$).



OTRAS ESPECIES ANALIZADAS

Para conocer más acerca de la distribución y estructura de los péptidos relacionados con SCPs en los moluscos bivalvos se analizaron otras especies además de *M mercenaria*. Para el aislamiento de los péptidos se utilizaron animales completos y el procedimiento empleado fue básicamente el mismo que para *M mercenaria*. En las especies que así lo requirieron se realizaron variaciones en los sistemas de HPLC usados. Los péptidos obtenidos fueron caracterizados por bombardeo atómico de masas y microsecuenciación. La primera especie analizada fue *Dinocardium robustum*. Esta especie pertenece a la familia Cardidae, y al igual que *Mercenaria* a la orden Veneroidea. En *Dinocardium* el perfil de inmunoreactividad en el primer paso de purificación es igual al de *Mercenaria* (tres picos inmunoreactivos). El análisis de los péptidos por bombardeo atómico de masas reportó para el pico 1 un peso molecular de 927 daltones cuya secuencia es YFAFPRQamida y para los picos 2 y 3 un peso de 1180 daltones que corresponde al péptido AMSFYFPRMamida (tabla II). La segunda especie analizada fue *Cassostrea virginica* que pertenece a la orden Ostroidea y a la familia Ostreidae. En esta especie se encontraron cuatro péptidos relacionados con SCPs, de estos solamente dos han podido ser identificados. El primero tienen un peso molecular de 1318 daltones y su secuencia es APKYFYFPRMamida

y el segundo tiene un peso de 1017 daltones y su secuencia es SAFYFPRMamida (tabla II).

La tercera especie analizada fue *Atrina serrata*. Este molusco pertenece a la familia de Pinnidae y a la orden Pteroida. En esta especie el perfil inmunorreactivo inicial fue diferente al de *Mercenaria* y solamente un péptido pudo ser identificado con un peso molecular de 1046 daltones. Este péptido requiere ser secuenciado.

TABLA II. DISTRIBUCION DE LOS SCPs EN LOS BIVALVOS

ESPECIE	P.M.	SECUENCIA
<i>Mercenaria mercenaria</i>	1261.77	IAMSFYFPRMa
	1180	AMSFYFPRMa
	927.45	YFAFPRQa
<i>Dinocardium robustum</i>	1180	AMSFYFPRMa
	927.45	YFAFPRQa
<i>Cassostrea virginica</i>	1318	APKYFYFPRMa
	1017	SAFYFPRMa
<i>Atrina serrata</i>	1046	?

Las especies analizadas fueron procesadas de la misma manera que *Mercenaria*. El peso molecular de los péptidos aislados fue calculado por bombardeo atómico de masas y su secuencia obtenida por microsecuenciación.

BIOENSAYO

En los moluscos gasterópodos existe evidencia que sugiere que los SCPs tienen un papel fisiológico en la cardiorregulación y en la regulación de la motilidad intestinal (Lloyd ,P.E. et al., 1985; Lloyd, P.E. 1989.). Para averiguar si la función de los péptidos relacionados con SCPs se encuentra conservada en los moluscos bivalvos, los tres nuevos péptidos relacionados con SCPs fueron sintetizados y su acción probada en ensayos de órgano aislado en diferentes tejidos de *Mercenaria*. Los tejidos probados incluyeron palpos labiales, branquias, corazón y recto. La actividad de los péptidos relacionados con SCPs fue comparada con la de SCPb. La actividad de los péptidos relacionados con SCPs fue inicialmente probada en 42 corazones aislados de *M. mercenaria*. En 34 de las preparaciones no hubo efecto (10^{-7} - 10^{-4} M) o bien el efecto observado no pudo ser reproducido. En los demás corazones se presentó una ligera inhibición en la amplitud del latido cardíaco con un umbral de 10^{-7} y 10^{-6} M. Con dosis más altas, se observó un incremento pasajero en la amplitud de la contracción y el tono. Solamente en 5 o 6 preparaciones se observó una clara relación dosis-respuesta. Con respecto a los palpos labiales y branquias de *M. mercenaria*, la aplicación de los péptidos relacionados con SCPs no produjo ninguna relajación o contracción en estos tejidos.

Al realizar el ensayo en el recto se encontró que dosis de 7×10^{-10} - 1×10^{-7} M de los péptidos YFAFPRQa y AMSFYFPRMa producen una relajación. Cuando se aplicaron dosis mayores de estos péptidos en el intervalo de 1×10^{-6} a 1×10^{-5} M, se obtuvo un efecto bifásico, relajación seguida por una contracción. La aplicación de SCPb tiene el mismo efecto sobre el recto. Sin embargo es menos potente que los péptidos endógenos de *Mercenaria*, con un umbral de 1×10^{-7} M (fig. 14).

En estudios previos se ha mostrado que a dosis bajas (3×10^{-9} - 3×10^{-8} M) la acetilcolina también relaja el recto de moluscos bivalvos, mientras que a dosis altas (3×10^{-6} - 10^{-5} M) produce una contractura (Greenberg y Jegla, 1963). Por lo antes expuesto, y para saber si la respuesta del recto a los péptidos relacionados con SCPs era mediada por vía colinérgica se administró benzoquinonio (BQ) un potente antagonista colinérgico (Ludueno y Brown., 1952; Greenberg y Jegla., 1963). El benzoquinonio se aplicó a una concentración de 10^{-5} M, la figura 15 muestra la respuesta del recto a los tres péptidos en presencia de BQ. Como se puede ver el efecto de los péptidos sobre el recto es el mismo aún en la presencia de BQ.

Como se ha mencionado anteriormente las acciones de SCPs y serotonina son diferentes en el intestino de *Aplysia*, ya que mientras los SCPs incrementan la motilidad intestinal la

Fig 14.- Efecto de los péptidos relacionados con SCPs en el recto de *Mercenaria mercenaria*. La figura muestra el efecto de dosis crecientes de los péptidos YFAFPRQa, AMSFYFPRMa y SCPb sobre el recto de *Mercenaria mercenaria*. La preparación fue lavada antes de aplicar una nueva dosis.

* respuesta fuera de escala

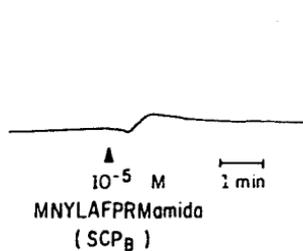
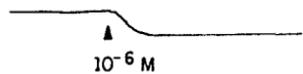
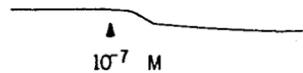
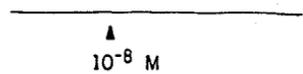
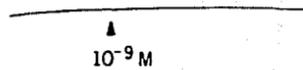
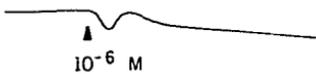
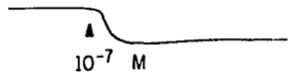
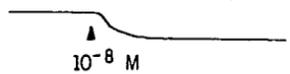
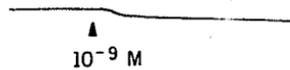
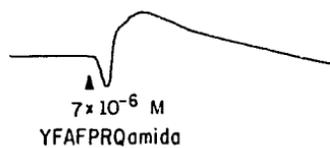
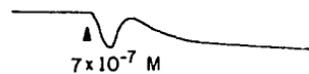
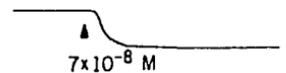
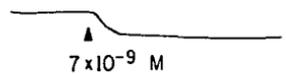
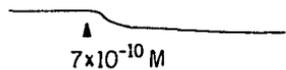
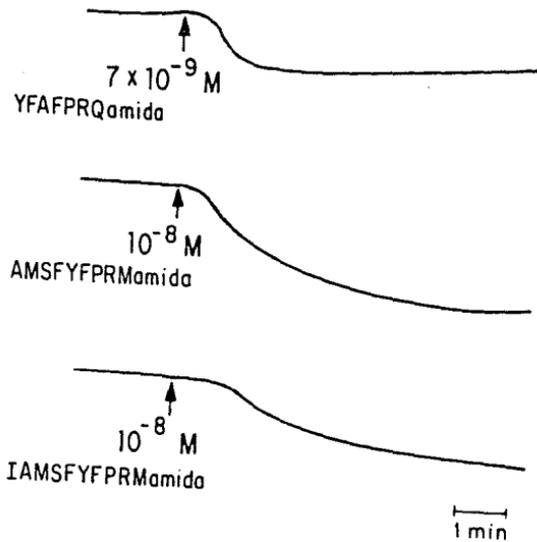


Fig 15.- Efecto de los péptidos relacionados con SCPs en presencia de benzoquinonio. Se aplicó benzoquinonio (1×10^{-5} M) al baño, 5 min antes de aplicar los péptidos YFAPPRQa (7×10^{-9} M), AMSFYFPRMa (1×10^{-8} M) y IAMSFYFPRMa (1×10^{-8} M).

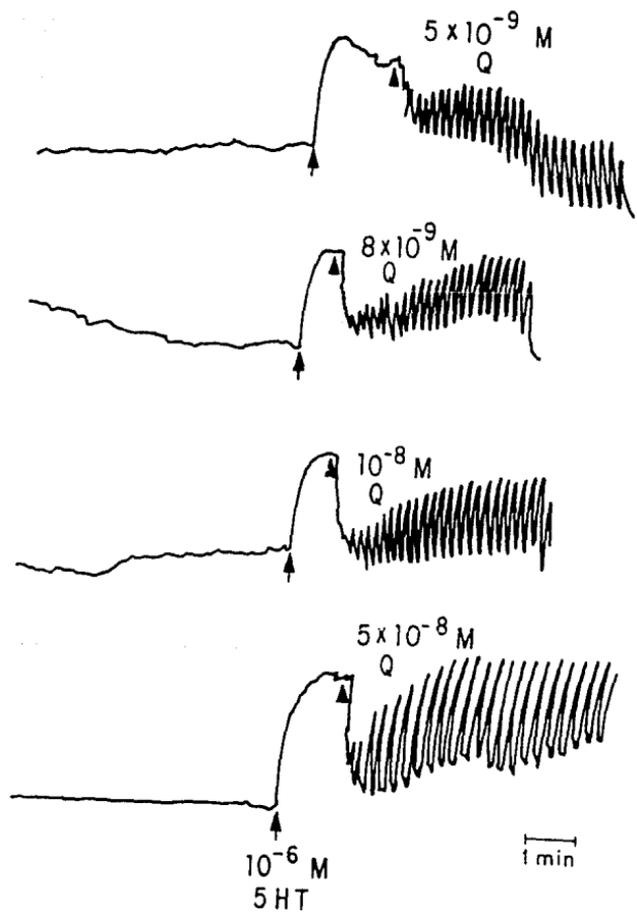
BQ 10^{-5} M



serotonina inhibe (Lloyd et al., 1988b; Lloyd 1989). Para saber si las acciones de la serotonina son antagonizadas por los péptidos relacionados con SCPs en el recto de *Mercenaria* como ocurre en el intestino de *Aplysia*, se aplicaron dosis crecientes del péptido YFAFPRQa al recto, luego de la aplicación de serotonina. Cabe señalar que la serotonina (1×10^{-6} M) produce un incremento de tono del recto de *Mercenaria* algunas veces acompañado de actividad rítmica (Greenberg y Jegla, 1963). En la figura 16 se observa como el incremento de tono producido por la serotonina es disminuido inmediatamente después de la aplicación de YFAFPRQa. Mientras que la actividad rítmica inducida por serotonina es aumentada por YFAFPRQa.

Fig 16.- Efecto del péptido YFAFPRQa en el incremento de tono producido por 5-HT en el recto de *Mercenaria mercenaria* . La figura muestra el efecto de dosis crecientes del péptido YFAFPRQa sobre la acción ejercida por 5-HT en el recto de *Mercenaria mercenaria*.

Q = YFAFPRQ_a



DISCUSION

Los SCPs (SCPa y SCPb) son substancia moduladoras, que incrementan la actividad espontánea de tejidos, como el corazón e intestino, o facilitan la eficacia de la transmisión sináptica (Lloyd, 1978; Cawthorpe et al., 1985; Lloyd et al., 1988). Las acciones de los SCPs son mediadas por un incremento de los niveles intracelulares de AMPc. Además los SCPs y la serotonina tienen acciones similares, aunque los péptidos son de uno a dos órdenes de magnitud más potentes. (Lloyd et al., 1985b; Cawthorpe et al., 1985; Lloyd et al., 1988; Weiss et al., 1979; Lloyd et al., 1984). Por otra parte, la familia de los SCPs parece estar ampliamente distribuida en los moluscos gasterópodos y también en otros Phyla (Price et al., 1989; Masinovsky et al., 1988).

En este trabajo, tres péptidos relacionados con SCPs han sido aislados mediante el uso de técnicas de HPLC a partir de extractos de acetona del bivalvo *Mercenaria mercenaria*. La extracción con acetona es un método de purificación conveniente que satisface los requerimientos especiales de los estudios filogenéticos, (ejem. la evolución de una familia de péptidos) ya que puede ser aplicada a cualquier especie relevante para el estudio sin importar si es pequeña o difícil de disecar. Para

este tipo de purificación el punto crítico es la relación de tejido/acetona. El tejido en moluscos es en su gran mayoría agua, así que suficiente tejido debe ser adicionado a la acetona para reducir su concentración a 90% o menos. Este método ha mostrado gran efectividad en el aislamiento de péptidos relacionados con FMRFamida (Price et al., 1987; Price et al., 1990) y ahora también para péptidos relacionados con SCPs.

Para llevar a cabo la purificación de estos péptidos por HPLC, se empleó una estrategia de dos pasos, un primer paso de oxidación y un segundo paso de reducción de la muestra. El propósito de oxidar y después reducir las fracciones activas es el modificar el tiempo de retención del péptido de interés y, así, separarlo de los demás péptidos con los que pueda coeluir. El uso de oxidaciones para la purificación de péptidos ya ha sido descrito antes por Price et al (1985). Uno de los inconvenientes de esta técnica es que debido a la modificación que sufren los péptidos durante la oxidación y la reducción, la sensibilidad del RIA empleado para su detección es disminuida. En este trabajo empleamos también una reducción posterior a la oxidación de los péptidos en los casos en que la oxidación no fue suficiente para obtener una separación adecuada. En los casos en que la reducción de los péptidos fue necesaria para su aislamiento, se puede observar la presencia de más de un pico inmunorreactivo (figs. 3a y 7a). Esto se debe a que el proceso de reducción no es

100% efectivo, ya que dentro de una misma muestra puede encontrarse el péptido en diferentes estados de reducción (reducción total y parcial). Una solución a este problema es mantener la muestra durante un tiempo mayor en presencia de los agentes reductores. A pesar de estos inconvenientes, en todos los casos la pureza y cantidad de los péptidos aislados fue suficiente para lograr análisis de calidad para obtener su peso molecular y secuencia.

Durante la secuenciación del péptido AMSFYFPRMa (fig. 6a), el residuo de Met del extremo carboxilo terminal no fue detectado. A pesar de esto, su presencia fue inferida gracias al peso molecular calculado para el péptido. Por un lado solo un residuo de metionina amidada podría dar como resultado ese peso molecular, por el otro el peso molecular calculado corresponde al péptido oxidado (con dos O_2), y en este caso solo una metionina en el extremo C-terminal es susceptible de ser oxidada.

Los péptidos relacionados con SCPs aislados de *Mercenaria* conservan una estructura similar a SCPa y SCPb. El tetrapéptido del C-terminal del péptido más grande encontrado en *M mercenaria* es idéntico al extremo C-terminal de los SCPs de gasterópodos. En contraste, en el péptido YFAFPRQa el residuo de metionina ha sido substituido por un residuo de glutamina. Sin embargo, su similitud al extremo C-terminal de SCPb (-YLAFPRMa) es evidente.

SCPa	<u>A-R-P-G-Y-L-A-F-P-R-M-amida</u>
SCPb	<u>M-N-Y-L-A-F-P-R-M-amida</u>
Q	<u>Y-F-A-F-P-R-Q-amida</u>
R	<u>I-A-M-S-F-Y-F-P-R-M-amida</u>
S	<u>A-M-S-F-Y-F-P-R-M-amida</u>

Por otra parte el péptido AMSFYFPRMa aislado de *Mercenaria* podría ser un producto de hidrólisis del péptido mayor IAMSFYFPRMa dado que la única diferencia que existe entre estos dos es el residuo de isoleucina N-terminal. Con respecto a los otros dos péptidos aislados de *Mercenaria* podrían ser procesados a partir de un misma proteína precursora como ocurre con SCPb y SCPa en *Aplysia*. Esta posibilidad será evaluada cuando se obtenga la secuencia del ARNm que codifica al precursor.

Los datos de distribución y fisiológicos indican que los péptidos relacionados con SCPs en *Mercenaria* como en otros moluscos es la regulación gastrointestinal. Comparado con los otros componentes del sistema nervioso central, el ganglio visceral, contiene las células nerviosas inmunoreactivas más grandes y numerosas. Este ganglio inerva la parte posterior del manto y branquias, el intestino, el sifón, el recto y el ano (Loveland, 1963). Con respecto a estos órganos blanco

potenciales, las branquias y el recto son las estructuras periféricas que contienen cantidades moderadas y altas de péptidos relacionados con SCPs (tabla 1). Además también se observaron pequeñas fibras inmunorreactivas en el recto. Por datos de inmunocitoquímica recientes, se ha confirmado la presencia de fibras inmunorreactivas en el recto y han sido observadas también en las branquias y el intestino (Greenberg, M. J. comunicación personal). De los otros componentes del SNC, el ganglio cerebral contiene una cantidad moderada de péptidos, este ganglio inerva entre otros tejidos los palpos labiales (los cuales contienen junto con el ganglio visceral las cantidades mayores de SCPs) y la región anterior del sistema digestivo. Además los palpos labiales presentan también fibras inmunorreactivas a SCPs (Greenberg, M.J. comunicación personal). Finalmente, el corazón tiene muy bajos niveles de péptidos.

Los datos de distribución sugieren que los palpos labiales, branquias y recto reciben una inervación SCPérgica. Todos estos órganos participan durante la alimentación y digestión, el papel específico que los péptidos relacionados con SCPs tiene en cada uno de estos órganos debe ser aclarado.

Al igual que en *Aplysia* los péptidos relacionados con SCPs presentan efecto sobre el intestino en *Mercenaria*. Dosis moderadas de péptidos relacionados con SCPs en el recto aislado de *Mercenaria* producen una relajación similar a la que produce

Ach. Sin embargo este efecto no fue bloqueado por cloruro de benzoquinonio (antagonista colinérgico), por consiguiente, la acción de los péptidos no puede ser atribuida a la liberación de Ach de las terminales presinápticas en el músculo.

La acción de los péptidos relacionados con SCPs y SCPb es similar en el recto de *M mercenaria*, lo que indica que se trata de una familia de péptidos que actúan sobre receptores similares. Sin embargo la equipotencia de los péptidos endógenos de *M mercenaria* y la poca potencia de SCPb indica que el receptor no es idéntico. Además la eficacia del péptido YFAFPRQa, en el cual el residuo de Met ha sido substituido por Glu en el extremo C-terminal, hace pensar que la relación estructura-función es compleja, involucrando ambos residuos de los extremos C-terminal y N-terminal y no solamente al extremo C-terminal como fue planteado originalmente para los SCPs de *Aplysia*. Esto plantea un punto interesante por investigar ya que no existe evidencia acerca de la localización y estructura del receptor o receptores de estos péptidos en *Aplysia* o en *Mercenaria*.

Por otra parte, los efectos de los SCPs en el intestino de *Mercenaria* son antagonistas a los de serotonina, ya que mientras serotonina produce una contracción en la musculatura del recto, los SCPs la relajan. Además los SCPs aumentan las contracciones que han sido iniciadas por la aplicación de serotonina. Probablemente los efectos de los SCPs en *Mercenaria* estén

mediados al igual que en *Aplysia*, por un incremento en los niveles de AMPc en el intestino. Si este es el mecanismo la aplicación de forskolina (activador de adenilato ciclasa) debe mimetizar los efectos de los SCPs en el recto de *Mercenaria*.

En contraste, la actividad cardioreguladora atribuida a los SCPs en gasterópodos (Lloyd 1978), parece ser no solo discreta sino también distinta en *Mercenaria*. Mientras que en *Aplysia* la aplicación de SCPb ($1 \times 10^{-10} M$) producen un incremento en la frecuencia y la amplitud del latido cardíaco (Cawthorpe et al 1985; Lloyd et al 1985a). En *Mercenaria* la aplicación de 1×10^{-6} - 1×10^{-7} M del péptido SCPb producen una inhibición en la amplitud del latido cardíaco. Solamente cuando la dosis fue mayor se presentó un incremento pasajero en el latido y el tono cardíaco. Por otra parte, estos resultados no pudieron ser reproducidos en todas las ocasiones. La posible explicación a esto ha sido encontrada recientemente. Una ligera pero clara inmunoreactividad a SCPs ha sido detectada en las válvulas auriculoventriculares (M. J. Greenberg y W. Lesser comunicación personal). Lo que probablemente ocurrió durante los experimentos realizados en el presente trabajo fue debido a variaciones durante la disección. Cuando el ventrículo fue extraído desde su parte más cercana a la unión auriculoventricular, parte de las válvulas pueden haber sido incluidas en la preparación obteniéndose una respuesta a la aplicación de SCPs, pero cuando el ventrículo fue extraído desde

su parte lejana a la unión auriculoventricular, no se obtiene respuesta a los SCPs.

El hecho de que un péptido pueda producir diferentes efectos en sus órganos blanco en distintas especies, es una observación común en endocrinología y farmacología comparada, un ejemplo de esto lo constituye el tetrapéptido FMRFamida. Este tetrapéptido aislado originalmente por sus propiedades cardioexcitadoras en moluscos bivalvos, actúa sobre una serie de receptores heterogéneos y presenta también componentes inhibitorios en el 50% de las especies analizadas, e inclusive en algunas de ellas la actividad es completamente inhibitoria. (Greenberg et al 1983b; Payza et al 1990). Este podría ser también el caso para los SCPs.

Hasta el momento la evidencia que existe no es suficiente para afirmar que los SCPs son comunes a todo el Phylum Mollusca, sin embargo si es bastante indicativa de que esto pueda ocurrir. Actualmente la clase mejor estudiada es la Gasterópoda, en ésta se han encontrado péptidos relacionados a SCPs en todas las Subclases estudiadas (Prosobranquia, Opistobranquia y Pulmonada) (Price, D.A., et al 1989; Masinovsky, B et al., 1988). En los SCPs identificados en las especies de Gasterópodos estudiados el pentapéptido -AFPRMamida se encuentra conservado (tabla III). Con respecto a la clase bivalva solo dos subclases de las seis existentes han sido estudiadas (Pteriomorphia y Heterodonta). La

TABLA III. DISTRIBUCION DE LOS SCPs EN MOLUSCOS

ESPECIES	SECUENCIA
<i>Aplysia californica</i>	ARPGYLAFPRMamida
	MNYLAFPRMamida
<i>Littorina irrorata</i>	SQPYIAFPRMamida
<i>Thais haemastoma</i>	-NYLAFPRMamida
<i>Busycon</i>	* TNYLAFPRMamida
<i>Helix aspersa</i>	MNYLAFPRMamida
<i>Lymnea</i>	* PQNLAFPRMamida
<i>Mercenaria campechiensis</i>	AMSFYFPRMamida

* Las secuencias de estos péptidos fueron deducidas a partir de su peso molecular.

subclase Pteriomorpha es la más antigua, en todas las especies analizadas de esta subclase se han encontrado péptidos relacionados con SCPs. Sin embargo no en todos los casos se ha podido aislar una cantidad suficiente de los péptidos para su caracterización. Con respecto a la subclase Heterodonta se estudiaron dos especies del orden Veneroioda (*Mercenaria* y *Dinocardium*). Ambas especies estudiadas contienen los mismos péptidos relacionados con SCPs.

Finalmente algunas de las clases menores aun no han sido estudiadas (Aplacophora, Poliplacophora y Escaphopoda) y en el caso de la clase Cephalopoda los resultados no han sido concluyentes.

Al comparar las secuencias conocidas de SCPs a través del Phylum Mollusca (tablas II y III), se observa la conservación del tripéptido -FPR- en el extremo C-terminal. Aun cuando el número de residuos conservados es relativamente pequeño no quiere decir que no se trate de una familia de péptidos. Un ejemplo de familias de péptidos con pocos residuos conservados, lo constituye la familia de ocho péptidos relacionados con la hormona concentradora de pigmento del langostino y la hormona adipocinética de insectos. En esta familia solamente tres residuos de aminoácidos han permanecido constantes (pGlu¹, Fen⁴ y Trp⁸) (Gade G. et al., 1985).

Por otra parte, la evidencia inmunocitoquímica que muestra la presencia de neuronas inmunorreactivas en el Phylum Artrópoda y Anélida (Masinovsky et al., 1988), sugiere que los SCPs pueden ser una familia de péptidos ampliamente distribuida en otros invertebrados. Tal es el caso de FMRFa un neuropéptido ubicuo en moluscos, y cuyos análogos han sido caracterizados también en varias especies de Artrópodos.

Con respecto a la función, aunque los miembros de una familia de péptidos pueden tener una función común, las funciones atribuidas a péptidos relacionados pueden llegar a ser muy heterogéneas conforme aumenta la distancia filogenética.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

1.- Tres péptidos relacionados con SCPs han sido aislados y secuenciados del molusco bivalvo *Mercenaria mercenaria*

Y-F-A-F-P-R-Q-amida

A-M-S-F-Y-F-P-R-M-amida

I-A-M-S-F-Y-F-P-R-M-amida

2.- Los tres péptidos parecen estar involucrados en la regulación gastrointestinal.

3.- Los efectos que estos péptidos tienen sobre el intestino no puede ser atribuida a la liberación de Ach de las terminales presinápticas del músculo.

4.- Estos péptidos regulan los efectos que 5-HT tiene sobre el recto de *Mercenaria*.

5.- La actividad cardioreguladora de los péptidos relacionados con SCPs es discreta e inclusive opuesta en *Mercenaria*

6.- La distribución de estos péptidos podría ser general en los moluscos bivalvos.

7.- La relación estructura-función es compleja, involucrando tanto al extremo C-terminal como N-terminal.

BIBLIOGRAFIA

Abrams, T.W., V. F. Castellucci, J. S. Camardo, E. R. Kandel, y P. E. Lloyd. 1984 Two endogenous neuropeptides modulate the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia* by means of presynaptic facilitation involving cAMP-dependent closure of a serotonin-sensitive S-potassium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:7956-7960.

Beltz, B. S. y Burd, G.D. 1989. Immunocytochemical techniques: Principles and practice. Blackwell Scientific Publications, Cambridge, M. A.

Brownstein, M. J. 1981. Neuropeptides. En Basic Neurochemistry, ed. G. Siegel, B. Agranoff, R. W. Albers y P. Molinoff. N. Y: Raven.

Cawthorpe, D. R. L., J. Rosenberg, W. F. Colmers, y K. Lukowiak, G. I. Drummond. 1985. The effects of small cardioactive peptide B on the isolate heart and gill of *Aplysia californica*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 63:918-924.

Coates, C. J. y G. M. Bulloch. 1985. Synaptic plasticity in the molluscan peripheral nervous system: Physiology and role for peptides. *J. Neurosci.* 5:2677-2684.

Cohen, J. L., K. R. Weiss, y I. Kupfermann. 1978. Motor control of buccal muscles in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 41:157-180.

Cropper, E. C., P. E. Lloyd, W. Reed, R. Tenenbaum, I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1987. Multiple neuropeptides in cholinergic motor neurons of *Aplysia*: Evidence for modulation intrinsic to the motor circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:3486-3490.

Cropper, E. C., D. A. Price, R. Tanenbaum, I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1990. Release of peptide cotransmitters from a cholinergic motor neuron under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:933-937.

Gade, G. y K. L. Rinehart. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141: 774-781.

Greenberg, M.J. y T. C. Jegla. 1963. The action of 5-hydroxytryptamine and acetylcholine on the rectum of the venus clam, *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* 9:275-290.

Greenberg, M. J. y D. A. Price. 1983. Invertebrate neuropeptides: native and naturalized. *Ann. Rev. Physiol.* 45:271-288.

Greenberg, M. J., S. D. Painter., K. E. Doble., G. T. Nagle., D. A. Price. y H. K. Lehman. 1983b. The molluscan neurosecretory peptide FMRFamide: comparative pharmacology and relationship to the enkephalins. *Fed. Proc.* 42:82-86.

Holman, G. M. 1990. Insect Neuropeptides. *Annu. Rev. Entomol.* 35:201-217.

Hooper, S. L., W. C. Probst, I. Kupfermann, y K. Weiss. 1991. SCPs and myomodulin utilize separate signals transduction pathways and converge on common substrates in the ARC muscle of *Aplysia*. *Soc. for Neurosci.* 17:1305.

Humason, G. L. 1967. *Animal Tissue Techniques*. 2 nd. ed. Freeman, San Francisco.

Loveland, R. E. 1963. Some aspects in cardioregulation in *Mercenaria mercenaria*. Depto. de Biología. Harvard University. Cambridge.

Lloyd, P. E. 1978. Distribution and molecular characteristics of cardioactive peptides in the snail, *Helix aspersa*. *J. Comp.*

Physiol. 128:279-276.

Lloyd, P. E. 1980a. Modulation of neuromuscular activity by 5-hydroxytryptamine and endogenous peptides in the snail, *Helix aspersa*. J. Comp. Physiol. 139:333-339.

Lloyd, P. E. 1980b. Mechanisms of action of 5-hydroxytryptamine and endogenous peptides on a neuromuscular preparation in the snail, *Helix aspersa*. J. Comp. Physiol. 139:341-347.

Lloyd, P. E. 1982. Cardioactive neuropeptides in gastropods. Fed. Proc. 41:2948-2952.

Lloyd, P. E. 1988. Fast axonal transport of neuromodulatory neuropeptides from central ganglia to components of the feeding system in *Aplysia*. J. Neurosci. 8:3507-3514.

Lloyd, P. E. 1989. Peripheral actions of the SCPs in *Aplysia* and other gastropod mollusc. Amer. Zool. 29:1265-1274.

Lloyd, P. E., I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1984. Sequence and neuronal localization of a newly characterized neuropeptide in *Aplysia*. Soc. for Neuroscience. 10:153.

Lloyd, P. E., I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1984. Evidence for parallel actions of a molluscan neuropeptide and serotonin in mediating arousal in *Aplysia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:2934-2937.

Lloyd, P. E., I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1985. Two endogenous neuropeptides (SCPa and SCPb) produce a cAMP-mediated stimulation of cardiac activity in *Aplysia*. *J. Comp Physiol A*. 156:659-667.

Lloyd, P.E., A. C. Mahon, I. Kupfermann, J. L. Cohen, R. H. Scheller, y K. R. Weiss. 1985b. Biochemical and immunocytochemical localization of molluscan small cardioactive peptides in the nervous system of *Aplysia californica*. *J. Neurosci*. 5:1851-1861.

Lloyd, P. E., S. Schacher, I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1986. Release of neuropeptides during intracellular stimulation of single identified *Aplysia* neurons in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:9794-9798.

Lloyd, P. E., I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1987. Sequence of small cardioactive peptide a: a second member of a class of neuropeptides in *Aplysia*. *Peptides*. 8:179-184.

Lloyd, P. E. y O. D. Willows. 1988. Multiple transmitter neurons in *Tritonia*: II. Control of gut motility. *J. Neurobiol.* 19:55-67.

Lloyd, P. E., I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1988. Central peptidergic neurons regulate gut motility in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 59:1613-1626.

Luduena, F. P. y T. G. Brown. 1952. Mytolon and related compounds as antagonists of acetylcholine on the heart of *Venus mercenaria*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 105: 232-239.

Mahon, A. C., P. E. Lloyd, K. R. Weiss, I. Kupfermann, y R. H. Scheller. 1985. The small cardioactive peptides A and B of *Aplysia* are derived from a common precursor molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3925-3929.

Masinovsky, B., S. C. Kempf, J. C. Callaway, y A. O. D. Willows. 1988. Monoclonal antibodies to the molluscan small cardioactive peptide SCPb: Immunolabeling of neurons in diverse invertebrates. J Comp. Neurol. 273:500-512.

Morris. H. R., M. Panico, A. Karplus, P. E. Lloyd, y B. Riniker. 1982. Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia*. Nature. 300:643-645.

Payza, K., M. J. Greenberg, D.A. Price. 1990. Further characterization of *Helix* FMRFamide receptors: kinetics, tissue distribution, and interactions with the endogenous heptapeptides. Peptides.10:657-661.

- Pojeta, J., B. Runnegar, y J. Kriz. 1973. *Fordilla troyensis* Barrande: the oldest known pelecypod. *Science*. 180:866-868.
- Price, D. A. 1983. Crustacean Neuroptides en Brain Peptides. Eds. Krieger, Brownstein y Martin. Wiley-Interscience. pp 217-228.
- Price, D. A., G. A. Cottrell, K. E. Doble, M. J. Greenberg, W. Jorenby, H. K. Lehman. y J. P. Riehm. 1985. A novel FMRFamide-related peptide in *Helix* pQDPFLRFamide. *Biol. Bull.* 169:256-266.
- Price, D. A., D. R. Reed, K. E. Doble, T. D. Lee y M. J. Greenberg. 1989. The distribution of SCPs peptides in molluscs. *Resumen. Soc. Neurosciences*. 15: 737.
- Price, D. A., W. Lesser, T. D. Lee, K. E. Doble y M. J. Greenberg. 1990. Seven FMRFamide-related and two SCP-related cardioactive peptides from *Helix*. *J exp. Biol.* 154: 421-437.
- Richmond, J. E., A. G. M. Bulloch, y K. Lukowiak. 1986. Peptidergic modulation of a neuromuscular junction in *Aplysia*: bioactivity and immunocytochemistry. *Brain Res.* 370:159-164.
- Schwartz, J. H. 1991 Chemical messengers: small molecules and peptides. En *Principles of neural science*. Eds. Kandel, Schwartz y Jessell. 3er edición. New York: Elsevier. pp 120-134.

Vilim, F. S., D. A. Price, W. Lesser, I. Kupfermann, y K. R. Weiss. 1991. Direct measurement of peptide co-transmitter release following intracellular stimulation of a single identified motorneuron in *Aplysia*. Resumen. Soc. Neurosci. 17:1305.

Weiss, K. R., J. L. Cohen, y I. Kupfermann. 1978. Modulatory control of buccal musculature by a serotonergic neuron (metacerebral cell) in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 41:181-203.

Weiss, K. R., D. E. Mandelbaum, M. Schomberg, y I. Kupfermann. 1979. Modulation of buccal muscle cotractility by serotonergic metacerebral cells in *Aplysia*: evidence for a role of cyclic adenosine monophosphate. J. Neurophysiol. 42:791-803.

Whim, M. D. y P. E. Lloyd. 1989. Frequency-dependent release of peptide cotransmitters from identified cholinergic motor neurons in *Aplysia*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 86:9034-9038.