

03068

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y del
Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

**“PURIFICACIÓN PARCIAL Y CARACTERIZACIÓN
BIOLÓGICA DE UN PÉPTIDO SEMEJANTE A LA RELAXINA
DEL SUERO DE CONEJA PREÑADA”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

presenta:

MARÍA DEL ROSARIO NERI BASURTO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Banco de Hormonas Proteicas del Centro de Neurobiología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Angélica Salas Valdés.

TESIS

COMPLETA

JURADO ASIGNADO

Dra. Angélica Salas Valdés.

Dra. Rosario Muñoz Clares.

Dra. Teresa Morales Guzmán.

Dra. Gabriela Morali de la Brena.

Dr. Héctor Ponce Monter.

Dr. Vicente Díaz Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Ponce Monter, por su asesoramiento, por prestarme su equipo y sustancias para la realización del bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas.

Al Dr. Eduardo Tena Betancourt, por donarme las conejas Nueva Zelanda, para la obtención del suero.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares y al Dr. Vicente Díaz Sánchez por su participación en los exámenes tutoriales, así como por la revisión de la tesis.

A la Dra. Teresa Morales Guzmán, a la Dra. Gabriela Morali y al Dr. Héctor Ponce Monter por la revisión de la tesis.

A la M. en C. Martha Carranza Salas, por su valiosa colaboración y apoyo en la realización de la tesis.

Al Q. F. B. Teodoro Villanueva, por su ayuda en la realización del bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas.

Al Dr. Pedro Nicolas Velázquez por prestarme su microscopio estereoscópico y su cámara fotográfica.

A la M. en C. Angélica González Maciel, por prestarme su impresora.

A la M. V. Z. Hilda Martínez Coria, por prestarme su impresora.

A la Bibliotecóloga María del Pilar Galarza Barrios por su ayuda en la búsqueda bibliográfica.

Al Sr. Jesus Ramírez por prestarme su computadora para la redacción de la tesis.

A los Sres. Rafael Ávila Maturano (dibujante), José Avilés Garduño y Jorge Hernández (fotógrafos) por su eficiente colaboración.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca-credito, para realización de la presente tesis.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	
I.- Relaxina de coneja.....	3
II.- Planteamiento del problema.....	6
III.- Objetivos.....	7
MATERIAL Y MÉTODO	
I.- Obtención de la relaxina del suero de coneja preñada.....	8
1.- Recolección de la materia prima.....	8
2.- Deslipidización.....	8
3.- Extracción.....	8
4.- Diálisis.....	9
5.- Purificación.....	9
Cromatografía en Sephadex G-50 (fino).....	9
II.- Bioensayos.....	11
1.- Bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas.....	11
A) Procedimiento.....	11
B) Diseño experimental.....	11
C) Análisis estadístico.....	12
2.- Bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico.....	13
A) Procedimiento.....	13
B) Diseño experimental.....	14
a) Edad del animal.....	14
b) Reproducibilidad.....	15
c) Sensibilidad.....	15
d) Especificidad.....	15
C) Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS	
I.- Purificación de la relaxina de la relaxina de suero de coneja preñada.....	17
1.- Lote 1 de suero de coneja preñada.....	17
A) Obtención de relaxina.....	17
B) Caracterización biológica.....	17
2.- Lote 2 de suero de coneja preñada.....	18
A) Obtención de relaxina.....	18
B) Caracterización biológica.....	20
II. Bioensayos.....	21
1.- Bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas.....	21
2.- Bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico.....	23
A) Edad del animal.....	23
B) Reproducibilidad.....	25
C) Sensibilidad.....	26
D) Especificidad.....	27
DISCUSIÓN	
I.- Purificación.....	29
II. Bioensayos.....	32
1.- Bioensayo de a inhibición de las contracciones uterinas espontáneas.....	32
2.- Bioensayo de la elongación del ligamento Interpúbico.....	33

CONCLUSIONES

I.- Conclusiones.....	36
II.- Perspectivas.....	37

ANEXO: ANTECEDENTES

I.- Historia de la relaxina.....	38
1. Generalidades.....	38
2.- Mecanismos de adaptación de la pelvis.....	38
A) Genético.....	38
B) Hormonal.....	38
a) A través de andrógenos.....	39
b) A través de relaxina.....	39
II.- Purificación y extracción de la relaxina.....	41
IV.- Métodos para determinar la relaxina.....	44
1.- Bioensayos.....	44
A) Bioensayo de la palpación de la sínfisis púbica.....	45
B) Bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico.....	45
C) Bioensayo de la inhibición de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas.....	46
D) Bioensayo en cultivos celulares.....	46
2.- Radioinmunoensayo.....	47
3.- Ensayos inmunoenzimáticos.....	47
III Bloquímica de la relaxina.....	47
1.- Estructura.....	47
2.- Evolución.....	50
3.- Biosíntesis.....	50
4.- Receptores.....	53
5.- Mecanismo de acción.....	53
A) Bases moleculares de la contracción del músculo liso.....	53
B) Posible mediación a través de la proteína cinasa A y/o través de los niveles de calcio intracelular.....	54
IV.- Acciones biológicas y tejidos de secreción de la relaxina.....	56
1.- En la hembra.....	56
2.- En tejidos no reproductivos.....	58
3.- En el macho.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60

RESUMEN

La relaxina (RLX) de coneja es una hormona proteica con un P.M. de 7.200 d, la cual está constituida por dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas por dos enlaces disulfuro. Entre sus efectos biológicos están la elongación del ligamento interpúbico, la inhibición de las contracciones uterinas durante la gestación y el reblandecimiento del cérvix durante el parto. La placenta es la fuente principal de la producción de RLX en la coneja (también es producida por el endometrio durante la gestación). Aunque esta hormona fue descubierta en el suero de conejas preñadas, no se habla aplicado ningún método para purificarla, quizás debido a su baja concentración en comparación a otras fuentes (placenta y endometrio). Sin embargo, aún cuando en el suero su concentración es baja, es el que presenta la mayor bioactividad (10 GPU/ml) de todas las especies estudiadas, por lo que se consideró adecuado desarrollar un método para purificar esta hormona.

Se procesaron dos lotes de suero de coneja preñada (SCP) de entre los días 25 a 30 de gestación, etapa en que la hormona está en su máxima concentración. El lote 1 de 126 ml se procesó de acuerdo a la técnica original de Brenner y col. (1985) (especial para suero de mujer embarazada), la cual consiste de una deslipidización, una extracción y una diálisis, para obtener un sobrenadante 4 (Sn4) como producto final, al que estos investigadores denominaron péptido semejante a la relaxina. Para el lote 2 de 560 ml se realizaron algunas modificaciones con el fin de mejorar la bioactividad y el rendimiento. Estas modificaciones consistieron en: 1) Aplicar un inhibidor de proteasas (P. M. S. F.), 2) Siliconizar el material de vidrio 3) Realizar el procedimiento a 4 °C y 4) Aplicar la cromatografía en Sephadex G-50 (fino).

Para identificar y determinar la potencia de la hormona contenida en cada uno de los productos (Sn2, Sn4 y Fx-Sephadex) que se obtuvieron durante la purificación de relaxina de ambos lotes, se realizó con el bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas en ratonas BALB/c de 4 semanas de edad (prepúberes) previamente sensibilizadas con 5 µg de ciclopentilpropionato de estradiol (CPE). El efecto inhibitorio se basó en la disminución de las frecuencias y/o amplitudes (porcentaje de inhibición) de las contracciones uterinas espontáneas, después de que se aplicaron por separado cada uno de los productos y el estándar de relaxina porcino (3000 GPU/mg).

El bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico se realizó en ratonas BALB/c previamente sensibilizadas con 5 µg de CPE en el día 0. En el día 7, se les inyectó la solución problema (suero de coneja preñada, progesterona o insulina) y 18 horas después se sacrificaron. Se les midió el ligamento interpúbico (por transluminación en un microscopio estereoscópico). Este bioensayo se realizó de acuerdo a los siguientes parámetros: 1) La edad del animal, en ratonas de 4 (prepúber), 6 (prepúber) y 9 (púber) semanas de edad. 2) Reproducibilidad. 3) Sensibilidad, con volúmenes crecientes de SCP (RLX) de 25 a 400 µl. y 4) Especificidad, para comparar el efecto del SCP (RLX) con la progesterona o insulina.

Con el Sn2 (extracto ácido-acetona) del lote 1 se obtuvo un rendimiento de proteína del 15.4 %, el cual mejoró en el lote 2 que fue del 40 %, pero no se detectó bioactividad en ninguno de los dos lotes. Con el Sn4 (producto de la diálisis) el rendimiento también mejoró: de 1.1 % para el lote 1 y de 2.4 % para el lote 2. Además con este producto sí se detectó bioactividad y mejoró al doble: de 0.15 GPU/mg para el lote 1 y de 0.3 GPU/mg para el lote 2. La inhibición de las contracciones uterinas espontáneas también mejoró: de 44.9 % para el lote 1 y de 90 % para el lote 2. Con el Sn4 del lote 2 que se pasó por cromatografía en Sephadex G-50 (fino), se obtuvo un producto (Fx-Sephadex) con una potencia biológica de 1.9 GPU/mg, o sea que se logró mejorar 6.3 veces (de 0.3 GPU/mg en el Sn4 a 1.9 GPU/mg en el producto Fx-Sephadex) y con una inhibición de las contracciones uterinas del 90.1 %. Sin embargo, el rendimiento fue muy bajo (0.01%) por lo que ya no se aplicó otro paso más de purificación (por carboximetilcelulosa) para mejorar aún más la bioactividad. Se puede concluir que con las modificaciones que se introdujeron, se lograron mejorar tanto la bioactividad como el rendimiento (aunque no fue así para la Fx-Sephadex). Sin embargo, el producto final Fx-Sephadex, se puede considerar como un péptido semejante a la relaxina, puesto que solo se le determinó la caracterización biológica.

Por otro lado, con el bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico la mayor longitud (de 1.13 ± 0.06 mm) se observó en el grupo CPE + SCP (RLX) en las ratonas de 4 semanas de edad en comparación a: 1) Los otros grupos experimentales (grupo control 0.25 ± 0.05 mm; grupo SCP (RLX) 0.3 ± 0.05 mm y grupo CPE 0.6 ± 0.06 mm) y 2) A las ratonas de 6 y 9 semanas de edad, en las cuales no hubo diferencia significativa entre el grupo tratado con CPE y el tratado con CPE + SCP (RLX). El efecto de una mayor longitud fue reproducible en las ratonas de 4 semanas de edad, en los tres experimentos realizados: 1.13 ± 0.06 mm, 1.03 ± 0.06 mm y 1.00 ± 0.06 mm. Además el ligamento respondió de manera proporcional a volúmenes crecientes de SCP (RLX): 0.89 ± 0.09 mm con 50 µl, 1.13 ± 0.06 mm con 100 µl, y 1.56 ± 0.02 mm con 200 µl. Cuando se comparó el efecto de SCP (RLX) con el de la progesterona e insulina, al parecer este efecto se debe a la RLX contenida en el SCP y no a la progesterona o insulina. Puesto que la progesterona también se encuentra en altas concentraciones durante la gestación y también actúa sobre la elongación del ligamento interpúbico, solo que su efecto es inhibitorio. Aunque la insulina estructuralmente es semejante a la relaxina, no tiene el mismo efecto.

Este bioensayo se estandarizó, con el fin de utilizarlo con la relaxina de ovarios de cerda preñada, pero debido a que no se consiguieron, se dejan establecidos los parámetros para futuras purificaciones de relaxina de este tejido, del cual se puede obtener un buen rendimiento y una buena bioactividad. Sin embargo con la RLX que se obtuvo del SCP solo se pudo aplicar al bioensayo *in vitro* de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas porque es más sensible y por lo tanto útil para el SCP donde la relaxina tiene baja concentración pero buena bioactividad.

ABREVIATURAS

AMP: Ácido fosfórico adenosin 3', 5' cíclico
ATP: Adenosin trifosfato
Ca²⁺: Calcio
CaCl₂: Cloruro de calcio
CPE: Ciclopentilpropionato de estradiol
Exto.: Extracto
Fx-Sephadex: Fracción Sephadex
GPU: Guinea Pig Unit
KCL: Cloruro de potasio
I: Insulina humana recombinante
MLCK: Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MgCl₂: Cloruro de magnesio
NaCl: Cloruro de sodio
NaHCO₃: Carbonato de sodio
P₄: Progesterona
p.I.: Punto isoeléctrico
P.M.: Peso molecular
PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro
Pp0: Precipitado 0
Pp1: Precipitado 1
Pp2: Precipitado 2
Pp3: Precipitado 3
Pp4: Precipitado 4
Prot.: Proteína
PV: Peso/volumen
RLX: Relaxina
SCP: Suero de coneja preñada
SCP (RLX): Suero de coneja preñada que contiene relaxina
Sn1: Sobrenadante 1
Sn2: Sobrenadante 2
Sn3: Sobrenadante 3
Sn4: Sobrenadante 4
St-RLX: Estándar de relaxina porcino (3,000 GPU/mg)

INTRODUCCIÓN

I.- RELAXINA DE CONEJA.

La relaxina (RLX) fue descubierta en el suero de coneja preñada (SCP) y fue este animal en el que se detectó la mayor bioactividad en el suero de todas las especies estudiadas (Tabla I). Esta situación permitió concentrar la hormona y determinar el perfil de bioactividad durante la gestación de la coneja, por medio del bioensayo de la palpación de la sínfisis púbica en la cobaya (diseñado por Abramowitz, Money, Zarrow, Talmage, Kleinholz y Hisaw, 1944).

Con este bioensayo se encontró que la relaxina se detectaba desde el tercer día de la gestación, después la hormona aumenta rápidamente entre los días 12 y 24, y se mantiene en un nivel constante hasta el final de la gestación. En el día 1 postparto, hay una disminución pronunciada hasta que la relaxina desaparece

Tabla I. Bioactividad aproximada de la relaxina en el suero de varias especies (Tomado de Sherwood, 1994).

Especie	Bioactividad (GPU/ml)
Perro	0.3 ^a
Gata	1.5 ^a
Rata	0.001 ^b
Ratón	0.1 ^b
Hámster	0.1 ^b
Cobaya	0.5 ^a
Coneja	10.0 ^a
Cerda	2.0 ^a
Vaca	0.2-1.0 ^a
Yegua	Detectable ^a
Mono rhesus	0.001-0.002 ^b
Mandril	0.001-0.002 ^b
Mujer	0.001-0.03 ^b

a: Determinada con el bioensayo de la palpación de la relajación de la sínfisis púbica (Abramowitz y col., 1944).

b: Determinada con el bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico (Steinetz, Beach, Kroc, Stasilli, Nussbaum, Nemlth y Dunn, 1960).

de la sangre 3 días después (Figura 1 A) (Mardner y Money, 1944). En 1953 Zarrow y Rosenberg informaron de resultados similares. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente por radioinmunoanálisis, por Lee y Fields (1991), quienes detectaron inmunoreactividad de relaxina en la sangre periférica de conejas preñadas. Durante la gestación la relaxina se detectó en el periodo de preimplantación (días 4-9), se alcanza el máximo nivel en el día 15 y permanece así hasta el día 32 (parto), después disminuye abruptamente en el día 1

postparto, y se mantiene a niveles detectables durante la primera semana postparto (Figura 1 B). La relaxina no se detectó en las conejas pseudopreñadas y en las no preñadas, ni en los machos. El gran aumento de los niveles de relaxina en la sangre entre los días 15 a 20, se relaciona con el periodo en el que sucede el desarrollo de la placenta, mientras que la caída brusca de relaxina (día 32) coincide con la expulsión de la placenta en el momento del parto. El endometrio es la fuente de los niveles bajos de relaxina durante el inicio de la gestación y la lactancia.

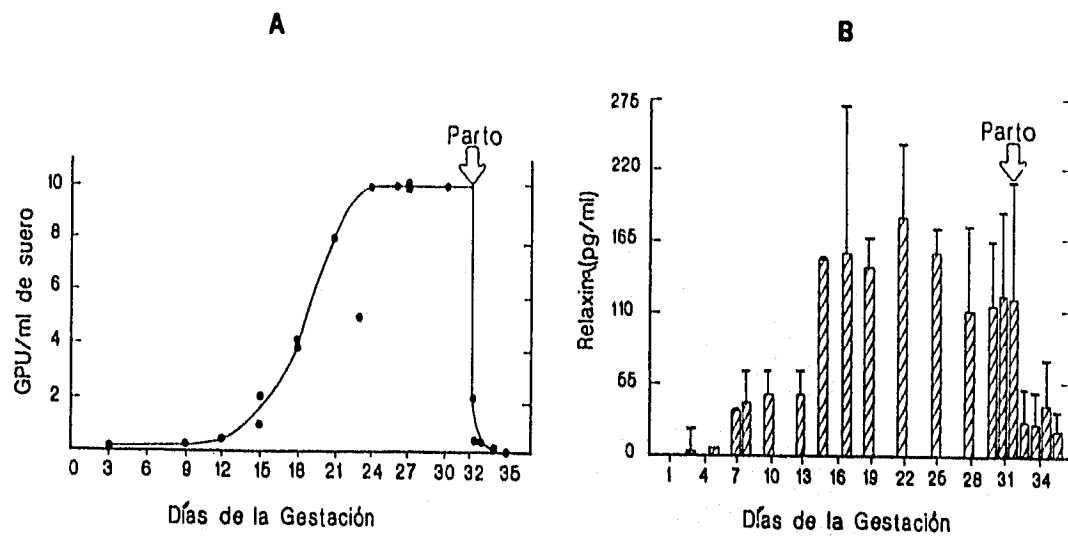


Figura 1. Perfil de bioactividad (A) e Inmunoactividad (B) de relaxina durante la gestación y después del parto en la coneja (Tomado de Mardner y col., 1944; Lee y Fields, 1991).

La ovariectomía (en el día 13 de la gestación) no influye sobre el perfil de relaxina inmunoactiva, por lo tanto el ovario no es una fuente significativa de relaxina en la coneja (Lee y col. 1991).

Eldridge y Fields (1986) demostraron que la placenta de conejas preñadas es el tejido que produce la relaxina (Tabla II), aunque no es el único animal donde este tejido es la fuente de la relaxina. También se ha detectado en la placenta de la vaca, gata y humano. En la coneja la relaxina se detectó específicamente en los gránulos de secreción del sincitiotrofoblasto placentario por medio de técnicas inmunohistoquímicas (Lee y col. 1990).

La presencia de relaxina durante el periodo de preimplantación es diferente en otras especies (gatas, yeguas, ratas y cerdas), en las cuales la hormona no se ha detectado, si no hasta después de la implantación. Aunque los niveles plasmáticos fueron bajos durante este periodo, estos datos coinciden con la relaxina inmunoteñida en el endometrio de conejas preñadas. Puesto que la relaxina provoca la inhibición de las contracciones

uterinas, remodela el tejido conectivo, aumenta la vascularización y aumenta el tamaño del útero (efecto uterotrófico), quizás sea sintetizada para preparar el tejido uterino y permitir que los blastocistos se implanten adecuadamente (Lee y col., 1991).

Fields, Fields Jr. y Larkin (1982), purificaron por primera vez la relaxina de placentas de conejas preñadas, las cuales se homogeneizaron (acetona 5 %-agua 2.83%-HCl 0.17 % v/v) a 4 °C, el extracto se sometió a cromatografía en Sephadex G-50, después se pasó por cromatografía de intercambio iónico (CMC) y obtuvieron un rendimiento de 30 mg/kg de placenta, una actividad específica de 15 GPU/mg y un punto isoeléctrico de aproximadamente 10.5. Más tarde en 1985, estos investigadores volvieron a purificar la relaxina de placentas de coneja modificando su técnica: agregaron inhibidores de proteasas y otro paso más de purificación (después de la CMC), con cromatografía en Sepharosa CL-4B. Obtuvieron una relaxina altamente pura y con un rendimiento de alrededor de 12 mg/kg de placentas. Las electroforesis en placa bajo condiciones reductoras y no reductoras, indicaron que la relaxina de coneja tiene un peso molecular de aproximadamente 7,200 d, esta constituida por dos cadenas (A y B) de tamaño similar y están unidas por dos enlaces disulfuro. La relaxina de coneja (23 GPU/mg) fue mucho menos activa que la relaxina porcina (3,000 GPU/mg) en el bioensayo *in vitro*

Tabla II. Bioactividad aproximada de relaxina en diferentes tejidos en la coneja (Tomado de Lee Fields, 1990).

Tejido	Bioactividad GPU/ml o mg
Placenta	23
Suero	10
Útero	9
Ovario	3

de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas en la ratona. El punto isoeléctrico fue de 6.8, más bajo que el de la relaxina porcina y de la rata (10.7 y 7.6 respectivamente). Además, con la técnica de Western-blott se demostró reacción cruzada con el antisuero de relaxina porcina, sólo que fue necesaria una concentración 1000 veces mayor para generar una respuesta positiva, en comparación a la relaxina porcina, la cual tiene una bioactividad de 3,000 GPU/mg (Eldridge y Fields, 1985).

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los objetivos del Banco de Hormonas Proteicas de Origen Animal, del Centro de Neurobiología-UNAM es: proporcionar hormonas proteicas y sus correspondientes sistemas analíticos (por ejemplo radioinmunoanálisis) a los veterinarios del país para realizar estudios fisiológicos. En esta ocasión, se había planteado como objetivo la purificación de la relaxina porcina, pero debido a que no se obtuvieron los ovarios de cerda preñada, se cambió el objetivo original, por el de la purificación de la relaxina a partir del suero de coneja preñada.

La obtención de la relaxina porcina era muy importante por su gran bioactividad en comparación a las relaxinas de otras especies (Tabla X). Además de que se obtiene con buen rendimiento y por su acción uterotrónica (Hisaw y Hisaw Jr., 1964). La acción uterotrónica consiste en el aumento del tamaño del útero, lo que permite la implantación de un mayor número embriones en las cerdas primerizas, las cuales tienen pérdidas de embriones por tener un útero pequeño. De esta manera aumenta el tamaño de la camada, lo cual es muy importante para los fines de producción animal (Anderson, 1985; Hall, Cantley, Day, Anthony, 1990).

A pesar de que en la coneja se detectó la mayor bioactividad (10 GPU/ ml) de relaxina circulante, solo se había concentrado, pero no se ha aplicado ningún método para purificarla a partir de esta fuente. En cambio, con otros líquidos biológicos como el suero de mujer preñada y plasma seminal humano, se han aplicado técnicas para obtener la relaxina parcialmente pura, a pesar de que esta hormona tiene una bioactividad y concentración muy bajas: 0.001 GPU/ml y 900 ng/ ml para el suero de mujer preñada y 2 ng/ml para el plasma seminal del hombre. La obtención de relaxina de estas fuentes en el humano, se consideró como una alternativa, ya que es muy difícil obtener ovarios de mujer gestante o de la próstata en el hombre (tejidos que producen la relaxina), para purificar la hormona (Brenner, Lessing, D'Elleto y Weiss, 1985, Lessing, Schoenfeld, Amelar, Dubin y, 1985; Loumaye, De Cooman y Thomas, 1980; Essig, Schoenfeld, D'Elleto, Amelar, Dubin, Steinetz, O'Byme y Weiss, 1982; Weiss, Goldsmith, Schoenfeld y D'Elleto, 1986).

Como ya se mencionó anteriormente, la relaxina de coneja ya se purificó de placentas y se obtuvo con una buena bioactividad y buen rendimiento con la técnica de Fields y col. (1985), la cual incluye el sacrificio del animal y el suero no se utilizó como otra fuente más de relaxina. Por lo tanto, nosotros consideramos que es más accesible obtener la relaxina del suero, además de la placenta. Puesto que estos animales sí se pueden sacrificar, aún estando gestantes y así resolver el problema de conseguir los ovarios de cerdas gestantes, los cuales son muy difíciles de obtener porque los criadores no sacrifican sus animales en estas condiciones.

OBJETIVOS

1- Desarrollar un método para extraer y purificar la relaxina del suero de coneja preñada.

2.- Determinar su caracterización biológica por medio del bioensayo *in vitro* de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas.

3.- Estandarizar el bioensayo *in vivo* de la elongación del ligamento interpúbico.

**MATERIAL
Y
MÉTODO**

I.- OBTENCIÓN DE RELAXINA DEL SUERO DE CONEJA PREÑADA

Se procesaron 2 lotes de suero de coneja preñada por separado: uno de 126 ml (suero hemolizado) y el otro de 560 ml. El lote 1 se procesó de acuerdo a la técnica de Brenner y col. (1985), quienes a partir de suero de mujer embarazada, aplicaron una deslipidización, extracción y diálisis, para obtener un péptido semejante a la relaxina (Sn4). Con el fin de mejorar la bioactividad y el rendimiento, se realizaron algunas modificaciones para el lote 2, como son:

- 1) Siliconizar todo el material de vidrio del laboratorio, para que la relaxina no se adhiera a las paredes y evitar pérdidas de la hormona durante la purificación.
- 2) Aplicar el inhibidor de proteasas P.M.S.F. (fenilmetilsulfonilfluoruro) al 2 % (p/v).
- 3) Realizar todo el procedimiento a 4 °C.
- 4) Aplicar otro paso más de purificación por Sephadex G-50.

1.- RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Conejas adultas albinas Nueva Zelanda de 3-4 kg se cruzaron, considerando el día del coito como el día 0. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas, con ciclos luz-obscuridad 12-12 hrs, agua y alimento *ad libitum*. Entre los días 24 a 30 de gestación (periodo en el que la relaxina esta en su máxima concentración), se sangraron a blanco, bajo anestesia con 45 mg/kg de pentobarbital sódico y 40 mg/kg de clorhidrato de quetamina. La sangre total se centrifugó a 2000 g para separar el suero, el cual se congeló a -72 °C, hasta su uso.

2.- DESLIPIDIZACIÓN

El suero se descongeló y se aplicaron secuencialmente gota a gota 10 volúmenes de acetona, seguido de 10 volúmenes de hexano y luego se agregaron otros 10 volúmenes de acetona. Los disolventes se aspiraron del precipitado que se formó, después de mezclarse constantemente por 30 min. El precipitado obtenido (Pp0), se filtró en papel Whatman # 1 (se remojó previamente en albúmina bovina al 1 % de Sigma, St. Louis, M. O.) sobre un embudo Buchner y se dejó secar bajo la campana de extracción toda la noche. La albúmina bovina se utilizó para limitar la adsorción de relaxina al material de laboratorio. Una vez que el precipitado se secó, se molió utilizando un mortero frío y se obtuvo un polvo al que se le llamó precipitado 0 molido (Pp0 molido).

3.- EXTRACCIÓN

La relaxina se extrajo de este Pp0 molido, con una solución de HCl 0.1 N-acetona (v/v), se agregaron 4 ml de esta solución por cada gramo de polvo. Después de mezclar manualmente para deshacer los grumos, la mezcla ácido-acetona-Pp0-molido se colocó sobre un agitador automático por 10 min y se centrifugó por 60 min a 2,500 g. Se obtuvo un sobrenadante 1 (Sn1), el cual se almacenó a -20 °C toda la noche y se centrifugó por 60 min a 2,500 g. El sobrenadante 2 (Sn2) del lote 1 se evaporó lentamente a 1/10 su volumen, bajo campana

de extracción y baño María a 40 °C (no se contaba con un rotavapor). El Sn2 del lote2 se evaporó rápidamente con un rotavapor a 38 °C a 1/10 del volumen total. En seguida, se diluyó con agua desionizada y se liofilizó. El producto liofilizado, se mezcló con ácido acético glacial 0.01 N. Esta solución se centrifugó a 2500 g por 30 min. y se obtuvo un tercer sobrenadante (Sn3).

4.- DIÁLISIS

El Sn3 se colocó en una bolsa de diálisis con límite de exclusión de 3,500 d (se remojó previamente en albúmina bovina al 1 %) y se dializó contra ácido acético glacial 0.01 N. Después de la diálisis, la solución se centrifugó por 15 min a 1,200 g, obteniéndose un cuarto sobrenadante (Sn4) que se liofilizó y al que Brenner y col. denominaron péptido semejante a la relaxina.

A los Sn2's y Sn4's de ambos lotes, se les determinó la bioactividad con el bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas en ratona de 4 semanas de edad (Tabla III).

5.-PURIFICACION

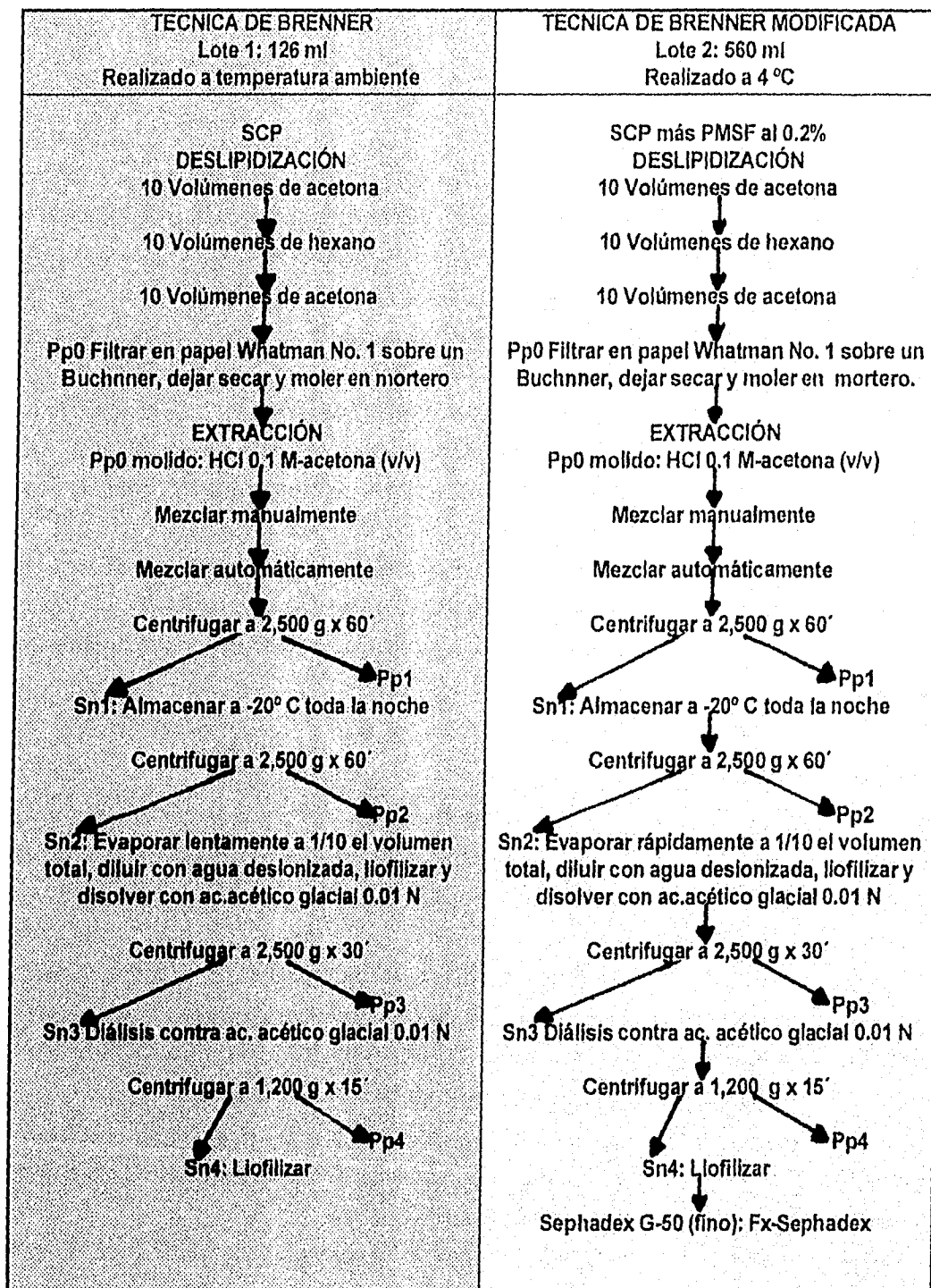
Cromatografía en Sephadex G-50 (fino)

Este paso de purificación solo se realizó para el Sn4 del lote 2. La insulina humana recombinante (Humulin P.M. 6,000 d) se utilizó como un estándar de peso molecular, puesto que es similar al de la relaxina de coneja (7,200 d). Primero se aplicó 1 ml (100 U.I.) de insulina, la cual se mezcló con 2 ml del amortiguador de corrida (acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8) y después de que se obtuvo su volumen de elución, la columna se lavó con el mismo amortiguador para aplicar el Sn4 (125 mg de proteína disuelto en 5 ml de amortiguador). La columna de Sephadex G-50-fino (Pharmacia; LKB Biotechnology, Piscaway, NJ) se equilibró con el mismo amortiguador, se colectaron fracciones de 3 ml y se desarrolló a un velocidad de flujo de 34 ml/hr con una bomba peristáltica.

La fracción en la que se detectó bioactividad de relaxina con el bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas, se liofilizó y se le denominó fracción Sephadex (Fx-Sephadex).

Para determinar el rendimiento de cada uno de los productos (Sn2, Sn4 y Fx-Sephadex) de ambos lotes, se realizó la cuantificación de proteínas según el método de Bradford (1974) con una curva patrón de albúmina sérica bovina y en concentraciones de 2-20 µg/ml (Bio Rad).

Resumen de los procedimientos para purificar relaxina del suero de coneja preñada de los lotes 1 y 2.



II.-BIOENSAYOS

1.- BIOENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LAS CONTRACCIONES UTERINAS ESPONTÁNEAS

A) Procedimiento

Este bioensayo se realizó de acuerdo a la técnica de Kroc y col. (1959). Se utilizaron ratonas BALB/c de 4 semanas de edad, las cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-obscuridad (12-12 hrs) y con alimento y agua *ad libitum*. En el día 0, se les inyectó subcutáneamente 5 µg de ciclopetilpropionato de estradiol (CPE) en 0.1 ml de aceite de cacahuete de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). En el día 7, se sacrificaron por desnucamiento y se disecó el útero (debe de estar hinchado, si no se descarta). Se cortó cada cuerno uterino, se quitaron los extremos y se dejó una tira de aproximadamente 1 cm de longitud. Los segmentos uterinos se colocaron en una cámara para tejidos aislados, la cual contenía 10 ml de solución Ringer. Esta solución estaba compuesta de (mM): NaCl 120; KCl 4.6; NaHCO₃ 20; KH₂PO₄ 1.2; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.5 y glucosa 11.5 (Lab. J. T. Baker, México). La solución se mantuvo a 37 °C, aerada con 5 % de CO₂ y 95 % de O₂ y con un pH de 7.4.

La actividad uterina se registró isométricamente con un transductor de tensión (FTO3 Grass) conectado a un polígrafo Beckman modelo R611. Los segmentos uterinos se sometieron a 1 gr de tensión y se estabilizaron durante 1 hr, para que se equilibraran las contracciones uterinas. Se realizaron lavados continuos con la solución Ringer.

B) Diseño experimental

Para detectar la bioactividad de la relaxina contenida en cada uno de los productos (**Sn2**, **Sn4** y **Fx-Sephadex**), se realizó de acuerdo al diseño experimental de la tabla III. Puede observarse que las dosis que se indican en esta tabla, se realizaron de acuerdo a Fields y col. (1985), para los productos que obtuvieron al purificar relaxina de placentas de conejas.

Por ejemplo, para la dosis alta de la Fx-Sephadex (4 µg/ml), se pesaron 40 µg, se disolvieron en 30 µl de agua desionizada y se aplicaron con una micropipeta a la cámara para tejidos aislados, la cual contenía 10 ml de solución Ringer. Por lo tanto, 40 µg/10 ml dieron una concentración final de 4 µg/ml; para la dosis media se pesaron 20 µg /10 ml de solución Ringer, dieron una concentración final de 2 µg/ml y para la dosis baja se pesaron 10 µg/10 ml de solución Ringer, dieron una concentración final de 1 µg/ml. De esta manera se realizó para las demás dosis del estándar (NIH-RNX-PI 3,000 GPU/mg) y de los demás productos que se indican en la tabla III. Para cada dosis se utilizaron 5 segmentos uterinos (n = 5).

El estándar de relaxina porcino o los productos se aplicaron después de un periodo control de 15 min y se dejó pasar otro periodo de prueba de otros 15 min para observar el efecto. La disminución de la frecuencia y/o

amplitud de las contracciones uterinas espontáneas durante el periodo de prueba, se comparó con el periodo control y así calcular el % de inhibición (Figura 7).

Tabla III. Dosis del estándar de relaxina porcino y de los productos obtenidos durante la purificación de RLX del SCP de los 2 lotes procesados, para determinar la bioactividad.

Producto	Lote 1 ($\mu\text{g prot./ml}$)	Lote 2 ($\mu\text{g prot./ml}$)
Si-RLX porcino		
Dosis baja	0.009	0.009
Dosis media	0.017	0.017
Dosis alta	0.033	0.033
Sn2 (exto ácido-acetona)		
Dosis baja	37.0	37.0
Dosis media	75.0	75.0
Dosis alta	150.0	150.0
Sn4 (producto de la diálisis)		
Dosis baja	8.0	8.0
Dosis media	16.0	16.0
Dosis alta	32.0	32.0
Fx-Sephadex		
Dosis baja	No se obtuvo	1.0
Dosis media		2.0
Dosis alta		4.0

C) Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con un programa manual (Figura 2) especial para calcular la bioactividad, diseñada por Alatorre F. S. (1976) de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Centro Médico Nacional del IMSS. La bioactividad se determinó con el 95 % de límites de confianza y un análisis de varianza de los contrastes para la fuente de variación, tratamientos, preparaciones, regresión, paralelismo, curvatura, curvatura opuesta y error experimental. Los cálculos se realizaron tomando en cuenta el porcentaje de inhibición de las contracciones uterinas espontáneas con ensayos balanceados 3 + 3 (dosis baja, media y alta). La bioactividad se expresó como GPU/mg de proteína (GPU/mg).

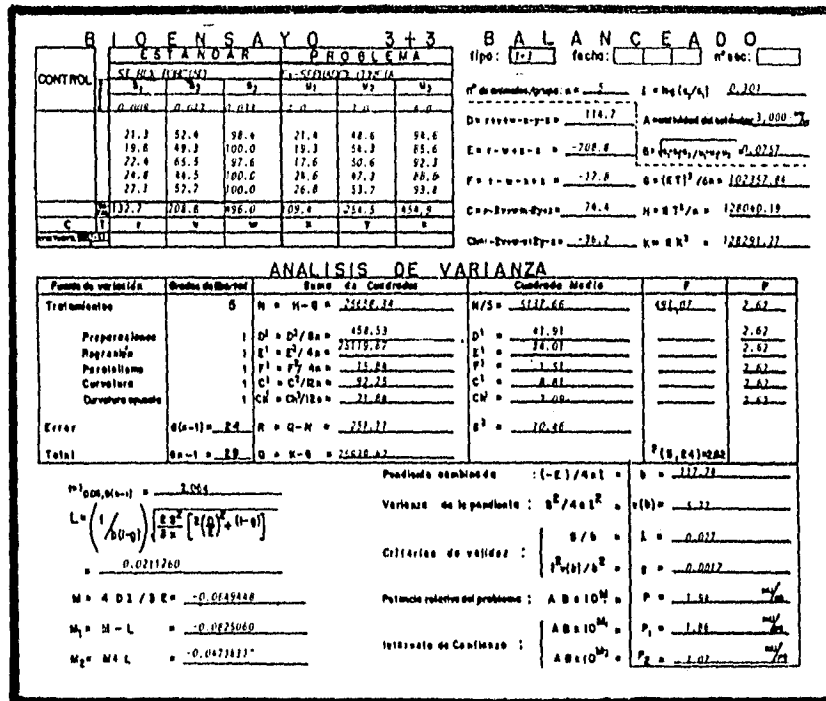


Figura 2. Análisis estadístico para determinar la bioactividad de las hormonas, diseñado por Alatorre (1976), para un ensayo 3 + 3 (dosis baja, media y alta).

2.- BIOENSAYO DE LA ELONGACIÓN DEL LIGAMENTO INTERPÚBICO

A) Procedimiento

Este bioensayo se realizó de acuerdo a la técnica de Steinetz y col. (1960). Se estandarizó con el SCP crudo y se representó como SCP (RLX). Un volumen de 0.1 ml representa 1 GPU de acuerdo a Mardner y col. (1944) y lo determinaron con el bioensayo de la palpación de la sínfisis púbica en la cobaya.

Se utilizaron ratonas BALB/c, las cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-obscuridad (12-12 hrs), alimento y agua *ad libitum*. Las ratonas se pesaron al inicio y final del experimento. En el día 0, se les inyectó subcutáneamente 5 µg de CPE disueltos en 0.1 ml aceite de cacahuete. En el día 7 se les inyectó subcutáneamente la substancia problema (ver diseños experimentales) y 18 hrs más tarde se sacrificaron con CO₂. Después se abrió la cavidad abdominal y los animales que no presentaban el útero hinchado (lo que indica que falló el tratamiento con estrógenos), se descartaron. Las áreas vulvar y anal se quitaron, mientras que la mitad superior del cuerpo se cortó, para evitar algún sangrado dentro del área pélvica. El canal pélvico se limpió de todos los tejidos hasta que se dejó expuesta la sínfisis del pubis. La pelvis se colocó sobre la platina de un microscopio estereoscópico, al cual se le adaptó una fuente de luz, que incidió directamente sobre el ligamento interpúbico, para dar un efecto de transluminación (Figura 3).

Con un micrómetro calibrado en uno de los oculares, se midió la distancia más corta entre los bordes del pubis. Las lecturas del micrómetro son convertidas a mm.

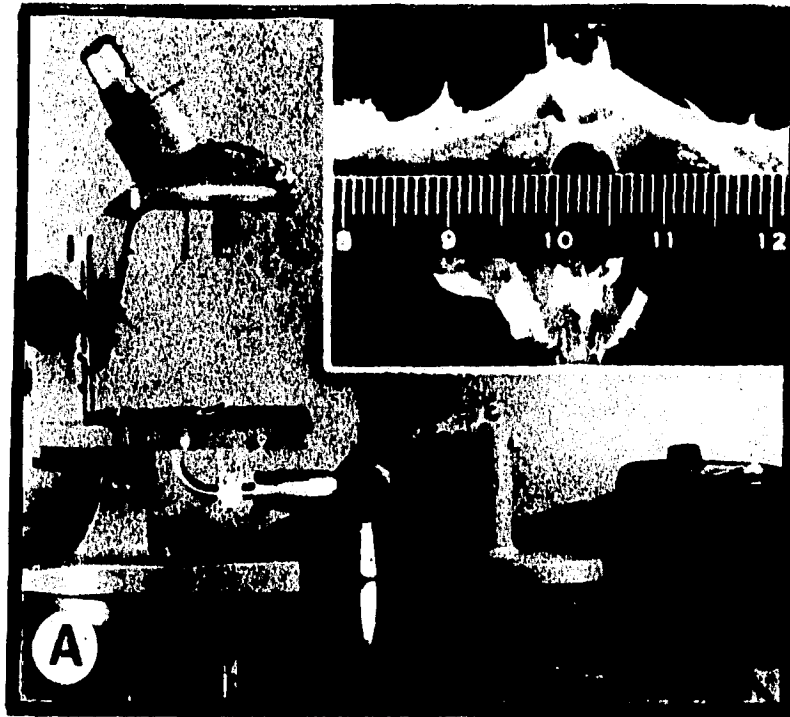


Figura 3. Equipo que se utilizó para bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico.

B) Diseño Experimental

a) Edad del animal

Dado que Steinetz y col. (1960) utilizaron ratonas inmaduras (púberes) que pesaban 19.0 ± 1 g, nosotros utilizamos ratonas de la cepa BALB/c de 9 semanas de edad (púberes), que es cuando alcanzan ese peso. Además decidimos trabajar con ratonas más jóvenes (4 y 6 semanas de edad, prepúberes), para comparar éste periodo, con las de 9 semanas de edad que ya son púberes. Para cada edad se realizaron los siguientes tratamientos:

- 1) Control: 0.1 ml de aceite de cacahuete.
- 2) SCP (RLX): 0.1 ml de aceite de cacahuete más 0.1 ml de SCP (RLX).
- 3) CPE: 5 μ g de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete.
- 4) CPE + SCP (RLX): 5 μ g de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete más 0.1 ml de SCP (RLX).

b) Reproducibilidad

Para determinar la reproducibilidad del bioensayo con SCP (RLX) + CPE en las ratonas de 4 semanas de edad, se realizaron otros dos experimentos bajo las mismas condiciones del inciso a, esto es:

- 1) Control: 0.1 ml de aceite de cacahuate.
- 2) SCP (RLX): 0.1 ml de aceite de cacahuate más 0.1 ml de SCP.
- 3) CPE: 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate.
- 4) CPE + SCP (RLX): 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate más 0.1 ml de SCP.

c) Sensibilidad

Para determinar la sensibilidad del bioensayo, se realizó en ratonas de 4 semanas de edad de acuerdo a los siguientes tratamientos:

- 1) Control: 0.1 ml de aceite de cacahuate.
- 2) CPE: 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate.
- 3) CPE + SCP (RLX): 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate más volúmenes crecientes de SCP (RLX) de 25, 50, 100, 200 y 400 µl.

Para cada volumen aplicado se tuvieron el grupo control, el grupo CPE y el grupo CPE + SCP (RLX).

d) Especificidad

Primero se comparó el efecto del SCP (RLX) con el efecto de la progesterona (P_4). La P_4 se utilizó porque también se encuentra en su máxima concentración durante la gestación, al igual que la relaxina. Se realizó en ratonas de 4 semanas de edad de acuerdo a los siguientes tratamientos:

- 1) Control: 0.1 ml de aceite de cacahuate.
- 2) CPE: 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate.
- 3) CPE + SCP (RLX): 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate más 0.1 ml de SCP.
- 4) CPE + P_4 : 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate más 3 mg de P_4 /0.1 ml de aceite de cacahuate.

La otra hormona que se aplicó fue la insulina, la cual es semejante en su estructura secundaria y terciaria a la relaxina. Se realizó en ratonas de 4 semanas de edad de acuerdo a los siguientes tratamientos:

- 1) Control: 0.1 ml de aceite de cacahuate.
- 2) CPE: 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate.
- 3) CPE + SCP (RLX): 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate más 0.1 ml de SCP.
- 4) CPE + I: 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuate más 15.1 mU de insulina humana recombinante.

La dosis de insulina de 15.1 mU, es la que puede soportar una ratona de esta cepa, sin que le provoque hipoglucemia.

C) Análisis estadístico

Con este bioensayo, se realizaron comparaciones entre los grupos experimentales, con el método estadístico de análisis de varianza (ANOVA), acoplado a la prueba de Duncan para comparaciones múltiples.

RESULTADOS

I.- PURIFICACIÓN DE LA RELAXINA DEL SUERO DE CONEJA PREÑADA

1.- LOTE 1 DE SUERO DE CONEJA PREÑADA

A) Obtención de relaxina

Los rendimientos de los productos obtenidos en el lote 1, se presentan en la tabla IV. El sobrenadante 2 (Sn2) que es un extracto ácido-acetona, contenía 238.1 mg de proteína total (15.4 %), mientras que el sobrenadante 4 (Sn4), producto de la diálisis contra ácido acético glacial, contenía un total de 17.7 mg de proteína (1.1 %).

Tabla IV. Rendimiento de proteína y la bioactividad de los productos obtenidos durante la purificación de relaxina del SCP del lote 1 (126 ml), de acuerdo a la técnica original de Brenner y col. (1985)

Producto	Recuperación (mg/ml de suero)	Rendimiento (mg totales)	% de recuperación	Bioactividad (GPU/mg)	Recuperación (GPU totales)
Suero	12.3	1549.8	100.0	-	-
Sn2	1.9	238.1	15.4	No detectable	No detectable
Sn4	0.14	17.7	1.1	0.15	2.6

B) Caracterización biológica

El Sn2 (extracto ácido-acetona), no provocó inhibición de las contracciones uterinas espontáneas en dosis de hasta 150 µg/ml, mientras que con el Sn4 (producto de la diálisis), si provocó una inhibición del 44.9 ± 3.1 % con una dosis de hasta 32.0 µg/ml y la bioactividad fue de 0.15 GPU/mg. El efecto inhibitorio del estándar de relaxina fue del 97.7 % con una dosis de 0.033 µg/ml como se puede observar en la figura 4.

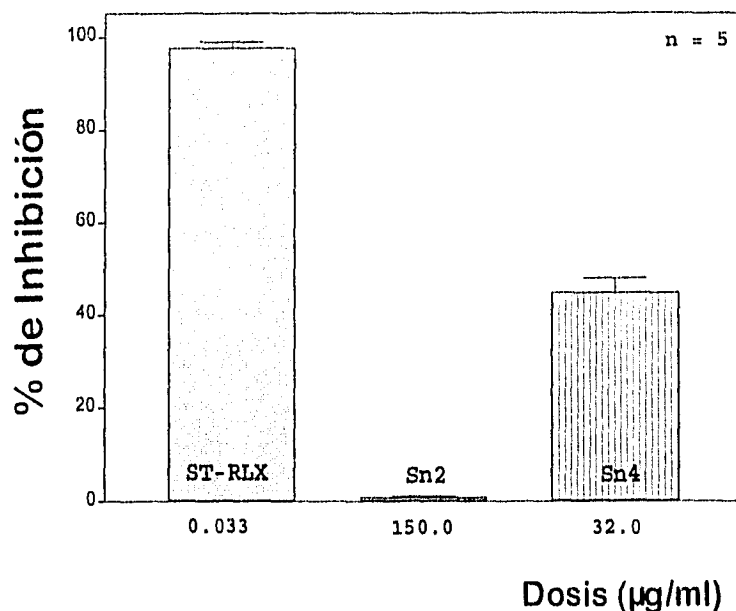


Figura 4. Inhibición de las contracciones uterinas espontáneas provocada por el St-RLX (3,000 GPU/mg) y por los productos obtenidos durante la purificación de relaxina del SCP del lote 1. Dosis: St-RLX- 0.033 µg/ml; Sn2 150 µg/ml y Sn4 32 µg/ml.

2.- LOTE 2 DE SUERO DE CONEJA PREÑADA

A) Obtención de relaxina

Con el producto ácido-acetona (Sn2) se obtuvo un rendimiento de 2054.7 mg (40 %) de proteína, mientras que con producto de la diálisis con ácido acético glacial (Sn4) el rendimiento fue de 125 mg (2.4 %) de proteína total. El producto bioactivo (fracciones 51-70) obtenido de la cromatografía en Sephadex G-50 contenía, 4.4 mg (0.01 %) de proteína total (Tabla V).

Tabla V.. Rendimiento de proteína y bioactividad de los productos obtenidos durante la purificación de relaxina del SCP del lote 2 (560 ml) de acuerdo a la técnica de Brenner y col. (1985), modificada.

Muestra	Rendimiento (mg/ml de suero)	Recuperación (mg totales)	% de recuperación	Bioactividad (GPU/mg)	Recuperación (GPU totales)
St-RLX	9.2	6138.7	100.0	-	-
Sn2	3.7	2054.7	40.0	No detectable	No detectable
Sn4	0.22	125.0	2.4	0.3	37.5
Fx-Sephadex	0.01	4.4	0.1	1.9	8.4

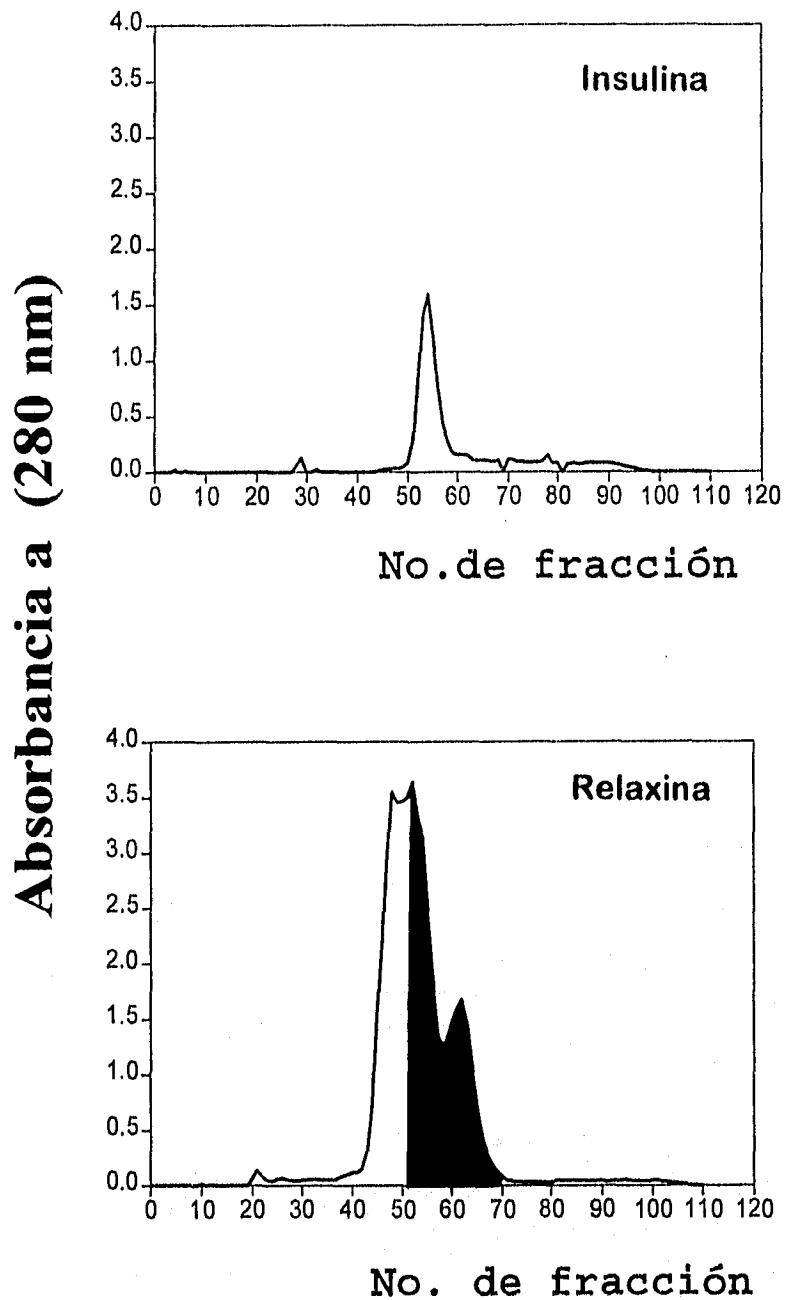


Figura 5. Cromatografía de filtración en gel de la Insulina y el Sn4 en una columna de 4.0 x 60 cm de Sephadex G-50 (fino). La columna fue equilibrada con acetato de amonio 0.1 M, pH 6.8. Se colectaron fracciones de 3 ml a una velocidad de flujo de 34 ml/hr. El área sombreada señala la fracción que contiene relaxina (P. M. 7,200) y fue bioactiva en el bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas y su comparación con el perfil de elución de la Insulina. Primero se aplicó 1 ml de Insulina y después los 120 mg de proteína del Sn4.

De todo el perfil de elución que se obtuvo con la cromatografía en Sephadex G-50 (fino), solo se detectó inhibición de las contracciones uterinas espontáneas con las fracciones 51 a 70, las cuales coinciden en parte con el perfil de elución de la insulina (fracciones 50-60) como se puede observar en la figura 5.

2.- Caracterización biológica

El extracto ácido-acetona (Sn2), no fue bioactivo ni aun con la dosis alta de 150 µg/ml (Figura 6). Con el Sn4 se detectó una inhibición de las contracciones uterinas espontáneas del 90.0 ± 1.31 % con la dosis alta de 32.0 µg /ml y una bioactividad de 0.3 GPU/mg de proteína. Con la Fx-Sephadex se provocó una inhibición del 90.1 ± 3.8 % con una dosis alta de 4 µg /ml y se determinó una bioactividad de 1.9 GPU/mg de proteína. Con el estándar de relaxina porcino (3,000 GPU/mg) la inhibición fue del 99.2 ± 2.1 % con una dosis alta de 0.033 µg/ml (Figura 6).

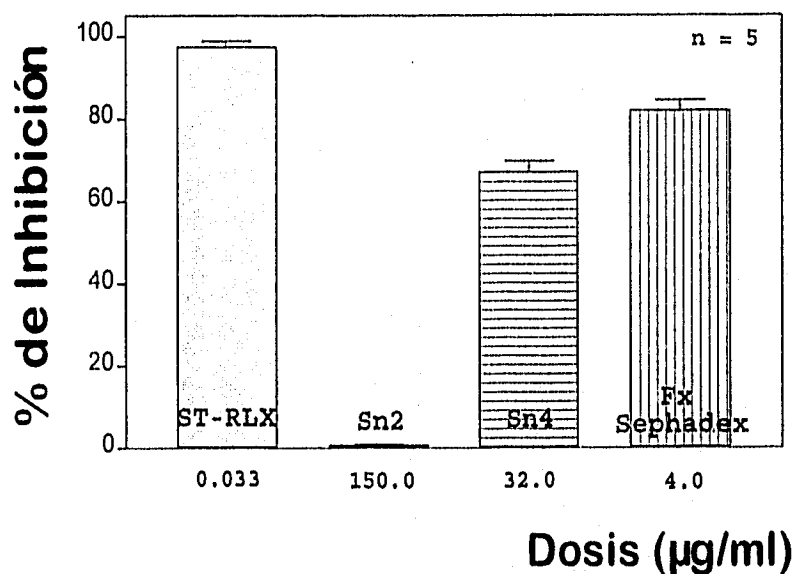


Figura 6. Efecto Inhibitorio de las contracciones uterinas espontáneas por el St-RLX (3,000 GPU/mg) y los productos obtenidos durante la purificación de relaxina del SCP del lote 2. Dosis: St-RLX- 0.033 µg/ml; Sn2 150 µg/ml; Sn4 32 µg/ml y Fx Sephadex 4 µg/ml.

Se trató de realizar la caracterización fisicoquímica de cada uno de los productos, pero desafortunadamente no se logró estandarizar la técnica de electroforesis, especial para péptidos pequeños.

II.-BIOENSAYOS

1.- BIOENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LAS CONTRACCIONES UTERINAS ESPONTÁNEAS

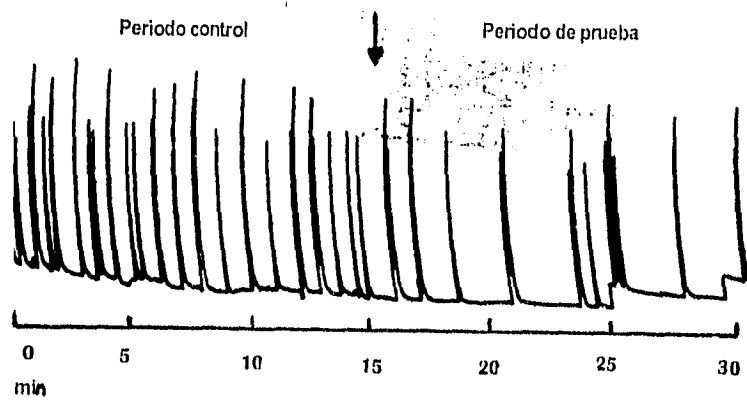
Parte de los resultados de este bioensayo, ya se mostraron en la parte de la caracterización biológica en donde solo se representa el efecto causado por las dosis altas del estándar y de los productos, porque con estas dosis se provocó el mayor efecto inhibitorio (Tablas IV, V y VII y Figuras 4 y 6).

En la tabla VII se muestran los porcentajes de inhibición provocados por las dosis baja, media y alta del estándar, de los Sn4's y de la Fx-Sephadex.

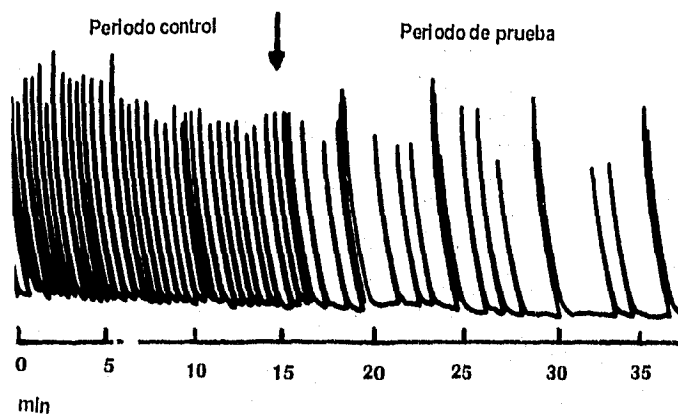
Tabla VII. Porcentaje de inhibición de las contracciones uterinas espontáneas, provocado por el estándar de relaxina porcino, el Sn4 y la Fx-Sephadex.

Producto	(µg prot./ml)		% de inhibición	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
ST-RLX porcino				
Dosis baja	0.009	0.009	24.7 ± 2.2	26.5 ± 1.2
Dosis media	0.017	0.017	51.1 ± 2.2	62.1 ± 2.4
Dosis alta	0.033	0.033	97.7 ± 1.1	99.2 ± 0.5
Sn4 (producto de la diálisis)				
Dosis baja	8.0	8.0	15.2 ± 1.1	21.6 ± 1.5
Dosis media	16.0	16.0	29.9 ± 1.7	62.5 ± 2.3
Dosis alta	32.0	32.0	45.3 ± 2.3	90.0 ± 1.5
Fx-Sephadex				
Dosis baja	-	1.0	-	21.8 ± 1.7
Dosis media	-	2.0	-	50.9 ± 1.4
Dosis alta	-	4.0	-	90.9 ± 1.7

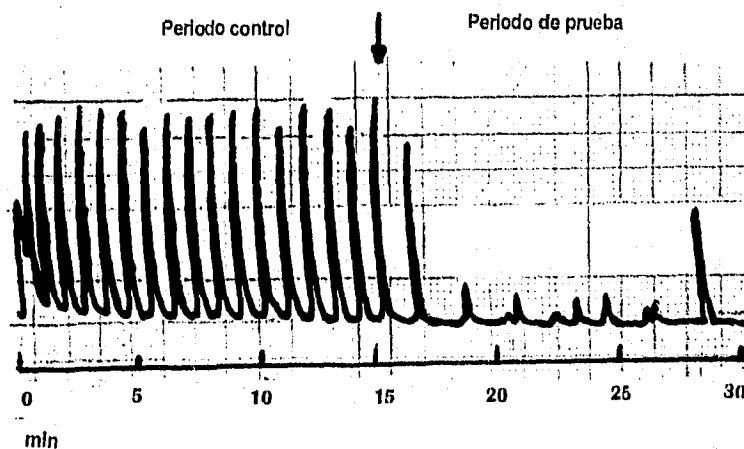
En la figura 7 se puede observar un ejemplo de la actividad contractil de segmentos uterinos de ratonas de 4 semanas de edad (previamente sensibilizadas con 5 µg de CPE), así como el efecto inhibitorio causado por las dosis baja (1.0 µg), media (2.0 µg) y alta (4.0 µg) de la Fx-Sephadex del lote 2.



DOSIS BAJA: 1.0 µg/ml provocaron una inhibición del $21.8 \pm 1.7\%$.



DOSIS MEDIA: 2.0 µg/ml provocaron una inhibición del $60.9 \pm 1.4\%$



DOSIS ALTA 4.0 µg/ml provocaron una inhibición del $90.9 \pm 1.7\%$

Figura 7. Actividad contráctil de segmentos uterinos de ratonas de 4 semanas de edad, previamente sensibilizadas con 5 µg de CPE. Se puede observar el efecto inhibitorio, causado por las dosis baja (1.0 µg/ml), media (2.0 µg/ml) y alta (4.0 µg/ml) de la Fx-Sephadex del lote 2.

Con el Sn2 (extracto ácido-acetona) de ambos lotes, no se provocó inhibición de las contracciones uterinas espontáneas, si no al contrario, las estimuló como puede observarse en la figura 8. Este efecto estimulador se observó con las dosis baja, media y alta.

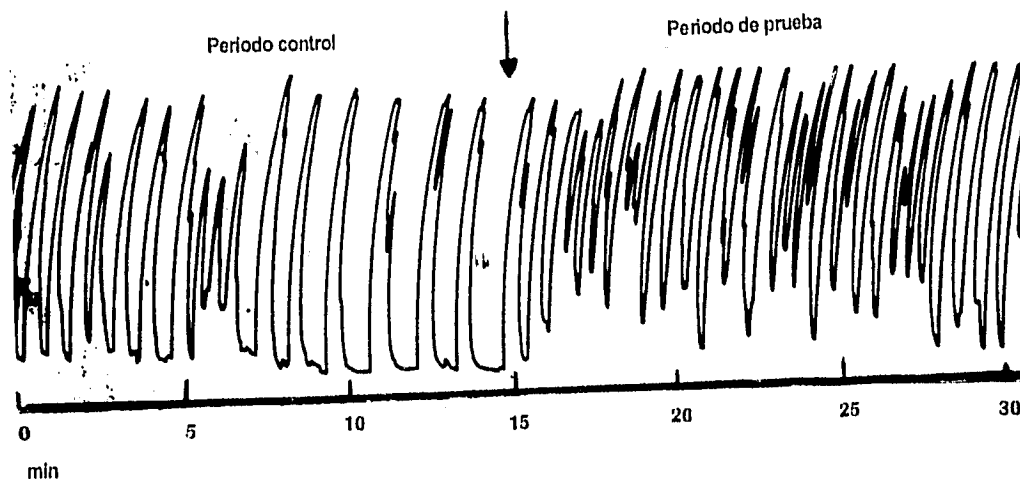


Figura 8. Actividad contráctil se un segmento uterino de ratona de 4 semanas de edad, previamente sensibilizada con 5 µg de CPE y el efecto estimuladorlo provocado por 150 µg /ml del Sn2.

2.-BIOENSAYO DE LA ELONGACIÓN DEL LIGAMENTO INTERPÚBICO

A) Edad del animal

En la tabla VIII se muestran los pesos inicial y final de las ratonas de 4 , 6 y 9 semanas de edad. Se puede observar que las ratonas de 4 semanas de edad fueron las que ganaron más peso durante el experimento (aprox. 3 g), en comparación a las ratonas de 6 y 9 semanas de edad que solo ganaron 1 g de peso aproximadamente.

Tabla VIII. Peso corporal de las ratonas al inicio (día 0) y final (día 7) del experimento-

Edad (semanas)	Peso inicial (día 0) (g)	Peso final (día 7) (g)
4	12.6 ± 1.4	15.6 ± 1.5
6	16.8 ± 0.6	18.2 ± 0.9
9	19.5 ± 0.7	20.6 ± 0.9

La comparación más importante que se realizó, fue entre el grupo tratado con CPE y el tratado con CPE + SCP (RLX): Se observó que las ratonas de 4 semanas de edad, tratadas con CPE + SCP (RLX), mostraron la mayor longitud (1.13 ± 0.06 mm) del ligamento en comparación a:

- 1) Al grupo control (0.25 ± 0.05 mm), al grupo SCP (RLX) (0.30 ± 0.05 mm) y al grupo CPE (0.60 ± 0.06 mm).
- 2) A las ratonas de 6 semanas de edad, en las cuales no hubo ninguna diferencia significativa entre el grupo tratado con CPE (0.92 ± 0.11 mm) y el grupo tratado con CPE + SCP (RLX) (1.02 ± 0.19 mm) y
- 3) A las ratonas de 9 semanas de edad, en las cuales no se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos experimentales (Figura 9).

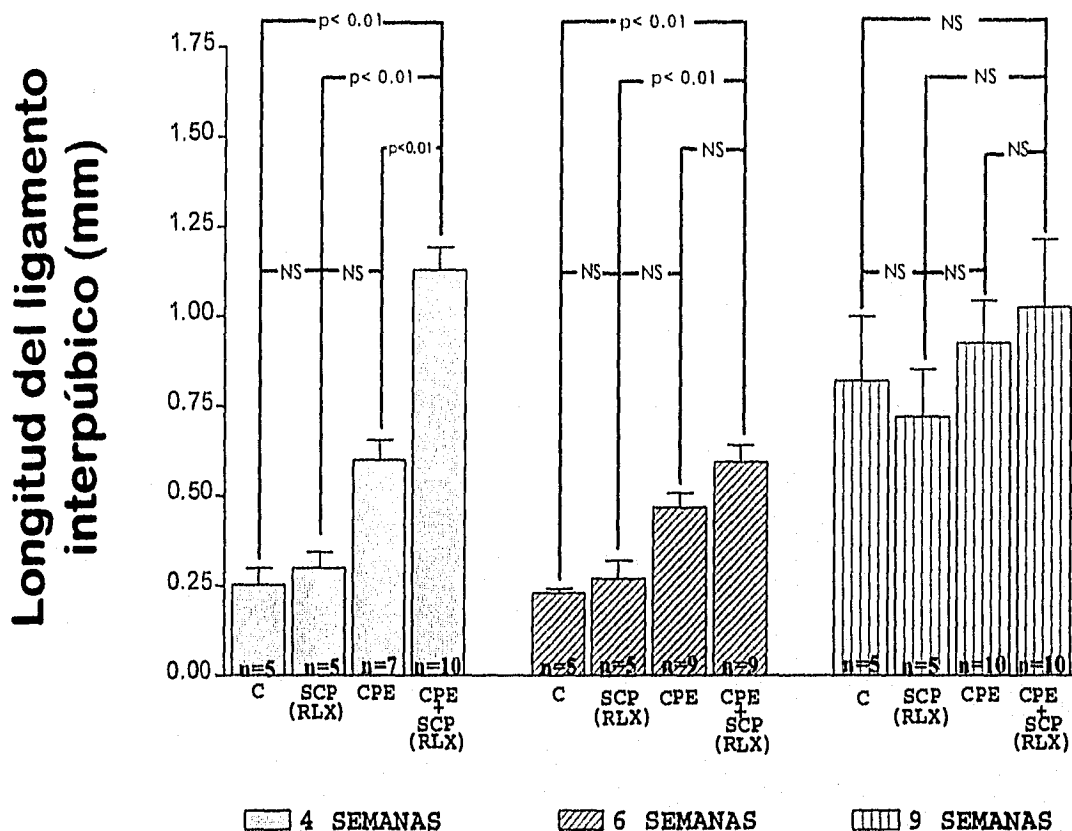


Figura 9. Efecto del SCP (RLX) sobre el ligamento interpúbico en ratonas de 4 (prepuber), 6 (prepuber) y 9 (puber) de edad. C: grupo control tratado con 0.1 ml de aceite de cacahuete, SCP (RLX): grupo tratado con 0.1 ml de aceite de cacahuete más 0.1 ml de SCP (RLX), CPE: grupo tratado con 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete y CPE + SCP (RLX): grupo tratado con 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete más 0.1 ml de SCP (RLX).

B) Reproducibilidad

Como se demostró que a las 4 semanas de edad, se obtiene el mejor efecto del tratamiento de CPE + SCP (RLX), sobre la elongación del ligamento interpúbico en comparación al grupo tratado solo con CPE, se realizaron otros dos experimentos similares para demostrar la reproducibilidad de tal efecto.

Las longitudes del ligamento (1.13 ± 0.06 mm, 1.03 ± 0.06 y 1.0 ± 0.06 mm) interpúbico en los tres experimentos fueron muy semejantes en los grupos tratados con CPE + SCP (RLX) y fueron significativamente diferentes de los grupos control, de los grupos SCP (RLX) y de los grupos CPE (Figura 10).

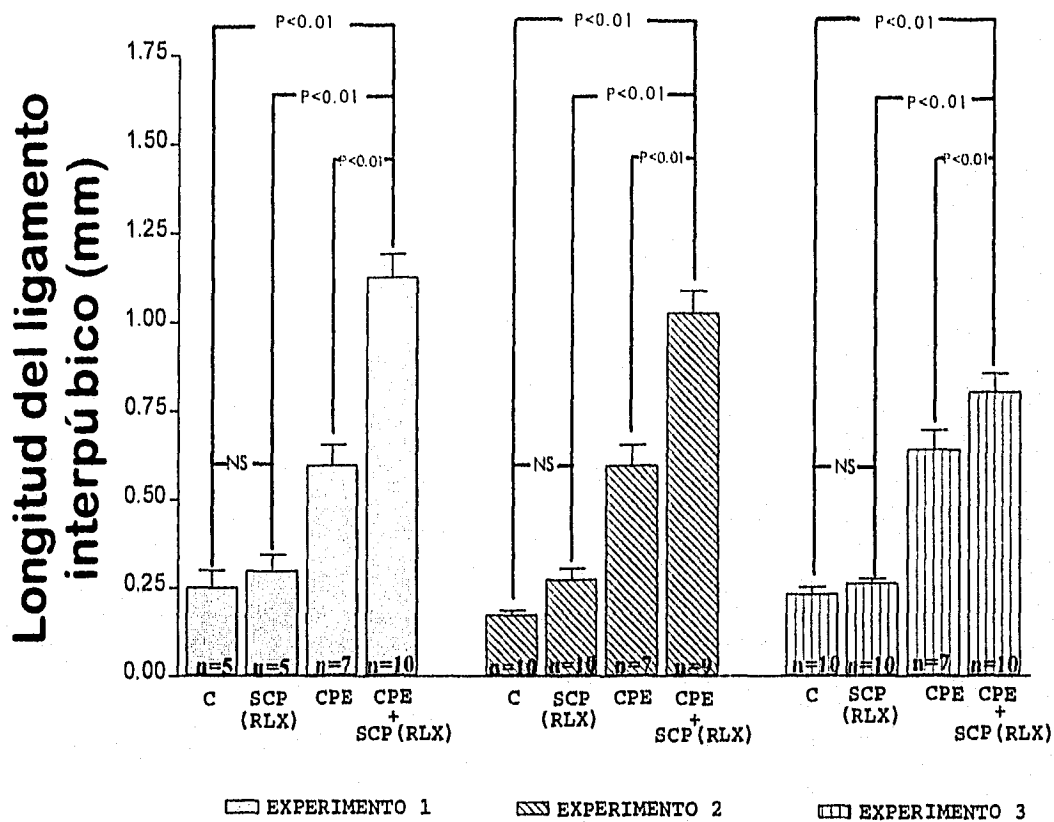


Figura 10. Reproducibilidad del efecto de 0.1 ml de SCP (RLX) sobre el ligamento Interpúbico en ratonas de 4 semanas edad.

C) Sensibilidad

La relaxina contenida en el SCP, induce la elongación del ligamento interpúbico y el efecto es dependiente del volumen aplicado. Este efecto es significativamente diferente desde los 50 μ l hasta los 200 μ l. El ligamento interpúbico midió como sigue: con 50 μ l 0.89 ± 0.09 , con 100 μ l 1.13 ± 0.06 , con 200 μ l 1.55 ± 0.13 mm y con 400 μ l 1.59 ± 0.20 mm (con las dos últimas dosis no hubo diferencia significativa entre sí). Con la dosis de 25 μ l (0.57 ± 0.06 mm) no hubo diferencia significativa en comparación al grupo tratado solo con CPE (Figura 11).

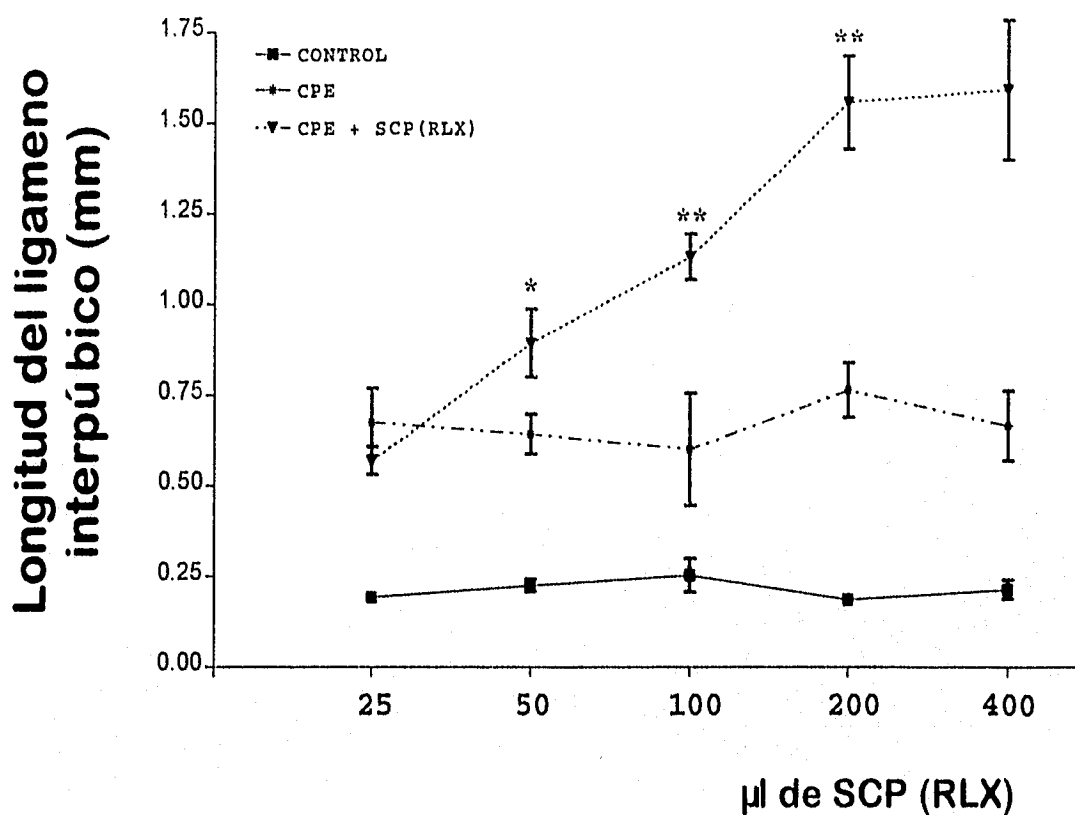


Figura 11. Efecto de volúmenes crecientes de SCP (RLX) 25, 50, 100, 200 y 400 μ l, sobre la elongación del ligamento interpúbico en ratonas de 4 semanas de edad previamente sensibilizadas con 5 μ g de CPE. Los asteriscos indican que sí hay diferencia significativa entre el grupo tratado con SCP (RLX) + CPE y los grupos control y el tratado solo con estrógenos.

D) Especificidad

Al comparar el efecto de la relaxina con el de la progesterona, se observó que la longitud del ligamento interpúbico en el grupo tratado con CPE + SCP (RLX) midió 1.13 ± 0.06 mm (significativamente diferente respecto a los demás grupos), mientras que en el grupo tratado con CPE + P₄, el ligamento midió 0.52 ± 0.06 mm, el cual fue significativamente diferente al del grupo tratado con CPE (0.7 ± 0.05 mm) (Figura 12).

Al comparar el efecto de la relaxina con el de la insulina sobre el ligamento interpúbico, se observó que en el grupo tratado con CPE + I, el ligamento midió 0.66 ± 0.09 mm, el cual es muy semejante al del grupo tratado solo con CPE (0.66 ± 0.06). En cambio en el grupo tratado con CPE + SCP (RLX) el ligamento midió 1.01 ± 0.06 mm (Figura 12).

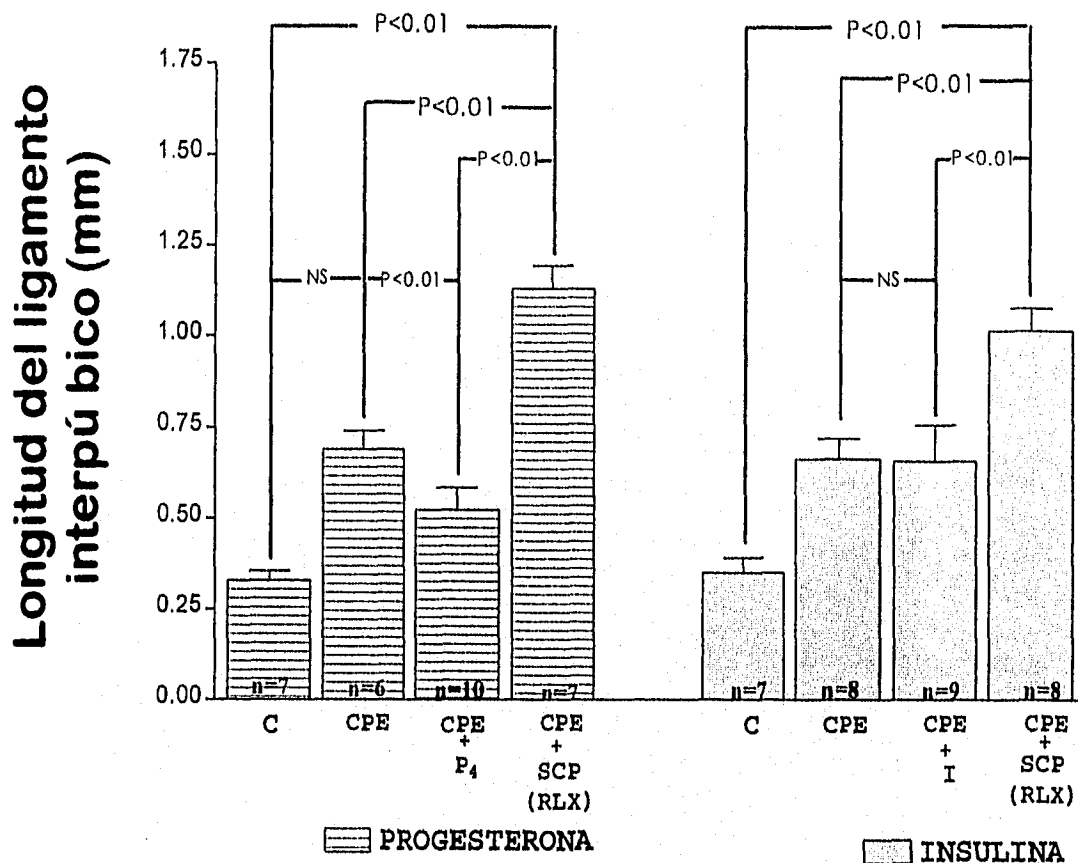


Figura 12. Efecto del SCP (RLX), Progesterona e insulina sobre el ligamento interpúbico en ratonas de 4 semanas de edad, previamente sensibilizadas con 5 µg de CPE. C: grupo control; CPE: grupo tratado con 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete, CPE + P₄: grupo tratado con 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete más 3 mg de progesterona/0.1 ml de aceite de cacahuete y CPE + I: grupo tratado con 5 µg de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete más 16.1 mU de insulina y CPE + RLX: grupo tratado con 5 µg de CPE/0.1 ml aceite de cacahuete más 0.1 ml de SCP (RLX).

En la figura 13, se puede observar la cintura pélvica y sínfisis púbica de una ratona de 4 semanas de edad: control (tratada solo con 0.1 ml de aceite de cacahuete), de ratona tratada con 5 μ g de CPE y de ratona tratada con 5 μ g de CPE más 0.1 ml de SCP (RLX).

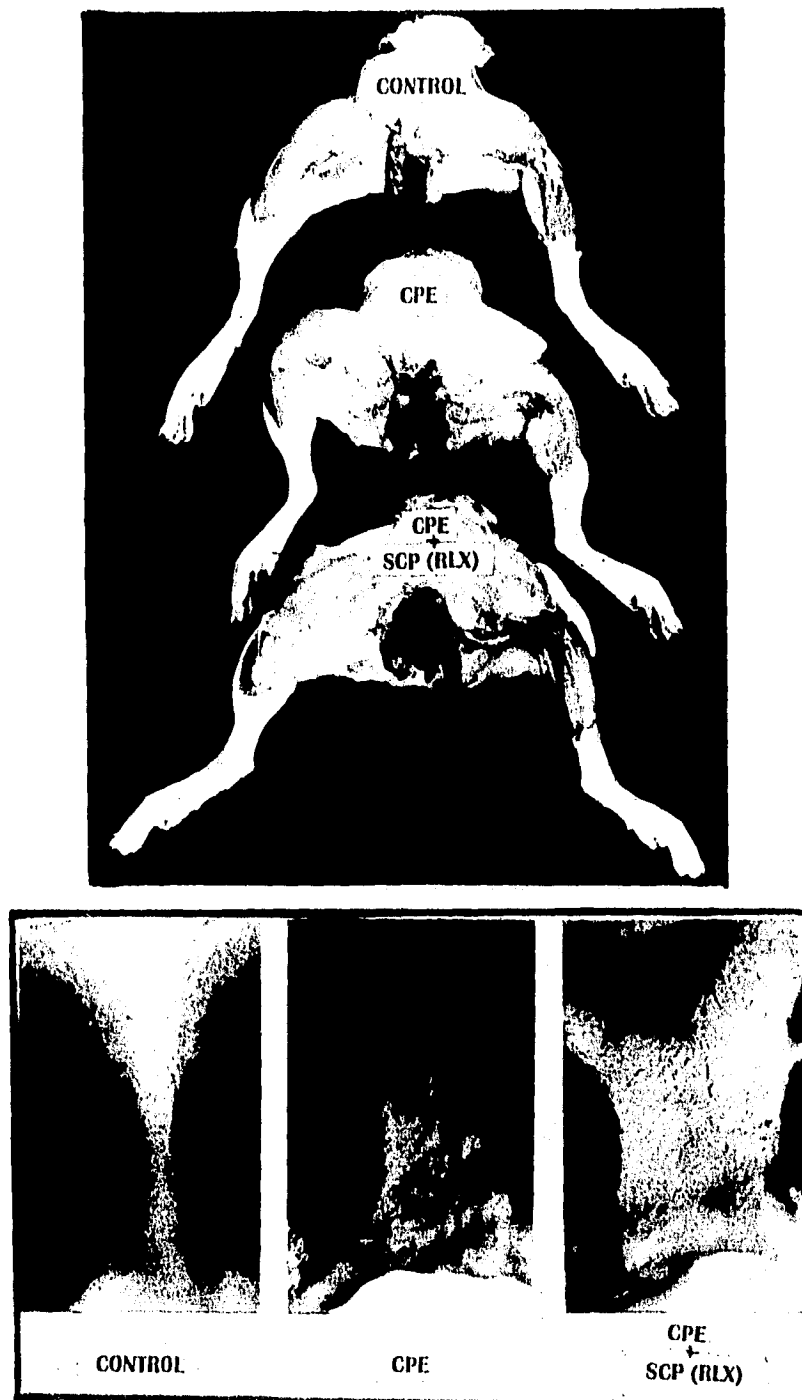


Figura 13. Fotografía superior: Cintura pélvica de ratona de 4 semanas de edad. Control, ratona tratada con 0.1 ml de aceite de cacahuete, ratona tratada con 5 μ g de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete y ratona tratada con 5 μ g de CPE/0.1 ml de aceite de cacahuete, más 0.1 ml de SCP (RLX). Fotografía inferior sínfisis púbica aumentada a 10 X.

DISCUSIÓN

I.- PURIFICACIÓN

A pesar de que la relaxina en el suero de coneja preñada presenta la mayor bioactividad (10 GPU/ml) de todas las especies estudiadas, solo se habían aplicado técnicas para concentrar la hormona. Como por ejemplo Mardner y col. en 1944, quienes solo trataron el suero con tolueno y luego lo aplicaron al bioensayo de la palpación de la sínfisis púbica en cobayas para determinar la bioactividad de relaxina durante la gestación en las conejas. Por otro lado Cohen y Steinetz en 1966, sometieron el suero a liofilización, seguido del tratamiento con ácido acético glacial, luego se llevó a 70 °C y después se precipitó la hormona con acetona. El ácido acético glacial, se utilizó para disociar la relaxina circulante de su proteína acarreadora, la cual al parecer no tiene efecto sobre la actividad biológica, pero sí sobre la actividad inmunológica (Steinetz, Beach y Kroc, 1969).

La relaxina generalmente se ha purificado de diversos tejidos (ovarios, placenta, endometrio, decidua etc.) en varias especies y solo se ha purificado parcialmente de líquidos biológicos como: el plasma seminal del hombre y el suero de mujer preñada (Essing y col., 1982; Brenner y col., 1985). Esto se debe a su baja concentración (de 900 ng/ml en el plasma de mujer embarazada) y a su baja bioactividad (de 0.001 GPU/ml en el plasma de mujer) (Schwabe, Steinetz, Weiss, Segaloff, McDonald, O'Byrne, Hochman, Carriere y Goldsmith 1978; Bryant-Greenwood y col., 1994).

La técnica de Brenner y col. (1985) consiste de una deslipidización, extracción ácido-acetona y diálisis contra ácido acético glacial, con cual obtuvieron 40.3 ng (determinados por RIA heterólogo) de un péptido semejante a relaxina (Sn4), a partir de 850 ml de suero de mujer embarazada. Este péptido inhibió el 60 % de la amplitud de las contracciones uterinas espontáneas del útero de rata adulta con una dosis de 8 ng/ml, en comparación al estándar de relaxina porcino (NIH RLX-1-460 GPU/mg), el cual inhibió el 85 %, con una dosis de 8.3 ng/ml. Solo que no podemos comparar estas dosis, con las que se aplicaron en nuestros experimentos, debido a que solo determinamos bioactividad.

Cuando Essing y col. (1982), purificaron relaxina del plasma seminal humano obtuvieron 1.85 µg de relaxina en 25.2 mg de proteína (a partir de 9 litros) solo fue suficiente para utilizarla como inmunógeno. Este protocolo de purificación ha resultado en una purificación de alrededor de 1000 veces mejor, pero con bajos rendimientos. Además este método requiere de varios litros de plasma seminal o de suero, por lo que esta purificación a granel resulta en rendimientos más bajos que el micrométodo utilizado por Brenner y col. (1985) para purificar la relaxina del suero de mujer embarazada.

Essing y col. (1986), recomiendan algunas estrategias para disminuir pérdidas durante el procedimiento, estas incluyen:

- 1) El almacenamiento de la relaxina en soluciones fuertemente ácidas.
- 2) La siliconización del material de vidrio de laboratorio para disminuir la adherencia de la hormona, ya que la relaxina es un péptido hidrofóbico que se pega fuertemente a este material, así como a otras proteínas y
- 3) Evitar la filtración y secado de la relaxina, es mejor que se mantenga en solución.

Estos investigadores, filtraron relaxina de cerda sobre un filtro Millex M.G. (una membrana hidrofílica de polivinilideno difluoruro) contenido en un soporte desechable de poliestireno. Primero filtraron relaxina porcina y este filtro permitió el libre paso sin pérdida de la hormona. Sin embargo, cuando se filtró relaxina humana se retuvo el 75 % de la hormona y no fue posible eluirlo por ninguna técnica.

Es importante que obtengamos la hormona con buenos rendimientos y con buena bioactividad, puesto que se requiere para la aplicación clínica veterinaria. Para el lote 1 se aplicó la técnica de Brenner y col. (1985) original, pero debido a que con el producto final (**Sn4**) se obtuvo una baja bioactividad (0.15 GPU/mg) aunque con un buen rendimiento (17.7 mg de proteína total-1.1%), decidimos procesar el lote 2, modificando la técnica original, para aumentar la bioactividad y el rendimiento de la hormona. Estas modificaciones fueron las siguientes:

- 1) Aplicar un inhibidor de proteasas (P.M.S.F).
- 2) Siliconizar todo el material de vidrio.
- 3) Realizar todo el procedimiento a 4 °C y
- 4) Aplicar otro paso más de purificación con cromatografía en Sephadex G-50).

En la tabla X se muestran los rendimientos, las bioactividades y los %'s de inhibición de los **Sn4**'s y de la **Fx-Sephadex**. De acuerdo a estas modificaciones se observó lo siguiente:

- 1) La bioactividad del **Sn4** del lote 2 aumentó al doble: de 0.15 GPU/mg en el lote 1 a 0.3 GPU/mg en el lote 2.
- 2) El rendimiento aumentó también al doble: de 1.1 % para el lote 1 y de 2.4 % para el lote 2.
- 3) La inhibición de las contracciones uterinas espontáneas también se mejoró: en el **Sn4** del lote 1 fue de 44.9 % y en el lote 2 fue del 90 %.
- 4) La bioactividad del **Sn4** lote 2 mejoró 6.3 veces, después de pasar por la cromatografía en Sephadex G-50, esto es: de 0.3 GPU/mg del **Sn4** a 1.9 GPU/mg de la **Fx-Sephadex**, solo que el rendimiento de proteína fue muy bajo (4.4 mg-0.01%).

En ninguno de los dos lotes se detectó bioactividad con los extractos ácido-acetona (**Sn2**) en el bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas. Más bien tuvieron un efecto estimulador (Figura 8), lo cual coincide con los datos de Brenner y col. (1985), quienes suponen que quizás se deba a alguna sustancia que supera la acción inhibitoria de la relaxina. Estas moléculas deben de tener un peso molecular pequeño (como podrían ser la oxitocina o prostaglandinas), puesto que son eliminadas del **Sn2** por la diálisis (bolsa con límite de exclusión de 3,500 d), de tal manera que con el **Sn4** sí se detectó bioactividad en ambos lotes. Fields y col, 1982, tampoco detectaron bioactividad con el **Sn2** (extracto ácido-acetona), al purificar relaxina de placentas de coneja, encontraron un factor que causó contracciones tetánicas (no determinaron su naturaleza química). Sin embargo, su presencia en los extractos ácido-acetona, interfiere con los bajos niveles de relaxina así como con la bioactividad. Para eliminar este factor, estos investigadores aplicaron cromatografía en Sephadex G-50.

El hecho de no haber aplicado inhibidores de proteasas al lote 1, quizás sea una de las razones para explicar porque con el **Sn4** del lote 2, se obtuvo una bioactividad del doble, en comparación a la obtenida en el **Sn4** del lote 1, además de haberlo realizado a 4 °C. Las temperaturas bajas también contribuyen a evitar la degradación de las proteínas. Aunque Sherwood en 1974, demostró que las carboxipeptidasas y aminopeptidasas, no afectaron la

actividad biológica de la relaxina porcina a pesar de perder parte de su extremo carboxiterminal. Posteriormente Fields y col. (1982) demostraron que se afecta tanto la bioactividad como el punto isoelectrico: al purificar por primera vez relaxina de placentas de conejas preñada, no utilizaron inhibidores de proteasas y determinaron, que presentaba un p. I. de 10.1 y una bioactividad de 15.1 GPU/mg. En una purificación posterior (1985), que

Tabla IX. Comparación entre la recuperación (rendimiento) de proteína, la bioactividad y el efecto inhibitorio de los productos obtenidos de los lotes 1 y 2 de SCP.

Producto	% Recuperación		Bioactividad (GPU/mg)		Efecto inhibitorio (%)	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
	Suero	100.0	100.0	-	-	-
Sn1	15.4	40.0	No detectable	No detectable	No detectable	No detectable
Sn4	1.1	2.4	0.15	0.3	44.9	90.0
Fx-Sephadex	-	0.01	-	1.9	-	90.1

consistió de una extracción ácida, seguida de cromatografía en Sephadex G-50, después cromatografía en carboximetilcelulosa y finalmente se pasó por Sepharosa, además utilizaron inhibidores de proteasas, entonces el punto isoelectrico fue de 6.8 y la bioactividad mejoró a 23 GPU/mg. El p.I. cambio, porque al no utilizar inhibidores de proteasas se provoca que haya pérdidas de aminoácidos de alguno de los extremos.

Otra causa que pudo haber contribuido a que se obtuviera una bioactividad baja en el Sn4 del lote, fue la hemolisis que sufrió el suero durante su obtención: La hemolisis provoca la degradación las proteínas del suero.

Al aplicar un paso de purificación, como lo es la cromatografía en Sephadex G-50 (con este paso se seleccionan moléculas de entre 1,500 a 30,000 d) se logró mejorar 6.3 veces la bioactividad del producto final (**Fx-Sephadex**) en el lote 2. Por lo que consideramos que la técnica de Brenner y col. (1985) que consiste solo de una deslipidación, una extracción y una diálisis, no son pasos suficientes para obtener una hormona pura, sino que deben de aplicarse pasos de purificación más selectivos como lo serían las diferentes cromatografías.

Por otro lado, la insulina y la relaxina tienen un peso molecular similar (Schwabe y McDonald, 1977; Bagnell y col., 1977), pero no se había utilizado habitualmente como estándar de referencia de P. M. para obtener relaxina. Sin embargo en 1991, Del Angel-Meza, Beas-Zarté, Alfaro y Morales-Villagran, 1991 utilizaron esta hormona, con el propósito de obtener primero el volumen de elución de la insulina y en base a esté, conocer el volumen de elución del extracto de relaxina de rata durante el proceso cromatográfico, además de que identificaron la relaxina, con el bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas en rata.

Con la técnica de Brenner modificada, se puede obtener relaxina del suero de coneja preñada con buena actividad biológica, pero no con buen rendimiento, por lo que no se pudo aplicar más pasos de purificación (por

ejemplo por carboximetilcelulosa más Sepharosa), como habíamos pensado hacerlo. Será necesario partir de varios litros de suero para obtener la cantidad necesaria de relaxina de coneja, o bien primero purificarla de placentas de conejas preñadas, inducir anticuerpos y realizar la purificación con cromatografía de afinidad.

Esta purificación por cromatografía de afinidad, solo se ha aplicado, para obtener relaxina de placentas de yegua preñada. Stewart, Nevins, Hadas y Vandley (1991), recomiendan la purificación por afinidad, debido a su gran potencial como un método rápido y eficiente, para obtener relaxina de tejidos o de líquidos biológicos, por su capacidad para concentrar relaxina de soluciones muy diluidas: como el suero, la orina o el plasma seminal. Al evitar varios pasos de purificación y utilizar un anticuerpo específico para la relaxina de coneja, se pueden obtener mejores rendimientos de la hormona, así como con una buena bioactividad. Por lo tanto, consideramos que es posible aprovechar esta cromatografía por afinidad para purificar relaxina a partir del suero.

Consideramos que la técnica de Brenner modificada tiene algunas ventajas en comparación a la técnica utilizada para purificar relaxina de las placentas, como son: que se puede aprovechar el suero como otra fuente más de relaxina, se evita la disección de separar los fetos de la placenta, el rompimiento del tejido y la homogeneización, para lo cual es necesario tener el equipo adecuado y de invierte bastante tiempo, por lo tanto esta técnica es más rápida. La desventaja sería que se obtiene con un rendimiento bajo, si se parte de un volumen de SCP pequeño.

II.- BIOENSAYOS

1.- BIOENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LAS CONTRACCIONES UTERINAS

La estandarización de los bioensayos se deben de realizar antes de iniciar un procedimiento de purificación, para poder determinar la bioactividad e identificar la hormona.

Con el bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas espontáneas, se tuvieron algunos problemas para demostrar la bioactividad de los productos obtenidos durante la purificación. Esto es, que varias veces el tejido aún sensibilizado con estrógenos, no tenía actividad o esta duraba poco tiempo. Además también hubo problemas para cuantificar el efecto, puesto que la relaxina influye tanto la amplitud como la frecuencia. Estos datos coinciden con las desventajas que mencionan otros investigadores (Fields y col., 1980, 1983) debido a que este bioensayo no es específico para la relaxina. Las desventajas serían las siguientes:

- 1) La oxitocina y prostaglandinas puede estar presentes en los extractos de cuerpo lúteo, en la placenta de coneja y en la placenta humana, en niveles suficientes como para interferir con el efecto quíacente de la relaxina sobre la contractilidad uterina como se observó con el Sn2.
- 2) Hay una variación considerable en la sensibilidad entre las diferentes partes del útero.
- 3) Se influye tanto la frecuencia, como la amplitud, por lo que es difícil la cuantificación del efecto de la hormona y
- 4) Las contracciones uterinas espontáneas tienden a ser irregulares, por lo que no se tiene una actividad basal satisfactoria. (Wiqvist y Paul, 1955).

St-Louis (1981) describió un experimento para resolver algunas de estas desventajas. Este consiste en inducir una contracción uterina sostenida, la cual se obtiene con una solución despolarizante de KCl. Con este proceso los segmentos uterinos, obtenidos de ratas sensibilizadas con estrógenos, se suspenden en una cámara para tejidos aislados con uno de los extremos atado a un transductor de músculo liso isotónico. Se induce una contracción tónica con solución de KCl, después de que se obtiene la primera contracción tónica y una vez que se alcanza una meseta, se aplica la relaxina al baño Marla. Con este método el grado con el cual la relaxina induce una relajación de la contracción tónica se determina por planimetría (St.-Louis, 1981; St-Louis, 1982).

Sin embargo, este bioensayo presenta varias ventajas, entre las que se encuentran:

- 1) El efecto inhibitorio es rápido (minutos) y se puede detectar, durante el proceso de purificación y caracterización de la relaxina en muchas especies.
- 2) Es más sensible que otros bioensayos, ya que se han reportado sensibilidades menores a 100 ng/ml para la relaxina porcina y es muy útil para identificar la hormona en tejidos o líquidos biológicos en los cuales la concentración de relaxina es muy baja como por ejemplo el suero de coneja preñada (Anderson, 1984; Brenner, Lessing y Weiss, 1984).

2.- BIOENSAYO DE LA ELONGACIÓN DEL LIGAMENTO INTERPÚBICO

Este bioensayo se ha estandarizado para aplicar la relaxina porcina, porque es específico para esta hormona, solo que no es muy sensible y por lo tanto, no es posible utilizarlo para tejidos o líquidos biológicos en los que la concentración de la hormona es baja (como por ejemplo el SCP).

La estandarización de este bioensayo, se realizó con el suero de coneja preñada, basandonos en los experimentos de Mardner y col. (1944), quienes aplicaron volúmenes de 25 a 400 μ l ml de suero de coneja preñada a cobayas vírgenes previamente sensibilizadas con estrógenos con un peso corporal inicial de 350 a 450 g y lograron detectar bioactividad aún utilizando el suero crudo. Se consideró que se podría inducir la elongación del ligamento interpúbico con el SCP en las ratonas BALB/c, previamente sensibilizadas con estrógenos y con un peso corporal inicial de 12.6 a 19.5 g.

La estandarización de este bioensayo duró aproximadamente 1 año, aunque no logramos obtener la relaxina porcina, se establecieron algunos parámetros importantes del bioensayo, como son:

- 1) En las ratonas de 4 semanas de edad (prepúber que solo tienen una semana de haber sido destetadas) se observó el mejor efecto de la relaxina contenida en el suero de coneja preñada, pero al parecer en las ratonas de 6 semanas y 9 semanas de edad no tiene efecto, quizás porque no se aplicó el volumen suficiente SCP (RLX), ya que al aplicar volúmenes mayores de suero (entre 100 y 200 μ l de SCP) en las ratonas de 4 semanas, el ligamento aumenta en proporción al volumen que se aplicó.
- 2) Se puede pensar que el mejor efecto de CPE + SCP (RLX) sobre el ligamento interpúbico en las ratonas de 4 semanas de edad, quizás se debió a que estaban en una etapa de gran desarrollo corporal, puesto que son las que más ganan peso entre el día 0, en que se le inyectó el CPE y el día 7 en el que se le aplicó el SCP (RLX). Estas ratonas ganaron 3 g en comparación a las de 6 y 9 semanas de edad que solo ganaron 1 g.

3) Por otro lado, queda descartado el efecto de la progesterona que también es producida por la placenta al igual que la relaxina y se sabe que en la ratona en lugar de aumentar la longitud del ligamento interpúbico lo disminuye (Figura 12), a diferencia de la cobaya, en la cual, esta hormona aumenta la longitud del ligamento interpúbico. Aunque se aplicó el suero crudo, pensamos que la relaxina fue la que actuó sobre el ligamento interpúbico y no la progesterona. La insulina, es la otra hormona que se aplicó y tampoco observó ningún efecto, a pesar de su semejanza en sus estructuras secundaria y terciaria. Hay que considerar que no es posible aplicar grandes dosis de insulina.

En las fotografías de la figura 13, se puede observar muy marcadamente el efecto de la relaxina (CPE + SCP-RLX) y de los estrógenos (CPE) sobre el ligamento interpúbico en ratonas prepúberes de 4 semanas en comparación al control. Se sabe que la separación de los huesos púbicos se debe a:

- 1) La reabsorción de la superficie de la sínfisis de los huesos púbicos.
- 2) Hinchamiento de la matriz cartilaginosa y
- 3) La transformación de las cápsulas de cartilago en un ligamento interpúbico fibroso, el cual alcanza una longitud máxima de 3 a 6 mm en el momento del parto.

Todos estos fenómenos también se llevan a cabo durante la última semana de gestación en la ratona. Después del parto la longitud del ligamento interpúbico disminuye rápidamente y es muy semejante al de las ratonas no preñadas, alrededor del día 5 postparto (Sherwood, 1994).

La longitud que se observó en las ratonas prepúberes de nuestros experimentos fue de 1.13 ± 0.06 mm en promedio, debe de considerarse que estos animales pesaban al final del experimento 16.6 g, en comparación a los utilizados por otros investigadores, quienes tenían animales que pesaban alrededor de 23 gr y la longitud del ligamento que midieron fue de aproximadamente 1.55 mm en ratonas púberes (Steinetz y col., 1960).

Para comprobar si realmente fue la relaxina la que actuó, sobre la sínfisis pública, hubiera sido apropiado realizar estudios histológicos y bioquímicos para determinar específicamente los efectos de la relaxina contenida en el suero. Aunque no lo realizamos, a continuación se dan algunos de los efectos que tienen los estrógenos y/o relaxina en la sínfisis pública de la ratona:

Los estrógenos, además de sensibilizar la sínfisis pública, para que responda a la relaxina (al aumentar el número de receptores), también lleva a cabo los cambios iniciales de la transformación de la sínfisis pública. Las acciones específicas que se le han atribuido a los estrógenos son las siguientes:

- 1) Aumentó del número de osteoclastos en los huesos púbicos.
- 2) Reabsorción de las porciones medias de los huesos púbicos.
- 3) Despolimerización de la matriz de de proteoglicanos con un subsecuente cambio a una fase rica en agua.
- 4) Aumentó del número de condrocitos en el cartilago hialino y del fibrocartilago, y
- 5) El hinchamiento y transformación de las cápsulas de cartilago hialino a fibrocartilago (Crellin y Brightman, 1983).

Steinetz, O'Byrne, Butler y Hicman (1983), postularon que los estrógenos llevan a cabo sus efectos sobre la sínfisis pública, al menos en parte, al inducir que las células del hueso y del cartilago produzcan enzimas

catabolicas que destruyen los componentes de la matriz y de los huesos, Después del tratamiento con estrógenos, la enzima lisosomal, fosfatasa ácida aumenta en los osteoclastos, osteocitos, condroblastos y condrocitos (Manning y col., 1965).

Además, en la sínfisis púbica de ratonas tratadas con estrógenos hay una elevación de las proteasas lisosomales catépsina B y la dipeptidil peptidasa 1, las cuales tienen el potencial de degradar colágeno y proteoglicanos.(Hall y Newton, 1946).

La relaxina puede llevar a cabo sus efectos, en parte, por un aumento de los procesos estimulados por los estrógenos que consisten en:

1) Aumentar los niveles de la fosfatasa ácida, de la catépsina B y de la dipeptidil peptidasa 1 en la sínfisis púbica de ratonas no preñadas, después del tratamiento con estrógenos, seguidos de relaxina porcina (Madonald, y col., 1985).

2) Los estrógenos más relaxina, pero no estrógenos solos, aumentan el peso húmedo, el peso seco, el colágeno total y el colágeno soluble en el tejido de la sínfisis púbica en ratonas inmaduras (Weiss, Nagrichmidt, y Struck, 1979).

3) También aumentan los niveles de la colagenasa, la peptidasa del colágeno y el inhibidor de la peptidasa, después del tratamiento con relaxina en ratonas sensibilizadas con estrógenos.

4) Steinetz y col. 1983, postularon que la relaxina puede causar una rápida liberación de enzimas lisosomales, las cuales promueven la destrucción del cartílago y de la matriz de proteoglicanos, también ataca las uniones de colágeno en la sínfisis púbica de ratonas sensibilizadas con estrógenos; así, las fuerzas laterales sobre la cintura púbica, empujan los huesos púbicos, esto hace que se una el tejido conectivo cartilaginoso y de el aspecto de un ligamento (Sherwood, 1994).

CONCLUSIONES

I.- CONCLUSIONES

1.- Se logró desarrollar un método rápido y alternativo para obtener un péptido semejante a la relaxina.

2.- Se logró mejorar la bioactividad y rendimiento de proteina de acuerdo a las siguientes modificaciones:

A) Siliconizar todo el material de vidrio.

B) Aplicar un inhibidor de proteasas (P.M.S.F.).

C) Realizar el procedimiento a 4 °C.

D) Aplicar un paso de purificación por cromatografía en Sephadex G-50.

Además de utilizar un suero no hemolizado y realizar la evaporación de la solución de extracción más rápidamente.

2.- Con la siliconización del material, la evaporación rápida, el inhibidor de proteasas y la temperatura a 4 °C, se mejoró al doble la bioactividad (de 0.15-lote1 a 0.3-lote2 GPU/mg) y el rendimiento de proteina (de 1.1-lote1 a 2.4 %-lote 2) del Sn4.

3.- Con la cromatografía en Sephadex G-50, se logró mejorar hasta 6.3 veces la bioactividad: de 0.3 a 1.9 U/mg, aunque el rendimiento de proteina fue muy bajo (0.01 %).

4.- El bioensayo de la inhibición de las contracciones uterinas fue suficientemente sensible para identificar la relaxina durante el procedimiento de purificación.

5- Debido a que solo se determinó la caracterización biológica de la **Fx-Sephadex**, se puede decir que se obtuvo un **péptido semejante a la relaxina**.

6.- Las ratonas de 4 semanas de edad (edad que no había sido utilizada por otros autores), son las más jóvenes y fueron las que respondieron mejor al tratamiento del SCP (RLX) + CPE, en comparación a las ratonas de 6 y 9 semanas de edad.

7.- Consideramos que es muy probable que la relaxina contenida en el suero de coneja preñada, fue la que actuó sobre la elongación de ligamento interpúbico en las ratonas de 4 semanas de edad, puesto que la sínfisis púbica es un tejido específico para la relaxina.

II.- PERSPECTIVAS

1.- Se propone purificar primero la relaxina de coneja a partir varios litros de suero o bien a partir de placentas de acuerdo a la técnica de Fields y col.,(1985), con la cual se puede obtener una hormona pura con rendimiento suficiente para inducir la formación de anticuerpo.

2.- Una vez que se obtenga el anticuerpo, se procederá a purificar la relaxina por cromatografía de afinidad a partir de 5 litros de suero de coneja preñada. Este método es rápido y permite obtener la relaxina con buen rendimiento y pureza.

3.- Una vez que se haya obtenido la hormona, determinar su actividad biológica por medio del bioensayo de la contracción sostenida inducida por KCl.

4.- Determinar algunas de sus características bioquímicas e inmunológicas, por medio de electroforesis bajo condiciones nativas, SDS reductoras y no reductoras, así como su reconocimiento inmunológico por inmunotransferencia.

**ANEXO:
ANTECEDENTES**

I.- HISTORIA DE LA RELAXINA

1.- GENERALIDADES

El descubrimiento de la relaxina fue el resultado de estudios acerca de las adaptaciones pélvicas asociadas con el parto en ciertas especies de mamíferos. En las especies de mamíferos que viven en madrigueras, que son pelágicas o voladoras, tienen pelvis estrechas y por consiguiente una disminución del canal pélvico por donde salen las crías en el momento del parto. Una pelvis pequeña es una ventaja para aquel animal que se desplaza en un espacio estrecho o a través de un túnel, o cuyo cuerpo es aerodinámico para nadar o volar, pero es una seria desventaja para el nacimiento de las crías. En otros mamíferos que no tienen una pelvis estrecha, pero sus crías tienen el diámetro de la cabeza mayor al diámetro del canal pélvico de la madre, también tendrían dificultades para el nacimiento si no se tuvieran adaptaciones especiales para tales situaciones (Hisaw y Zarrow, 1950).

2.- MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE LA PELVIS

Hay dos mecanismos de adaptación, por medio de los cuales estos animales pudieron resolver los problemas de tener un canal pélvico estrecho y/o una pelvis pequeña, estos son uno genético y el otro hormonal:

A) Genético

La reducción más notable de la pelvis entre los mamíferos subterráneos se encuentra en *Scalopus aquaticus machrinus*. En este animal el arco púbico cartilaginoso no llega a osificarse, pero se reabsorbe en el macho y en la hembra a la mitad de su desarrollo corporal. Las dos mitades de la pelvis se unen para formar una sínfisis secundaria dorsal al tracto digestivo (Hisaw, 1927). Así, en el adulto el tracto reproductivo está completamente fuera y ventral a la cintura pélvica, situación que evita el problema de un parto a través de un espacio estrecho. Aparentemente el sistema endocrino no influye en este fenómeno adaptativo, si no más bien está determinado genéticamente (Hisaw y col., 1950).

B) Hormonal

Las adaptaciones de la pelvis hormonalmente reguladas involucran dimorfismo sexual de la pelvis. En la hembra hay un aumento de la flexibilidad de la sínfisis sacroiliaca y/o pélvica, durante la preñez tardía. Una adaptación adicional que ocurre en algunas especies, es la transformación de una articulación cartilaginosa a un ligamento interpúbico elástico, el cual permite una considerable separación de los huesos innominados (Sherwood, 1994).

Estos mecanismos hormonales son dos, uno actúa a través de los andrógenos y el otro a través de la relaxina.

a) A través de andrógenos

El dimorfismo sexual de los huesos pélvicos, que permite que la hembra tenga un canal pélvico suficientemente grande, se ha descrito en muchos mamíferos como las tuzas (Hisaw, 1925), las ratonas (Gardner, 1936; Crelin, 1960), las ratas (Crelin y Brighdman, 1957; Bernstein y Crelin, 1967), las conejas (Lovell, 1965), los murciélagos de cola libre (Crelin y Newton, 1969) y en mujeres (Crelin, 1969). El dimorfismo de la pelvis, el cual generalmente ocurre entre el nacimiento y la pubertad, es causado por la exposición de la pelvis del macho a los andrógenos durante el periodo postnatal temprano, ya que si se castran al nacimiento ratas o ratones machos y hembras, éstos desarrollan una pelvis tipo hembra, mientras que el tratamiento de estos animales castrados con andrógenos conduce al desarrollo de pelvis tipo macho (Crelin, 1960; Bernstein, 1967).

El mejor ejemplo de este fenómeno se encuentra en la tuza, en la cual la pelvis está completa en ambos sexos antes de la pubertad: Los cartílagos púbicos en ambos sexos llegan a osificarse y se unen para formar una sínfisis púbica rígida. Al aproximarse el primer estro, los huesos púbicos se reabsorben gradualmente en la hembra, dando origen a una pelvis abierta ventralmente, mientras que en el macho permanece cerrada (Figura 14), por lo que la ausencia de los huesos pélvicos hace posible el parto sin ninguna dificultad (Hisaw, 1927).

b) A través de relaxina

Otro mecanismo de adaptación en el cual también hay un dimorfismo sexual de la pelvis para facilitar el parto, es la transformación de una articulación cartilaginosa de la pelvis a un ligamento interpúbico elástico y flexible, fenómeno que ocurre en varias especies como la cobaya, la ratona, el murciélago y la mujer) (Steinetz, Beach y Kroc 1959; O'Connor, Cain y Zarrow, 1966). Por ejemplo, en la cobaya se observa una marcada relajación de la sínfisis del pubis y las uniones sacroilíacas. Estos cambios se desarrollan durante la gestación y son más pronunciados en el parto. En este momento las dos mitades de la pelvis están ampliamente separadas y pueden moverse libre e independientemente una de la otra. Se tienen reportes de Le Gallos (1882), quien quizás fue el primero en describir el fenómeno de la relajación púbica en la cobaya. Más tarde, esta observación se confirmó por Duncan (1854) y Owen (1866) y se demostró que se daba durante el estro (Brohna y Desclin, 1834). Aunque la relajación pélvica y la separación de la sínfisis púbica había sido observada por varios investigadores, fue Hisaw quien propuso que estos fenómenos estaban bajo control hormonal, al probar que la inyección del suero de conejas y cobayas preñadas en cobayas vírgenes castradas, previamente sensibilizadas con estrógenos, inducía una notable relajación del ligamento interpúbico y demostró que la responsable de tales efectos era una hormona a la que llamó **RELAXINA** (Hisaw, 1925; 1926, 1927). Esta relajación también es causada por estrógenos y/o progesterona, por lo que se dudó si la relajación pélvica era causada por estas hormonas y no por la relaxina. Entonces se comparó la acción relajante de dos extractos del cuerpo lúteo de cerda, el primer extracto soluble en agua producía la relajación en un plazo de 6-12 hrs, mientras que el segundo extracto lipídico insoluble en soluciones acuosas, daba resultados negativos. Los estrógenos solos

requieren de 20 a 25 días y la progesterona de 72-96 hrs, para obtener el mismo resultado. Así, se postuló que la relajación era efecto de la relaxina y no de estas hormonas esteroides.

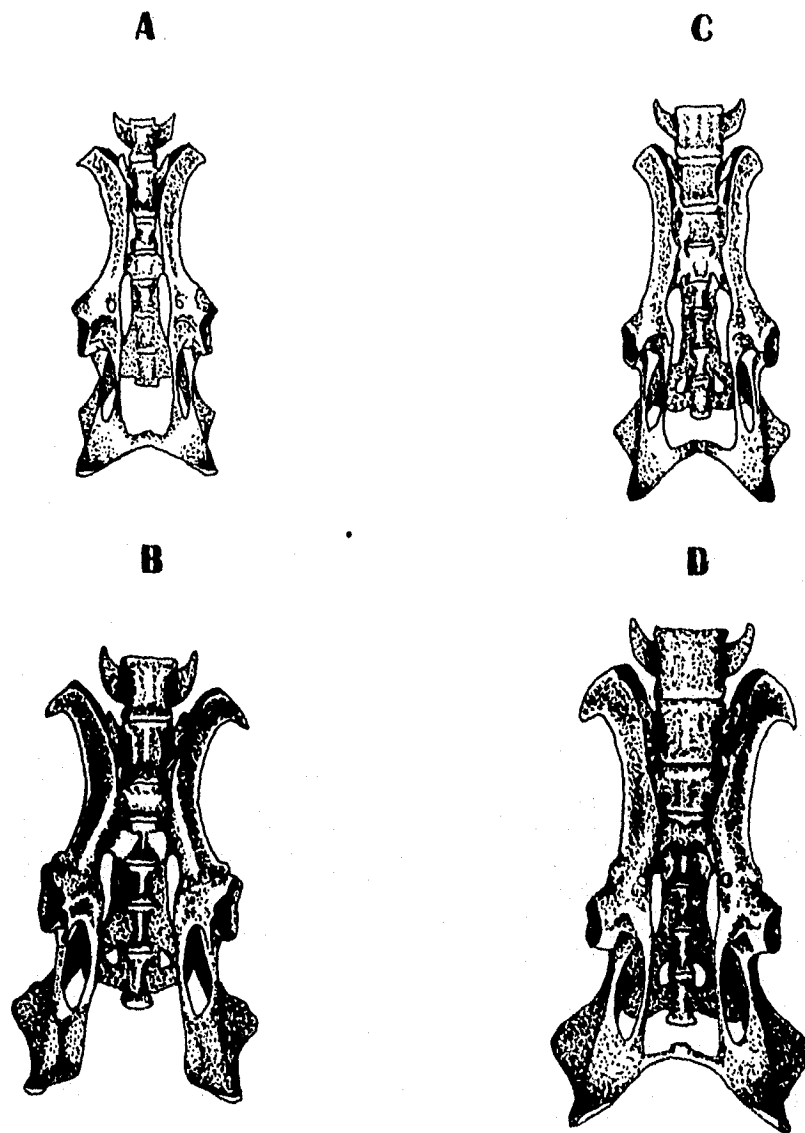


Figura 14. Cambios que sufre la cintura pélvica de la tuza durante la pubertad. A Hembra Inmadura, B Hembra madura, C Macho Inmaduro y D Macho maduro (Tomado de Hisaw, 1927)

II- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

Durante los años 30's y principios de los 40's, hubo poco interés en la relaxina debido a que no se contaba con buenos métodos de purificación, ni con bioensayos cuantitativos y específicos. Entre los años 40's y 50's resurgió el interés por esta hormona y aunque se obtenía en forma impura, fue posible determinar sus efectos biológicos sobre el tracto reproductivo de animales no preñados, que más tarde se confirmaron con preparaciones de relaxina altamente pura. En los años 60's y mediados de los 70's, esta hormona se estudió con más auge, gracias al desarrollo de una tecnología más avanzada para su purificación, así como de bioensayos más específicos (Figura 15) (Steinetz y col., 1960, Sherwood y O'Byrne, 1974)

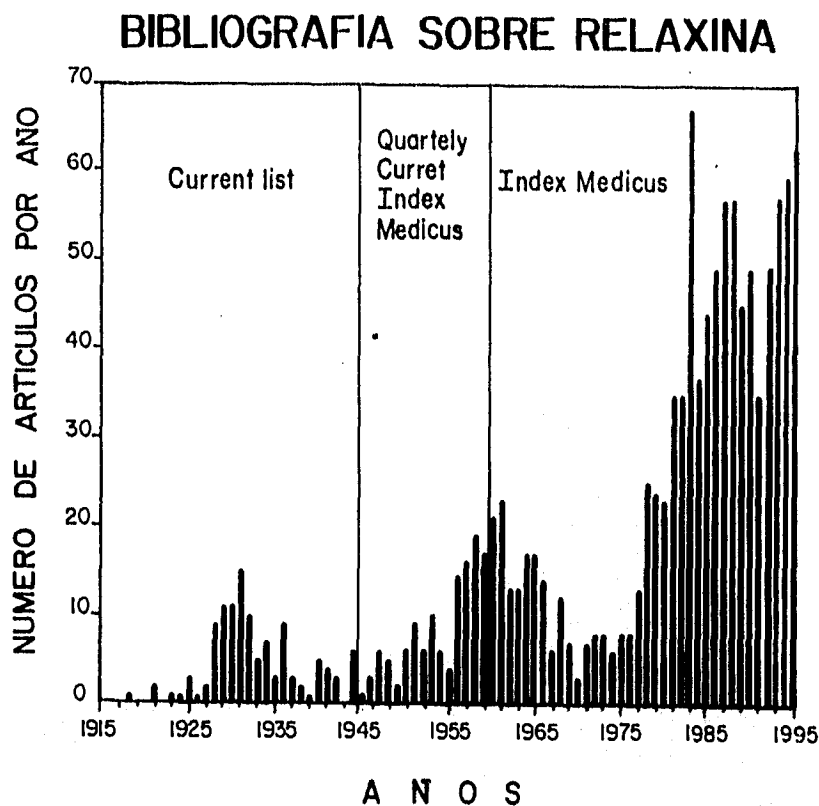


Figura 15. Número de artículos publicados acerca de la relaxina desde que se descubrió en 1927 hasta 1995.

Existen similitudes entre los distintos procesos de purificación que se han aplicado, los cuales toman en cuenta las ventajas de la relaxina: es estable en disolventes orgánicos y es soluble en 60-70 % de acetona. Después de la extracción, la relaxina se purificó por combinación de cromatografía de filtración en gel y de intercambio

iónico. En algunos casos por cromatografía de alta presión (HPLC) y/o cromatografía de afinidad (Sherwood, 1994). El rendimiento de la relaxina por kilogramo de tejido, difiere ampliamente entre las especies. Por ejemplo, en el cuerpo lúteo de cerda y rata, la concentración de relaxina es mucho más alta, que en cualquiera de los otros tejidos de las otras especies (tiburón, yegua, coneja, vaca y humano), de donde se ha obtenido la hormona en cantidades escasas pero suficientes para realizar estudios fisiológicos y químicos. Además de la relaxina porcina, también se han obtenido otras relaxinas altamente puras, como son la de rata, perra, tiburón, coneja, marsopa, murciélago, ballena y yegua (Tabla X) (Sherwood, 1994).

Tabla X. Resumen de las características de preparaciones de Relaxina (RLX) altamente puras, de diferentes especies.

Especie (fuente)	Preparación	Rendimiento (mg/kg de tejido)	Peso molecular	Punto isoelectrico	Bioactividad (GPU/mg)
Cerde (ovarios)	CMB	38	6,300	10.6	2,500-3,000 ^{a,b,c}
	CMa	34	6,300	10.7	
	CMa'	30	6,300	10.8	
Rata (ovarios)	CM1	140	6,000	7.8	CM1=CM2 ^a y menor que la RLX porcina. ^{a,b}
	CM2	140	6,000	8.4	
Tiburón (ovarios)	-	23	6,000	-	Menor que la RLX porcina. ^{a,b}
Coneja (placenta)	-	17	7,200	8.8	23 ^b
Marsopa (cuerpo lúteo)	-	-	-	-	Equivalente a la RLX porcina. ^c
Murciélago (cuerpo lúteo)	-	-	6,050	-	-
Perra (ovarios)	I	1.9	6,800	-	Menor a la RLX porcina. ^{a,b}
	II	3.8	7,500	-	
Perra (placenta)	R2	-	6,800	-	-
Yegua (placenta)	R1	1.8	5,600	-	28 ^a
	R2	0.8	-	-	
	R3	0.4	5,200-5,600	-	
	4 Isoformas mayores A-P-R 1,2,3,4	-	-	-	Menor a la RLX porcina. ^c

^a: Bioensayo *in vivo* de la elongación del ligamento Interpúbico en ratona (Steinetz y col., 1960).

^b: Bioensayo *in vitro* del útero en ratona (Kroc y col., 1969).

^c: Bioensayo *in vivo* de la palpación de la sínfisis en cobaya y bioensayo *in vitro* del útero en la cobaya (Steinetz y col., 1969).

En 1974, Sherwood y col., describieron un procedimiento para aislar relaxina porcina con altos rendimientos, a partir de un kilogramo de ovarios congelados de cerdas preñadas, los cuales se sometieron a una extracción con acetona al 70 %-HCl 0.15 N y después se pasó por Sephadex G-50. La relaxina bioactiva se absorbió en carboximetilcelulosa (CMC), de la cual se obtuvieron 3 picos contiguos, designados CMa, CMa' y CMB (Figura 16). Se les determinó la secuencia de aminoácidos y se encontró que solo diferían en el extremo carboxiterminal de la cadena B. Sin embargo, Walsh y col. en 1980 demostraron que esta microheterogeneidad

se atribuye a una proteólisis durante el proceso de purificación, de una variante molecular más grande de relaxina porcina.

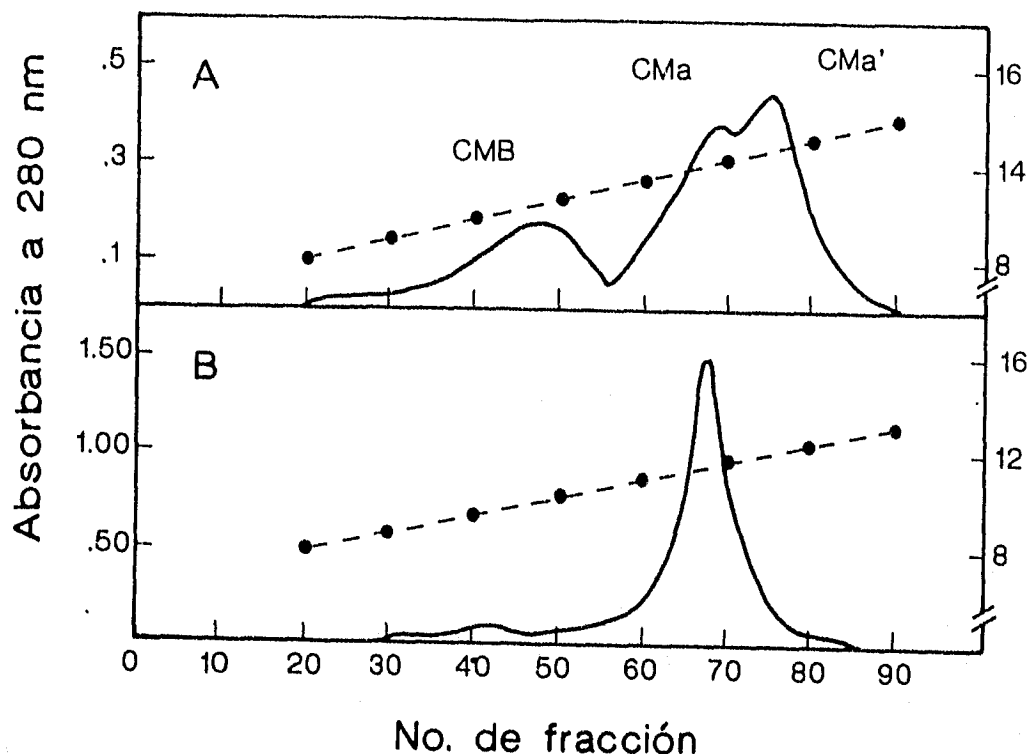


Figura 16. Cromatografía de intercambio iónico de la relaxina porcina, sobre carboximetilcelulosa. A: Perfil de elución según la técnica de Sherwood y col., 1974 y B: Perfil de elución según la técnica de Walsh y col., 1980.

Estos investigadores modificaron el proceso de extracción, por uno fuertemente ácido (el cual se puede aplicar a péptidos pequeños) con lo que se eliminó la heterogeneidad de la hormona. Los ovarios congelados se homogeneizaron en un medio fuertemente ácido, (ácido trifluoroacético al 15%-ácido fórmico al 5%-NaCl 1 N), el extracto se adsorbió y eluyó en columnas pequeñas de octadecilsilica (ODS), la fracción que contenía la relaxina se pasó por Sephadex G-50 y después por CMC, obteniendo un solo pico (Figura 16). El medio fuertemente ácido minimiza la proteólisis, al tener un pH bajo y precipitar proteasas de alto peso molecular. Aunque esta técnica tiene la ventaja de reducir la multiplicidad de formas de la relaxina porcina, solo se puede aplicar para purificar relaxina a baja escala (20 g de tejido), debido a que las columnas de ODS son muy pequeñas y por lo tanto, tienen poca capacidad para retener proteína. La relaxina no solo se ha obtenido de los tejidos en los cuales se sintetiza, también se ha obtenido por ADN recombinante y por síntesis química. Además de la relaxina porcina, también se ha producido relaxina humana H2 recombinante por Genetech Inc., principalmente para uso clínico en la dilatación del cérvix durante la preñez tardía. Recientemente, se han

sintetizado por medios químicos ambas relaxinas humanas H1 y H2, las cuales están disponibles comercialmente. También se ha elaborado un método ELISA para la relaxina H2, que evita el marcaje de la relaxina (que resulta en la pérdida de su bioactividad) (Bryant-Greenwood y col., 1994).

IV.- MÉTODOS PARA DETERMINAR LA RELAXINA

1.- BIOENSAYOS

Los bioensayos para la relaxina han sido indispensables para identificar y caracterizar preparaciones de relaxina durante el desarrollo de los procesos de purificación, para validar los resultados obtenidos con radioinmunoensayos y para determinar si formas propias de relaxina cuya secuencia de aminoácidos ha sido deducida de la secuencia de nucleótidos son biológicamente activas después de la síntesis química (Hudson, Haley y John 1983). La mejor caracterización de una hormona purificada es la determinación de su actividad biológica (bioactividad) y se realiza por medio de los bioensayos. Para la relaxina se han desarrollado varios, pero solo tres son los que más se han utilizado: uno específico, el de la elongación del ligamento interpúbico, mientras que los otros dos son inespecíficos: el de la palpación de la relajación de la sínfisis púbica y el de la inhibición de la contractilidad uterina.

El límite de sensibilidad en el bioensayo del ligamento interpúbico en ratona o cobaya es alrededor de 100 ng de relaxina de cierta altamente pura. Por otro lado, el bioensayo de la inhibición de la contractilidad del útero de rata y de ratón *in vitro* es moderadamente más sensible (Steinetz, O'Byrne, Welss y Schwabe, 1982).

La extensa variación en la secuencia de aminoácidos de las relaxinas entre las especies (Figura 18), tiene implicaciones importantes: Primero, es necesario explorar la bioactividad de la relaxina de una especie dada, en más de un bioensayo para encontrar la mejor, ya que es muy variable entre las relaxinas altamente puras de las diferentes especies aún utilizando los mismos bioensayos (Tabla X). Por ejemplo, las relaxinas de rata y equino tienen menos bioactividad que la relaxina porcina en el bioensayo del ligamento interpúbico de la ratona (Larkin, 1974 ;Bradshaw, Dowing, Moffatt y Porter, 1981), mientras que la relaxina de coneja es menos activa que la relaxina porcina en el bioensayo de la contractilidad uterina. Además la relaxina de tiburón promueve el desarrollo del ligamento interpúbico e inhibe las contracciones uterinas en la cobaya pero no en la ratona (Eldridge y col., 1985; Reining, Daniel, Schwabe, Gowan, Steinetz y O'Byrne, 1981). Segundo, cuando se determinan los niveles de bioactividad de relaxina, deberían utilizarse el estándar y el problema de la misma especie para estimar la potencia real de la hormona, porque al utilizar de diferentes especies no se pueden obtener respuestas paralelas (Steinetz, O'Byrne, Welss y Schwabe 1969; Steinetz y col., 1981). El bioensayo de la inhibición de la contractilidad del útero, no debe utilizarse en estadíos tempranos de purificación de la relaxina del cuerpo lúteo de la vaca, placenta de coneja o humana, porque al parecer hay un pequeño factor contráctil uterino, el cual interfiere con el efecto relajante de la relaxina.

Será necesario mejorar los métodos para el bioensayo de relaxina, porque los antes descritos pierden precisión y sensibilidad, características que son necesarias para medir la bioactividad de relaxina en sangre periférica o en extractos de tejidos donde las concentraciones de la hormona son bajas (Sherwood, 1994).

A) Bioensayo de la palpación de la sínfisis púbica.

El bioensayo de la palpación de la sínfisis púbica en la cobaya, el cual se describió por primera vez por Abramowitz y col. 1944, se basa en la palpación de la relajación de la sínfisis púbica inducida por la relaxina. Con este bioensayo se determinó la unidad cobaya (Guinea Pig Unit-GPU) como: la cantidad de hormona que induce 6 hrs después de su aplicación, una relajación detectable de la sínfisis púbica, en al menos dos terceras partes de un grupo de 12 cobayas castradas, con peso de entre 350-800 g y pretratadas con 0.85 µg de estradiol diariamente por 4 días. Este bioensayo tiene limitaciones ya que las unidades GPU, están basadas sobre una respuesta que es valorada cualitativamente, de acuerdo al criterio del experimentador, además de que hay marcados cambios en las respuesta de la sínfisis púbica, si se aplican dosis repetidas de relaxina en el mismo animal (Frieden y Hisaw, 1950; Frieden y Adams, 1977; Frieden y Rawitch, 1981).

B) Bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico.

El bioensayo de la elongación del ligamento interpúbico en la ratona, está basado en las observaciones originales de Hall y col. (1946, 1947), sobre la sínfisis púbica de ratonas sensibilizadas con estrógenos, las cuales respondieron a extractos que contenían relaxina en una forma dependiente de la dosis (Hall y col., 1946; Hall, 1947). En los primeros experimentos del bioensayo, se emplearon rayos X para observar la pelvis y obtener una estimación de la ampliación del ligamento interpúbico después del tratamiento con relaxina (Dorfman, Marsters y Dinerstein, 1953; Kliman y col., 1953). Steinetz y col. (1960) describieron un bioensayo cuantitativo en el que se medía directamente de manera más rápida y objetiva, la longitud del ligamento interpúbico. Ratonas inmaduras con un peso corporal de entre 18-20 g, son previamente sensibilizadas con una sola inyección de estrógenos de larga acción (ciclopentilpropionato de estradiol). Siete días más tarde, se aplican tres o más dosis de relaxina estándar o el problema. Los vehículos acarreadores como la cera de abeja al 5 % en aceite de cacahuate y benzopurpurina al 1 % (un colorante nitrogenado), potencian la actividad de relaxina porcina de 100-300 veces. El o los mecanismo(s) por los cuales los vehículos de depósito hacen que aumente la actividad de relaxina, aún no se conocen. Al parecer, ambos vehículos pueden potenciar la actividad de relaxina por un retardo mecánico de la absorción, desde el sitio de inyección (Kliman y Greep, 1958). Esto ha sugerido que la benzopurpurina-4B, puede unirse fuertemente a la relaxina y protegerla del metabolismo degradativo (Bedarker, Turnell, Blundell y Schwabe, 1977).

Este bioensayo ha sido utilizado extensamente durante el aislamiento y caracterización de la relaxina de la cerda, la rata, la coneja, la vaca, la mujer y de la yegua. Las marcadas diferencias en las capacidades de la relaxina de diferentes especies para promover el desarrollo del ligamento interpúbico en ratona, puede excluir el

uso de este bioensayo en algunas especies. No obstante, en vista de su objetividad, especificidad y simplicidad, es uno de lo más utilizados, aunque pierde precisión y sensibilidad, por lo que no es posible aplicarlo cuando se desea purificar relaxina de tejidos o líquidos biológicos, en los que la hormona tiene una baja concentración (Steinetz y col., 1960; Sherwood, 1994).

C) Bioensayo de la Inhibición de las contracciones uterinas espontáneas

Los bioensayos de la contractilidad uterina están basados en el descubrimiento original de Krantz y col. (1950), cuando al probar extractos del cuerpo lúteo de cerda, observaron que disminuían las contracciones uterinas espontáneas en cobayas previamente sensibilizadas con estrógenos. La potencia de la relaxina sobre el útero es de alrededor de 1-5 nmol/l (asumiendo que la relaxina tiene un peso molecular de 6000 d), por lo que la relaxina es un potente inhibidor reversible de las contracciones uterinas espontáneas en varias especies, incluyendo ratas, ratonas, cobayas, conejas, cabras y cerdas tanto *in vitro* como *in vivo* (Dowing y Hollingsworth, 1993). Las contracciones uterinas son inhibidas rápidamente (1-5 min) después de la aplicación de la relaxina *in vitro* y hay una recuperación rápida después de lavar el tejido. Estas observaciones sugieren que la relaxina interacciona con un receptor membranal en el miometrio. La sensibilidad del útero a relaxina como un inhibidor de las contracciones *in vivo* e *in vitro*, es modulada por estrógenos y progesterona. Después del tratamiento por 48 hrs. con una dosis fisiológica baja de estrógenos (0.4 µg/kg./día), aumenta unas dos veces la sensibilidad uterina a la relaxina, mientras que el tratamiento con progesterona tiene poco efecto, pero al combinar estrógenos más progesterona, la sensibilidad a la relaxina aumenta unas diez veces. Por lo tanto se ha sugerido que los estrógenos aumentan la concentración de receptores miometriales (St-Louis, 1981; Mercado-Simmen y col., 1982).

D) Bioensayos en cultivos celulares

Los bioensayos *in vivo* e *in vitro* antes mencionados tienen las desventajas de perder tanto precisión como sensibilidad. Este último parámetro es necesario para medir la bioactividad en sangre periférica o extractos de tejidos, donde las concentraciones de la hormona son bajas. En 1990, se describieron bioensayos basados sobre la elevación de los niveles de AMPc en cultivos de células endometriales humanas (Fei, Gross, Lofgren, Mora-Worns y Chen A., 1990) y en células uterinas de mono rhesus recién nacido (Kramer y col., 1990). Ambos bioensayos son específicos para la relaxina, más precisos y suficientemente sensibles hasta para medir 1 ng de relaxina humana. Sin embargo, tienen limitaciones importantes como son: el alto costo para tener el equipo necesario para cultivos celulares, la disposición de las células en cantidades limitadas y por último, la respuesta de las células a la relaxina varía entre las diferentes líneas celulares endometriales humanas (Fei y col., 1990) y entre las líneas celulares uterinas de mono rhesus recién nacido (Kramer y col., 1990).

2.- RADIOINMUNOENSAYO

Los límites de sensibilidad de los bioensayos restringen severamente su aplicación para medir relaxina en la sangre. El primer radioinmunoensayo que se desarrolló para la relaxina se realizó en 1972, con una preparación impura de relaxina NIH-R-P1 (440 GPU/mg), la cual contenía 20 % de relaxina biológicamente activa y 80 % de proteínas no caracterizadas (Bryant-Greenwood, 1972; Bryant-Greenwood, 1977). Cuando se contó con preparaciones puras de relaxina, se utilizaron para desarrollar radioinmunoensayos homólogos para la cerda (Afele Bryant-Greenwood, Chemley y Dax, 1979), la rata (Sherwood y Crnekovic, 1979), la yegua (Stewart, 1986) y la mujer (Eddie, Bell., Lester, Bennett, Johnston y Niall, 1986). Estos RIA's homólogos son 1000 veces más sensibles que los bioensayos, ya que se detectan concentraciones de 100 pg o menos y se pueden realizar con volúmenes pequeños de hasta 2-5 μ l. Ya que el RIA solo mide inmunoreactividad y no bioactividad de relaxina, debe de tenerse precaución en cuanto a las interpretaciones fisiológicas de los niveles de inmunoreactividad de relaxina.

La marcada variación de aminoácidos entre las especies, contribuye a que haya un limitado entrecruzamiento de las preparaciones de relaxina purificada, en radioinmunoensayos para la relaxina de otras especies (Sherwood, 1982; Gutkowska, St-Louis, y Genest, 1985); a pesar de este problema, el RIA porcino se ha utilizado para obtener información con respecto a los niveles en la sangre periférica o de tejidos de otras especies (mono, orangután, hamster, ratón, gato, coneja, etc.) y así tener una aproximación del perfil de los niveles de inmunoreactividad durante la preñez (Sherwood 1994).

3.- ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS

En 1981, Bodsch y Struck informaron del desarrollo de dos tipos de inmunoensayos enzimáticos para relaxina porcina. La sensibilidad es muy parecida a la reportada para los RIA's porcinos. Sin embargo, es necesaria una caracterización más rigurosa de estos ensayos inmunoenzimáticos para la relaxina. No es claro si estos ensayos, son tan precisos o exactos como los radioinmunoensayos para la relaxina, pero tienen ventajas sobre los RIA's, como son: que el anticuerpo marcado con la enzima, es más estable que la relaxina radiomarcada y se evitan los problemas de manejo y desecho del material radioactivo (Sherwood, 1994).

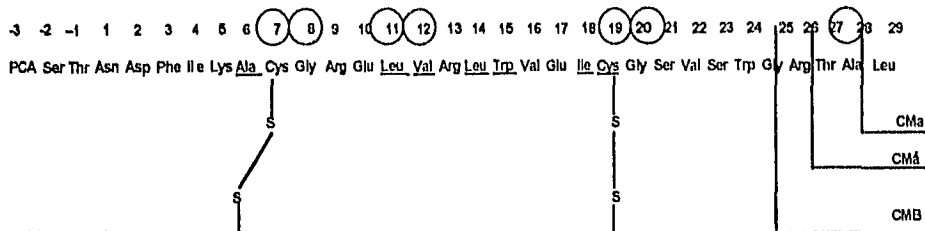
III.- BIOQUÍMICA DE LA RELAXINA

1.- ESTRUCTURA

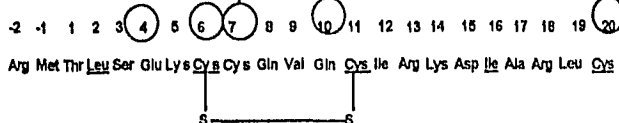
Las relaxinas de las diferentes especies, son péptidos con un peso molecular bajo de entre 5,200-7,200 d. La relaxina porcina (Figura 17), está constituida por una cadena A de 24 aminoácidos y una B de 32 aminoácidos, unidas covalentemente por dos enlaces disulfuro intercadena y uno intracadena en la A (Schwabe, McDonald y Steinetz 1976; James, Niall y Kwok, 1977). Los puntos isoeléctricos generalmente son alcalinos (9.4-10.6), a excepción de la relaxina de coneja que tiene un p. I. ácido (6.8). La secuencia de aminoácidos de las cadenas A

RELAXINA PORCINA

CADENA B

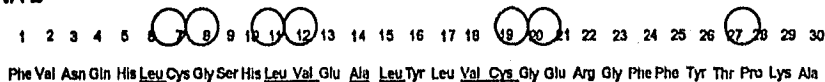


CADENA A



INSULINA PORCINA

CADENA B



CADENA A

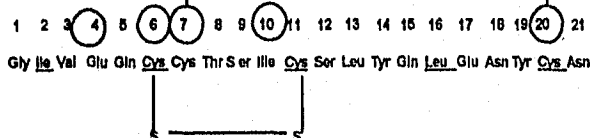


Figura 17. Estructura covalente de la relaxina y la insulina porcinas. En esta figura, los residuos están enumerados con respecto a la secuencia de la insulina, para facilitar la comparación de las dos hormonas. CMA, CMA', CMB son formas de relaxina porcina que se diferencian en el número de aminoácidos de la cadena B. Los aminoácidos encerrados en círculos son idénticos en la relaxina e insulina y los aminoácidos subrayados son los que contribuyen a formar el centro hidrófobo en ambas hormonas (Tomado de Sherwood, 1993).

y B se determinó por análisis de secuencias de aminoácidos de preparaciones de hormona nativa. Mas tarde, se confirmó por análisis de secuencia de nucleótidos de ARNm (Bryant-Greenwood y col, 1994). La localización de los enlaces disulfuro se ha determinado únicamente para la relaxina porcina y es muy semejante en la insulina porcina (Figura 17). Sin embargo, parecen ser similares para otras relaxinas puesto que las cisteínas que son las encargadas de formar los enlaces disulfuro, están en la misma posición (Figura 18) (Schwabe y col., 1977).

CADENAS A DE LAS RELAXINAS

```

Humano 2      <Q L Y S A L A N K C C H V G C T K R R S L A R F C
Humano 1      R P Y V L F E K C C L I G C T K R R S L A K Y C
Gorila 1      R P Y V A L F E K C C L I G C T K R R S L A K Y C
Gorila 2      <Q L Y S A L A N K C C H V G C T K R R S L A R F C
himpancé     <Q P Y V A L F E K C C L I G C T K R R S L A N Y C
Chimpancé 2   <Q L Y S A L A N K C C H V G C T K R R S L A R F C
Orangután 2   <Q L Y S A L A N K C C H V G C T K R R S L A R F C
Orangután 1   P Y M A V F E K C C L I G C T K R R S L A K Y C
Mono rhesus   <Q L Y M T L S N K C C H I G C K K S L A K F C
Mandrill      <Q L Y T T L S N K C C H I G C T K K S L A K F C
Porcino       R M T L S E K C C Q V G C I R K D I A R L C
Rata          Q S G A L L S E Q C C H I G C T R R S I A K L C
Ratón         E S G G L M S Q Q C C H V G C S R R S I A K L Y C
Yegua         <Q L S H K C C Y W G C T R K E L A R Q C
Perro         R M Y L S E K C C Q V G C I R K D I A R L C
Cobaya        <Q L D M T V S E K C C Q V G C T R R F I A D S C
B. edeni      R M T L S E K C C Q V G C I R K D I A R L C
B. aurostrata R M T L S E K C C Q V G C I R K D I A R L C
Marsopa       R M T L S E K C C Q V G C R K D I A R L C
Tiburón (ST)  A T S P A M S I K C C I Y G C T K K D I S V L C
Tiburón (DF)  E G S P G M S S K C C T Y G C T R K D I S I L C
Mantaraya     E E K M G F A K K C C L A P C S V D V L L S T C
  
```

CADENAS B DE LAS RELAXINAS

```

Humano 2      D S W M E E V I K L C G R E L V R A Q I A I C G M S K R S L
Humano 1      K W K D D V I K L C G R E L V R A Q I A I C G M S T W S K R S L
Gorila 1      K W K D D V I K L C G C E L V R A Q I A I C G M S T W S
Gorila 2      D S W K D D V I K L C G R E L V R A Q I A I C G M S T W S
Chimpancé 1   D S W M D E V I K L C G R E L V R A Q I A I C G K S T W S
Chimpancé 2   D S W M D E V I K L C G R E L V R A Q I A I C G K S T W S
Orangután 1   K W K E D V I K L C S R E L V R T Q I A I C G M S T W R
Orangután 1   D S W M D E V I K V C G R E L V R V Q I A I C G M S T L D
Mono Rhesus   K W M D D V I K A C G R E L V R A Q I A I C G K S T L G
Mandrill      K W M D D V I K A C G R E L V R A Q I A I C G K S T L G
Porcino       <Q S T N D F I K A C G R E L V R L W V E I C G S V S W G R T A L
Rata          R V S E E W M D Q V I Q V C G R G Y A R A W I E V C G A S V G R L A L
Ratón         R V S E E W M D G F I R M C G R E Y A R E L I K I C G A S V G R L A L
Yegua         <Q K P D D V I K A C G R E L A R L A I E I C G S L S W K
Perra         T D D K K L K A C G R D Y V R L Q I E V C G S S W W G R K A G Q L R E
Cobaya        G F L D K V I K V C G R D L V R I K I D I C G K I L L G D M T T G
B. edeni (w)  <Q R T N D L I K A C G R E L V R L W V E I C G S V R W G R I A L
B. acutorostrata <Q R T N D L I K A C G R E L V R W V E I C G S V R W G Q S A L
Marposa       <Q R T N D L I K A C G R E L V R L W V E I C G S V W G R T A T
Tiburón (ST) <Q S L S N A E S G I K L C G R E F I R A F I Y L C G G T R W T R L P N F G N P I M
Tiburón (D:F) <Q S F K N A E P S I K L C G E F I R A V I Y T C G G S R
Raya          R P N W E E R S R L C G D L I R A F I Y L C G G T R W T R W T R L P N F G N Y P
Bombixina     Q P A V H T Y C G R H L A R T L A D L C W E A G V D
  
```

Figura 18. Secuencia primaria de relaxinas y secuencias predeterminadas basadas sobre cadN's para las cadenas A y B. Las secuencias han sido alineadas respecto a los residuos de cisteína. El gen 1 en el orangután y gorila no son funcionales (tomado de Bryant-Greenwood y Schwabe, 1994).

2.- EVOLUCIÓN

La relaxina, la insulina y los factores de crecimiento, son similares en su estructura secundaria y terciaria pero difieren en su secuencia de aminoácidos, así como en su función (Blundell y Humbel, 1980; Bradshaw y Niall 1978). La similitud en la estructura de estas tres hormonas, condujo a postular que pertenecían a una misma familia de péptidos (Blundell y Humbel, 1980); esto es, que duplicaciones genéticas de una molécula primitiva semejante a la insulina, seguida de mutaciones genéticas, codificó moléculas con diferente función (Bedarker y col., 1977; James y col., 1977). Por otro lado, Schwabe, Gowan y Reining (1982) desafiaron la hipótesis monofilética, la cual dice que la relaxina e insulina son productos de duplicaciones genéticas. Con base en las diferencias en su secuencia de aminoácidos, que es del 75 %, y solo tienen una homología del 25 %. Estos investigadores propusieron que estas dos hormonas no son productos de duplicaciones genéticas, sino más bien explican su origen a través de una hipótesis, a la que denominaron del potencial genético polifilético, por medio de la cual se originaron las familias de proteínas semejantes a la insulina. De acuerdo con esta hipótesis del potencial genético, las condiciones medio ambientales prebióticas llevaron a la síntesis abiótica de un gran número, pero finito de polímeros de nucleótidos (potencial genético), los cuales tenían capacidad de autoreplicarse, pero también se mezclaban y ampliaban a través del caldo primitivo. Cuando las células se formaron, incorporaron un gran número de polímeros informacionales (potencial genético), algunos de ellos codificaron para familias tales como la insulina. Si esta hipótesis es correcta, los genes presentes en formas de vida superiores deben estar presentes en algunos organismos unicelulares, como lo demostraron Schwabe, LeRoith, Thompson, Shiloach y Roth en 1983, quienes reportaron la extracción de una molécula con el tamaño y propiedades inmunológicas de la relaxina porcina en el protozoario *Tetrahymena pyriformis*. Esta hormona tiene una amplia distribución a través de toda la escala filogenética, ya que se ha detectado inmunológicamente desde un protozoario hasta el humano e incluso en una planta inferior (*Spirogira*) (Schwabe y Büllsbach, 1990).

A diferencia de la estructura primaria de la insulina de las diferentes especies, la cual conserva una alta homología (60-98 %), la estructura de las relaxinas, divergió considerablemente durante la evolución, ya que solamente existe, con raras excepciones, entre un 40-48 % de homología en la secuencia de sus aminoácidos. Sin embargo, la posición de las cisteínas a la mitad de las cadenas y las glicinas adyacentes no varían (Figura 18).

3.- BIOSÍNTESIS

En la figura 19, se puede observar el flujo de información de gen 1 de la relaxina humana para dar preprorelaxina: El gen de relaxina se transcribe para dar el ARN mensajero, el cual contiene un intrón de 3,700 bases. Después el ARN mensajero se traduce en la preprorelaxina (Kemp y Niall, 1984). Esta cadena de preprohormona consiste de: péptido señal/cadena B/péptido conectante/cadena A (Figura 20). El péptido señal de la preprorelaxina de rata, cerda y de mono contienen de 22-25. La diferencia entre los

tamaños de los precursores de relaxina e insulina (Gast, 1983), se atribuye a la longitud de los péptidos conectantes (péptido C). Por ejemplo, los péptidos C de la relaxina de rata y cerda son de 104 y 105 aminoácidos, mientras los de proinsulina de rata y cerda contienen 30 aminoácidos. Aunque no se conoce la función del péptido C, al parecer media el plegamiento de los precursores para una correcta unión de los puentes disulfuro entre las cadenas A y B. Además, parece tener alguna actividad hormonal, pero deben de realizarse más estudios, para establecer esta función (Hudson, Haley, Cronk, Shlne y Niall, 1981, Sherwood, 1994).

El rompimiento de los péptidos señal y conectante de la preprorelaxina, es semejante al de otros péptidos

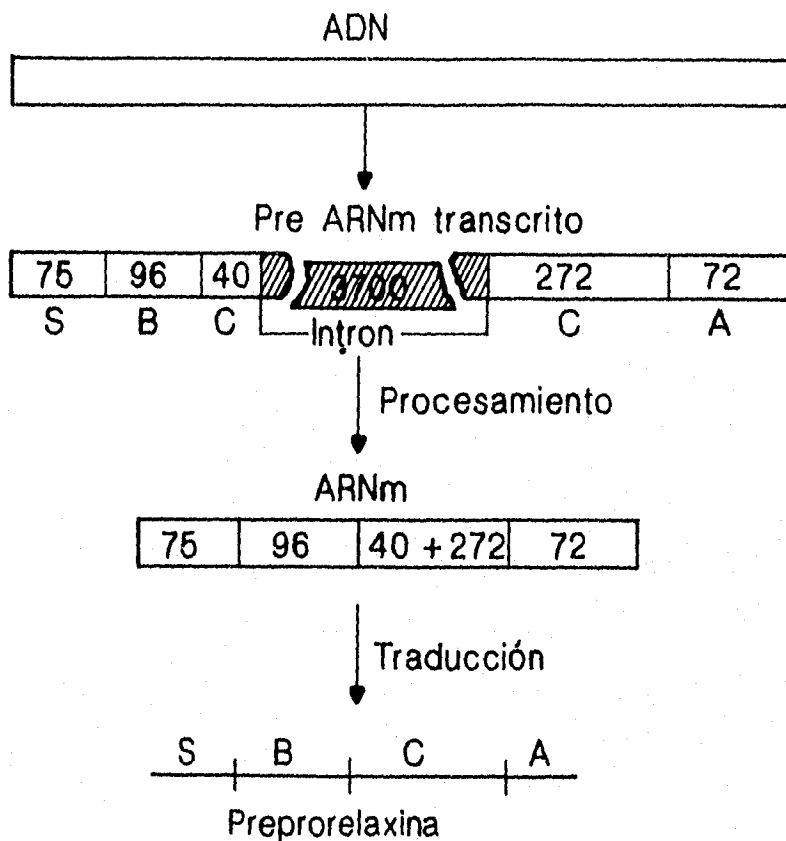


Figura 19. Representación esquemática del flujo de información del gen 1 de la relaxina humana a preprorelaxina. (Tomado de Kemp y Niall, 1984).

(Figura 20). Esto es, que muchas proteínas secretadas se sintetizan como un precursor inactivo, el cual luego es activado. En general, la activación consiste en la remoción de una parte de la cadena polipeptídica, que

puede suceder en diferentes sitios. Diversas hormonas polipeptídicas se producen como prohormonas inactivas y éstas son luego activadas intracelularmente, por medio de enzimas proteolíticas de conversión que están presentes en el aparato de Golgi. Entre otros ejemplos, aparte de la prorelaxina, están la proinsulina, el proglucagon, la progastriina etc. Al pasar la preprorelaxina por el retículo endoplásmico, se remueve el péptido señal por la peptidasa señal. La cadena de prorelaxina es luego activada en el aparato de Golgi por la remoción del péptido C, a cargo de la enzima de conversión. Finalmente, la relaxina y el péptido C quedan en el granulo de secreción en las células de la granulosa del cuerpo lúteo de cerda (Kemp y col., 1984).

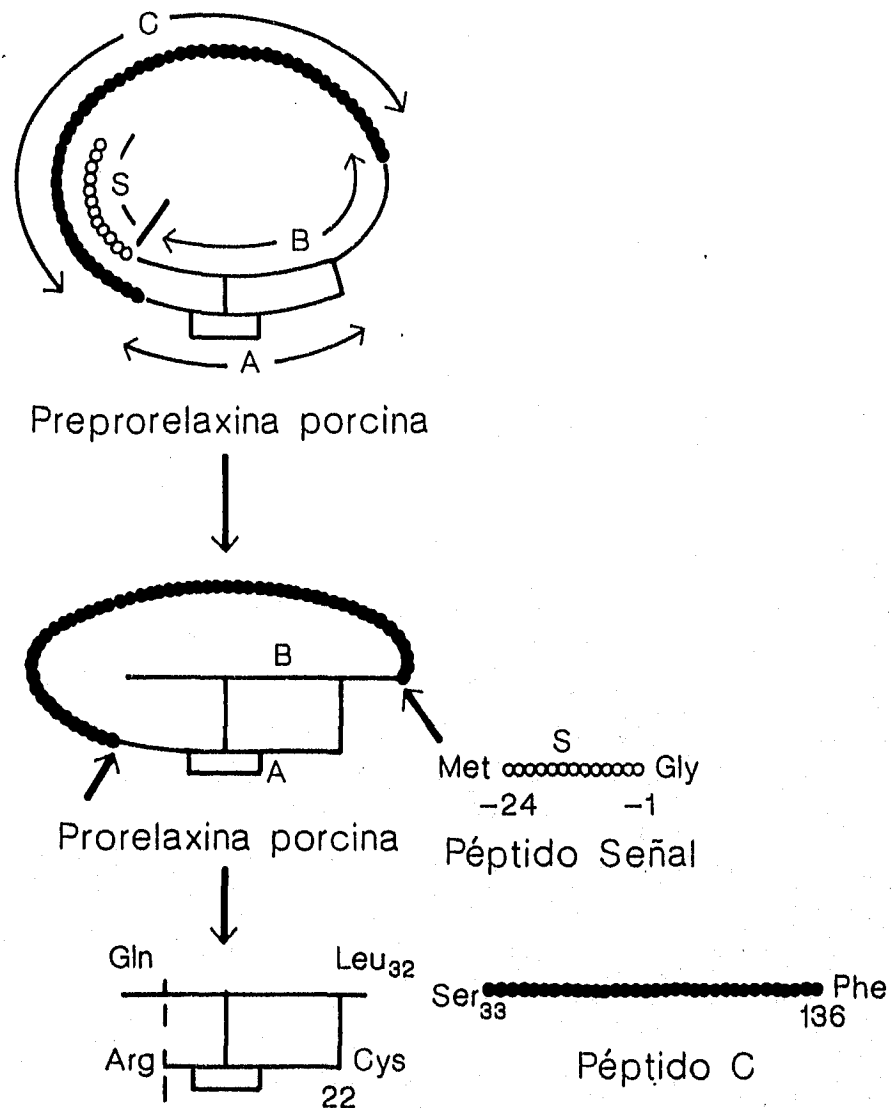


Figura 20. Resumen esquemático del procesamiento de relaxina, después de eliminar el péptido señal (S) y el péptido conectante (C) por digestión proteolítica (Tomado de Kemp y col., 1984).

4.- RECEPTORES

Estudios a nivel de tejidos y con el animal completo demostraron receptores para relaxina en el útero. Se informó que en los cuernos uterinos de rata (McMurtry, Kwok y Bryant-Greenwood, 1978; Mercado-Simmen, Bryant-Greenwood y Greenwood 1980; Mercado-Simmen, Bryant-Greenwood y Greenwood, 1982), cobaya (Gates, Flynn, Ryan y Sherwood, 1981), cerda (Mercado-Simmen y col., 1982) y ratona (Yang, Rembiensa, Büllsbach y Schawave, 1992), existe un número finito de receptores de alta afinidad ($k_a = 10^9-10^{10} M^{-1}$) (Mercado-Simmen y col., 1980; Gast y col., 1980; Mercado-Simmen y col., 1982). Además, con estudios de radioautoradiografía se han localizado sitios de unión en ambas capas musculares (circular y longitudinal) de los segmentos uterinos de ratas sensibilizadas con estrógenos (Weiss, O'Byrne, Hochman, Steinetz, Goldmish y Flitcraft, 1978). Como con otros receptores de hormonas proteicas, los receptores de relaxina parecen estar asociados con la membrana plasmática. Se informó que los receptores para la relaxina se encuentran en un mayor número, durante los estados dominados por los estrógenos del ciclo estral de la rata (Maillet, 1979) y después de la administración de estrógenos en ratas y cerdas ovariectomizadas (Mercado-Simmen y col., 1980). Mercado-Simmen y col. en 1982, propusieron que la modulación de los receptores de relaxina en el útero, puede ser parte del mecanismo por el cual los estrógenos aumentan la sensibilidad del útero a la relaxina. Estos investigadores, también informaron que los sitios de unión aumentan durante la segunda mitad del embarazo en el útero de la rata y que la relaxina endógena y la exógenamente administrada puede reducir su número. Los receptores de la relaxina no han sido aislados o caracterizados (Sanborn, 1986, Sherwood, 1994).

5.- MECANISMO DE ACCIÓN

Los estudios sobre el mecanismo de acción de la relaxina a nivel molecular, se han limitado al útero, donde la inhibición de las contracciones uterinas dependiente de la relaxina, es rápida. Se ha realizado poco trabajo con respecto a otros órganos blanco de la relaxina como la sínfisis púbica o el cérvix, razón por la cual el mecanismo de acción de la relaxina se refiere solo al útero (Kemp y col., 1984) y Niall, 1984). Varias hormonas influyen sobre la actividad del músculo liso: la acetilcolina, la oxitocina, la angiotensina y las prostaglandinas estimulan la contracción, mientras que los agonistas B-adrenérgicos y la relaxina causan la relajación (Kemp y col., 1984). La relaxina inhibe las contracciones uterinas espontáneas (Krantz, Bryant y Carr, 1950; Sawyer, Frieden y Martin, 1953; Wiqvist y col., 1958), así como aquellas manejadas por estimulación eléctrica (Porter, Downing y Bradshaw, 1981; Kemp, 1981), por despolarización con KCl (St. Louis, 1981), oxitocina, o prostaglandinas F2 (PGF 2) (Porter y col., 1981).

A) Bases moleculares de la contracción del músculo liso

Cuando las células del músculo liso son estimuladas se provoca un aumento de los niveles de calcio intracelular, ya sea del que entra a la célula o del que sale del retículo endoplásmico. El Ca^{2+} entonces se une a la calmodulina, una proteína reguladora del calcio (la cual se encuentra en altas concentraciones), para

formar el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Este complejo Ca^{2+} -calmodulina se une a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) (la cual esta inactiva cuando esta sola) para formar el complejo holoenzimático Ca^{2+} -calmodulina-MLCK activo. La MLCK activa fosforila las cadenas ligeras de la miosina de 20,000 d. Una vez fosforilada la miosina interacciona con la actina y da como resultado la contracción. Cuando la actina interacciona con la miosina, estimula la actividad ATPasa de la miosina (Figura22) (Kemp y col., 1984).

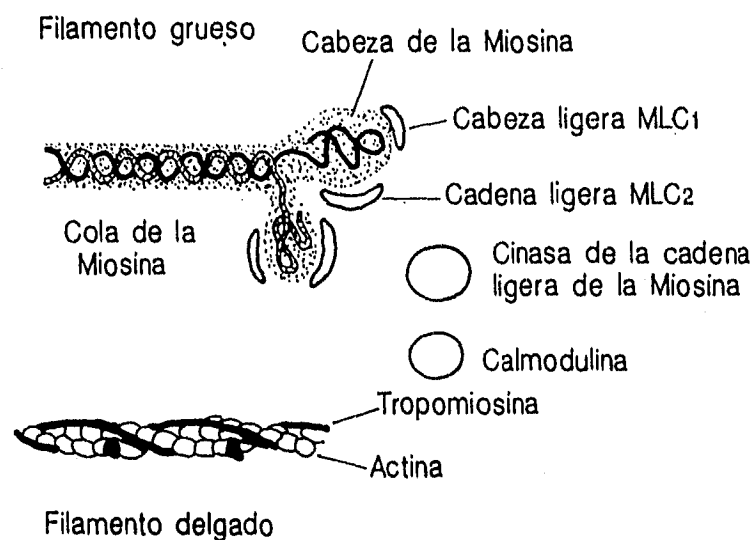


Figura 21. Representación diagramática de los elementos contractiles del músculo liso. La fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLCK2) estimula la ATPasa de la miosina activada por la actina (Tomado de Kemp y col., 1984)

B) Posible mediación a través de la proteína-cinasa A y/o a través de los niveles de calcio intracelular.

El mecanismo(s) por el cual la relaxina lleva a cabo la inhibición de las contracciones uterinas aún no se conoce (Sherwood 1994). Sin embargo, se sabe que este mecanismo puede ser a través de la fosforilación de la MLCK, mediada por proteínas-cinasas dependientes de AMPc. O que la relaxina disminuye la actividad de la MLCK, a través de la reducción de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Figura 22).

Proteínas cinasas: Cuando la relaxina se une a su receptor membranal, provoca la activación de la adenilato ciclasa, que a su vez induce un aumento de AMPc. Este AMPc se une a la subunidad reguladora de una proteína cinasa A (PKA) para activarla. Esta PKA activa, induce la fosforilación de la MLCK, lo cual hace que se separe del complejo Ca^{2+} -calmodulina y de esta manera la MLCK queda inactiva y no fosforila más miosina. Además se activan fosfatasas que desfosforilan la miosina y se provoca la separación de la actina (Relajación) (Nishikori, Welsbrodt, Sherwood y Sanborn, 1983).

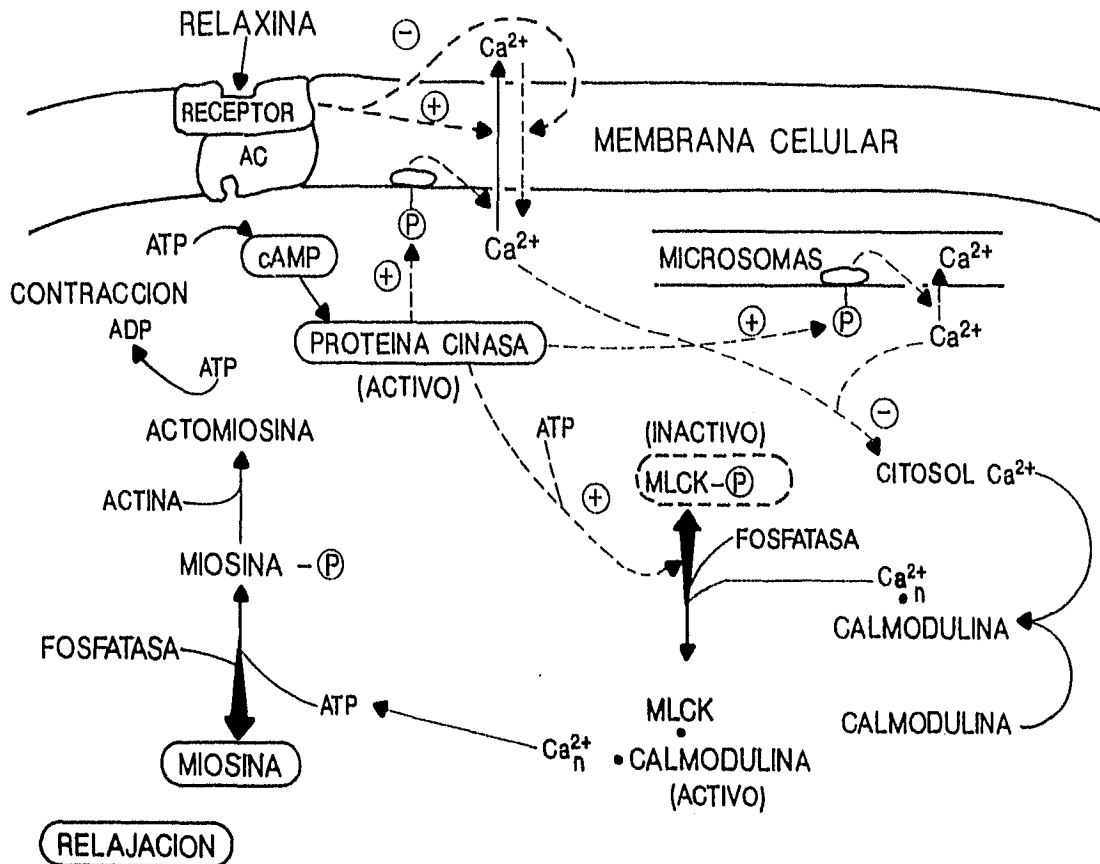


Figura 22. Mecanismos Intracelulares por medio de los cuales la relaxina puede inhibir las contracciones uterinas de células miométricas uterinas. Los efectos propios de la relaxina que están apoyados en datos experimentales en células miométricas de rata, están encerrados con líneas sólidas y precedidas de flechas sólidas. Los posibles efectos de la relaxina que no han sido demostrados, se muestran con líneas interrumpidas. La proteína cinasa A dependiente de AMPc, se disocia en presencia de AMPc en un complejo subunidad reguladora-AMPc y una subunidad proteína catalítica cinasa activa, que promueven la fosforilación de proteínas intracelulares. Después del tratamiento con relaxina, aumenta el AMPc, aumenta la actividad de la proteína cinasa, disminuye la afinidad de la MLCK por el complejo Ca^{2+} -calmodulina, disminuye la actividad de la MLCK, disminuye la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, disminuye la actividad de la ATPasa actomiosina, todos estos eventos llevan a la relajación de la contractilidad uterina. No es claro si la relaxina lleva a cabo sus efectos a través de la fosforilación de la MLCK. Si la relaxina puede actuar, al menos en parte, por la reducción de los niveles de Ca^{2+} intracelular, disminuyendo así la actividad de la MLCK y la fosforilación de la cadena ligera de la miosina. Hay evidencia de que la relaxina promueve el aumento del flujo de Ca^{2+} de las células miométricas en cultivo (Sanborn, 1986; Sherwood, 1994).

Calcio: Otro mecanismo por el cual la relaxina puede inhibir la actividad de la MLCK, es a través de la regulación de los niveles de MLCK. La formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina, necesario para la activación de la MLCK, se puede inhibir a través de la reducción de los niveles de Ca^{2+} intracelular. La relaxina puede:

- 1) Aumentar el secuestro de Ca^{2+} dentro de los microsomas.
- 2) Aumentar el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana celular hacia el espacio extracelular,
- 3) Disminuir la entrada de Ca^{2+} dentro de las células miométricas

4) Promover la combinación de estos procesos.

Es posible que estos procesos de transporte de Ca^{2+} , estén mediados por la fosforilación de proteínas de la membrana, proceso catalizado por una PKA dependiente de AMPc, como se muestra esquemáticamente en la figura 22. El Ca^{2+} intracelular que es secuestrado por los microsomas uterinos y la fosforilación de proteínas microsomiales, es estimulado por el AMPc (Sanborn, 1985, 1986). Si fosforilación de una proteína(s) intracelular es un componente en el mecanismo(s) por el cual la relaxina reduce la actividad de la MLCK, o por la fosforilación directa de la MLCK o indirectamente a través de la fosforilación de proteínas que influyen sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, no se sabe con certeza pero quizás sea por las PKA o que otras proteínas cinasas, dependientes de AMPc estén involucradas. Finalmente, la relaxina puede alterar los niveles de Ca^{2+} intracelular, al menos en parte, a través de mecanismos (que no involucran la fosforilación de proteínas intracelulares) que controlan la entrada de calcio por medio de canales operados por el receptor o por otro tipo de canales (Sanborn y Anwer, 1990)

IV.- ACCIONES BIOLÓGICAS Y TEJIDOS DE SECRECIÓN DE LA RELAXINA

1.- EN LA HEMBRA

La relaxina es producida en altos niveles por los tejido(s) del tracto reproductivo durante la preñez. El tejido que la produce varía entre las especies (Tabla XI), estos pueden ser el cuerpo lúteo, la placenta, o el útero. En muchas especies que han sido estudiadas, uno de estos tejidos es la fuente primaria (y probablemente la única) de relaxina en la sangre periférica. No es claro el patrón de factores fisiológicos relacionados con la preñez que pueden predecir la fuente de relaxina dentro de las diferentes especies estudiadas. En algunas especies, tales como la cerda, la rata, y la ratona, en las que la producción de progesterona lútea es necesaria a través de la preñez, la fuente de relaxina es también el cuerpo lúteo. Sin embargo, en la coneja, donde la progesterona lútea es necesaria a través de la preñez, la placenta es la fuente de relaxina. En la mujer, la yegua y la cobaya, especies en las cuales el cuerpo lúteo no es la única fuente de progesterona a través de la preñez, la relaxina se produce en el cuerpo lúteo, placenta y útero respectivamente. La regulación de la secreción, también varía entre las especies. Por ejemplo, los niveles de la relaxina ovárica de la rata permanecen bajos, a menos que el animal este preñado, mientras que la relaxina ovárica de la cerda puede aumentar a niveles altos en ausencia de la preñez. La regulación de la secreción también varía entre las especies, consecuentemente los perfiles de los niveles de relaxina en la sangre periférica a través de la preñez, son diferentes entre las especies (Sherwood, 1994).

Aunque se conoce una gran variedad de acciones biológicas para la relaxina, la primera acción que se le determinó fue la ampliación de la pelvis antes del parto. En la rata, ratona y cobaya la relaxina induce el desarrollo del útero, imbibición de agua y la acumulación de glucógeno, así como la inhibición de las contracciones uterinas (Kroc, Steinetz y Beach, 1959). La relaxina, en sinergismo con los estrógenos y la

progesterona, tiene efectos sobre el endometrio, influye en el acomodamiento del colágeno uterino y consecuentemente en la distensibilidad uterina (O'Byrne y Steinetz, 1976). La relaxina parece ser la responsable de la maduración y dilatación del cérvix en muchas especies, incluyendo a la mujer. Además la relaxina potencia la cornificación inducida por los estrógenos en la superficie vaginal (Hall, 1960). En la glándula mamaria, la relaxina ejerce un sinergismo con estrógenos y progesterona, causando el desarrollo lóbulo alveolar (Smith, 1981).

Hay evidencia de que el ovario de cerda y ratas no preñadas contienen relaxina. Sin embargo parece que la relaxina es sintetizada por el folículo, ya que células de la granulosa y de la teca obtenidas de folículos preovulatorios de cerda, secretan relaxina *in vitro*, en respuesta a la estimulación de LH. Aun no se ha establecido la función de la relaxina, que se produce a niveles bajos en los ovarios de las cerdas durante el periodo folicular y periovulatorio, o durante el estro en ratas. Bryant-Greenwood y col. en 1982, obtuvieron

Tabla XI.- Fuentes de secreción de Relaxina en diferentes mamíferos.

Especie	Ovario necesario a través de la preñez	Fuente primaria de relaxina	Fuente(s) secundaria de relaxina ^a
Cerda (<i>Sus scrofa</i>)	SI	Cuerpo lúteo	Útero
Yegua (<i>Equus caballus</i>)	No	Placenta	
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	SI	Cuerpo lúteo	
Oveja (<i>Ovis aries</i>)	No	Placenta	
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	SI	Placenta	Ovarios
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	SI	Cuerpo lúteo	Útero
Ratón (<i>Rattus musculus</i>)	SI	Cuerpo lúteo	
Cobaya (<i>Cavia porcellus</i>)	No	Útero	Glándula Mamaria
Conzpa (<i>Dryobates autotus</i>)	SI	Mamaria	Útero
Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	SI	Placenta	
Mujer (<i>Homo sapiens</i>)	No	Cuerpo lúteo	Desludia,placenta glándula mamaria

a: La fuente secundaria de relaxina aún no está bien establecida (tomado de Sherwood, 1994).

evidencia de que la relaxina Intraovárica puede actuar localmente en la rata. Estos investigadores exploraron la influencia de la relaxina sobre tres enzimas involucradas en la remodelación del tejido conectivo, durante el desarrollo folicular y/o ovulación, estas son el activador del plasminógeno la colagenasa y la proteoglicanasa.

2.- EN TEJIDOS NO REPRODUCTIVOS

La relaxina también tiene efectos sobre otros tejidos no reproductivos que incluyen el tejido adiposo, la glándula tiroidea, la mucosa gástrica, la piel y los vasos sanguíneos. Olefsky, Saekow y Kroc (1982), informaron que la relaxina de cerda altamente pura, aumenta la capacidad de la insulina porcina, para unirse a los adipocitos obtenidos de ratas hembras adultas (pero no los obtenidos de machos o de hembras inmaduras) y que este aumento de unión de la insulina, se atribuye a un aumento en la afinidad por su receptor. Se postuló que el aumento que induce la relaxina, en la unión de la insulina puede tener algún significado biológico, puesto que niveles fisiológicos de relaxina potencian la capacidad de concentraciones submáximas de insulina para promover el transporte de glucosa y la oxidación de glucosa en los adipocitos. El efecto estimulante de la relaxina sobre la actividad biológica y la unión de la insulina, también se observó en adipocitos humanos. El mecanismo(s) por el cual la relaxina modifica la interacción de la insulina con su receptor aún no se conoce (Olefsky y col., 1982, Sherwood, 1994).

Los efectos de la relaxina sobre la tiroides y mucosa gástrica, aún no se conocen. Pero al parecer, extractos de relaxina cruda aumentan el peso de la tiroides, la captación de iodo radioactivo y la unión de proteínas marcadas con iodo. No se ha reportado que la relaxina tenga algún efecto sobre la función o el desarrollo de la tiroides. Un reporte breve, indica que dosis bajas de relaxina, activa la adenilato ciclasa de la mucosa gástrica. Sin embargo, se necesitan estudios más profundos para establecer los verdaderos efectos de la relaxina sobre estos tejidos (Ruoff, Lippert, Seeger y Voelter, 1984, Sherwood, 1994).

En 1956, Boucek informó que ratas que recibieron una administración prolongada de relaxina porcina impura, mostraron un marcado aumento en la elasticidad de la piel *in vivo*. Con esta observación, se exploró el uso de relaxina porcina en pacientes con enfermedades crónicas que debilitaban el tejido conectivo, con disminuciones severas en la elasticidad cutánea y en el flujo de la sangre en los vasos sanguíneos periféricos (como son el escleroderma y la enfermedad arterial periférica ocliterativa). Se informó que al inyectar intramuscularmente relaxina porcina impura por 3 días en un periodo de 6 a 30 meses en combinación con estrógenos, se observaron efectos curativos dramáticos (Casten y Boucek, 1958). Aunque hubo efectos curativos similares con la administración de relaxina porcina parcialmente purificada en pacientes con escleroderma, otros investigadores informaron que la relaxina porcina tuvo poco o ningún efecto (Jefferris y col., 1962). Los efectos terapéuticos propios de la relaxina sobre los vasos sanguíneos, parecen necesitar de un tratamiento continuo. Actualmente, no hay información de la influencia de relaxina altamente pura, sobre el tejido conectivo en otras especies (Jefferris y Dixon, 1962, Sherwood, 1994)).

Por otra parte, en ratas la presión sanguínea sistólica es baja durante los primeros 3 o 4 días de la gestación y coincide con el periodo en el que los niveles de la relaxina en la sangre periférica están elevados al máximo (St-Louis y Massiocotte, 1985). Algunos informes indican que la relaxina quizás tenga algún efecto sobre la vasculatura de tejidos no reproductivos. Así Del Mese, Casali y Novelli en 1983, informaron que la relaxina porcina y un extracto de decidua humana, ejercieron un efecto vasodilatador rápido sobre la microcirculación del mesocecum. St-Louis y col. en 1985, estudiaron la influencia de una infusión intravenosa de relaxina porcina y

de rata, altamente purificadas a dosis bajas (aproximadamente 100 ng/hr) en ratas no preñadas hipertensas y normotensas. Estos investigadores encontraron que ambas relaxinas reducen la presión sanguínea sistólica en ratas espontáneamente hipertensas. Pero esta infusión no reduce la presión sanguínea en ratas normotensas. Se cree que la relaxina puede ser uno de los factores responsables de la disminución de la presión sanguínea durante la preñez tardía en la rata.

3.- EN EL MACHO

Steinetz y col en 1959, identificaron bioactividad para relaxina (con el bioensayo del ligamento interpúbico) en los testículos del armadillo. Dubois y Dacheux (1978), detectaron relaxina en los testículos del jabalí. Después en 1980, describieron una sustancia en el plasma seminal humano. Lomouye y col. (1980), también encontraron un péptido semejante a relaxina en el plasma seminal humano. Estos resultados fueron confirmados por Essig y col. (1982), quienes demostraron bioactividad para la relaxina en el plasma seminal humano, con el bioensayo de la palpación de la relajación de la sínfisis púbica en la cobaya. Estos investigadores postularon que la fuente de la relaxina era la próstata, ya que la relaxina se encontró en hombres después de que se les realizó la vasectomía, con lo cual se eliminan los componentes testicular y epididimal. También se encontraron concentraciones altas de relaxina, en la primera porción (rica en secreción prostática) del eyaculado. Por otro lado la relaxina no se encontró en el suero de hombres, pero sí en el de los jabalís y los niveles disminuían después del celo (Weiss, 1989). La relaxina se ha detectado dentro de las células del epitelio secretorio prostático del gallo, cerdo, armadillo y humano adultos. También se ha encontrado relaxina, pero en menor concentración, en las vesículas seminales y la parte ampular de los vasos deferentes (Yki-Järvinen, Wahlström y Seppälä, 1983).

La relaxina afecta la movilidad de los espermatozoides; cuando se aplicó el anticuerpo antirelaxina porcina a espermatozoides de humano y de jabalí, disminuyó notablemente la motilidad y se observó lo mismo cuando se aplicó con un anticuerpo antirelaxina humana, por lo que se ha propuesto que los anticuerpos antirelaxina pueden servir como adyuvantes para aumentar la eficiencia de los métodos anticonceptivos (Weiss, 1989). La relaxina mantiene la motilidad de los espermatozoides porcinos y la mejora cuando se aplica a muestras de espermatozoides humanos, que tienen una baja motilidad. La relaxina porcina aumenta significativamente la capacidad de penetración de los espermatozoides humanos, dentro del mucus cervical humano o bovino. Como la relaxina es un componente normal del plasma seminal humano se podría utilizar como un aditivo efectivo y seguro en el tratamiento de infertilidad masculina (Brenner, Lessing, Schoenfeld, Amelar, Dubin y Weiss, 1984).

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Abramowitz A. A., Money W. L., Zarrow M. X., Talmage R. V. N., Kleinholz L. H. and Hisaw F. L. (1944): Preparation biological assay and properties of relaxin. **Endocrinol.**, **34**: 103-114.
- 2.- Afele S., Bryant-Greenwood G. D., Chemley W. A. and Dax E. M. (1979): Plasma relaxin immunoactivity in the pig at parturition and during nuzzling and suckling. **J. Reprod. Fertil.**, **56**: 451-457.
- 3.- Anderson M. B. (1984): Bioassay of porcine relaxin components by *in vitro* inhibition of rat uterine contractions. **Endocrinology**, **114**: 364-368.
- 4.- Anderson L. L. (1985): Physiology of relaxin and progesterone during pregnancy in pigs. **Iowa State University of Science and Technology. Agriculture and Home Economics Experiment Station Cooperative Extension Service.** Ames Iowa. pp 1-7.
- 5.- Bedarker S., Turnell W. G., Blundell T. L. and Schwabe C. (1977): Relaxin as conformational homology with insulin. **Nature**, **270**: 449-451.
- 6.- Bernstein P. and Crelin E. S. (1967): Bony pelvic sexual dimorphism in the rat. **Anat. Rec.**, **157**: 517-526.
- 7.- Blundell T. L. and Humbel R. E. (1982): Hormone families: Pancreatic hormones and homologous growth factors. **Nature**, **287**: 781-787.
- 8.- Bodsch W. and Struck H. (1980): Enzyme-immunoassay for the peptide hormone relaxin. **Fresenius Z. Anal. Chem.**, **301**: 133-134.
- 9.- Boucek R. J. (1956): Biochemical and histological aspects of *in vivo* cultivated connective tissue. In: **Lectures on Orthopedics and Rheumatic Diseases**. Dedication volume, Hospital for Special Surgery. New Haven, C. T. : Quinpiak Press, pp 155-158.
- 10.- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254.
- 11.- Bradshaw R. A. and Niall H. D. (1978): Insulin-related growth factors. **Trends Biochem. Sci. Rec.**, **3**: 274-278.
- 12.- Bradshaw J. M., Downing S. J. Moffatt A. Hinton J. C. and Porter D. G. (1981): Demonstration of some of the physiological properties of rat relaxin. **J. Reprod. Fertil.**, **63**: 145-163.
- 13.- Brenner S. H., Lessing J. B. and Weiss G. (1984): The effect *in vivo* progesterone administration on relaxin-inhibited rat uterine contractions. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **148**: 946-950.
- 14.- Brenner S. H., Lessing J. B., Schoenfeld C., Amelar R. D., Dublin L. and Weiss G. (1984): Stimulation of human sperm cervical mucus penetration *in vitro* by relaxin. **Fertil. Steril.**, **47**: 714-716.
- 15.- Brenner S. H., Lessing J. B., D'Eletto R. D. and Weiss G. (1985): Relaxin-like bioactivity in pooled human pregnancy serum. **Obstet. Gynecol.**, **66**: 46-49.
- 16.- Bryant-Greenwood G. D. (1972): The detection of relaxin in porcine, ovine and human plasma by radioimmunoassay. **Endocrinology**, **91**: 1113-1117.
- 17.- Bryant-Greenwood G. D. (1977): Radioimmunoassay of relaxin. In Abraham G. E. (Ed.), **Handbook of Radioimmunoassay.** Marcel Dekker, New York, pp 243-273.

- 18.- Bryant-Greenwood G. D. (1982): Relaxin as a new hormone. *Endocr. Rev.*, 3: 62-90.
- 19.- Bryant-Greenwood G. D. and Schwabe C. (1994): Human relaxin: Chemistry and Biology. *Endocrine Reviews*, 15 (1): 5-26.
- 20.- Casten G. G. and Boucek R. J. (1958): Use of relaxin in the treatment of scleroderma. *J.A.M.A.*, 166: 319-324.
- 21.- Cohen H. and Steinetz B. G. (1966): Possible role of protein binding in failure of antibody to porcine relaxin to react with pregnant rabbit serum relaxin. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 25: 313-330.
- 22.- Crelin E. S., and Brightman M. W. (1957): The pelvis of the rat: Its response to estrogen and relaxin. *Anat. Rec.*, 128: 467-484.
- 23.- Crelin E. S. (1960): The development of bony pelvic sexual dimorphism in mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 84: 481-511.
- 24.- Crelin E. S. (1969): The development of the bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 31: 1049-1058.
- 25.- Crelin E. S. and Newton E. V. (1969): The pelvis of the free tailed bat: Sexual dimorphism and pregnancy changes. *Anat. Rec.*, 164: 348-358).
- 26.- Del Angel-Meza A. R. Beas-Zarté C., Alfaro F. L. and Morales-Villagran (1991): A simple biological assay for relaxin measurement. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99: 35-39.
- 27.- Del Mese A. Casali R. and Novelli G. P. (1983): Relaxin induced dilation of the venous wall and reduction of the venous blood flow. In: M. Bigazzi F. C. Greenwood and F. Gasparri (Eds.), **Biology of Relaxin and Its Role in the Human**. *Experta Medica*, Amsterdam. pp 291-293.
- 28.- Dorfman R. I., Marsters R. W. and Dinerstein J. (1953): Bioassay of relaxin. *Endocrinology*, 52: 204-214.
- 29.- Dubois M. P. and Dacheux J. L. (1978): Relaxin, a male hormone? *Cell Tissue Res.*, 187: 201-214.
- 30.- Eddie L. W., Bell R. J., Lester A., Bennett H. P. J., Johnston P. D. and Niall H. D. (1986): Radioimmunoassay in pregnancy with an analogue of human relaxin. *Lancet*, 1: 1344-1346.
- 31.- Eldridge B. K. and Fields P. A. (1985): Rabbit placental relaxin and immunohistochemical localization. *Endocrinology*, 117: 2512-2519.
- 32.- Eldridge R. K. and Fields P. A., (1986): Rabbit placental Relaxin: Ultrastructural localization in secretory granules of the syncytiotrophoblast using rabbit placental relaxin antiserum. *Endocrinology*, 119 (2): 606-615.
- 33.- Essig M., Schoenfeld, C., D'Eletto R., Amelar R., Dubin I., Steinetz B. G., O'Byrne E. M. and Weiss G. (1982): Relaxin in human seminal plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 380: 224-230.
- 34.- Essig M. Schoenfeld C. and D'Eletto R. (1982): Relaxin in human seminal plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 380: 224-230.
- 35.- Fei D. T. W., Gross M. C., Lofgren J. L., Mora-Worns M. and Chen A. B. (1990): Cyclic AMP response to recombinant human relaxin by cultured human endometrial cell As specific and high through put *in vitro* bioassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 214-222.

- 36.- Fields P. A. and Larkin L. H. (1980): Enhancement of uterine cervix extensibility in oestrogen-primed mice following administration of relaxin. *J. Endocrinol.*, **87**: 147-152.
- 37.- Fields M. J., Fields P. A. , Castro-Hernández A. and Larkin L. H. (1980): Evidence for relaxin in corpora lutea of late pregnant cows. *Endocrinology*, **107**: 869-876.
- 38.- Fields P.A. Larkin L. H. (1981): Purificación of relaxin from the placenta of the rabbit. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **380**: 75-86.
- 39.- Fields M. J., Fields P. A. and Larkin L. H. (1982): Chemistry of bovine relaxin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **143**: 191-207.
- 40.- Fields P.A., Eldridge R.K., Fuchs A. R. and Fields M. J. (1983): Oxytocin contamination of bovine corpora lutea and human placental relaxin extracts: Problems encountered with the *in vitro* mouse uterus relaxin bioassay. In Bigazzi M., Greenwood F. C. Gasparri F. (Eds.), *Biology of Relaxin and its role in the human*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 185-187.
- 41.- Fields P. A. Eldridge R. K. Fuchs A. R., Roberts R. F. and Fields P.A. (1983): Human placental and bovine corpora lutea oxytocin. *Endocrinology*, **112**: 1544-1546.
- 42.- Fields P.A. and Lee V. H. (1991): Conceptus-mediated integrity of endometrial epithelial cells and maintenance of relaxin synthesis in pregnant rabbits: effects of unilateral oviduct ligation *Biol. Reprod.*, **44**: 364-375.
- 43.- Frieden E. H. and Hisaw F. L. (1950): The purification of relaxin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **29**: 166-178.
- 44.- Frieden E. H. and Adams W. C. (1977): The response to endogenous relaxin of guinea pigs refractory to porcine relaxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **155**: 558-561.
- 45.- Frieden E. H. and Rawitch A. B. (1981): Isolation and chemical properties of relaxin subspecies. In: Bryant-Greenwood G. D., Niall H. D. and Greenwood F. C. (Eds.), *Relaxin*. Elsevier/North-Holland, New York, pp 21-26.
- 46.- Gardner W. U. (1936): Sexual dimorphism of the pelvis of the mouse, the effect of estrogenic hormones upon the pelvis and upon the development of scrotal hernias. *Am. L. Anat.*, **59**: 459-483.
- 47.- Gast M. J., Mercado-Simmen R., Niall H. and Boine I. (1980): Cell-free synthesis of a high molecular weight relaxin-related protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **343**: 148-154.
- 48.- Gast M. J. (1983): Characterization of preprorelaxin by tryptic digestion and inhibition of its conversion to prorelaxin by amino acid analogs. *J. Biol. Chem.*, **258**: 9001-9004.
- 49.- Gates G. S., Flynn J. J., Ryan R. J. and Sherwood O. D. (1981): *In vivo* uptake of ¹²⁵I in the guinea. *Biol. Reprod.*, **25**: 549-554.
- 50.- Gutkowska J., St-Louis J. and Genest J. (1985): Solid-phase radioimmunoassay for relaxin. *Clin. Invest. Med.*, **8**: 133-138.
- 51.- Hall K. and Newton W. H. (1946): The action of relaxin on the mouse. *Lancet*, **1**: 54-55.
- 52.- Hall K. (1947): The effects of pregnancy and relaxin on the histology of the pubic symphysis of the mouse. *J. Endocrinology*, **5**: 174-185.
- 53.- Hall K. (1960): Review relaxin. *J. Reprod. Fertil.*, **1**:368-384.

- 54.- Hall J. A., Cantley T. C., Day B. N., Anthony R. V. (1990): Uterotropic actions of relaxin in prepuberal gilts. *Biol. Reprod.*, **42**: 769-774.
- 55.- Hisaw F. L. (1925): The influence of the ovary on the resorption of the pubic bones of the Pocket Gopher, *Geomys bursarius* (Shaw). *J. Exp. Zool.*, **42** (4) : 411-434.
- 56.- Hisaw F. L. (1926): Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **23**: 661-663.
- 57.- Hisaw F. L. (1927): Experimental relaxation of the symphysis pubis of the guinea pig. *Anat. Rec.*, **37**: 126.
- 58.- Hisaw F. L. and Zarrow M. X. (1950): The Physiology of relaxin. *Vitam. Horm.*, **8**: 151-178.
- 59.- Hisaw L. E. and Hisaw L. E. Jr. (1964): Effect of relaxin on the uterus of monkeys (*Macaca mulatta*) with observations on the cervix and symphysis pubis. *Am. J. Obst. & Gynec.* **89**: 141-155.
- 60.- Hsu C. L. and Sanborn B. M. (1986): Relaxin affects the shape of the rat myometrial cells in culture. *Endocrinology*, **118**: 495-498.
- 61.- Hudson P., Haley J., Cronk M. Shine J. and Niall H. (1981): Molecular cloning and characterization of cDNA sequences coding for rat relaxin. *Nature*, **291**: 127-131.
- 62.- Hudson P. Haley J. and John M. (1983): Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature*, **301**: 638-631.
- 63.- James R., Niall H., Kwok S. and Bryant-Greenwood G. (1977): Primary structure of porcine relaxin: Homology with insulin and related growth factors. *Nature*, **267**: 544-546.
- 64.- Kemp B. E. (1981): Activation of rat uterine cAMP-dependent protein kinase by relaxin. **Program of the 63rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Cincinnati, O. H. 200 (abst.)**
- 65.- Kemp B. E. and Niall H.D. (1984): Relaxin, *Vitam. Horm.*, **41**: 79-115.
- 66.- Kliman B. and Greep R. O. (1958): The enhancement of relaxin-induced growth of the pubic ligament in mice. *Endocrinology*, **63**: 586-595.
- 67.- Kramer S. M., Gibson U. E. M., Fendly B. M., Mohler M. A., Drolet D. W. and Johnston P. D. (1990): Increase in cyclic AMP levels by relaxin in newborn rhesus monkey uterus cell culture *In vitro Cell Dev. Biol.*, **26**: 647-656.
- 68.- Krantz J.C, Bryant G. H and Carr C. J. (1950): The action of aqueous corpus luteum extract upon uterine activity. *Surg. Gynecol. and Obstet.*, **90**: 372-375.
- 69.- Kroc R. L. Steinetz B. G. and Beach V. L. (1959): The effects of estrogens, progestagens and relaxin in pregnant and nonpregnant laboratory rodents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **75**: 942-980.
- 70.- Larkin L. H. (1974): Bioassay of rat metrial gland extracts for relaxin using the mouse interpubic ligament technique. *Endocrinology*, **94**: 567-570.
- 71.- Lee V. H. and Fields P. A. (1990): Rabbit endometrial relaxin: Immunohistochemical localization during preimplantation, pregnancy, and lactation. *Biol. Reprod.*, **42**: 737-745.

- 72.- Lee V. H. and Fields P.A. (1991): Rabbit relaxin: The influence of pregnancy and ovariectomy during pregnancy on the plasma profile. *Biol. Reprod.*, **45**: 209-214.
- 73.- Loumaye E., De Cooman S. and Thomas K. (1980): Immunoactive relaxin-like substance in human seminal plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **50**: 1142-1143.
- 74.- Lovell A. P. (1965): Bony pelvic dimorphism in rabbits. *Anat. Rec.*, **151**: 462 (abst.).
- 75.- Maillot K. von. (1979): Changes in the glycosaminoglycans distributions pattern in the human uterin cervix during pregnancy and labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **135**: 503-506.
- 76.- Mardner S. N. and Money W. L. (1944): Concentration of relaxin in the blood serum of pregnant and postpartum rabbits. *Endocrinology*, **34**: 115-121.
- 77.- McMurtry J. P., Kwok S. C. M. and Bryant-Greenwood G. D. (1978): Target tissues for relaxin identified *in vitro* with ¹²⁵I-labeled porcine relaxin. *J. Reprod. Fertil.*, **53**: 209-216.
- 78.- Mercado-Simmen R. C., Bryant-Greenwood G. D., Greenwood F. C. (1980): Characterization of the binding of ¹²⁵I relaxin to rat uterus. *Biol. Chem.*, **255**: 3617-3623.
- 79.- Mercado-Simmen R. C., Bryant-Greenwood G. D., Greenwood F.C. (1982): Relaxin receptor in the rat miometrium: Regulation by estrogen and relaxin. *Endocrinology*, **110**: 220-226.
- 80.- Nishikori K. Weisbrodt N. W., Sherwood O. D. and Sanborn B. M. (1983): Effects of relaxin on rat uterine myosin light chain kinase activity and myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **258**: 2468-2474.
- 81.- O'Byrne E. M. and Steinetz B. G. (1976): Radioimmunoassay of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **152**: 272-276.
- 82.- O'Connor W. B., Cain G. D. and Zarrow M. X. (1966): Elongation of the interpubic ligament in the little brown bat (*Myotis lucifugus*): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **123**: 935-937.
- 83.- Olefsky J. M., Saekow M., and Kroc R. L. (1982): Potentiation of insulin binding and insulin action by purified porcine relaxin. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **380** : 200-215
- 84.- Porter D. G. Downing S. J. and Bradshaw J. M. C. (1981): Inhibition of oxytocin or prostaglandin F2 driven myometrial activity by relaxin in the rat is oestrogen-dependent. *J. Endocrinol.*, **89**: 399-404.
- 85.- Reining J. W., Daniel L. N., Schwabe C., Gowan L. K., Steinetz B. G., and O'Byrne E. M. (1981): Isolation and characterization of relaxin from the sand tiger shark (*Odontaspis taurus*). *Endocrinology*, **109**: 537-543.
- 86.- Ruoff H. J., Lippert T. H., Seeger H. and Voelter W. (1984): Immunoactive relaxin-like substance and relaxin sensitive adenilate cyclase in the gastric mucosa. *IRCS Med. Sci.*, **12**: 224-225.
- 87.- Sawyer, W.H., Frieden, E. H. and Martin A. C. (1953): *In vitro* inhibition of spontaneous contractions of the rat uterus by relaxin-containing extracts of sow ovaries. *Am. J. Physiol.*, **172**: 547-552.
- 88.- Sanborn B. M. and Sherwood O. D. (1981): Effect of relaxin on bound cAMP in rat uterus. *Endocrin. Res. Commun.*, **8**: 179-192.
- 89.- Sanborn B. M., Kuo H. S., Weisbrodt N. W., Sherwood O. D. (1982): Effect of relaxin in cyclic nucleotide levels and spontaneous contractions of the uterus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **143**: 273-282.

- 90.- Sanborn B. M. (1986): The role of relaxin en uterine function. In: Huszar G., de. *Physiology and Biochemistry of the Uterus in Pregnancy and Labor*. Boca Raton, F. L.: CRC, pp 225-238.
- 90.- Sanborn and Anwer (1990): Hormonal regulation of myometrial intracellular calcium. In: Garfield R. E., ed. *Uterine Contractility*. Norvell, M. A.: Serono Symposia. pp 69-82.
- 92.- Schwabe C., McDonald J. K. and Steinetz B. G., (1976): Primary structure of the A chain of porcine relaxin. *Biochem. Biophys., Res. Comm., 70: 397-405.*
- 93.- Schwabe C. and McDonald J. K. (1977): Relaxin: A disulfide homolog of insulin. *Science, 197: 914-915.*
- 94.- Schwabe C., Steinetz B., Weiss G., Segaloff A., McDonald J.K., O'Byrne E., Hochman J., Carriere B and Goldsmith, (1978): Relaxin. *Recent. Progress. Horm. Res., 34: 123-199.*
- 95.- Schwabe C. Gowan L. K. and Reinig J. W. (1982): Evolution, relaxin, and insulin: A new perspective. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 380: 6-12.*
- 96.- Schwabe C., LeRoith D., Thompson R., Shiloach J. and Roth J. (1983): Relaxin extracted from protozoa (*Tetrahymena pyriformis*). *J. Biol. Chem., 258: 2778-2781.*
- 97.- Schwabe C. and Büllesbach E. E. (1990): Mini-Review. Relaxin. *Comp. Biochem. Physiol., 96(1):15-21.*
- 98.- Sherwood O. D. and O'Byrne E. M. (1974): Purification and characterization of porcine relaxin. *Arch. Biochem. Biophys., 160: 185-196.*
- 99.- Sherwood O. D. and Crnekovic V. E. (1979): Development of a homologous radioimmunoassay for rat relaxin. *Endocrinology, 104: 893-897.*
- 100.- Sherwood O. D. (1982): Radioimmunoassay of relaxin. *Adv. Exp. Med. Biol., 143: 221-248.*
- 101.- Sherwood O. D. (1994): Relaxin. In: Knobil E. and Neill J. (Eds.): *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. Ltd, New York, 585-673.
- 102.- Steinetz B. G., Beach V. L. and Kroc R. L. (1959): The physiology of relaxin in laboratory animals. In Lloyd C. W. (ed.), *Recent Progress In the Endocrinology of reproduction*. Academic Press, New York, pp. 389-423.
- 103.- Steinetz B. G., Beach V. L., Kroc R. L., Stasilli N. R., Nussbaum R. E., Nemith P. J. and Dunn R. K. (1960): Bioassay of relaxin using a reference standard a simple and reliable method utilizing direct measumerent of interpubic ligament formation in mice. *Endocrinology, 67: 102-115.*
- 104.- Steinetz B. G., Beach V. L. and Kroc R. L. (1969): Bioassay of relaxin In: R. I. Dorfman (De.) *Methods Inh hormon research*. Academic Press, New York., pp 481-513.
- 105.- Steinetz B. G. H. ,O'Byrne E. M., Weiss G and Schwabe C. (1981): **Specificity and aplications of biological assays for porcine relaxin**. In: G. D. Bryant-Greenwood H. D. Niall and F. C. Greenwood (Eds.) *Relaxin*. Elsevier/North-Holland, New York., pp 331-355.
- 106.- Steinetz B. G., O'Byrne E. M., Weiss G. and Schwabe C. (1982): Bioassay methods for relaxin: Uses and pifalls. *Adv. Exp. Med. Biol., 143: 79-104.*
- 107.- Steinetz B. G. H., O'Byrne E. M., Butler M. C. and Hickman L. B. (1983): Hormonal regulation of the connective tissue of the symphysis pubis. In: Biggazi M., Greenwood F. C. And Gasparri F. Eds. *Biology of Relaxin and Its Role In the Human*. Amsterdam: Experta Medica, pp 71-92.

- 108.- Stewart D. R. (1986): Development of a homologous equine relaxin radioimmunoassay. **Endocrinology**, **119**: 1100-1104.
- 109.- Stewart D. R., Nevins B., Hadas E. and Vandlen (1991): Affinity purification and sequence determination of equine relaxin. **Endocrinology**, **129**: 375-383.
- 110.- St-Louis J. (1981): Relaxin inhibition of KCl-induced uterine contractions *in vitro*: An alternative bioassay. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **59**: 507-512.
- 111.- St-Louis J. (1982): Pharmacological studies on the action of relaxin upon KCl-contracted rat uterus. **Pharmacology**, **25**: 327-337
- 112.- St-Louis J. and Massicotte G. (1985): Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, **37**: 1351-1357.
- 113.- Yki-Järvinen H., Wahlström T. and Seppälä M. (1983): Immunohistochemical demonstration of relaxin in the genital tract of men. **J. Reprod. Fertil.**, **69**: 693-695.
- 114.- Walsh J. R. and Niall H. D. (1980): Use of an octadecylsilica purification method minimizes proteolysis during isolation of porcine and rat relaxin. **Endocrinology**, **107**: 1258-1260.
- 115.- Weiss G., O'Byrne E. M., Hochman J. Steinetz B. G. Goldmish L. and Flitcraft J. G. (1978): Distribution of relaxin in women during pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, **52**: 569-570.
- 116.- Weiss M., Nagelschmidt M, Struck H. (1979) Relaxin and collagen metabolism. **Horm. Metab. Res.** **11**: 408-410.
- 117.- Weiss G., Goldsmith L, T. Schoenfeld C. and D'Eletto R. (1986): Partial purification of relaxin from human seminal plasma. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **154**: 749-755.
- 118.- Weiss G. (1989): Minireview: Relaxin in the male. **Biol. Reprod.**, **40**: 197-200.
- 119.- Wqvist N. and Paul P. G. (1958): Inhibition of the spontaneous uterine motility *in vitro* as a bioassay of relaxin. **Acta Endocrinol. (Copenh.)**, **29**: 135-146.
- 120.- Yang S. Remblensa B., Büllsbach E. E. and Schwabe C. (1992): Demonstration of ligand binding in symphyseal tissues and uterine membrane fragments. **Endocrinology**. **130**: 179-185.
- 121.- Zarrow M. X. and Rosenberg B. (1953): Sources of relaxin in the rabbit. **Endocrinology**. **53**: 593-598.