mos: "

NO POF A

UNIVERSIDAD

NACIONAL

AUTONOMA

DE

MEXICO

Facultad de Química

"PURIFICACION DE LA HORMONA NEURODEPRESORA

DE <u>Penaeus vannamei</u> (Boone), POR CROMATOGRAFIA

LIQUIDA DE ALTA PRESION "



Informe de trabajo de investigación que para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA), presenta

QFB Carlos Arámburo de la Hoz.

Mayo, 1981





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.

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo del FONDO DE FOMENTO EDUCATIVO, B.C.H.

Agradecemos también el apoyo prestado por CONACYT, por el donativo otorgado para realizar este proyecto.

Agradezco al Dr. Alberto Huberman su apoyo y tutoria durante la realización de este trabajo de investigación.

También hago patente mi agradecimiento al Dr. Hugo Aréchiga y al Dr. Víctor Anaya, del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, del IPN, por su colaboración en los aspectos fisiológicos de este trabajo.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica, del INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

INDICE .-

	página
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	8
RESULTADOS	24
DISCUSION	131
BIBLIOGRAFIA	154

INTRODUCCION

La acción de las hormonas como moduladoras de patrones conductuales se halla bien documenda en muchos animales, pero en realidad poco se conoce sobre los mecanismos por los cuales esas acciones moduladoras funcionan. Algunos de los patrones de conducta más conspicuos son las tmos circadianos de actividad locomotora, que persisten aún en ausencia de información sensoal sobre los eventos ambientales externos.

En loc crustáceos, el papel de factores endócrinos sobre la ritmicidad locomotora fue propuesto icialmente por la observación de que la separación de los tallos oculares resultaba en la abolión del ritmo circadiano de actividad en el acocil <u>Potamobius astacus</u> (1), en donde se inducía estado de hipoactividad continua por este método, y la inyección de un extracto de tallos sulares provocaba un aumento en la actividad.

Posteriormente, se reportó que en <u>Procambarus clarkii y Cambarus diogenes</u> (2), y en <u>Orcoctes virilis</u> (3), la separación de los tallos oculares también inducía un cambio en el nivel actividad motora de estos animales, pero en este caso se obtenía un estado continuo de hipertividad, mientras que la inyección de extractos frescos de tallos oculares provocaban una disnución en dicha actividad motora.

Más tarde, estas últimas observaciones se han descrito también en varias especies de crustáos, como son <u>Uca</u> (4), <u>Trichodactylus</u> (5) y <u>Carcinus maenas</u> (6). En todos estos, como en <u>Drconectes y Cambarus</u>, se ha propuesto que una hormona inhibidora de la actividad locomotora s producida por el tejido neurosecretor del tallo ocular.

Desde el punto de vista neurofisiológico, se han descrito fluctuaciones circadianas en la resuesta a elementos sensoriales en fase con el ritmo circadiano de la actividad motora (7), y se a visto que la inyección de extractos del tallo ocular induce una disminución de la actividad euronal, ya sea en animales intactos o en estructuras nerviosas aisladas.

En <u>Carcinus maenas</u>, la supresión parcial inducida por extractos de tejido nervioso sobre la ctividad de neuronas a varios niveles de integración, es similar a la actividad disminuída que se bserva durante la fase diurna del ciclo circadiano espontáneo. En este mismo organismo, la deresión diurna de la actividad neuronal es inducida por la liberación de un agente hormonal, la cual es una molécula pequeña, termoestable y de naturaleza peptidica (8), particularmente bundante en el tallo ocular.

Los registros unitarios de diversas neuronas en el acocil <u>Procambarus bouvieri</u> mostraron que es extractos de tallos oculares, ya sean inyectados en animales intactos o aplicados localmente o preparaciones aisladas, resultaban en una disminución de la actividad espontánea y en las spuestas evocadas en receptores sensoriales e interneuronas (9). En este caso también, la sus-noia responsable de este efecto se identificó como un péptido de bajo peso molecular, el cual e bautizado con el nombre de Hormona Neurodepresora (HND).

Se sabe que el sistema nervioso de los crustáceos es capaz de proporcionar cantidades mensubles de HND, específicamente el que forma parte del tallo ocular, y el del ganglio supraesofáco. La cantidad de actividad de HND en ambos órganos es diferente, conteniendo el tallo ocular 3 – 5 veces más la cantidad de HND que se puede obtener del ganglio supraesofágico. Dentro I tallo ocular, se reportó que la mayor parte de la actividad neurodepresora se encuentra contada en el sistema médula interna – glándula sinusal. Cuando se disecó selectivamente la glánda sinusal, se observó que más del 90% de la actividad de la fracción médula interna – glándu-

a sinusal se localizaba en dicho órgano. De hecho, la glándula sinusal contiene alrededor del 55% de toda la actividad de HND existente en el sistema nervioso del acocil (10).

También se ha demostrado que la liberación de HND de la glándula sinusal de <u>Procambarus</u>

<u>souvieri</u> muestra características similares a las de otras hormonas peptidicas. La liberación parece
er estimulada por la excitación de los axones neurosecretores, y se sabe que los axones de la

llándula sinusal son eléctricamente excitables. Se encontró que la aplicación de pulsos eléctricos
e 1 milisegundo de duración, en un rango de voltaje de 0.1 a 10 V provocaban la liberación de

HND de la glándula sinusal, obteniéndose la saturación con 1 V. También se estudiaron los efec
ss de la frecuencia de aplicación y se obtuvo un valor óptimo entre 1 y 10 pulsos por segundo (10).

De la misma manera, se ha estudiado el efecto del potasio sobre la inducción de la liberación e HND en la glándula sinusal, y se ha observado que las soluciones con 40 mM de K⁺ estimulan a liberación máxima de HND, en presencia de calcio. Una característica común a la liberación e los transmisores sinápticos o de los productos de neurosecreción es su dependencia de la peneración de calcio durante el período de activación. En el caso de la liberación de HND de la llándula sinusal, también se ha observado que el calcio desempeña un papel relevante en dicha beración, ya que ésta es inhibida con soluciones carentes de Ca⁺⁺, aún en presencia de K⁺ D mM (10).

Desde el punto de vista morfológico, se ha observado por microscoplia electrónica que la beración de HND de las terminales neurosecretoras de la glándula sinusal ocurre por exocitosis e gránulos. Cuando se midió la cantidad de HND liberada en función de la concentración de K⁺, observó que era aproximadamente paralela a la depleción de gránulos en las terminales neurocretoras (10). La dependencia de la liberación de HND con respecto al calcio puede estar lacionada con la exocitosis, ya que este ión no está involucrado en la generación de potencia-s de acción en los axones neurosecretores.

También se ha observado que la secreción de la HND en P. bouvieri posee un ritmo circadiano,

or medio de la medición de su concentración en el sistema nervioso a diferentes horas del ciclo ictameral. Los resultados indican que, a) en animales colocados en ciclos normales de iluminaión o en obscuridad constante durante más de 24 horas, la curva de concentración-respuesta pa1 HND muestra títulos entre 100 y 200% más altos para esta hormona durante la fase diurna que
1 n la fase nocturna; b) en animales colocados en obscuridad continua, después de haber estado
1 metidos durante una semana a ciclos naturales de luz y obscuridad, la actividad de HND, de1 rminada en intervalos de 3 hrs., alcanza títulos más altos en las muestras tomadas en la fase
1 iurna, coincidiendo las transiciones entre ambas fases con las del ciclo nictameral; c) la sensi1 ilidad de la neurona f-5 a una concentración dada de HND también fluctúa a lo largo del nic1 mero, siendo mayor cuando la neurona se encuentra en la fase nocturna del ciclo (11).

Estos resultados sugieren que la producción de HND en los crustáceos participa en la modulaón de la excitabilidad neuronal, particularmente en relación al ciclo de 24 hrs.

El efecto neurodepresor de la HND parece ser no selectivo, es decir, afecta tanto a neuronas nsoriales como a motoneuronas (12).

En cuanto a la localización de la HND en el sistema nervioso, se ha encontrado que la mar actividad se encuentra en el tallo ocular. También se halla en el ganglio supraesofágico peen una concentración mucho menor. Asimismo, también se ha observado un poco de actividad
los ganglios torácicos y en cantidades muchísimo más pequeñas en la cadena abdominal. Igualente, se ha identificado su presencia en la hemolinfa del acocil (12).

Cuando se separan los tallos oculares del resto del animal, se ha observado que la concentra
5n de HND en las diferentes estructuras (ganglio supraesofágico, ganglios torácicos, ganglios
dominales y hemolinfa) disminuye constantemente hasta desaparecer al cabo de cuatro días.

1 embargo, a partir del quinto día se empieza a observar una recuperación que rápidamente
canza los niveles basales (12), siendo el efecto mucho más predominante en el ganglio supra
ofágico y en los ganglios torácicos, que en la cadena abdominal.

En algunos experimentos diseñados para localizar el sitio de síntesis de HND, se observó ue en forma mayoritaria se lleva a cabo en los tallos oculares, necesitándose un tiempo de tres oras a 14°, para encontrar actividad. Sin embargo, existe también síntesis, aunque en mucho enor escala, en el ganglio supraesofágico y en los ganglios torácicos (12).

Las características temporales de la actividad de HND, la presencia de esta sustancia en la emolinfa y su síntesis en el sistema nervioso central, junto con el conocimiento sobre su almacemiento y liberación en la glándula sinusal, son indicativas de la naturaleza neurohormonal de ste péptido.

Posteriormente, se ha sugerido que el lugar primordial de síntesis de la HND es el órgano X, calizado en la médula terminal del tallo ocular. Los axones de órgano X corren distalmente para rminar en la glándula sinusal (13). Las neurosecreciones son transportadas a lo largo de estos tones en forma de gránulos cuyos tamaños varían entre 300 – 1200 A. Su liberación probablementinvolucra un proceso de exocitosis, estimulado por una despolarización de las terminales.

Por otra parte, también se han realizado estudios para conocer la distribución de la HND

los invertebrados, a lo largo de la escala filogenética. Así, se ha identificado que exis te

cruzamiento fisiológico y el mismo comportamiento bioquímico entre la HND de Procambarus

nuvieri y la HND del camarón Penaeus vannamei (Boone) (14,15). Asimismo, se han encontra
los mismos resultados con toda una serie de especies de crustáceos decápodos, tanto marinos

mo de agua dulce, lo que nos llevó a postular que la presencia de esta hormona es una carac
rística común a todos los crustáceos decápodos (16).

Posteriormente, dicha proposición fue confirmada también en Nephrops norvegicus y Carcinus venas (17).

Recientemente, hemos publicado que la HND, con las mismas características descritas en los cápodos, se encuentra presente también en el estomatópodo Squilla mantis, el cual es un crusceo más primitivo que los decápodos en la escala evolutiva (18). Este hallazgo sugirió que

o unicamente los decápodos poseían esta molécula, sino que su existencia en los crustáceos arecía ser general.

Aún más, en experimentos muy recientes, hemos observado a la misma actividad neurodeprera, con el mismo comportamiento fisicoquímico, en un anélido: <u>Lumbricus terrestris</u>, y en un
plusco marino: <u>Neri ta scabricosta</u> (19). Los extractos obtenidos en estas especies han cruzado
siológicamente con el receptor del acocil P. bouvieri.

Todos estos datos apuntan a la posibilidad de poder sugerir que la HND es común a una gran ariedad de grupos invertebrados. Dicha situación es acorde con las características biológicas de hormona, es decir una molécula encargada de modular la excitabilidad neuronal, que presenuna gran estabilidad evolutiva.

Desde el punto de vista bioquímico, se ha logrado purificar y caracterizar parcialmente a hormonas neurodepresoras de <u>Procambarus bouvieri y Penaeus vannamei</u>. Inicialmente se alnazó un grado razonable de pureza con la HND del acocil por métodos electroforéticos únicante (20,21), pero la mayor desventaja de este método era que no se podían trabajar grandes ntidades de material. Posteriormente, diseñamos un método que involucraba pasos de purifican por cromatografía en gel junto con pasos electroforéticos, que fueron aplicados tanto para purificación de HND de <u>P. bouvieri</u> (22), como para la de <u>P. vannamei</u> (14,15), y en pos se alcanzó un nivel razonable de pureza (alrededor de 4 x 10⁴ sobre el nivel del extractudo).

Los trabajos de caracterización realizados nos llevaron a postular que la HND es un péptido -ueño, susceptible a la acción de enzimas proteolíticas; termoestable; dializable; compuesto camente por aminoácidos que le confieren características de neutralidad ante un campo eléc-o, como son: Asn, Ala, Val, Ser, Gln, Gly, Thr, Leu/lle y Pro; que tiene un peso molecular eximado de 1200 daltones y que se encuentra bloqueado en ambos extremos, con la posibilidad que se trate de un péptido cíclico (14,15,21,22).

Como puede suponerse, el establecer la estructura primaria de esta hormona es indispensable ara poderla caracterizar totalmente. Además, dicho conocimiento nos permitiría poder sintetiarla, lo cual nos daría la posibilidad de poseer grandes cantidades para utilizarlas en estudios anto bioquímicos como fisiológicos. Esto nos permitirá elucidar por completo el mecanismo de cción de esta hormona y la regulación de su biosíntesis, entre otras cosas.

Sin embargo, a la fecha no ha sido posible conseguir dicho objetivo en función de que las reparaciones purificadas por la metodología desarrollada no han sido todavía capaces de proporionarnos una cantidad de hormona completamente pura y en cantidades suficientes como para
oder obtener datos confiables e inequívocos sobre la estructura de la HND.

Es por ello que hemos decidido utilizar una nueva herramient a para conseguir el objetivo nhelado. Dicha herramienta la constituye la cromatografía líquida de alta presión, la cual una técnica que permite un grado de resolución que ninguna de las metodologías empleadas nteriormente puede igualar.

En el presente trabajo, pues, se hace un resumen de los esfuerzos realizados con el fin de prener una preparación abundante con las características de pureza necesarias para hacer el tudio de secuenciación, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión.

MATERIALES Y METODOS

Limpieza del material. - Todo el material de vidrio utilizado en este trabajo fue lavado preamente en una mezcla sulfonitrica (ácido sulfúrico concentrado: ácido nitrico concentrado,
: 1, v/v) calentando dicha mezcla hasta la emisión de vapores. Después se enjuagó el material
in agua bidestilada y desionizada. Posteriormente se trató con una solución de Aquasil al 1%,

v, con el objeto de siliconizar las paredes del material de vidrio y evitar adsorción de material
oternico.

Animales. - Los tallos oculares utilizados fueron obtenidos de camarones blancos del Pacífico, la especie Penaeus vannamei (Boone), capturados en las costas de Mazatlán, Sinaloa. Estos imales fueron utilizados sin distinción de sexo ni edad.

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

En el caso de los solventes utilizados en la cromatografía líquida de alta presión, únicamente utilizaron solventes grado HPLC.

Soluciones amortiguadoras.-

1) Solución amortiguadora pH 1.8. - Esta solución se preparó utilizando ác. fórmico: ác. - ético glacial: agua, en las proporciones 1: 4: 45, v/v/v.

- 2) Solución amortiguadora pH 10.0.- Esta solución se preparó usando carbonato de amoio 0.1 M y ajustando a pH 10.0 con amonfaco.
- 3) Solución amortiguadora pH 3.5.- Esta se prepara utilizando piridina : ác. acético glaial : agua, en las proporciones 1 : 10 : 89, v/v/v.
- 4) Solución amortiguadora pH 6.0.- Se prepara mezclando piridina : ác. acético glacial : gua, en las proporciones 46 : 4 : 950, v/v/v.
 - 5) Solución fisiológica para crustáceos de Van Harreveld (23):

Tinciones.-

- 1) Método de la ninhidrina. Se emplea como agente localizante ninhidrina al 0.25% nacetona. La técnica consiste en rociar las tiras de papel con un aspersor que contiene la soción de ninhidrina, hasta que el papel quede bien humedecido. Después se colocan las tiras nel horno a 100°durante 10 15 minutos, con el objeto de desarrollar la coloración (24).
 - 2) Método de Pauly. Esta técnica es específica para histidina y otros imidazoles (25). utilizan los siguientes reactivos:

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

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

Solución III: carbonato de sodio al 15% en agua.

Para mayor explicación de la técnica, véase (14).

3) Método del cloro. Este método es muy útil para el caso de aminoácidos, aminoácidos en el grupo amino bloqueado y para péptidos (26). Para realizar esta técnica se siguió el métode Rydon-Smith (27,28). Para mayores detalles consúltese (14).

Bioensayo. – La actividad de la hormona neurodepresora fue probada in vitro, como se ha escrito en detalle previamente (10), por su efectividad en reducir la frecuencia de descarga spontánea de las motoneuronas del ganglio abdominal del acocil <u>Procambarus bouvieri</u> (Ortmann).

Las mediciones de frecuencia de descarga fueron medidas en la motoneurona f-5 del tercer anglio abdominal, de acuerdo a la terminología establecida por Wine et al (29).

Posteriormente, se cambió de preparación fisiológica a una motoneurona del sistema tensoceptor del acocil, en donde se aísla una motoneurona después de disecar el tejido muscular y
s registros se hacen directamente de ella, con un electrodo de succión (38). Esta preparación
sulta más sensible que la anterior.

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

En el laboratorio se mantuvieron a -70°, en un congelador Revco, hasta el momento de iniciar se extracciones.

Extracción y aislamiento de la HND.- Se siguió el procedimiento que se ha descrito previainte (14,22). En breve, dicho procedimiento consiste en moler a los tallos congelados a -70°
un molino para carne pre-enfriado, utilizando trocitos de hielo seco como abrasivo. Los pols obtenidos se trataron con varios volúmenes de acetona y posteriormente cloroformo, con el
de disgregar lípidos que pudieran estar englobando moléculas de hormona. Después de elimilos solventes con corriente de aire, se extrajeron los polvos con agua a 45°, agitando mecá:amente durante 60 minutos, y luego se centrifugó a 700 x g, por 30 minutos, a 4°. Se recogielos sobrenadantes y los precipitados se reextrajeron nuevamente, utilizando la misma metodo
4fa. Al final de las extracciones se reunieron todos los sobrenadantes obtenidos.

Concentración. – En el caso de volúmenes mayores obtenidos de las extracciones de HND, en la etapa de obtención del extracto crudo, así como cuando se concentraron las fracciones ativas de las columnas de cromatografía en gel, se concentró hasta la obtención de volúmenes queño s en un evaporador rotatorio marca Buchler, adaptado a una bomba de alto vacío mara Speedivac. Para mayor detalle consúltese (14).

En el caso de fracciones pequeñas, también se utilizó una corriente de nitrógeno aplicada rectamente sobre las muestras, con el fin de concentrarlas o de llevarlas a sequedad.

En el caso de las fracciones obtenidas de la cromatografía líquida de alta presión, el contedo de los tubos se concentró en un evaporador centrífugo al vacío, marca Savant, calentando 45°.

Diálisis. Los extractos totales obtenidos de las extracciones de HND fueron dializados dictamente contra agua bidestilada y desionizada, a 4º. La actividad de HND se localiza en las uas de diálisis, quedando en el interior de la bolsa las moléculas con un peso molecular mayor 13,600 daltones.

Determinación de proteínas totales.— Los extractos obtenidos en diferentes etapas de purifición fueron cuantificados en cuanto a su contenido de proteínas totales. Para ello se utilizó método de Lowry, en la forma modificada por Hartree (30), utilizando como patrón una soción de albúmina sérica bovina. Las muestras ensayadas se probaron en tres diferentes dilucios, siempre por duplicado.

Cromatografías de filtración molecular en gel. – Durante diferentes etapas en los procesos purificación se utilizó la cromatografía de filtración molecular como un medio para obtener -ractos más puros o bien desde el punto de vista analítico, para observar las condiciones de muestras en cuanto a nivel de pureza se refiere.

Para ello se utilizaron principalmente el Sephadex G-25 fino y el Sephadex G-15 (ambos de -ma). Las columnas utilizadas variaron sus condiciones de acuerdo a las necesidades de cada

xperimento. Los parámetros de cada columna se hallan indicados en la sección de RESULTADOS.

Dependiendo del caso, la salida de la columna se acopló a un espectrofotómetro de flujo con linde registrar la absorbencia de las muestras cromatografiadas, ya sea a un registrador Uvicord de LKB, con longitud de onda fija a 254 nm, o bien a dos Uvicord S, de LKB, con longitudes e onda a 206 nm y 280 nm, con el objeto de registrar simultáneamente a ambas longitudes de nda. Finalmente, las fracciones se colectaron en tubos colocados en un colector de fracciones arca LKB, modelo Ultrorac 7000.

En otros experimentos se utilizaron columnas montadas con Bio-Gel P-2 (BioRad).

Todas las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente.

En algunos casos se utilizaron las columnas de cromatografía LKB, modelo s 2137-026 y 37-016, las cuales poseen un dispositivo de inyección de la muestra muy adecuado para favorer una buena separación.

Cromatografía de intercambio iónico en CM-celulosa. - Se utilizó una CM-celulosa de Sigma).74 meq/g, fino), la cual se recicló antes de ser montada en las columnas.

Cromatografía analítica. – Se trataron 2 g de CM-celulosa con 30 ml de NaOH 0.5 M, itando suavemente y dejando en reposo 30 minutos. Se decantó y se lavó con agua hasta obter un pH cercano a 8.0. Posteriormente se agregaron 30 ml de HCl 0.5 N, se agitó y se dejó reposo 30 minutos. Este segundo tratamiento se repitió una vez más. Luego se decantó el sonadante y se lavó con agua hasta obtener un pH cercano a 5.0. Durante el lavado con agua eliminaron los finos.

La CM-celulosa reciclada se equilibró en un amortiguador de acetato de amonio 50 mM, 4.7, y se montó en una jeringa de 5 ml, previamente siliconizada. Las dimensiones del lecho ron: 1.4×5.3 cm.

La muestra se equilibró en el amortiguador mencionado. Después de aplicar la muestra, se 6 equilibrando en contacto con la columna durante 15 minutos, deteniendo el flujo. Posterior-

ente se empezó a eluir. Las fracciones recogidas fueron de 1 ml. Después de haber eluído on 10 ml del amortiguador inicial, se cambió a un amortiguador de acetato de amonio 50 mM, H 8.0. Después de 5 ml se cambió nuevamente de amortiguador, en este caso a uno de acetato e amonio 500 mM, pH 8.0. Después de la fracción 60 se empezó a eluir con un amortiguador e acetato de amonio 1 M, pH 8.0, con el fin de despegar cualquier particula retenida en la olumna.

Las fracciones fueron leídas a 254 nm. Luego se evaporaron las fracciones con corriente de trógeno, en dos ocasiones, resuspendiéndolas posteriormente en agua, con el fin de leer en el pectrofotómetro a 230 nm y a 206 nm.

Los tubos obtenidos se reunieron en doce fracciones y se buscó la HND por bioensayo.

Cromatografía preparativa. – En este caso se reciclaron 10 g de CM-celulosa, inicialmencon 150 ml de NaOH 0.5 N y posteriormente con HCl 0.5 N, en la misma forma que se indicó riba. Se equilibró la resina en acetato de amonio 50 mM, pH 4.7 y se montó una columna con las quientes dimensiones: 1.5 x 27 cm. La muestra se equilibró en el mismo amortiguador y se aplicó a columna. Se empezó a eluir con un flujo de 40 ml/hr. Posteriormente se cambió a un amorquador de acetato de amonio 50 mM, pH 8.0, y más tarde se inició un gradiente de 50 mM a 0 mM, manteniendo el pH 8.0.

Las fracciones eluídas se leyeron directamente a 254 nm en el Uvicord I. Los tubos obtenidos -reunieron en nueve fracciones y se buscó la HND por bioensayo.

Electroforesis en papel.-

Electroforesis analítica a mediano voltaje. Se utilizó una celda tipo Durrum, marca :kman, modelo R. La fuente de poder utilizada fue de marca Beckman, modelo Duostat RD. soporte empleado fueron tiras de papel Whatman 3MM, de 3 x 31 cm, o bien tiras dobles de 31 cm.

Las condiciones empleadas fueron las que a continuación se mencionan:

Tiempo de saturación de la cámara: 30 minutos

Tiempo de corrida: 80 minutos

Voltaje aplicado: 450 volts (14.5 v/cm)

Las tiras se secaron en el horn o a 100°.

Las variantes en las electroforesis fueron las soluciones amortiguadoras usadas en cada caso la cantidad de muestra aplicada. En todos los casos, las electroforesis se realizaron a temperara ambiente. En cada caso se observaron las tiras bajo la luz ultravioleta y se realizaron las aciones deseadas (como se observa en la sección de RESULTADOS).

Electroforesis preparativa a mediano voltaje. En estos experimentos se utilizaron el mistipo de celdas y fuente de poder que en el caso de las electroforesis analíticas. El soporte
apleado fueron hojas de papel Whatman 3MM, de 29 x 31 cm.

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

Después de cada corrida, se cortó un extremo de la hoja y se tiñó por el método de la clorición. Una vez identificadas las manchas, se recortó una tira a lo ancho de la hoja y de ahí procedió a extraer a la hormona.

Extracción a partir del papel. Las tiras de papel de las hojas de electroforesis preparativas recortaron en pequeños pedacitos, los cuales se colocaron en adaptadores de plástico para tuside centrifuga, a los que previamente se había puesto un poco de fibra de vidrio lavada según método de Schwartz (31). Después se empaparon los pedacitos de papel con 1 ml de agua y centrifugaron a 900 x g, 15 minutos, a 4°. Se efectuaron cinco lavados a cada tubo. Los filtrase reunieron y concnentraron en el evaporador rotatorio hasta un volumen determinado. Electroforesis y cromatografía en capa delgada. Esta técnica se utilizó como un criterio pureza de las muestras purificadas. Se utilizó una cámara marca Camag (tipo Pastuska), mode-IECF6/TLE-69-E. La muestra se aplicó sobre placas de celulosa MN300, de 250 micras de es-

pesor, de 20 x 20 cm. En la electroforesis se utilizó el amortiguador de pH 6.0, con la apliación de 500 V durante 45 minutos.

La cromatografía se llevó a cabo utilizando una cámara cromatográfica de Eastman, en una egunda dimensián, empleando n-butanol : ác. acético glacial : agua, en las proporciones 4 : 1 : 5, /v/v, utilizando únicamente la fase orgánica (superior). El tiempo de corrida fue de 2 hrs.

Después de secar la placa se hace la tinción con cloro.

Para mayor detalle de las últimas técnicas expuestas se sugiere consultar (14).

Crona tografía ascendente unidimensional en capa fina. Esta también se utilizó como un iterio de pureza de las muestras. La mezcla de solventes fue n-butano: ác. acético glacial: gua, (4:1:5, V/v/v) fase superior. La muestra se aplicó en una placa de celulosa MN300, e 250 micras de espesor, de 20 x 20 cm. La cromatografía se corrió dutante dos horas y luego se ñó.

Para mayor detalle, véase (14).

Determinación de la composición de aminoácidos. - El análisis de composición de aminoácis se realizó en forma automática en un analizador tipo Durrum D-500, en el laboratorio del
. Paul Fletcher, de la Universidad de Yale.

Las muestras se enviaron en ampolletas selladas a la flama, previamente evaporadas con coente de nitrógeno. El método de hidrólisis se realizó con HCl 6 N, a 110°, durante 20 hrs.,
presencia de 0.5% de fenol, in vacuo. El producto de la hidrólisis se disolvió en un amortiador de citrato de sodio 0.2 M, pH 2.2, y se aplicó al Durrum D-500. El procedimiento de
àlisis utilizó una sola columna y duró 50 minutos.

Espectro de absorción. – Se utilizó un espectrofotómetro de barrido Unicam SP-700 de doble o. La muestra se colocó en la celdilla y se registró su espectro de absorción desde 200 nm has-330 nm, con una sensibilidad de 0.8 AUFS y una resolución de 2.

Dansilación. - Otra forma de obtener la composición de aminoácidos fue mediante la técnide dansilación. Se siguió el método de Gray y Hartley (32), con algunas pequeñas modificiones (33). La técnica se desarrolló así:

- Utilizar tubos de 6 x 50 mm, lavados con mezcla sulfonítrica y siliconizados.
- -- Cubrir los tubos con papel aluminio.
- Colocar alicuotas de 2 nanomoles de muestra y evaporar a sequedad con corriente de N2.
- Resuspender en 5 ul de NaHCO₃ 0.05 M, pH 10.0
- Agragar 15 ul de acetona.
- Agregar 10 ul de una solución de DNS-CI 10 mM en acetona.
- Incubar a 37°, 30 minutos.
- Evaporar a sequedad con corriente de nitrógeno.
- Resuspender en 10 ul de la mezcla acetona : ác. acético (3:2, v/v).
- Hacer diez aplicaciones con micropipetas alargadas sobre placas de poliamida (Analtech), 3 x 3 cm.

Correr las microcromatografías con el siguiente sistema de solventes:

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

- 2a. dimensión: n-butanol : heptano : ác. acético (3:3:1, v/v/v).
- Secar las plaquitas con el calor de un foco de 100 watts y posteriormente con una co
 •nte de aire frío y luego aire caliente.
 - Observar bajo la luz ultravioleta e identificar las manchas fluorescentes.

El remanente de los productos dansilados se sometieron a hidrólisis ácida con HCl 6 N, durante hrs. a 110°, en los mismos tubos, sellados a la flama.

Después de la hidrólisis se evaporó el HCl con corriente de nitrógeno, se resuspendió el conido del tubo en 25 ul de agua y nuevamente se evaporó, esta operación se realizó en dos ocanes. Luego se resuspendió en 10 ul de la mezcla de acetona : acético (3:2, v/v) y se hicieron

ez aplicaciones sobre placas de poliamida. Se corrieron las cromatografías en los mismos sismas de solventes señalados. De esta forma se puede obtener la identificación del grupo -NH₂ minal de un péptido.

El remanente del producto hidro lizado se sometió nuevamente a una dansilación, siguiendo mismo procedimiento descrito arriba. Al observar las placas bajo la luz ultravioleta se obtie-la composición de aminoácidos.

De esta forma, se pueden obtener tres datos: el DNS-péptido, el grupo amino terminal y la mposición de aminoácidos, con una sola muestra de 2 nanomoles de material.

Cromatografía ascendente en papel. – Con el objeto de eliminar al tiodiglicol de las preparaones de HND se utilizó la cromatografía ascendente en papel (34). Como soporte se utilizó
a hoja de papel Whatman 3MM de 18 x 29 cm. La muestra se aplicó en banda a 2 cm de la
lla del papel. En un extremo se colocó una alícuota de HND pura de <u>Procambarus bouvieri</u>
no patrón. Se desarrolló la cromatografía con el sistema n-butanol: ác. acético: agua
: 1:5, v/v), durante dos horas. Se secó la hoja con aire caliente y se tiñó con cloro.

Desalificación de los extractos de HND. – Con el fin de eliminar a las sales que acompañan
as preparaciones de hormona neurodepresora se siguió el procedimiento que a continuación se

as preparaciones de hormona neurodepresora se siguió el procedimiento que a continuación se naciona. Las muestras se evaporaron prácticamente hasta sequedad en el concentrador centrío al vacío. El precipitado obtenido se extrajo con 2 ml de metanol, agitando en un vortex;
go se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y los precipios se extrajeron nuevamente con metanol. El procedimiento se repitió ó veces. Posteriormene evaporó el metanol y la pastilla obtenida se resuspendió en agua. Se enviaron alícuotas a
ensayo para determinar si se había recuperado toda la actividad.

Cromatografía líquida de alta presión. Los diversos experimentos de cromatografía líquida alta presión (HPLC), se llevaron a cabo en un aparato Altex, modelo 332, que posee dos abas modelo 110A, con un microprocesador modelo 420 y un inyector de muestras modelo 210.

Todas las cromatografías de alta presión se realizaron con columnas de fase reversa Ultrasnere -ODS, con diámetro de partículas de 5 um, y dimensiones de $4.6 \times 250 \text{ mm}$.

Los programas utilizados durante los diversos experimentos se introdujeron al microprocesador e datos de la siguiente manera:

Programa A:

tiempo	función	valor	duración	
0 .	flujo	0.5		S/E
0	vel. papel	1.0		S/E
0	%B	0.0	2	S/E
2	%B	5 0	10	S/E
12	%B	100	5	S/E
1 <i>7</i>	%B	100	5	S/E
22	%B	0.0	5	SÆ
27	filujo	0.0		S/E
27	vel. papel	0.0		S/E

Ivente A: agua

Ivente B: acetonitrilo al 100%

gistrafo a 212 nm en un espectrofotómetro Beckman DB

jo: ml/min

l. papel: cm/min ración: minutos E: almacena/ejecuta

B: porcentaje del solvente B en el gradiente

Programa B:		_		
tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	0.25		S/E
0	vel . paepl	1.0		S/E
0	%B	0.0	10	S/E
10	%B	35	30	S/E
40	%B	100	10	S/E
5 0	%B	100	5	S/E
55	%B	0.0	10	S/E
65	Flujo	0.0		S/E
65	vel papel	0.0		S/E

Ivente A: agua

Ivente B: acetonitrilo al 100%

gistrado a 212 nm en un espectrofotómetro Beckman DB.

Programa C	:			
tiempo	función	valor	du ra ción	
0	flujo	0.5		S/E
0	vel.papel	1.0		S/E
0	%B	0.0	1 <i>7</i>	S/E
1 <i>7</i>	%B	0.0		S/E
1 <i>7</i>	Hujo	0.0		S/E
1 <i>7</i>	vel papel	0.0		S/E

Ivente A: metanol al 50% en agua + ácido trifluoroacético (TFA) 5 mM, pH 3.0 registró a 212 nm en un expectrofotómetro Beckman DB.

Programa D:				
tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	0.5		S/E
0	vel. papel	1.0		S/E
0	%B	0.0	10	S/E
10	%B	100	15	S/E
25	%B	100	5	S/E
30	%B	0.0	10	S/E
40	flujo	0.0		S/E
40	vel. papel	0.0		S/E

Ivente A: metanol al 10% en agua + TFA 5 mM, pH 3.0 vente B: metanol al 50% en agua + TFA 5 mM, pH 3.0 gistrado a 212 nm en el Beckman DB.

Programa 1:				
t i em po	función	valor	duración,	
0	flujo	0.5	•	S/E
0	vel. papel	1.0		S/E
0	%B	0.0	10	S/E
10	%B	100	30	S/E
40	%B	100	10	S/E
<i>5</i> 0	%B	0.0	15	S/E
65	flujo	0.0		S/E
65	vel. papel	0.0		S/E

vente A: metanol al 10% en agua + TFA 5 mM, pH 3.0
vente B: metanol al 100% + TFA 5 mM, pH 3.0
vistrado a 206 nm en el Uvicord S y a 212 nm en el Beckman DB.
En algunos casos se aumentó el lavado con MeOH 100% a 15 min.

Programa	2	:

tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	1.5		S/E
0	vel . papel	0.5		S/E
0	%B	100	20	S/E
20	%B	100	10	S/E
30	%B	0.0	15	S/E
45	Ħûjo	0.0		S/E
45	vel. papel	0.0		S/E

Ivente A: agua

Ivente B: metanol al 100% + TFA 5 mM, pH 3.0

gistrado a 212 en el Beckman DB.

Este programa se utilizó para analizar la calidad del agua utilizada en la cromatografía de ta presión.

Programa 3:

tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	2.0		S/E
0	vel. papel	0.5		S/E
0	%B	100	180	S/E
180	%B	0.0		S/E
180	flujo	0.0		Ś/E
180	vel papel	0.0		S/E

l ventes A y B: agua gistrado a 212 nm.

Este programa se utilizó para acabar de purificar al agua utilizada en HPLC, en una columna Ultrasil-ODS, con partículas de 10 um de diámetro y dimensiones $4.6 \times 250 \text{ mm}$.

Programa 4:

tiempo	función	valor	d ur ación	
o [.]	flujo	0.5		S/E
0	vel. papel	1.0		S/E
0	%B	0.0	15	S/E
15	%B	15	20	S/E
35	%B	5 0	15	S/E
<i>5</i> 0	flujo	0.0		S/E
5 0	vel papel	0.0		S/E

vente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0 vente B: metanol al 100% + TFA 5 mM, pH 3.0 sistrado a 206 nm en el Uvicord S.

Programa 5:				
tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	0.5		S/E
0	vel. papel	1.0		S/E
0	%В	0.0	20 (30)	S/E
20 (30)	flujo	0.0		S/E
20 (30)	vel papel	0.0		S/E

Ivente A: agua

gistrado a 206 nm en el Uvicord S.

pendiendo del experimento se usó también alguna de las siguientes mezclas para el solvente A:

- a) agua, pH 5.0
- b) agua + TFA 5 mM, pH 3.0
- c) Acetonitrilo al 5% en acetato de amonio 10 mM, pH 7.5 cada una de ellas la cromatografía se desarrolló en forma isocrática.

Programa 6:				
tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	1.0		S/E
0	vel. papel	1.0		S/E
0	%B	0.0	20	S/E
20	flujo	0.0		S/E
20	vel. papel	0.0		S/E

Ivente A: metanol al 70% en agua gistrado a 254 nm en el Uvicord S.

Este programa se utilizó para hacer la determinación de platos teóricos a las columnas de trasphere-ODS, con diámetro de partículas de 5 um y dimensiones de 4.6 x 250 mm. Como tándares se utilizaron las siguientes sustancias: 1) acetofenona; 2) nitrobenceno; 3) benceno; tolueno.

Programa 7:				
tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	0.5	•	S/E
0	vel. papel	1.0		S/E
0	%B	0.0	60	S/E
60	flujo	0.0		S/E
60	vel. papel	0.0		S/E

vente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0 gistrado a 206 nm en el Uvicord S.

Este programa se utilizó cuando se unieron dos columnas de Ultrasphere-ODS en serie, dando 4.6×500 mm.

Debido a que la técnica del HPLC es muy sensible, es necesario que la calidad de lòs reactiy solventes usados sea de altisima pureza, por ello todos los solventes orgánicos usados fueron grado HPLC. Por su parte el agua utilizada para estos experimentos fue sometida al siguiente amiento. El agua bidestilada comercial se desionizó inicialmente, y luego se bidestiló en vidrio. osteriormente se filtró en Millipore 0.22 um, y finalmente se acabó de purificar en una columa Ultrasil-ODS, con partículas de 10 um de diámetro y de dimensiones 4.6 x 250 mm, utilizano el programa 3. El agua salida de este tratamiento se analizó bajo las condiciones del programa

Debe mencionarse que el grado de pureza obtenido en el agua sometida a este tratamiento e mejor que el que se puede observar con el agua grado HPLC de fuentes comerciales.

Todas las muestras que iban a ser cromatografiadas en HPLC fueron filtradas previamente en illipore 0.22 um, para evitar la presencia de macropartículas que pudieran tapar las tuberías interaccionar en forma irreversible con la columna.

Las columnas de cromatografía de alta presión fueron protegidas por la colocación de una pre-Jumna llena del mismo material Ultrasphere-ODS.

Todos los solventes utilizados fueron desgasificados con vacío, durante 30 minutos, antes ser utilizados en las cromatografías.

En muchos casos, las fracciones eluídas de la columna de alta presión fueron colectadas en oques, sobre todo aquellas provenientes del programa 1. Dichos bloques estuvieron distribuídos la siguiente manera:

- a) bloque 1: 10 50% metanol
- b) bloque 2: 50 100% metanol
- c) bloque 3: 100% metanol
- d) bloque 4: 100 10% metanol

Las fracciones obtenidas se evaporaron en el concentrador centrífugo al vacío y luego se uspendieron en agua. Alícuotas de cada fracción fueron enviadas a bioensayo para determinar donde se ubicaba la actividad biológica.

Separación de la HND en Sep-Pak. En vista de algunos resultados obtenidos con los experintos preliminares en la cromatografía de alta presión, se decidió utilizar a los cartuchos de

2-Pak (Waters Associates, part No. 51910) que contienen el mismo material de octadecilsilano e las columnas, con el fin de separar en forma gruesa a la HND del resto de sus contaminantes. Inicialmente se activa el Sep-Pak con 10 ml de metanol absoluto. El cartucho se inserta en pieringa de 10 ml y, sin permitir que se seque se empieza a equilibrar con 10 ml de agua + TFA 1M. En seguida se aplica la muestra y se sigue lavando con agua + TFA 5 mM, una vez que sella ha penetrado. Cuando el eluato es claro, se cambia de tubo de colección y se empieza avar el cartucho con metanol + TFA 5 mM (10 ml), para que se desprendan los contaminantes se han separado de la muestra.

RESULTADOS

DTA ACLARATORIA: Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado cuatro lotes diferes de material proveniente de tallos oculares de <u>Penaeus vannamei</u> (Boone). Las extracciode HND a partir de estos lotes se hicieron en épocas diferentes, de acuerdo a los resultados enidos y a las necesidades imperantes en determinado momento. Sin embargo, en varias ocanes se dejaba de trabajar con un lote para continuar con otro, con la intención de buscar alnativas durante el proceso de purificación, y posteriormente se retomaba el procesamiento del eque se había dejado.

En otras ocasiones la determinación por bioensayo de la actividad hormonal en las fracciones enidas por algún procedimiento tardaba un tiempo relativamente largo, por lo que, para aprothar el tiempo, se trabajaba sobre otro lote, y cuando los resultados se obtenían entonces se
tinuaba el trabajo con el lote anterior.

Estas observaciones se hacen para indicar que los lotes se estuvieron trabajando en forma alnante. Sin embargo, con el fin de tener mayor claridad en la exposición del trabajo realizado
na presentar los resultados obtenidos con cada lote en forma secuencial, tomando cada uno
separado, sin importar la etapa cronológica en que los experimentos fueron realizados
Espero que esta forma de presentación de los resultados proporcione un panorama más claro
o dé lugar a confusiones.

Los lotes utilizados fueron:

Lote 1): 9150 tallos oculares (t.o.)

Lote 2): 7000 t.o.

Lote 3): 9000 t.o.

Lote 4): 12000 t.o.

TE 1).- Se partió de 914 g de material biológico (tallos oculares de <u>Penaeus vannamei</u>) ngelado a -70° (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 10). Sabiendo que cada tallo ocular sa alrededor de 100 mg entonces se calculó que iniciábamos la extracción con aproximadante 9150 t.o., los cuales fueron molidos y tratados en la forma descrita anteriormente (ver ATERIALES Y METODOS, pag. 10).

El volumen obtenido después de la extracción con agua de los polvos fue de 15.6 l, el cual concentró en un evaporador rotatorio hasta 450 ml.

Este volumen se colocó en 3 bolsas de diálisis (150 ml en cada una) de 1 1/8 " y se dialion tal como se describió en la sección anterior (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 11).

Se hicieron ó cambios de aguas de diálisis. El volumen obtenido fue de 24 l de un extracto
arillento, translúcido, que se concentró en el evaporador rotatorio hasta un volumen de 62 ml,
cual presentó una coloración café intensa. Durante la concentración se formó un precipitado
fue eliminado centrifugando a 10,000 rpm (15,000 x g), durante 30 minutos, a 10°.

A este extracto se le denominó EXTRACTO CRUDO y se tomaron dos alícuotas de 50 ul cada
para determinar actividad hormonal por bioensayo y contenido de proteínas totales.

El bioensayo (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 10) determinó que había una actividad
respondiente a 9000 t.o., y la determinación de proteínas por el método de Lowry, modificado
Hartree (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 11) indicó que existían 6.2 g de proteína en

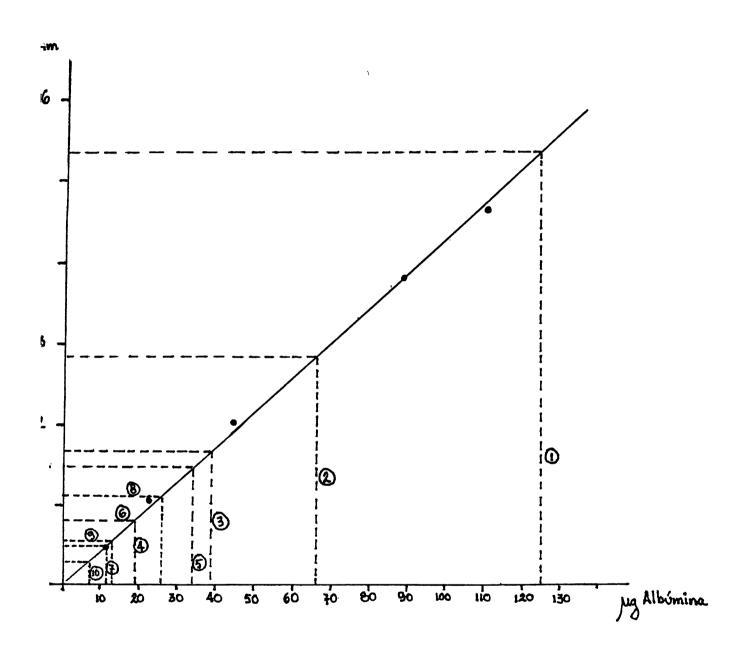


Figura 1) DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.
1) 1.25 ul extracto crudo, 2) 2 ul laSG25f, 3) 1 ul laSG25f, 4) p.5 ul laSG25f, 5) 2 ul laSG25f, 3) 1 ul laSG25f, 7) 0.5 ul laSG25f, 8) 2 ul laSG15, 9) 1 ul laSG15, -10) 0.5 ul laSG15.

1. Cromatografía en Sephadex G-25 fino. - El volumen de exclusión obtenido mediante la libración de la columna de Sephadex G-25 fino con dextrán azul al 2% fue de 157 ml, con siguientes parámetros para la columna. Dimensiones: 1.9 x 113 cm; volumen total del lecho: 1 ml; flujo: 22 ml/hr; volumen de cada fracción: 9 ml. Ya calibrada la columna se procedió promatografiar al extracto crudo bajo las mismas condiciones.

El extracto crudo se separó en cinco fracciones que fueron cromatografiadas por separado ra no sobrecargar la columna. Al finalizar cada corrida se tomaron alícuotas de 100 ul cada a de cada tercer tubo para averiguar por bioensayo en donde se encontraba la actividad hornal.

Los resultados fueron los siguientes:

Extracto crudo	Volumen de el ución de la HND
EXIIGEIO GIOGO	

12 ml (1740 t.o.)	270 - 306 ml
12 ml (1740 t.o.)	297 - 333 ml
13 ml (1890 t.o.)	297 - 333 ml
12 ml (1740 t.o.)	270 - 315 ml
13 ml (1890 t.o.)	270 - 333 ml

En la figura (2) se muestra una gráfica representativa de los perfiles obtenidos en estas ridas.

Después de averiguar en qué tubos se localizaba la HND, se unieron todas las fracciones ivas de las cinco corridas y se concentraron en el evaporador rotatorio hasta un volumen de ml.

Se tomaron alícuotas para determinar actividad hormonal y contenido de proteínas totales el extracto salido de esta cromatografía (laSG25f).

El bioensayo mostró que se había recuperado toda la actividad después de este paso.

La determinación de proteínas totales en el extracto la SG25f señaló que había 1.246 g de teína.

. Cromatografía en Sephadex G-25 fino. - El material con actividad neurodepresora salido la SG25 se volvió a cromatografíar en la misma columna, varian do en esta ocasión el flujo, n el fin de mejorar la resolución y permitir que se separaran más los componentes del extracto. s condiciones fueron las que a continuación se mencionan. Dimensiones: 1.9 x 116 cm; volun total del lecho: 329 ml; flujo: 16 ml/hr; volumen de cada fracción: 5 ml.

El extracto se dividió en tres fracciones que se cromatografiaron por separado. Al finalizar da corrida se tomaron alícuotas de 100 ul de cada segundo tubo para localizar a la hormona bioensayo.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Extracto 1aSG25f	Volumen de elución de HND	
11.3 ml (3000 t.o.)	280 - 315 ml	
11.3 ml (3000 t.o.)	275 - 305 ml	
11.3 ml (3000 t.o.)	275 - 310 ml	

En la figura (3) se observa una gráfica representativa de los perfiles obtenidos en estas ridas.

Se reunieron todas las fracciones activas de estas tres corridas y se concentraron en el evaador rotatorio hasta un volumen de 20 ml.

Se envió una alícuota para medir actividad por bioensayo y se observó que se había recupeo ésta en su totalidad después de este paso. Asimismo, se hizo una determinación de proteína al obteniéndose la cantidad de 393.3 mg.

Cromatografía en Sephadex G-15.- En la calibración de la columna de Sephadex G-15 dextrân azul al 2% se obtuvo un volumen de exclusión de 135 ml, con los parâmetros que ndican. Dimensiones: 1.9 x 113 cm; volumen total del lecho: 321 ml; flujo: 11 ml/hr; volude cada fracción: 3.5 ml. Ya calibrada la columna se procedió a cromatografíar el extracte 2aSG25f bajo las mismas condiciones. En esta ocasión se registró la absorbencia a 206 nm

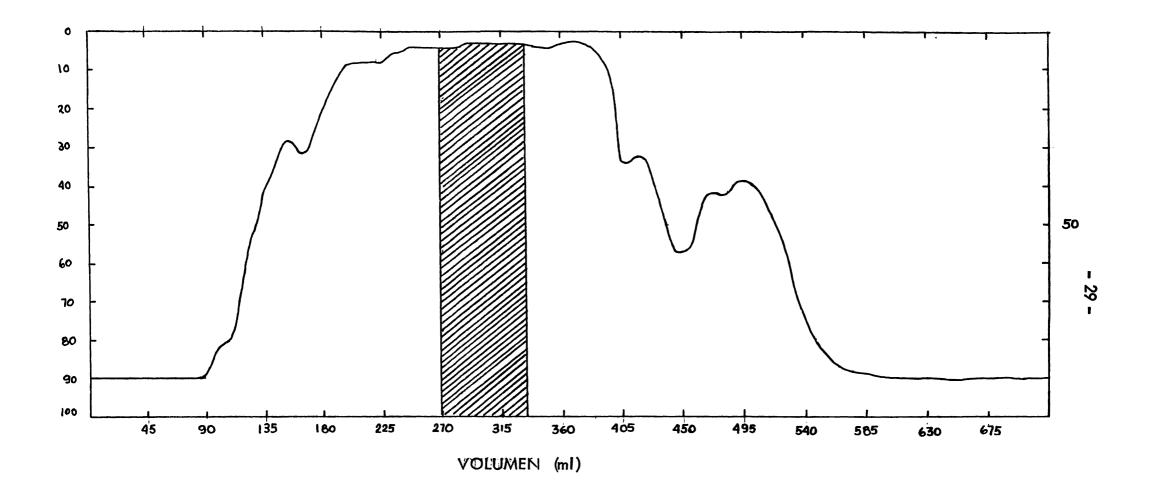


Figura 2) la. Cromatografía en Sephadex G-25 fino. LOTE 1. Dimensiones: 1.9 x 113 cm; flujo: 22 ml/hr; volumen de cada fracción: 9 ml. Elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

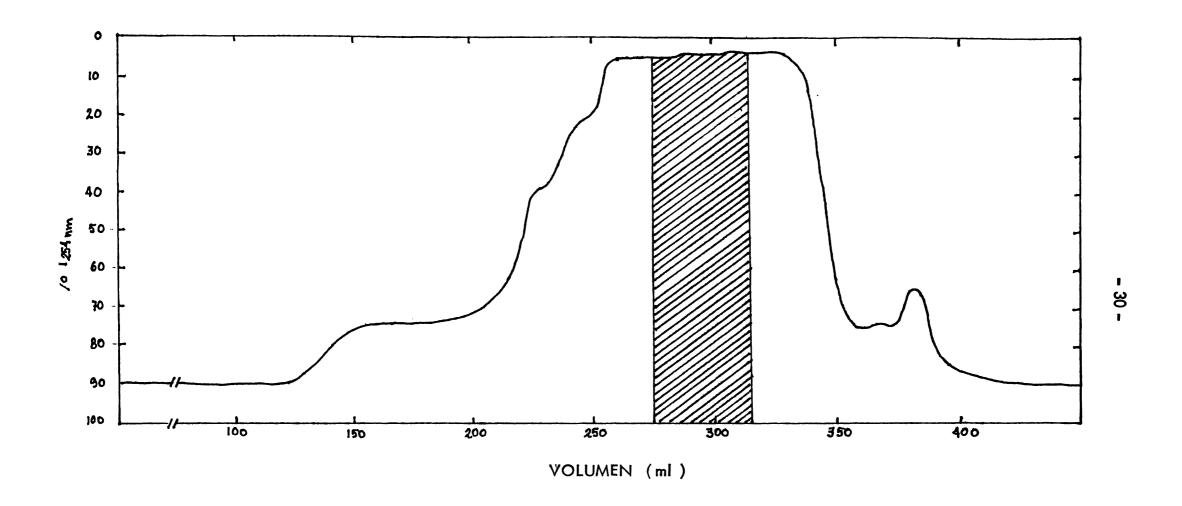


Figura 3) 2a. Cromatografía en Sephadex G-25 fino. - LOTE 1. Dimensiones: 1.9 x 116 cm; flujo: 16 ml/hr; volumen de cada fracción: 5 ml. Elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada

1 254 nm simultáneamente en el Uvicord III. Al finalizar cada corrida se enviaron alícuotas
100 ul de cada segundo tubo para localizar en donde se encontraba la actividad neurodepre-

El extracto de 2aSG25f se dividió en dos fracciones que se cromatografiaron por separado.

Extracto 2aSG25f

Volumen de elución de HND

Debe mencionarse que en estas corridas se separó una fracción que en el bioensayo presentó ividad neuroexcitadora, correspondiéndole un volumen de elución de 262 y 259 ml respectinente. (En nuestro laboratorio se ha demostrado la existencia de una hormona neuroexcitadon la glándula sinusal de Penaeus vannamei, y se han realizado intentos para obtener su purinción. Datos no publicados).

En la figura (4) se muestra una gráfica en donde se aprecia la posición en la que se localion las hormonas.

Se concentraron las fracciones que presentaron actividad de HND en el evaporador rotatohasta un volumen de 7 ml.

El bioensayo reveló que se había recuperado la totalidad de la actividad biológica después este paso.

Por su parte la determinación de proteínas indicó que se tenían 91 mg de proteína en el exto de laSG15.

Cromatografía analítica en CM-celulosa. Se decidió probar el comportamiento del extracto do de laSG15 en cromatografía de intercambio iónico, como una alternativa al procedimiente purificación mediante métodos electroforéticos, tal como se había realizado anteriormento de la procedimiente purificación mediante métodos electroforéticos, tal como se había realizado anteriormento de la procedimiente purificación mediante métodos electroforéticos, tal como se había realizado anteriormento de la procedimiente purificación mediante métodos electroforéticos, tal como se había realizado anteriormento de la procedimiente purificación mediante métodos electroforéticos, tal como se había realizado anteriormento de la procedimiente purificación mediante métodos electroforéticos, tal como se había realizado anteriormento de la procedimiente purificación mediante métodos electroforéticos, tal como se había realizado anteriormento de la procedimiente purificación mediante métodos electroforéticos, tal como se había realizado anteriormento de la procedimiente de la

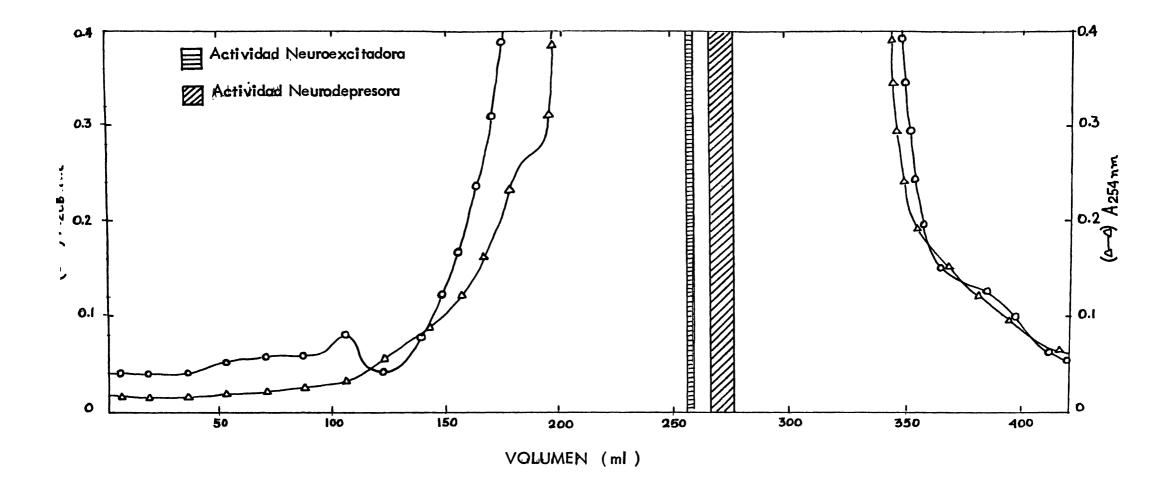


Figura 4) la. Cromatografía en Sephadex G-15.- LOTE 1. Dimensiones: 1.9 x 113 cm; flujo: 11 ml/hr; volumen de cada fracción: 3.5 ml. Elución con agua.

racto de laSG15 con una corriente de nitrógeno y se resuspendió en 500 ul de acetato de onio 50 mM, pH 4.7. De aquí se tomaron 20 ul y se diluyeron a 1 ml con el amortiguador e determinó su absorbencia en un espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ-II, obteniéndose los vientes resultados:

280 nm 0.332 16.6 unidades D.O./ml 254 nm 0.530 26.5 unidades D.O./ml

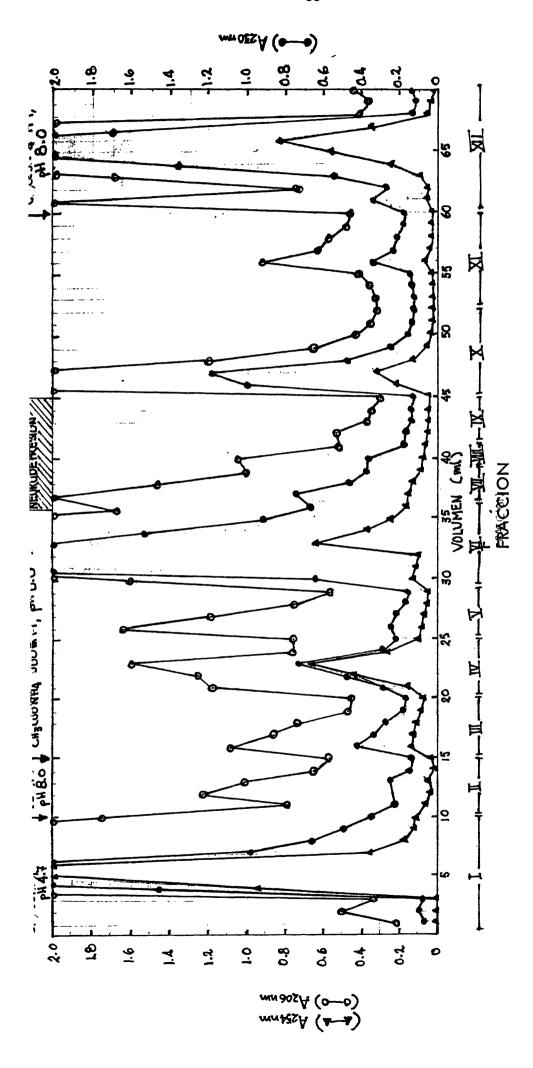
Las condiciones de la cromatografía fueron cmo se indica. Dine ensiones: 1.4 x 5.3 cm; o: 18 ml/hr; volumen de cada fracción: 1 ml; cantidad de muestra aplicada: 1.3.mg disuelen 500 ul.

Se aplicó la muestra y se eluyó en la forma indicada (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 13). perfil obtenido a 254 nm se observa en la figura (5). Posterormente se evaporó el contenido los tubos con corriente de N2 con el fin de eliminar las sales volátiles. Esto se hizo en dos siones, resuspendiendo en agua cada vez. A continuación se leyó la absorbencia de las fractes a 230 nm y a 206 nm respectivamente. El perfil también se puede observar en la misma (5).

Los tubos obtenidos se reunieron en doce fracciones, en la forma que se ilustra en la figura), con el fin de no mandar muchas muestras a bioensayo y con el objeto de determinar en rápida como se había comportado la actividad neurodepresora bajo estas condiciones.

El bioensayo reveló que había hormona en la fracción VII (tubos 37 – 39), en la fracción (tubos 40 – 41) y en la fracción IX (tubos 42 – 45). Estos datos implicaron que la HND abía retenido en la columna de CM-celulosa bajo las condiciones empleadas.

Con el fin de analizar el estado en que se encontraba la actividad eluída en estas fracciose decidió hacer una electroforesis analítica a pH 1.8 (ver MATERIALES Y METODOS, pag.
3) de alícuotas correspondientes a 20 ul cada una. Los resultados fueron los siguientes:
racción VII mostró una mancha en el origen, cloro (+) y ninhidrina (-), como se observa en



Cromatograffa analítica en CM-celulosa.- LOTE 1. Dimensiones: 1.4 x 5.3 cm; flujo: 18 ml/hr; volumen de cada fracción: 1 ml. Figura 5)

la figura (6). Ni la fracción VIII ni la fracción IX revelaron manchas positivas a las tinciones con ninhidrina o cloro. Estos resultados podrían indicar que las cantidades utilizadas fueron muy pequeñas y que se encontraban fuera del límite de sensibilidad de la técnica.

Debido a que en la fracción VII se encontró actividad neurodepresora y una sola mancha que se comportaba electroforéticamente en forma similar a la HND, con respuestas características a las tinciones empleadas, se decidió utilizar a la cromatografía de intercambio iónico en forma preparativa.

Cromatografía preparativa en CM-celulosa. Se tomaron 10 g de CM-celulosa y se trataron por el método descrito (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 13). La columna, equilibrada en acetato de amonio 50 mM, pH 4.7, quedó en las siguientes condiciones: Dimensiones: 1.5 x 27 cm; flujo: 40 ml/hr; volumen de cada fracción: 6.5 ml. Se aplicaron 4500 t.o. disueltos en 4 ml del amortiguador inicial. Se eluyó bajo las condiciones señaladas, utilizando un gradiente de 50 mM a 500 mM. El registro de esta corrida a 254 nm se muestra en la figura (7).

Nuevamente, con el objeto de no mandar demasiados tubos a bioensayo, se reunieron nueve fracciones de la siguiente manera:

Fracción	Tubos
1	1 - 18, zona de carga, acetato de amonio 50 mM,pH 4.7
2	19 - 36, zona de lavado, acetato de amonio 50mM,pH 8.0
3	37 – 45, gradiente
4	46 - 55, gradiente
5	56 - 65, gradiente
6	66 - 75, gradiente
7	76 – 85, gradiente
8	86 – 95, gradiente
9	96 –105, gradiente

En la fracción 1 (zona de carga) se encontró actividad de HND correspondiente a

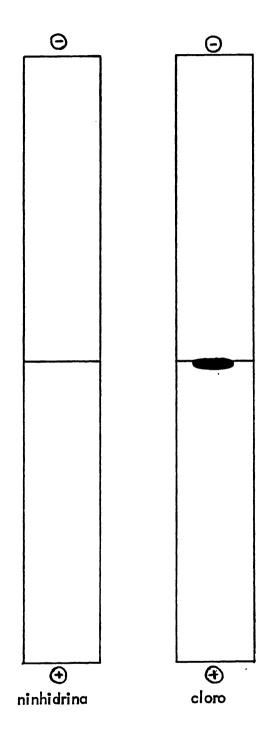


Figura 6) Electroforesis analítica de la fracción VII de CM-celulosa a pH 1.8.

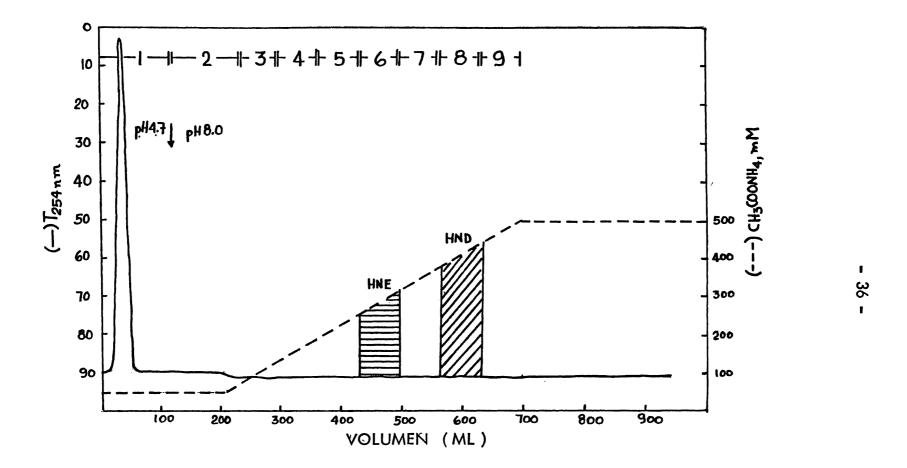


Figura 7) Cromatografía preparativa en CM-celulosa. Dimensiones: 1.5×27 cm; flujo: 40 ml/hr; volumen de cada fracción: 6.5 ml.

400 t.o., lo que indica que dicha fracción no se retuvo en la columna.

En la fracción 8 se encontró actividad de HND equivalente a 2100 t.o. Esta fración sí se retuvo en la columna.

También se detectó actividad neuroexcitadora en la fracción 6.

La zona del gradiente en que eluyó la hormona neurodepresora se ubicó entre 370 - 35 mM de acetato de amonio, pH 8.0, como se aprecia en la figura (7).

Este experimento mostró que alrededor del 47% de la actividad original en el extracfue retenida en la columna de CM-celulosa, lo que corresponde a aproximadamente
100 t.o. purificados de esta manera.

El siguiente paso consistió en efectuar electroforesis analíticas del extracto purificado 1 CM-celulosa, a pH 1.8 y pH 10.0 (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 9,13). Las as de electroforesis se tiñeron con los métodos de ninhidrina y cloro (ver MATERIALES METODOS, pag. 9). En la figura (8) se muestran los resultados. A pH 1.8 se obtuvuna mancha en el origen, cloro (+) y ninhidrina (-); a pH 10.0, una mancha en -1, oro (+) y ninhidrina (-), y otra mancha ninhidrina (+) y cloro (-) en -7, ésta última sabe que corresponde a un contaminante del amortiguador de pH 10.0 y también apace en los controles negativos.

En función de estos resultados se decidió hacer una electroforesis y cromatografía en -pa delgada, analítica, de acuerdo al método descrito (ver MATERIALES Y METODOS, g. 14). Se aplicó una alícuota de 60 ul (50 t.o.) de la fracción 8 de CM-celulosa punto sobre la placa y se corrió el experimento. Como se puede observar en la figura ?), apareció una mancha tenue y difusa que se mantuvo electroforéticamente en el orin, y que en la cromatografía recorrió 8.5 cm.El frente del solvente recorrió 12.5 cm; r lo tanto el Rf fue de 0.68.

Debido a que este resultado no fue concluyente, pues como se mencionó la muestra

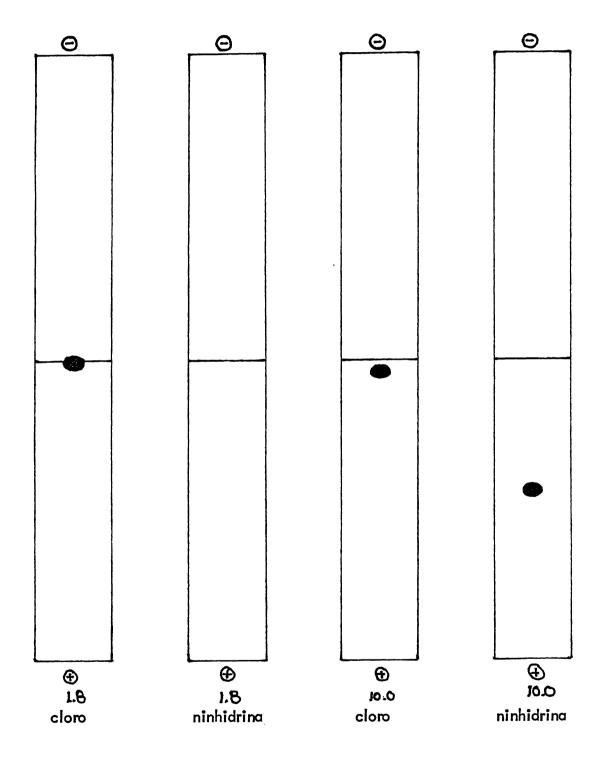


Figura 8) Electroforesis analítica a pH 1.8 y pH 10.0 del extracto salido de CM- celulosa (fracción 8).

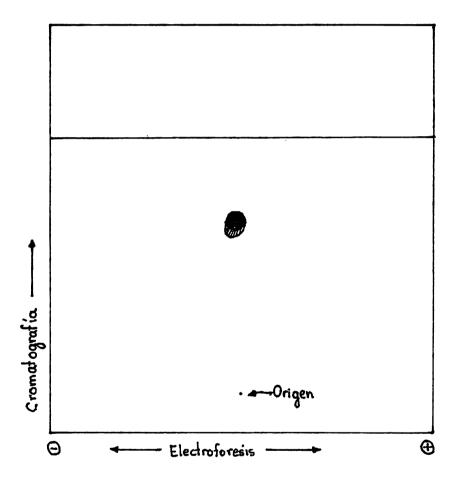


Figura 9) Electroforesis y cromatografía en capa delgada. 50 t.o. Condiciones: Electroforesis, 500 V, 45 min, pH 6.0. Cromatografía: n-butanol:ác. acético:agua (4:1:5,v/v/v) fase orgánica. 2 hrs. Tinción con cloro.

observó muy difusa, se decidió hacer una cromatografía en capa delgada (ver MATE-ALES Y METODOS, pag. 15) con mayor cantidad de muestra. Por lo tanto se tomaron 5 ul (100 t.o.) y se aplicaron en banda a la placa cromatográfica, corriéndose en las ndiciones indicadas durante dos horas. La tinción con cloro mostró el resultado que se estra en la figura (10): 3 manchas claras y una dudosa, que se encimaba con el solnte. Los Rf obtenidos para cada una fueron los siguientes. Mancha A: Rf=0.176; man
B: Rf=0.408; mancha C: Rf=0.480; mancha D: Rf=0.544.

Estos resultados nos hicieron concluir que el extracto salido de CM-celulosa aún sentaba contaminantes, por lo tanto se decidió hacer electroforesis analíticas a pH 3.5 pH 6.0 para ver si en esas condiciones se podrían separar los contaminantes.

Se aplicaron 50 t.o. a cada tira doble de papel y al finalizar las corridas se tiñen por los métodos de ninhidrina, Pauly y cloro.

En la figura (11) se muestran los resultados. A pH 3.5 se observaron tres manchas sitivas al cloro: en el origen, en -2, y en -12. Con ninhidrina apareció una sola mana en -12. La tinción con Pauly resultó negativa. A pH 6.0 se observaron dos manchas sitivas con cloro: en el origen y en -4. Con ninhidrina apareció una mancha en +2. tinción con Pauly resultó negativa.

Como se demostró que electroforéticamente se podían separar los contaminantes se zidió llevar a cabo una electroforesis preparativa a pH 6.0 (ver MATERIALES Y METO-1)S, pag. 14). Se concentró el extracto salido de CM-celulosa hasta un volumen de 1) ul, y se aplicaron 300 ul a cada hoja de electroforesis. Después de la corrida se retó un margen para teñirlo con cloro, se observaron las mismas manchas que en la electoresis analítica y entonces se procedió a extraer la hormona del papel, recortando a largo de la hoja de +0.6 a -1.5 cm del origen. Posteriormente la hormona se eluyó a aqua por el método ya descrito (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 14). Los fil-

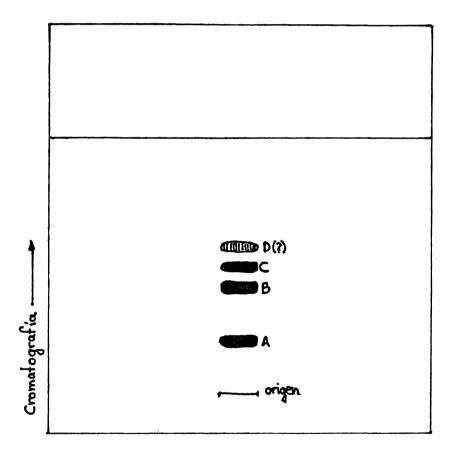


Figura 10) Cromatografía analítica en capa delgada de 50 t.o. del extracto de CM-celulosa. Condiciones: n-butanol:ác. acético: agua (4:1:5, v/v/v), fase orgánica. 2 hrs. Tinción con cloro.

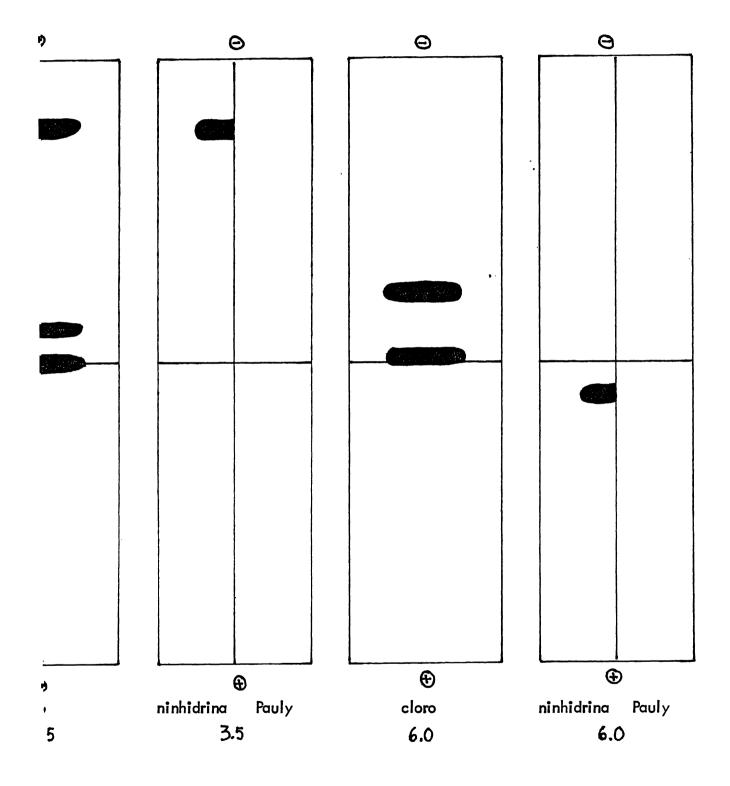


Figura 11) Electroforesis analíticas a pH 3.5 y pH 10.0 del extracto de CM-celulosa.

ados se concentraron en el evaporador rotatorio hasta un volumen de 1 ml.

Nuevamente se decidió ver el grado de pureza alcanzado, mediante la combinación electroforesis y cromatografía en capa delgada. Se aplicaron 75 ul (110 t.o.) y se derrolló la técnica. La tinción con cloro mostró los resultados que se ilustran en la figura 12): dos manchas, una desplazada hacia -1 cm en la electroforesis y en la cromatogra
con un Rf=0.496; y la otra desplazada hacia -2 y con un Rf cromatográfico de 0.232. ta última mancha mostró un comportamiento raro a la tinción ya que apareció aproximamente una hora después de haber teñido y se vió muy tenue y difusa.

También se realizaron electroforesis analíticas a pH 1.8, pH 3.5, y pH 10.0 para r el estado de la muestra en dichas condiciones. Se tiñó con cloro y ninhidrina. Se apliel equivalente a 50 t.o. en cada tira. Los resultados se observan en la figura (13). pH 1.8 se vió una mancha cloro (+), ninhidrina (-) en el origen. A pH 3.5 se observó a mancha cloro (+), ninhidrina (-) en el origen, y otra no muy clara en -4. A pH 10.0 vió una mancha cloro (+), ninhidrina (-) en el origen.

Por otra parte se volvió a realizar el análisis en electroforesis y cromatografía en pa delgada. Se aplicaron 20 ul del extracto (50 t.o.) y la tinción reveló tres manchas, como se ve en la figura (14). Una mancha en el origen electroforético y Rf cromagráfico de 0.491; una mancha hacia -2 cm y Rf=0.508, y una tercera mancha que co-5 hasta -7.3 cm con un Rf=0.508.

En vista de estos resultados se decidió someter al extracto con HND a una serie de ectroforesis preparativas con el fin de eliminar los contaminantes. Se empezó con una ectroforesis preparativa a pH 10.0. Al teñir un extremo de la hoja se observó una mana cloro (+) en el origen, y otra cloro (+) en -2. Se recortó de +1 a -1 y se extrajo la mona por el método acostumbrado.

Se concentró el filtrado obtenido de pH 10.0 hasta 250 ul y se hizo una electrofo-

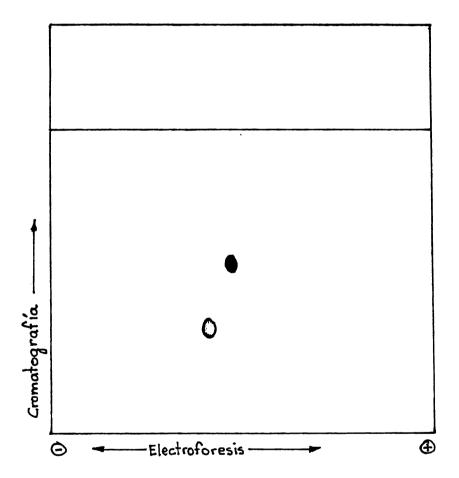


Figura 12) Electroforesis y cromatografía en capa delgada del extracto de pH 6.0. Condiciones. – Electroforesis: 500V, 45 min, pH 6.0. Cromatografía: n-butanol:ác. acético:agua (4:1:5, v/v/v), fase orgánica, 2 hrs. Tinción con cloro.

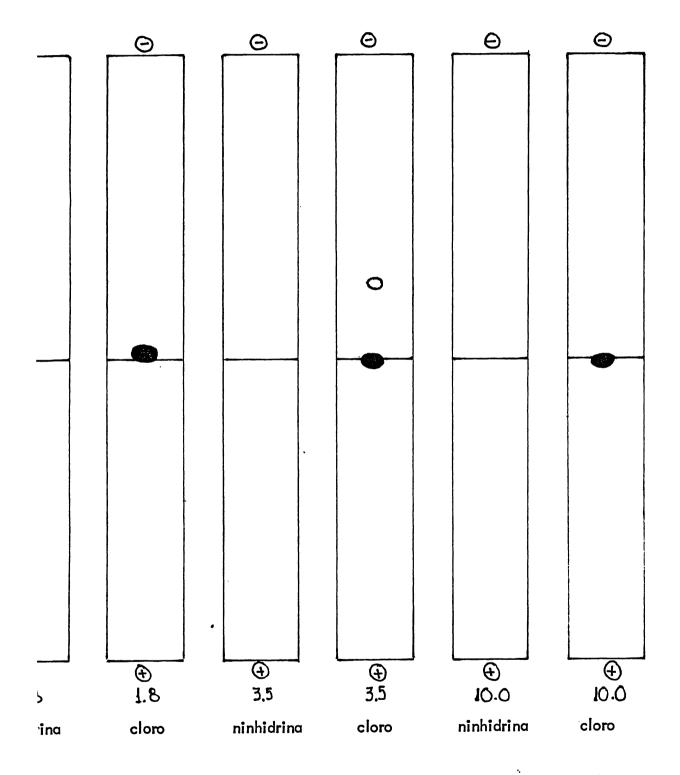


Figura 13) Electroforesis analíticas a pH 1.8, pH 3.5 y pH 10.0 del extracto salido de pH 6.0.

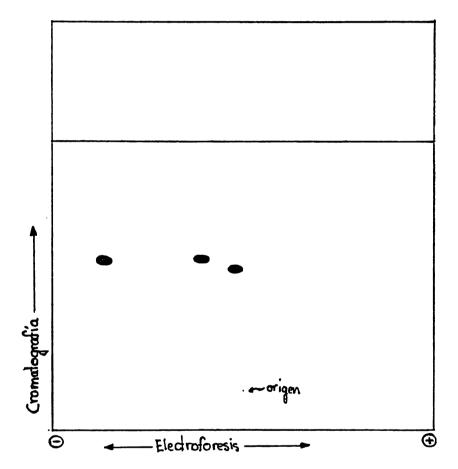


Figura 14) Electroforesis y cromatografía en capa delgada del extracto salido de pH 6.0. Condiciones. – Electroforesis: 500 V, 45 min, pH 6.0. Cromatografía: n-butanol:ác. acético:agua (4:1:5, v/v/v), fase orgánica. 2 hrs. Tinción con cloro.

eis preparativa a pH 1.8. Nuevamente, al teñir se obtuvo una mancha cloro (+) en el gen. Se recortó de +0.4 a -0.7 y se extrajo la hormona del papel. Se concentró has-300 ul.

Se realizó una electroforesis preparativa a pH 3.5. Se observó una mancha en el gen cloro (+). Se recortó de +0.2 a -0.8 y se extrajo la HND en la forma descrita. filtrados se concentraron hasta 1 ml.

Se decidió volver a observar el comportamiento de la solución que contenía a la mona en electroforesis y cromatografía en capa delgada. Se aplicaron 50 t.o. y se corron bajo las condiciones ya conocidas. Tal como lo indica la figura (15), se observon tres manchas positivas a la tinción con cloro: una en el origen electroforético y con Rf=0.5; otra que se desplazó hacia -3.3 cm en la electroforesis y que tuvo un Rf=0.525; inalmente otra más (que apareció alrededor de una hora después de la tinción) que se plazó hacia -1.2 cm con un Rf=0.189.

También se hizo una electroforesis analítica a pH 6.0, de 50 t.o. La tinción reveló a mancha cloro (+) en el origen, y una muy tenue y difusa en -7, como se aprecia en figura (16).

Se pensó que era conveniente someter el extracto salido de pH 3.5 a una electroforepreparativa a pH 6.0. Se aplicaron 200 ul (950 t.o.) y después de teñir un extremo de
hoja se vió un resultado similar al obtenido analíticamente. Se recortó desde el origen
ta -1 y se recuperó la hormona por el método acostumbrado. Los filtrados se concentrahasta 500 ul.

Una vez más se aplicó el criterio de la electroforesis y cromatografía en capa delgapara analizar el estado de pureza de la muestra. Se aplicaron 50 t.o. Después de la
ción se observó una sola mancha cloro (+) en el origen y con un Rf=0.520, tal como se
ecia en la figura (17).

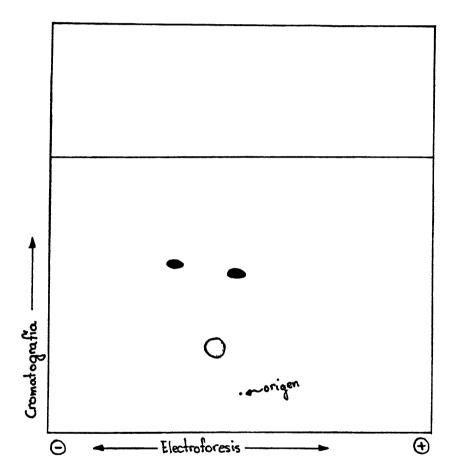


Figura 15) Electroforesis y cromatografía en capa delgada del extracto salido de pH 3.5. Condiciones. – Electroforesis: 500 V, 45 min, pH 6.0. Cromatografía: n-butanol:ác. acético:agua (4:1:5, v/v/v), fase orgánica. 2 hrs. Tinción con cloro.

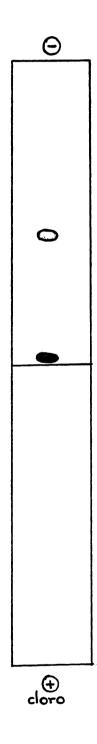


Figura 16) Electroforesis analítica a pH 6.0 del extracto salido de pH 3.5.

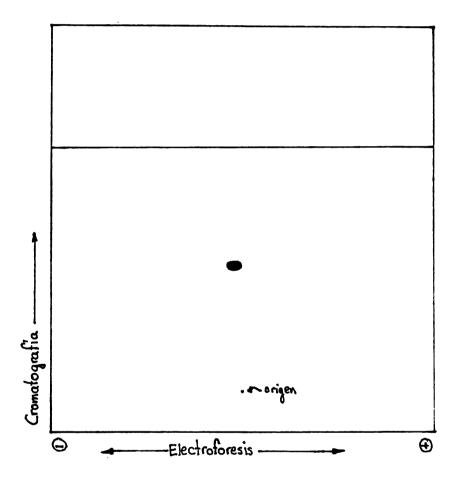


Figura 17) Electroforesis y cromatografía en capa delgada del extracto salido de pH 6.0. Conciciones. – Electroforesis: 500 V, 45 min, pH 6.0. Cromatografía: n-butanol:ác. acético:agua (4:1:5, v/v/v), fase orgánica. 2 hrs. tinción con cloro.

Este resultado indicó que, cuando menos a este nivel de análisis la muestra se enconaba libre de contaminantes. Además se comportaba electroforética y cromatográficamente
el sistema desarrollado, tal y como se había observado en otras ocasiones (14).

Después de este largo proceso de purificación se obtuvieron alrededor de 950 t.o. partir de los 2100 que habían salido de CM-celulosa (pag. 37). El resto se usó en prue-s analíticas y bioensayos.

r otra parte se tomó el remanente de 4000 t.o. del Lote 1 que habían salido de 1aSG15 se decidió volverlos a recromatografiar por una columna de Sephadex G-15, bajo las indiciones que se indican. Dimensiones: 1.9 x 117 cm; flujo: 20 ml/hr; volumen de cada acción: 4.5 ml. Como se indica en la figura (18) la actividad neurodepresora se locazó en un volumen de elución de 288 - 328 ml.

Después de concentrar las fracciones activas, el bioensayo indicó que en realidad se nía una actividad equivalente a 3200 t.o.

Dicho extracto de 3200 t.o. se dividió en dos fracciones: una fracción A corresponente a 1750 t.o., y una fracción B correspondiente a 1450 t.o.; con la intención de puicar a la fracción A por métodos electroforéticos y a la fracción B por cromatografía de tercambio iónico en CM-celulosa.

Se concentró la fracción A (1750 t.o.) hasta 250 ul y se aplicaron a una hoja de apel Whatman para hacer una electroforesis preparativa a pH 10.0. Se tiñó un extremo la hoja con cloro y se observaron manchas positivas en el origen, en +1, +2, +3 y +4. In tanto se recortó de +0.2 a -0.6 y se extrajo el papel por el método acostumbrado. concentró hasta 250 ul.

A continuación se realizó una electroforesis preparativa a pH 1.8 del material salido pH 10.0. Al teñir un extremo se observaron manchas positivas al cloro en el origen y

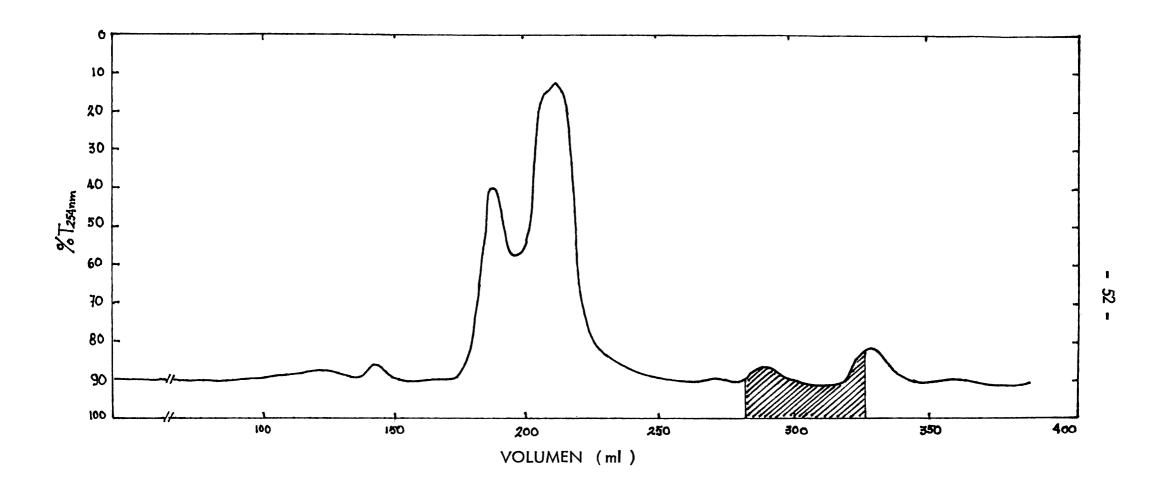


Figura 18) Cromatografía en Sephadex G-15 de 4000 t.o. después de laSG15. LOTE 1.

Dimensiones: 1.9 x 117 cm; flujo: 20 ml/hr; volumen de cada fracción: 4.5 ml.

Elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

n -6. Se recortó de +0.2 a -1.2. Se extrajo la hormona del papel y se concentró has-250 ul.

En seguida, se hizo una electroforesis preparativa a pH 3.5 del extracto salido de 1.8. Se observaron manchas cloro (+) en el origen y en -12. Se recortó de +0.2 a 3 y se extrajo el material. Se concentró hasta 250 ul.

Finalmente, se efectuó una electroforesis preparativa a pH 6.0 del material salido de 3.5. Se obtuvieron manchas positivas en el origen, en -3 y en -7. Se recortó de +0.4 1. La hormona se extrajo del papel por el método acostumbrado y se concentró hasta 1 ul.

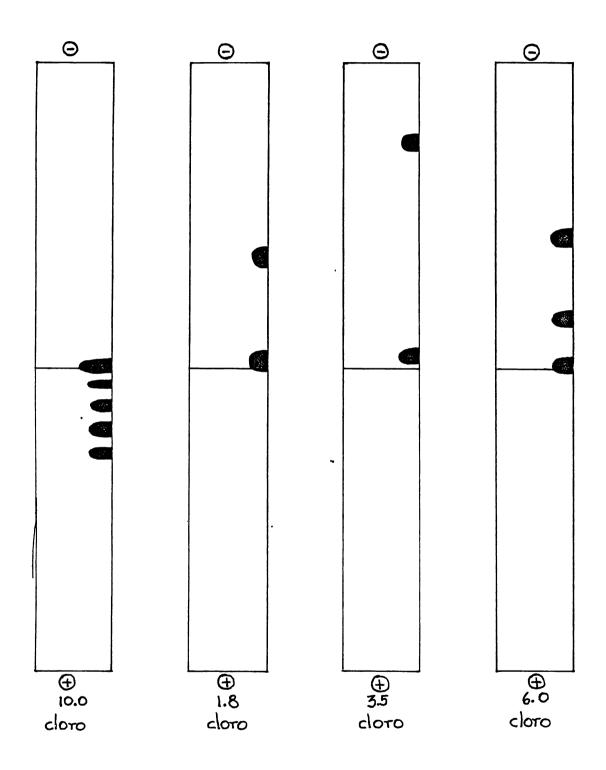
En la figura (19) se pueden apreciar los patrones de manchas obtenidos en loss: remos de las hojas que se tiñeron, correspondientes a los pasos electroforéticos realizados.

Ahora se decidió analizar el grado de pureza obtenido mediante electroforesis y crotografía en capa delgada, bajo las mismas condiciones que ya se indicaron. Se aplicaron ul correspondientes a 50 t.o. El resultado de la tinción con cloro mostró una sola manpositiva que se mantuvo electroforéticamente en el origen y en la cromatografía pretó un Rf=0.529, como se observa en la figura (20).

Este tipo de análisis mostró que la fracción A se encontraba ya libre de contaminanvisibles para la sensibilidad del método, y que la muestra poseía las mismas caracterisas electroforéticas y cromatográficas que la que se había obtenido por un proceso más go (pag. 51).

Por lo tanto se decidió reunir a la fracción de 950 t.o. con la de 1700 t.o., consyendo 2650 t.o. que se encontraban en el mismo grado de pureza.

Se analizó una alícuota de 12 ul (30 t.o.) por bioensayo para ver si la actividad respondía a lo que se tenía. El resultado mostró aproximadamente un 15% más de actilad de lo que se pensaba, lo que indicó que entonces en esa muestra se tenía el equi-



y pH 6.0 del extracto de 2aSG15 (1750 t.o.)

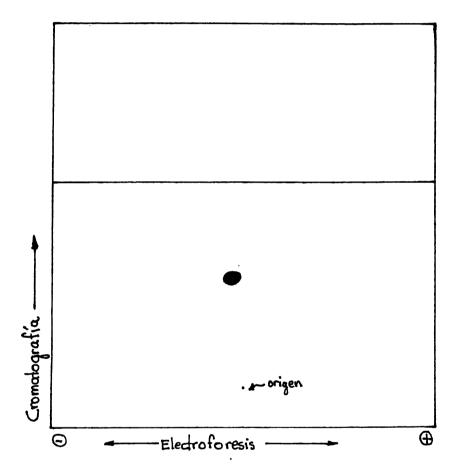


Figura 20) Electroforesis y cromatografía en capa delgada del extracto de pH 6.0 (1750 t.o.). Condiciones. – Electroforesis: 500 V, 45 min, pH 6.0. Cromatografía: n-butanol:ác. acético:agua (4:1:5, v/v/v), fase orgánica. 2 hrs. Tinción con cloro.

ente a 3000 t.o. aparentemente puros por criterios electroforéticos y por electroforesis cromatografía en capa delgada.

Con el fin de analizar el estado de pureza de esta muestra por otros criterios, se la matografió en una columna de Sephadex G-15, registrando a 206 nm, con el Uvicord. Las condiciones fueron las siguientes. Dimensiones: 1.9 x 107 cm; flujo: 10.5 ml/hr; umen de cada fracción: 2.3 ml. Se obtuvo un pequeño pico adelante del volumen vacio, eluyó a los 152 ml. Después apareció un solo pico que comenzó a eluir a los 225 ml erminó de eluir a los 248 ml. En esta zona se encontró la actividad neurodepresora. El fil de la gráfica se observa en la figura (21). Como se ve el pico no fue completante simétrico, por lo que se tomaron únicamente las fracciones correspondientes a la te central del pico. Estas fracciones se concentraron hasta 400 ul.

De esta solución se tomó una alícuota de 130 ul (1000 t.o.), correspondiente a una cera parte del total y se envió a la Universidad de Yale para que el Dr. Paul Fletcher terminara la composición de aminoácidos en un analizador Durrum D-500.

La muestra fue tratada tal como se mencionó en la sección anterior (ver MATERIALES METODOS, pag. 15).

Los resultados obtenidos para una alícuota correspondiente a 100 t.o. fueron los sientes:

Aminoácido	nanomoles	factor de corrección	nanomoles corregidas	encontrados	;
Asp	0.08		-	8.0	1
Th r	0.12	0.95	0.13	1.3	1
Ser	0.25	0.90	0.28	2.8	3
Glu	0.09			0.9	1
Gly	0.21			2.1	2
Alá	0.11			1.1	1
Val	0.10			1.0	1
Leu	0.05			0.5	0 - 1
Tyr	0.04			0.4	-
Phe	0.03			0.3	-
His	0.20			2.0	2
Lys	0.06			0.6	0 - 1
Arg	0.03			0.3	-



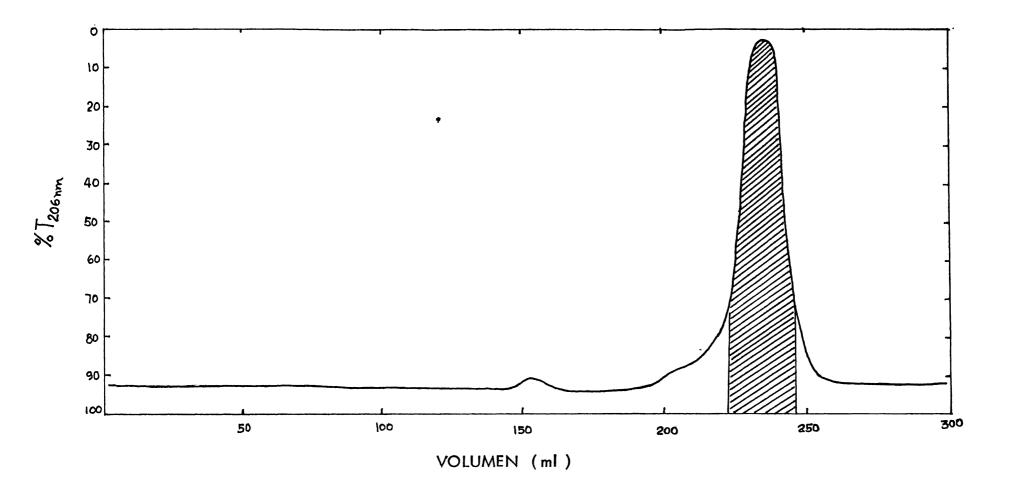


Figura 21) Cromatografía en Sephadex G-15 del extracto purificado de 3000 t.o.
Dimensiones: 1.9 x 107 cm; flujo:10.5 ml/hr; volumen de cada fracción:
2.3 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

De acuerdo a estos datos la molécula contendría entre 12 - 14 aminoácidos.

Los resultados para el análisis de una muestra correspondiente a 500 t.o. fueron los juientes:

Aminoácido	nanomoles	factor de corrección	nanomoles corregidas	encont rados	
Asp	0.41		-	0.8	1
Thr	0.47	0.95	0.49	1.2	1
Ser	0.70	0.90	0.77	1.9	2
Glu	0.44			1.1	1
Pro	0.12			0.3	-
Gly	0.87			2.1	2
Ala	0.54			1.3	1
Val	0.21			0.5	0 - 1
lle	0.11			0.3	-
Leu	0.21			0.5	0 - 1
Tyr	0.27			0.7	0 - 1
Phe	0.08			0.2	-
His	0.97			2.4	2
Lys	0.21			0.5	0 - 1
Arg	0.20			0.5	0 - 1

En función de estos datos existen entre 10 - 15 aminoácidos en la molécula.

A partir de estos últimos datos se calculó la cantidad de proteína existente en la estra analizada, calculando un peso molecular para la HND de 1200 daltones, en base datos obtenidos anteriormente (14). Por lo tanto se determinó que en los 130 ul que enviaron habían 11.8 nanomoles, así que en los 400 ul originales existían 36.31 nanomoles, equivalentes a 43.57 ug de proteína en la solución de 3000 t.o.

Al extrapolar estos datos en el esquema de purificación del Lote 1, se habrían obteo los resultados que se muestran en la Tabla 1.

Etapa	Cantidad de proteina (mg)	tallos oculares	Activ. específica (t.o./mg proteína)	Purificación (veces)
:tracto crudo	6200	9000	1.451	1
aSG25f	1246	8917	7 . 1 <i>5</i> 6	4.932
2aSG25f	393.3	8835	22,463	15.481
aSG15	91	8775	96.428	66.456
spués de elec-				
of a 4 pH	0.116	8000	68965 . 5	47529.647

Por otra parte, a una alícuota de 20 ul (150 t.o.) del extracto purificado de HND le determinó su espectro de absorción en el rango de 200 nm a 330 nm, en el Unicam 700 tal como se indicó anteriormente (ver MATERIALES Y METODOS, pag.15). Tal no se observa en la figura (22), se obtuvo absorción entre 200 - 240 nm.

Con el objeto de determinar la composición de aminoácidos del péptido en nuestro pratorio se decidió utilizar la técnica de dansilación en la forma mencionada en la secun anterior (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 16).

Como patrón positivo para la técnica se utilizó al péptido S de la ribonucleasa, cucomposición y secuencia de aminoácidos son bien conocidas.

Se tomaron dos nanomoles de péptido S de la ribonucleasa y se dansilaron. La cromarafía desarrollada con el sistema de solventes dió el panorama que se muestra en la fia (23 A), mostrando además de los subproductos normales de la reacción, una mancha
fluorescencia amrilla intensa en el punto de aplicación, correspondiente al DNS-péptido.

El resto del tubo de reacción se sometió a una hidrólisis ácida, como se describió.

observar el resultado de la cromatografía bidimensional bajo la luz ultravioleta se obseron, además de DNS-OH y DNS-NH2, manchas correspondientes a di-DNS-Lys y a DNS-Lys, lo que es congruente con el resultado esperado ya que el péptido S de la onucleasa contiene Lys en su grupo amino terminal y además una Lys interior.

El contenido del tubo volvió a dansilarse, se corrió la cromatografía y al finalizar obtuvo la siguiente composición de aminoácidos para el péptido S de la ribonucleasa:

1, Ser, Thr, Ala, Phe, (Met), His, Asp, Lys, Glu.

Los resultados se ven en conjunto en la figura (23).

Una vez probado el método se aplicó a una alícuota de 250 t.o. de la muestra pucada de HND de Penaeus vannamei.

La dansilación inicial mostró DNS-OH, DNS-NH2, di-DNS-Lys, (DNS-His y DNS-Asn losas) v una mancha con fluorescencia amarilla en las inmediaciones de la DNS-NH2.

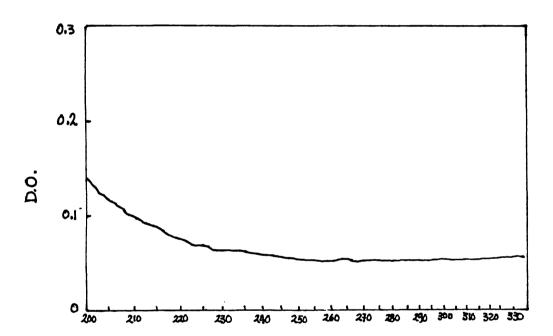


Figura 22) Espectro de absorción de HND en el ultravioleta.

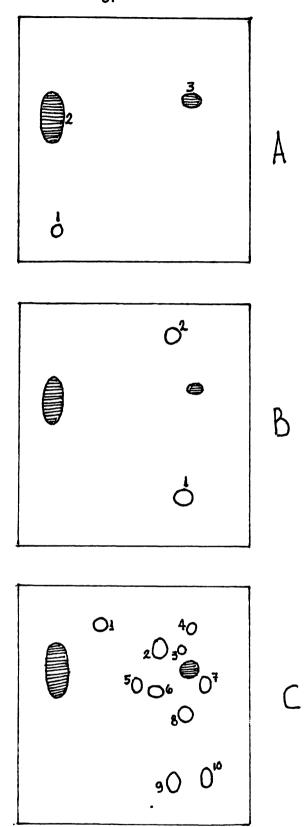


Figura 23) Péptido S de la ribonucleasa (2 nanomoles).— A) Dansilación: 1) DNS-péptido (amarillo), 2) DNS-OH, 3) DNS-NH2. B) Dansilación e hidrólisis: 1)di-DNS-Lys, 2) -DNS-Lys, C) Hidrólisis y dansilación: 1) DNS-Arg, 2) DNS-Ser, 3) DNS-Thr, 4) DNS-Met-sulfona, 5) DNS-Asp, 6) DNS-Giu, 7) DNS-Ala, 8) DNS-Phe (DNS-Met), 9) di-DNS-Lys, 10) DNS-His.

icha mancha podría corresponder a un DNS-péptido pequeño.

Después de la hidrólisis ácida se observó que la mancha con fluorescencia amarilla sapareció de la plaquita y también que aumentó la fluorescencia correspondiente a la -DNS-Lys; las demás manchas desaparecieron. Esto podría indicar que la mancha con sorescencia amarilla era un péptido pequeño con Lys en su grupo amino terminal.

Después de volver a dansilar el producto de la hidrólisis ácida y correr la cromatoafía no se observó ninguna mancha. Estos resultados tal vez indicaban que se había cocado menor muestra de la necesaria para tener una buena detección.

Todos estos resultados se observan en la figura (24).

Para comprobar si un péptido pequeño al dansilarse podría correr en el sistema de liventes usado, se corrió un experimento en donde se dansiló por una parte penta-alanina por otra el tripéptido Leu-Gly-Gly. El resultado se observa en la figura (25). Como puede apreciar, en efecto hubo un corrimiento de ambos DNS-péptidos, y aún más, estraron una fluorescencia ligeramente amarillenta, aunque no tan intensa como la obserda para el caso del péptido S de la ribonucleasa o el peptidito que se dansiló en la soción de hormona. Tal vez la intensidad de la fluorescencia amarilla se vea estimulada r la presencia de Lys en el grupo -NH2 terminal.

Dado que el aminograma realizado en la Universidad de Yale mostró la presencia de itidina, se decidió aplicar una alícuota de 55 t.o. de la solución de HND purificada punto sobre un papel filtro y teñirla por el método de Pauly. El resultado fue la apatión de una manchita rojiza muy tenue, lo que es indicativo de la existencia de histidien dicha muestra.

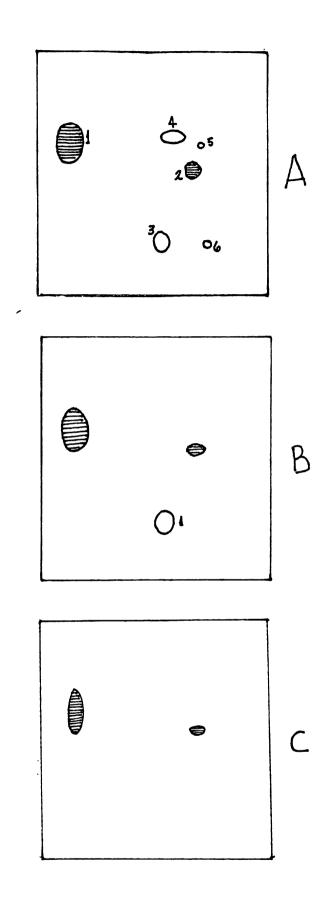


Figura 24) 250 t.o. HND.- A) Dansilación: 1) DNS-OH, 2) DNS-NH₂, 3) di-DNS-Lys, 5) DNS-Asn, 6) DNS-His, 4) fluorescencia amarilla.

B) Dansilación e hidrólisis: 1) di-DNS-Lys.

C) Hidrólisis y dansilación.

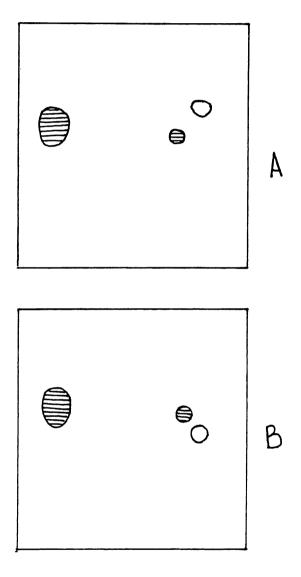


Figura 25) A) Dansilación de 2 nanomoles de penta-alanina.
B) Dansilación de 2 nanomoles de Leu-Gly-Gly.

Una vez más se analizó el comportamiento de la muestra purificada (de la cual quecan aproximadamente 1700 t.o.) por cromatografía en Sephadex G-15. Las condiciones
ron las que se mencionan a continuación. Dimensiones: 1.6 x 85 cm; flujo: 9 ml/hr;
umen de muestra: 1 ml; volumen de cada fracción: 4 ml. En esta ocasión se corrió la
matografía en una columna LKB que dispone de un mejor sistema de inyección de la
estra. Se registró simultáneamente a 206 nm: 0.1 AUFS, y a 280 nm: 0.02 AUFS, acondo dos Uvicord S a la salida de la columna. El perfil obtenido se muestra en la figu(26). Como se aprecia se obtuvieron tres picos, uno que eluyó a los 104 ml, otro a
124 ml, y otro que eluyó a los 132 ml. La actividad neurodepresora se localizó en el
o que eluyó a los 124 ml. Esta fracción se concentró hasta 400 ul. Por bicensayo se
erminó que la actividad biológica había disminuído hasta el equivalente a 1000 t.o.

Nuevamente se cromatografió a dicha fracción en Sephadex G-15 bajo las siguiencondiciones. Volumen de muestra: 1 ml; dimensiones: 1.6 x 85 cm; flujo: 10.5 ml/hr;
umen de cada fracción: 3 ml. Se registró a 206 nm: 0.1AUFS, y a 280 nm: 0.02 AUFS,
ultáneamente. El resultado se observa en la figura (27). Otra vez se obtuvieron tres
os, eluyendo a los 102 ml, 117 ml y 123 ml. La actividad se localizó por bioensayo
la fracción que eluyó a los 117 ml. La muestra se concentró hasta 350 ul.

Posteriormente se hizo un análisis de 500 t.o. de esa fracción por cromatografía vida de alta presión (HPLC), bajo las condiciones del programa 1 (ver MATERIALES METODOS, pag. 19). Se registró a 212 nm en un espectrofotómetro Beckman DB. Las estras se recogieron por bloques, tal como se explicó anteriormente (ver MATERIALES METODOS, pag. 22).

Se encontró actividad biológica muy disminuída en la región 1L, como se indica en figura (28). El control positivo para el bioensayo de una alícuota no cromatografiada esa muestra mostró muy poca actividad.

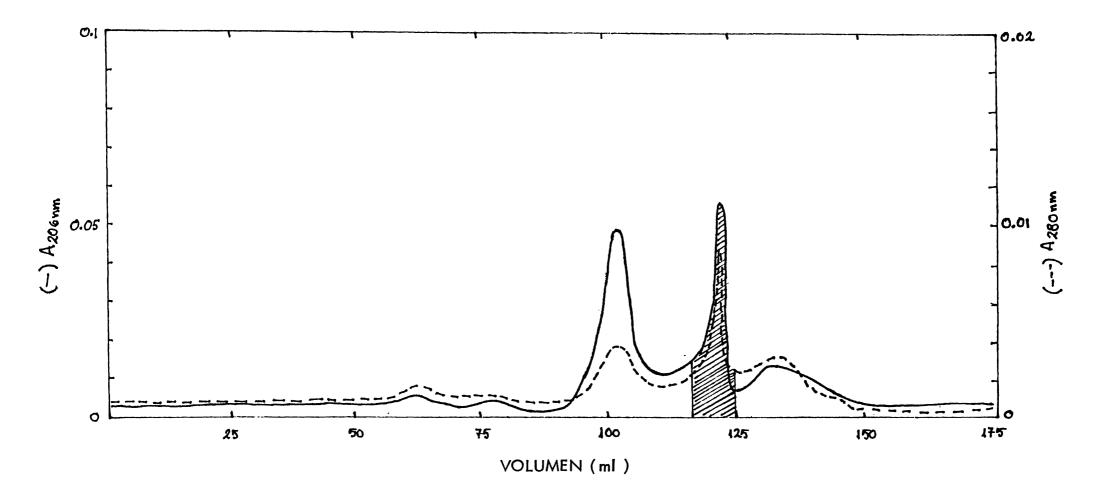


Figura 26) Cromatografía en Sephadex G-15 de 1700 t.o. - Dimensiones: 1.6 X 85 cm; flujo: 9 ml/hr; volumen de cada fracción: 4 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

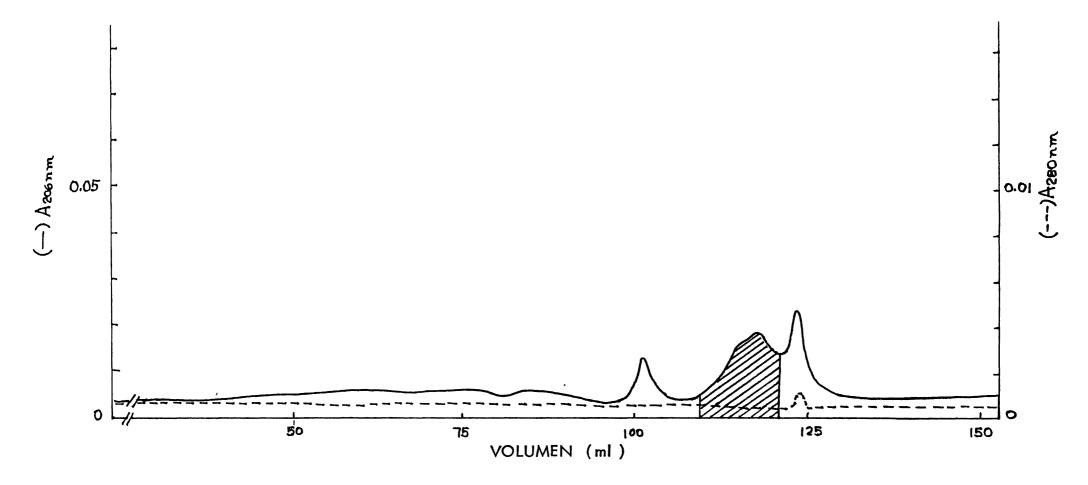


Figura 27) Cromatografía en Sephadex G-15 de 1700 t.o.- Dimensiones: 1.6 x 85 cm; flujo:10.5 ml/hr; volumen de cada fracción: 3 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

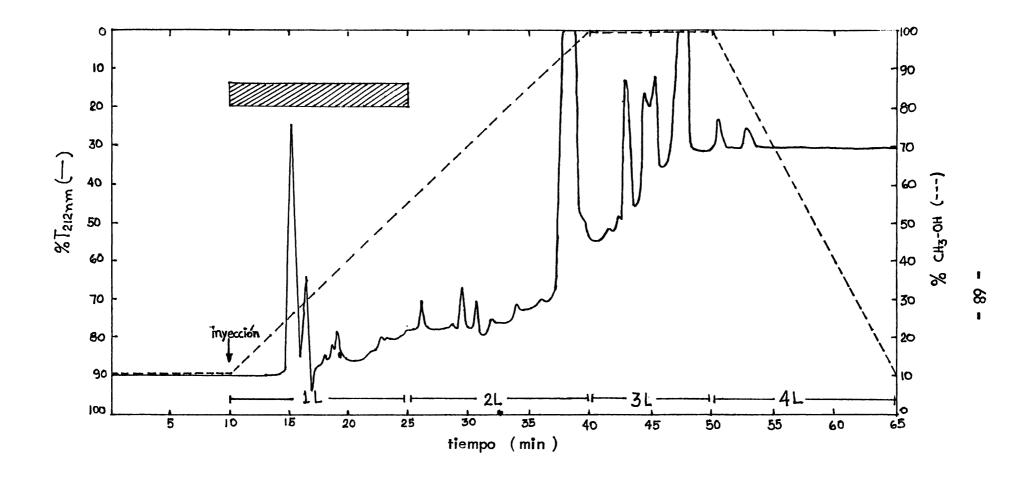


Figura 28) Corrida L en HPLC. Lote 1. 500 t.o. Gradiente de metanol 10 – 100%, TFA 5 mM. Programa 1. Colección en bloques. La HND se localizó en la zona sombreada.

Por otra parte, la fracción B correspondiente a 1450 t.o. del Lote 1 (ver pag. 51) fue purificada en CM-celulosa, como se había propuesto, sino que se cromatografió ectamente en HPLC, bajo las condiciones del programa 1, para compararla con el panobtenido de la fracción A. La gráfica de la corrida M se observa en la figura (29). esta ocasión no se detectó actividad biológica en ninguna de las fracciones colectadas en el control positivo de dicha muestra.

Debe mencionarse que en la época en que se realizaron estos experimentos (los de C), existían múltiples problemas con la determinación de actividad en el bioensayo, no se menciona en la sección de DISCUSION (ver pag. 138), y tal vez a eso puedan buírse los últimos resultados.

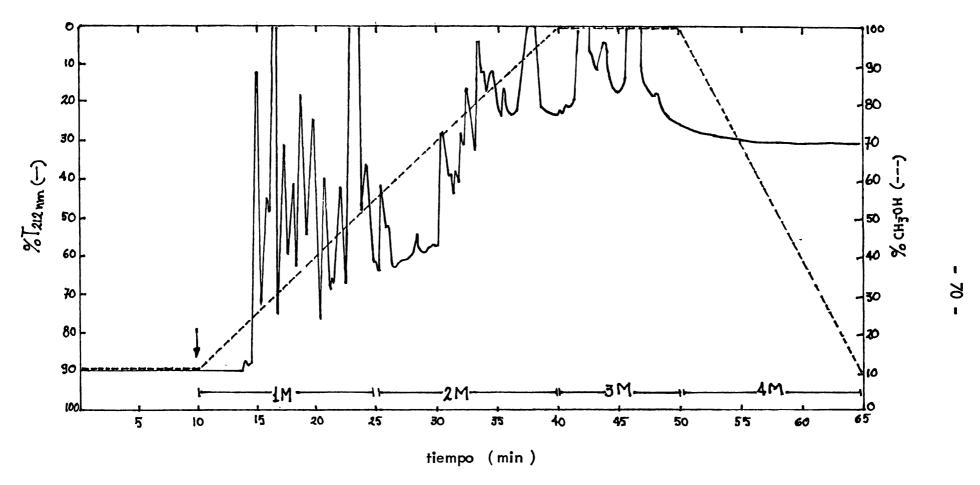


Figura 29) Corrida M en HPLC. Lote 1. 500 t.o. después de Sephadex G-15. Gradiente de metanol 10 - 100%, TFA 5 mM. Programa 1. Colección en bloques.

re 2).- Se inició a partir de una preparación de 7000 t.o. que se había extraído con propósito de purificar hormona neuroexcitadora. Debido a que en el paso de purificación cromatografía en Sephadex G-15 (ver pag. 31) hay una separación de la hormona neu-citadora y la hormona neurodepresora, las fracciones activas en cada caso se trabajaron separado a partir de dicha etapa.

Por lo tanto este lote se había tratado siguiendo la misma metodología descrita para Lote 1 hasta el paso de la 1a. cromatografía en Sephadex G-15. La única variante icho esquema fue la adición de tiodiglicol (TDG) al 0.1% como antioxidante.

Al recibir este lote se decidió recromatografiarlo en Sephadex G-15 con la intención eliminar el TDG. Las condiciones se mencionan a continuación. Dimensiones: 2.6 x 86 flujo: 14 ml/hr; volumen de muestra: 2 ml; volumen de cada fracción: 6.7 ml; se re-ró a 206 nm: 0.5 AUFS, y a 280 nm: 0.5 AUFS, simultáneamente. El resultado se ob-ra en la figura (30). La actividad neurodepresora apareció en el pico que eluyó a 380 ml. Las fracciones activas se concentraron hasta 200 ul.

Se hizo una electroforesis preparativa a pH 10.0 del material salido de Sephadex

15. La tinción con cloro mostró una mancha blancuzca en el origen, debida a contamiión con restos de tiodiglicol. Por lo tanto se recortó de +0.5 a -1.5 y se recuperó la
mona por el método usual. Se concentró hasta 100 ul.

Para eliminar el TDG se realizó una cromatografía ascendente en papel en forma preativa (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 17). Se aplicó la muestra y como control
puso a un lado una alícuota de 50 t.o. de HND de <u>Procambarus bouvieri</u> (purificada por
otros). La tinción con cloro reveló el resultado que se aprecia en la figura (31). Cose observa, la mancha correspondiente a HND de <u>P. bouvieri</u> tuvo un Rf=0.395, junto
illa se presentó una correspondiente a <u>P. vannamei</u>; también se vió otra mancha con un



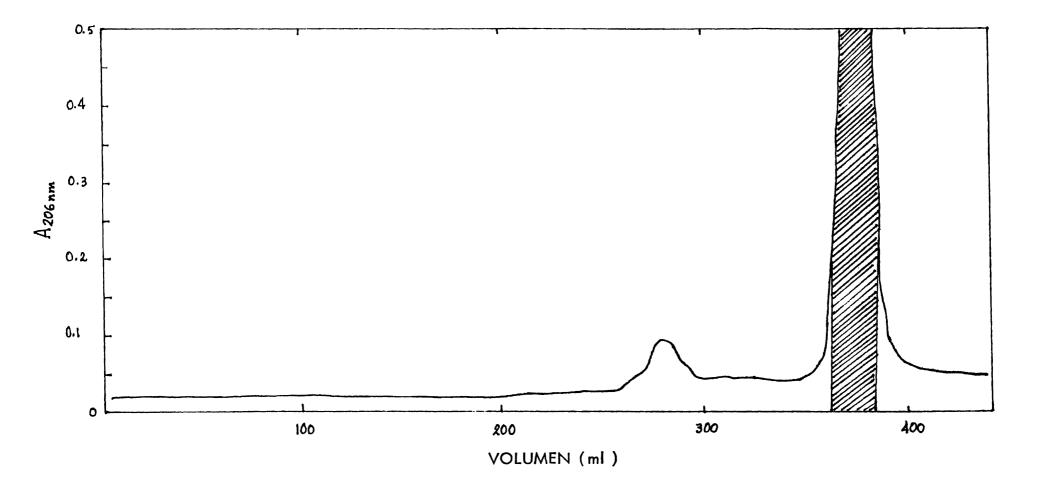


Figura 30) Cromatografía en Sephadex G-15 de 7000 t.o. Lote 2.- Dimensiones: 2.6 x 86 cm; flujo: 14 ml/hr; volumen de cada fracción: 6.7 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

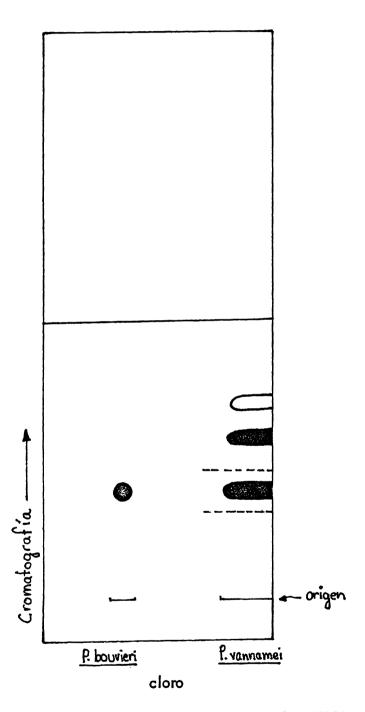


Figura 31) Cromatografía ascendente en papel de 7000 t.o. después de pH 10.0.

=0.589 y una blancuzca con un Rf=0.719, debida al TDG. Por lo tanto se recortó el spel de 4.5 a 6.5 cm del punto de aplicación y se recuperó la hormona en la forma sostumbrada. Se concentró hasta 150 ul.

Esta fracción fue sometida a una electroforesis preparativa a pH 1.8. Se obtuvo una ancha en el origen, otra en +4 (muy tenue) y una blancuzca en -12. Se recortó de 1.5 a -1.5 y se extrajo la hormona del papel. Se concentró hasta 200 ul.

A continuación se realizó una electroforesis preparativa a pH 3.5 del material salido pH 1.8. Se observó una mancha en -1. Se recortó de +0.5 a -1. Después de extraer hormona se concentró hasta 200 ul.

A dicho extracto se le hizo una electroforesis preparativa a pH 6.0. Se observó una a mancha en el origen. Se extrajo la hormona del papel y se concentró hasta 1 ml.

Este material se cromatografió en una columna de Sephadex G-15 bajo las siguientes ndiciones. Dimensiones: 1.6 x 85 cm; flujo: 8.8 ml/hr; volumen de cada fracción: 3 ml. registró a 206 nm: 0.2 AUFS, y a 280 nm: 0.02 AUFS. La gráfica obtenida se observa la figura (32). La HND eluyó en un volumen de 146 ml.

Con este material se decidió proseguir la purificación con la técnica de cromatografía uida de alta presión. Los primeros pasos fueron dirigidos a probar una serie de condiciocico con el objeto de identificar el comportamiento de la hormona neurodepresora en este ema.

Se probaron las condiciones del programa A (ver MATERIALES Y METODOS, pag.18), ectando 100 t.o. Se colectaron por separado los picos eluídos y después de evaporar con para eliminar al acetonitrilo, se mandaron alícuotas a bioensayo. Como se observa en figura (33) la actividad neurodepresora eluyó en el primer pico en forma mayoritaria, que también se observó un poco en el segundo. En esta forma se realizaron cinco corri-

Se probaron también las condiciones del programa B (ver MATERIALES Y METODOS,

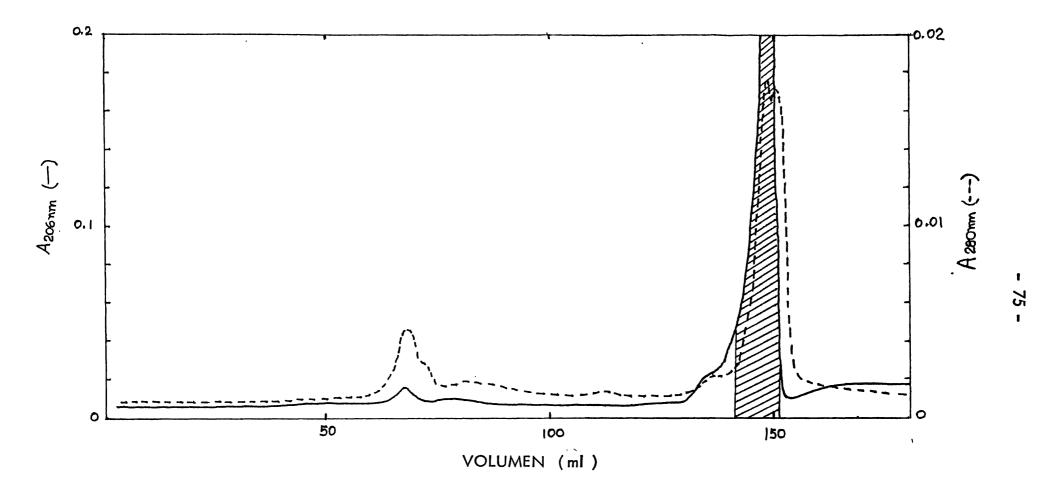


Figura 32) Cromatografía en Sephadex G-15 del extracto salido de pH 6.0. Lote 2. Dimensiones: 1.6 x 85 cm; flujo: 8.8 ml/hr; volumen de cada fracción: 3 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.



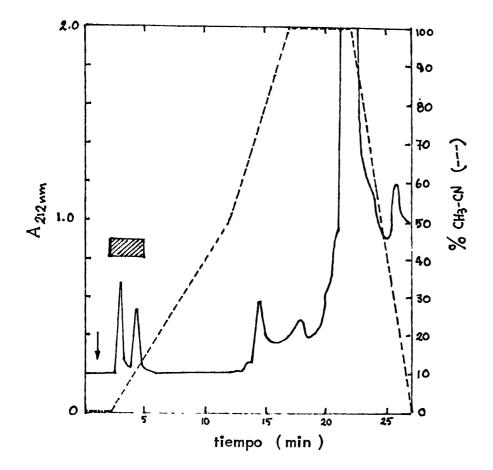


Figura 33) HPLC de 100 t.o. Lote 2. Programa A. La HND se localizó en la zona sombreada.

. 18) inyectando 100 t.o. Nuevamente se colectaron por separado los picos eluídos. gráfica obtenida se muestra en la figura (34). Nuevamente la actividad se encontró artida en ambas fracciones.

Se decidió comparar el efecto de metanol sobre el sistema y para ello se utilizaron condiciones del programa C (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 19). La gráfica ocaliza en la figura (35). En esta ocasión la hormona apareció en un solo pico, cose indica. Sin embargo, al repetirse el experimento, bajo las mismas condiciones, el altado fue diferente, como puede apreciarse en la misma figura (35).

Posteriormente, se probaron las condiciones mencionadas en el programa D (ver MA-IALES Y METODOS, pag. 19). En la figura (36) se muestra una gráfica representade esta serie de corridas analíticas. Bajo estas condiciones se observó que la HND etenía en la columna, y que eluía con una concentración de 45% de metanol.

Con estos últimos resultados en mente, se decidió optimizar las condiciones de este mo programa para utilizarlo en forma semipreparativa, de manera que se pudiera purifia este lote de hormona por este método.

Por lo tanto, el resto de este lote se cromatografió bajo las condiciones del programa 1 er MATERIALES Y METODOS, pag. 19). Se colectaron por separado los picos eluídos e mandaron a bioensayo alícuotas para localizar la actividad biológica. De acuerdo a datos obtenidos, la HND apareció en el pico que eluye con 80% de metanol, tal como puede observar en la figura (37). Dicho resultado se obtuvo en dos ocasiones, y postemente, se siguió recogiendo ese pico únicamente por su aparición en el cromatograma, fue muy reproducible a lo largo de las corridas A – H.

Todas las fracciones correspondientes al pico de 80% de metanol se reunieron y concenon. Posteriormente, en función de los resultados obtenidos en la corrida I (pag. 84) se lizó por bioensayo la actividad biológica de esta muestra y se vió que no había ninguna.

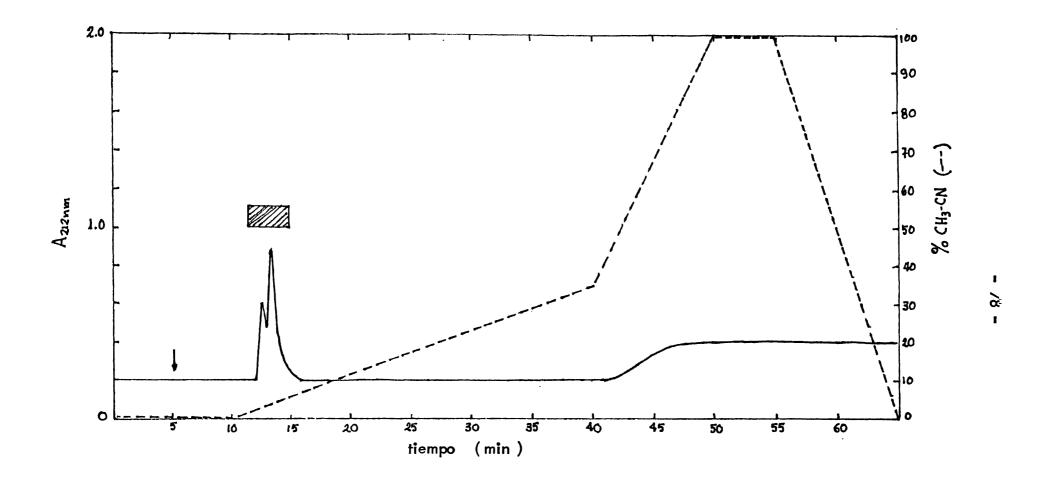
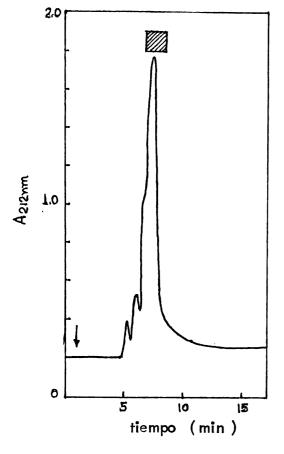


Figura 34) HPLC de 100 t.o. Lote 2. Programa B. La HND se localizó en la zona sombreada.



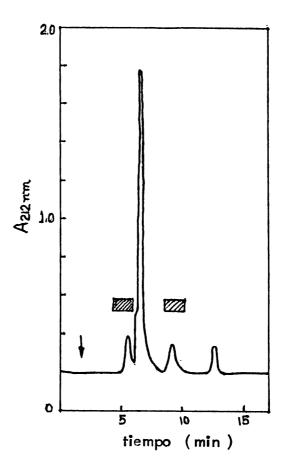




Figura 35) HPLC de 50 t.o. Lote 2. Programa C.

Metanol al 50% + TFA 5 mM.

La HND se localizó en la zona sombreada.

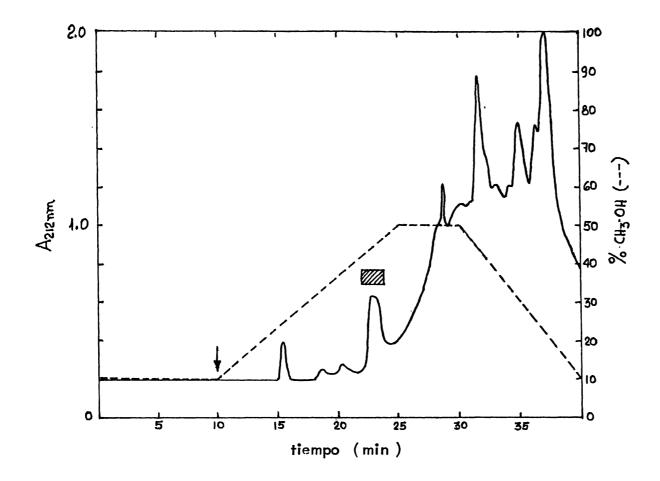


Figura 36) HPLC de 50 t.o. Lote 2. Programa D.
Gradiente de metanol 10 - 50% + TFA 5 mM.
La HND se localizó en la zona sombreada.

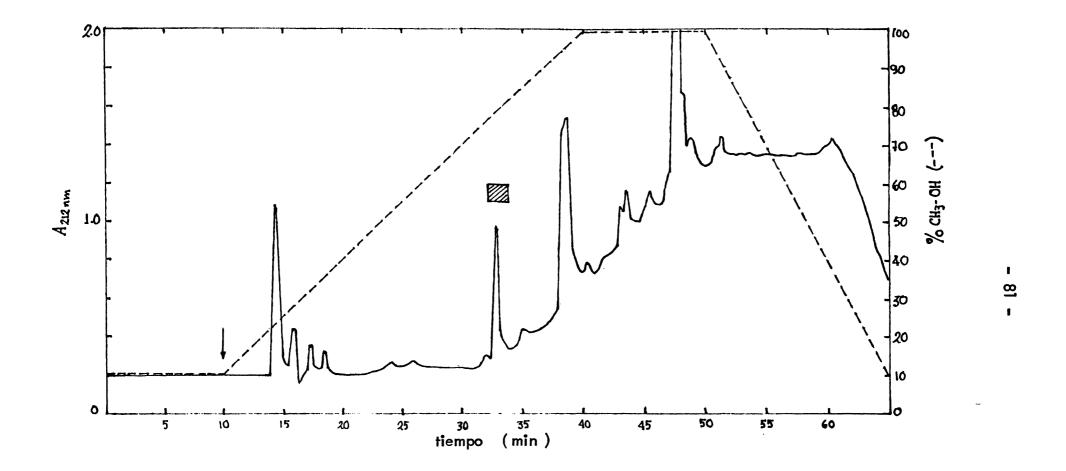


Figura 37) Gráfica representativa de las corridas A – H en HPLC, Lote 2. Gradiente de metanol 10 – 100% + TFA 5 mM. La HND se localizó en la zona sombreada. Programa 1.

TE 3).- Este lote estuvo constituído por una fracción de aproximadamente 7000 t.o. venientes de una purificación de hormona neuroexcitadora, y por una fracción de aproximamente 2400 t.o. que habían salido en la zona de carga de una cromatografía en CM-ulosa del Lote 1 (ver pag. 34). Se reunieron ambas fracciones y se liofilizaron a seque
Luego se resuspendieron en 7 ml de agua. El bioensayo de una alícuota indicó que stían 9000 t.o. en el Lote 3.

Para observar el estado en que se encontraba este material se hizo una cromatografía Sephadex G-15 bajo las condiciones que se mencionan. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; o: 13 ml/hr; volumen de cada fracción: 5 ml; se registró a 206 nm: 2.0 AUFS, y a nm: 1.0 AUFS, simultáneamente. Como se observa en la figura (38), la HND eluyó re los 305 y 350 ml. Las fracciones activas se concentraron hasta 3 ml.

Este extracto se dividió en tres fracciones: Fracción I correspondiente a 2500 t.o.; ción II correspondiente a 2250 t.o.; y Fracción III correspondiente a 4250 t.o.

Fracción I.- A esta fracción de 2500 t.o. se decidió purificarla primeramente con un amiento electroforético.

Por lo tanto se inició con una electroforesis preparativa a pH 1.8. Se recortó de +1 1 y se extrajo la hormona del papel por el método acostumbrado. Se concentró hasta ul.

A continuación se hizo una electroforesis preparativa a pH 10.0 del material salido de 1.8. Directamente se recortó de +1 a -1 y se recuperó la HND. Se concentró hasta ul.

Luego se hizo una electroforesis preparativa a pH 3.5 del material salido de pH 10.0. ndo se tiñó con cloro se observaron cuatro manchas positivas: en el origen, dos en -2,

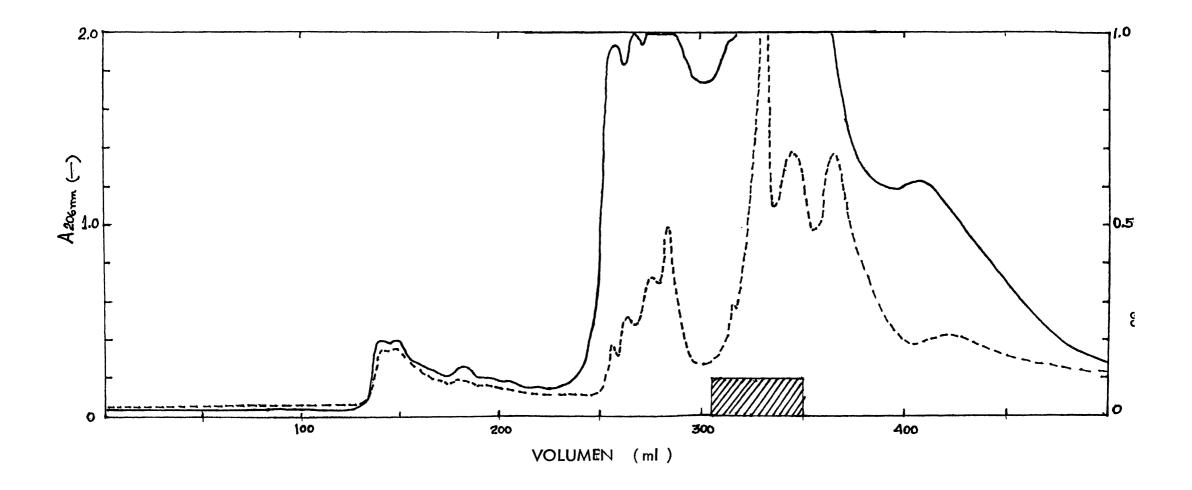


Figura 38) Cromatografía en Sephadex G-15 de 9000 t.o. Lote 3. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 13 ml/hr; volumen de cada fracción: 5 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

una en -3. Se recortó de +1 a -1. Se concentró hasta 300 ul.

Posteriormente se hizo una electroforesis preparativa a pH 6.0 del extracto de pH 3.5. In cloro se vió una sola mancha positiva en el origen. Se extrajo la zona de +1 a -1 se concentró hasta 500 ul.

Este material se diluyó a 2 ml con agua y se aplicó a una columna de Bio-Gel P-2 ver MATERIALES Y METODOS, pag. 12) para cromatografiarse bajo las condiciones que expresan. Dimensiones: 1.6 x 75 cm; flujo: 3.5 ml/hr; volumen de cada fracción: 1.75 ml; registró a 206 nm: 0.1 AUFS, y a 280 nm: 0.02 AUFS. La HND eluyó entre 101.5 a 7 ml. Las fracciones activas se concentraron hasta 2 ml. La gráfica se observa en la fi-a (39).

Dicho material se recromatografió en Bio-Gel P-2 bajo las siguientes condiciones.

nensiones: 1.6 x 83 cm; flujo: 4.5 ml/hr; volumen de cada fracción: 2 ml; se registró a

5 nm: 0.1 AUFS, y a 280 nm: 0.02 AUFS. En la figura (40) se observa el perfil obte
lo y el lugar en el cual eluyó la actividad neurodepresora, que fue entre 119 y 127 ml.

Se concentraron las fracciones activas. Se decidió proseguir la purificación de esta cción por cromatografía líquida de alta presión. Para ello fue necesario filtrar la muespor Millipore 0.22 um con el fin de eliminar partículas que pudieran tapar las microerías del cromatógrafo o interaccionar con la columna en forma irreversible. Se utilizalas condiciones del programa 1. La columna usada fue de fase reversa, Ultrasphere-ODS, 5 um. Se registró a 212 nm en el Beckman D.B.

El extracto salido de Bio-Gel P-2 se dividió en cuatro fracciones de 625 t.o. cada y se cromatografiaron por separado.

Debido a que al pasar la primera muestra, correspondiente a la corrida I, no se obserel pico que se había identificado como poseedor de la actividad neurodepresora en la lificación por HPLC del Lote 2 (ver fig. 37) y que sin embargo esta fracción de Bio-Gel poseía actividad, se decidió cambiar de táctica y en vez de colectar únicamente los

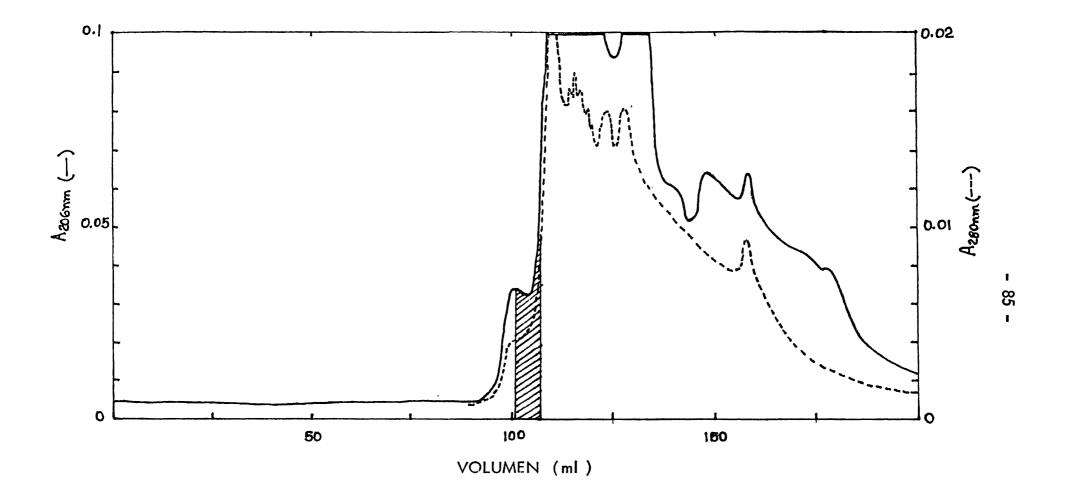


Figura 39) la. Cromatografía en Bio-Gel P-2, fracción I, Lote 3 (2500 t.o.) Dimensiones: 1.6 x 75 cm; flujo: 3.5 ml/hr; volumen de cada fracción: 1.75 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

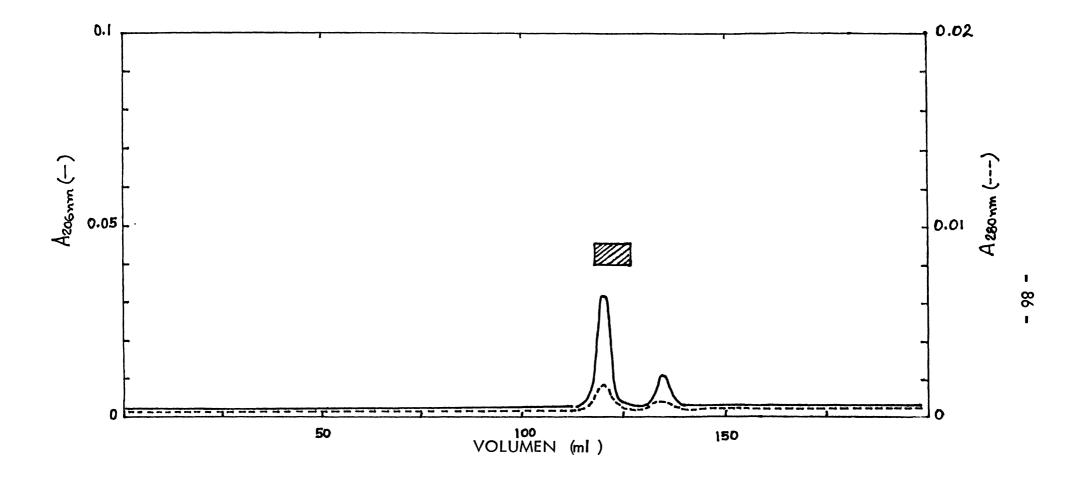


Figura 40) 2a. Cromatografía en Bio-Gel P-2, fracción I, Lote 3 (2500 t.o.) Dimensiones: 1.6 x 83 cm; flujo: 4.5 ml/hr; volumen de cada fracción: 2 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

cos con absorbencia a 212 nm, se decidió colectar toda la corrida, recogiendo por oques, en la forma indicada anteriormente (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 22).

Así pues, en la corrida J se detectó actividad en la zona 3J, correspondiente al lado con 100% de metanol, TFA 5 mM. La gráfica se observa en la figura (41).

Con estos datos en mente, con la siguiente alícuota, en la corrida K, se colectó el cer bloque por minutos, y la actividad (muy escasa) se localizó en las fracciones 10K 11K, como lo ilustra la figura (42).

Debido a que el resultado anterior mostró que la actividad neurodepresora aparentente se localizaba al final del lavado con metanol absoluto, se decidió modificar el proma 1 y alargar el lavado con metanol a 15 minutos. En la corrida N se obtuvo un retado similar al anterior.

Se debe mencionar que en la época en que se llevaron a cabo estos experimentos estaba cambiando de técnica de bioensayo, de la cadena abdominal al sistema del teneceptor, y que los resultados no fueron confiables por un tiempo, tal como se discute ampliamente en la próxima sección (pag. 138).

Los controles positivos para el bioensayo en algunas ocasiones solo daban menos del % de la actividad enviada y en ocasiones se reportaban como negativos.

Fracción II.- Esta fracción se resuspendió en 2 ml de agua y se cromatografió en una umna de Bio-Gel P-2 bajo las siguientes condiciones. Dimensiones: 1.6 x 75 cm; flujo: 1/hr; volumen de cada fracción: 1.6 ml; se registró a 206 nm: 2.0 AUFS, y a 280 nm: AUFS. Tal como se indica en la figura (43) la actividad hormonal se localizó entre y 102 ml. Las fracciones activas se concentraron hasta 350 ul.

Este material se sometió a una electroforesis preparativa a pH 1.8. La tinción con o de un margen de la hoja indicó la presencia de tres manchas: en el origen, en -3,

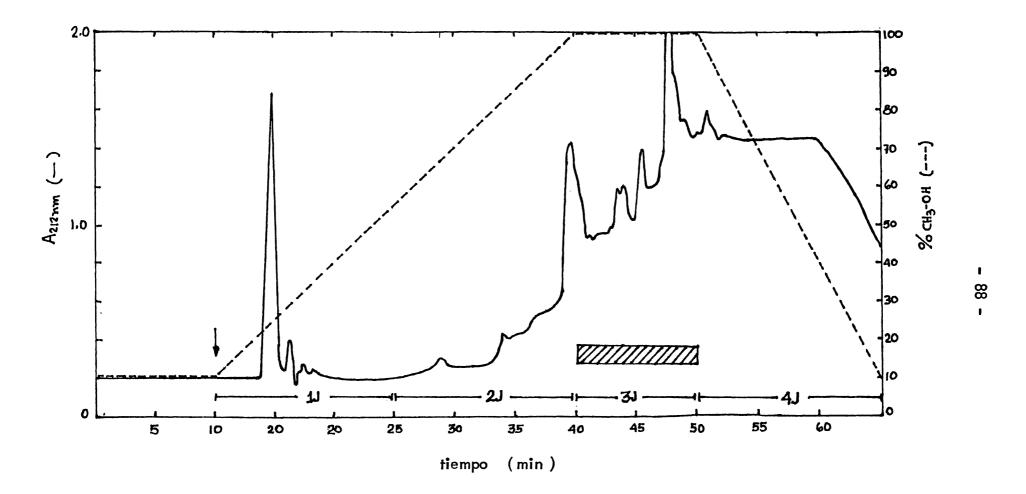


Figura 41) Gráfica de la corrida J, fracción I, Lote 3. Programa 1 en HPLC. Gradiente de metanol 10 – 100% + TFA 5 mM. La HND se localizó en la zona sombreada. Colección por bloques.

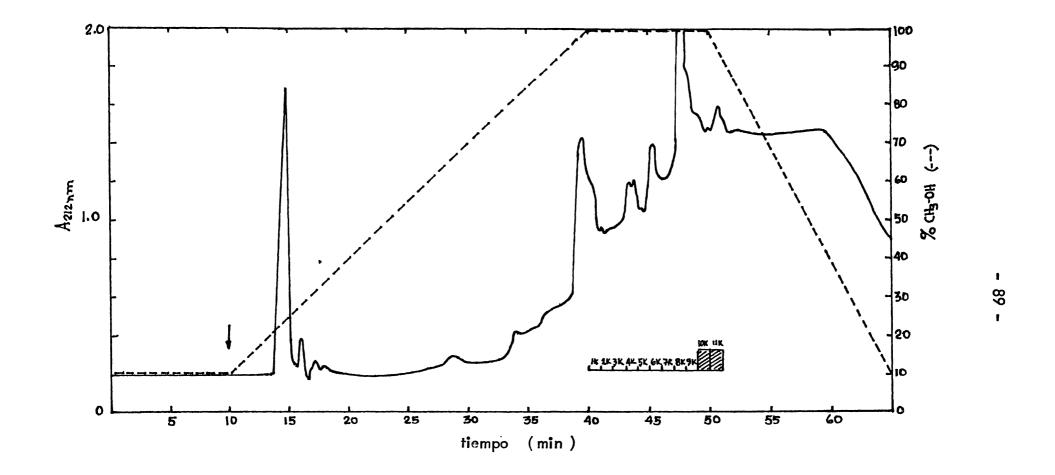


Figura 42) Corrida K en HPLC, fracción I, Lote 3. Programa 1. Gradiente de metanol 10 – 100% + TFA 5 mM. La HND se localizó en la zona sombreada. Se colectó por minutos en el bloque 3.

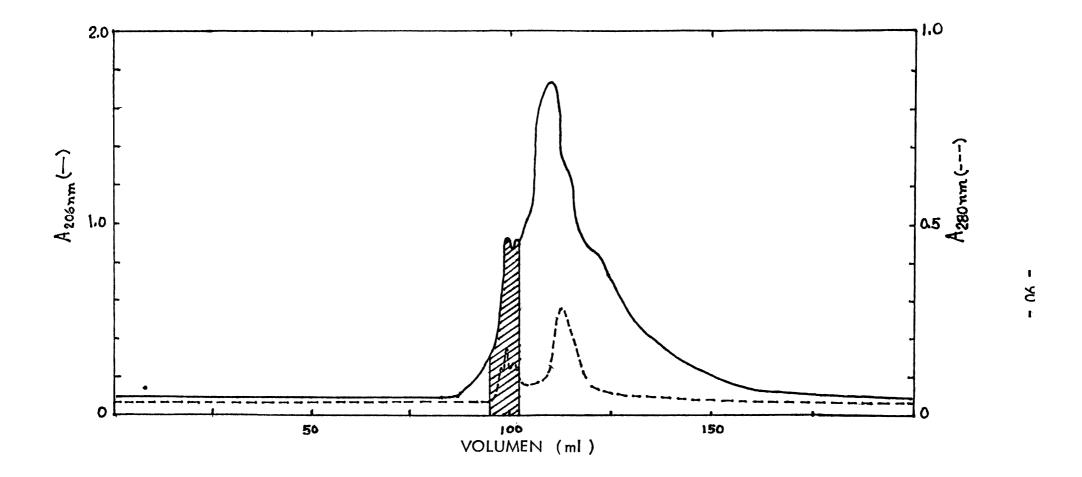


Figura 43) la. Cromatografía en Bio-Gel P-2, fracción II, Lote 3 (2250 t.o.)
Dimensiones: 1.6 x 75 cm; flujo: 4 ml/hr; volumen de cada fracción:
1.6 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

A continuación se efectuó una electroforesis preparativa a pH 10.0 del material salido de 1.8. Se observaron conco manchas cloro (+): en el origen, en -9, en +2, en +3 y en +6. recortó de +1 a -1. Se concentró hasta 300 ul.

Después se hizo una electroforesis preparativa a pH 3.5 de la fracción de pH 10.0. La tinn mostró una sola mancha en el origen. Se recortó de +1 a -1 y se extrajo la actividad. Se ncentró hasta 300 ul.

vó una sola mancha cloro (+) en el origen. Se extrajo la hormona de la zona de +1 a -1

2 concentró hasta 500 ul.

El siguiente paso consistió en volver a cromatografiar el material en la columna de Bio-Gel 2. Dimensiones: 1.6 x 83 cm; flujo: 8 ml/hr; volumen de cada fracción: 2 ml; se registró a 5 nm: 0.2 AUFS, y a 280 nm: 0.05 AUFS. Tal como se observa en la figura (44) la activid neurodepresora eluyó entre 124 y 132 ml.

Las fracciones activas se concentraron y luego se filtraron por Millipore 0.22 um. El volun filtrado se concentró hasta 200 ul.

Con este material se hicieron cuatro cromatografías de alta presión, de aproximadamente) t.o. cada una, bajo las condiciones del programa 1, recogiendo en bloques. Se registró 06 nm: 0.05 AUFS. Se observaron los siguientes resultados:

Corrida O: no se detectó actividad en ninguna fracción.

Corrida P: no se detectó actividad en ninguna fracción.

Corrida Q: se encontró HND en la zona 3Q.

Corrida R: se encontró HND en las zonas 2R y 4R.

En la figura (45) se muestra una gráfica representativa de estas cromatografías.

Nuevamente, los controles positivos para el bioensayo tampoco dieron resultados claros, ni

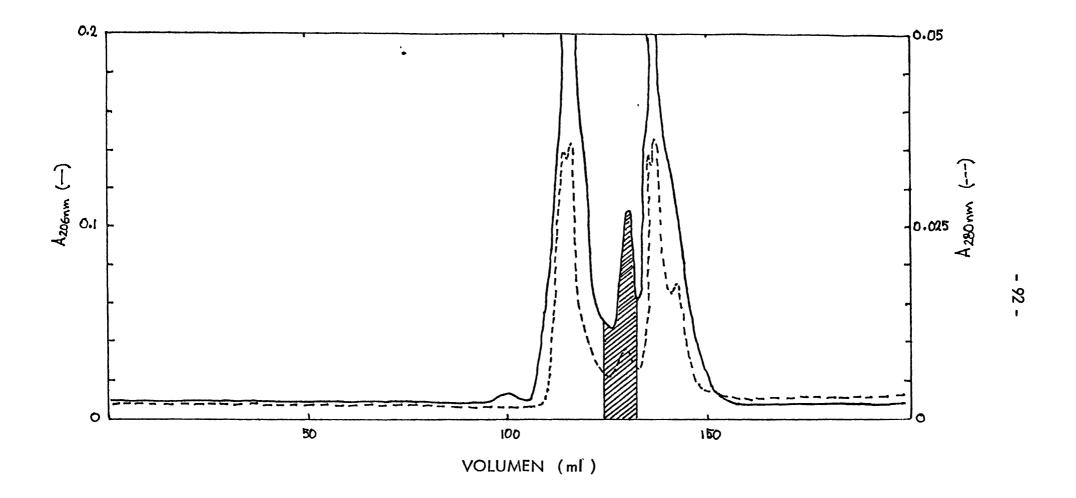


Figura 44) 2a. Cromatografía en Bio-Gel P-2, fracción II, Lote 3 (2250 t.o.)
Dimensiones: 1.6 x 83 cm; flujo: 8 ml/hr; volumen de cada fracción:
2 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

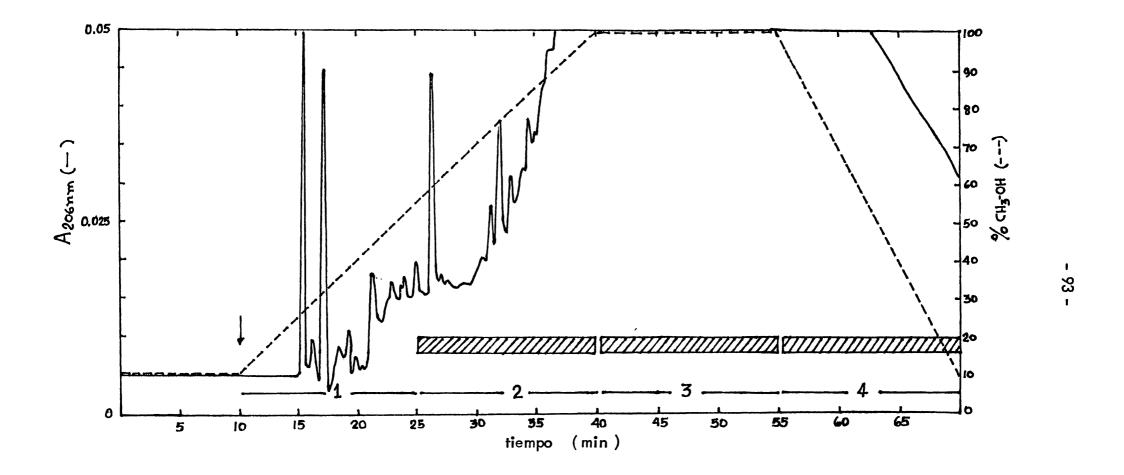


Figura 45) Gráfica representativa de las corridas O – R en HPLC, fracción II, Lote 3. Programa 1. Gradiente de metanol 10 – 100% + TFA 5 mM. Se colectó por bloques. La HND se localizó en la zona sombreada.

cluyentes. Ver DISCUSION (pag. 138).

Fracción III.- En vista de los resultados obtenidos con las fracciones I y II en HPLC, se idió probar si el sistema de la cromatografía líquida de alta presión funcionaría con extracmenos purificados y que en forma más rápida se pudiera llegar a obtener una fracción sufintemente pura como para poder caracterizarla y hacer los trabajos de secuenciación, aprohando la posibilidad del sistema de lograr mejor resolución en tiempos muy cortos.

Por lo tanto se tomó la fracción III salida de Sephadex G-15, correspondiente a 4250 t.o.

purificarla por este procedimiento. Se concentró hasta 500 ul y se eliminó un precipitado blancino mediante centrifugación a 2000 rpm, 4°, 30 min. Luego se filtró por Millipore 0.22 um.

bioensayo se corroboró que en efecto se tenían 4250 t.o. en esa fracción.

La fracción III se dividió en nueve partes, correspondiendo cada una a aproximadamente

t.o. Se cromatografiaron por separado utilizando las condiciones del programa 1 y registran
1 206 nm: 1.0 AUFS. Las fracciones eluídas se colectaron en cuatro bloques, en la forma

licada. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Corrida S: no se detectó actividad en ninguna fracción.

Corrida T: se encontró HND en la zona 1T.

Corrida U: se encontró HND en la zona 2U.

Corrida V: se encontró HND en la zona 2V.

Corrida W: se encontró HND en la zona 1W.

Corrida X: se encontró HND en la zona 1X.

Corrida Y: se encontró HND en la zona 1Y.

Corrida Z: se encontró HND en la zona 1Z.

Corrida : se encontró HND en la zona la.

En todos los casos en donde se localizó actividad neurodepresora en las zonas 1 ésta fue muy a. Los controles positivos para el bioensayo también salieron bien, dando los resultados que speraban.

En la figura (46) se muestra una gráfica representativa de estos experimentos.

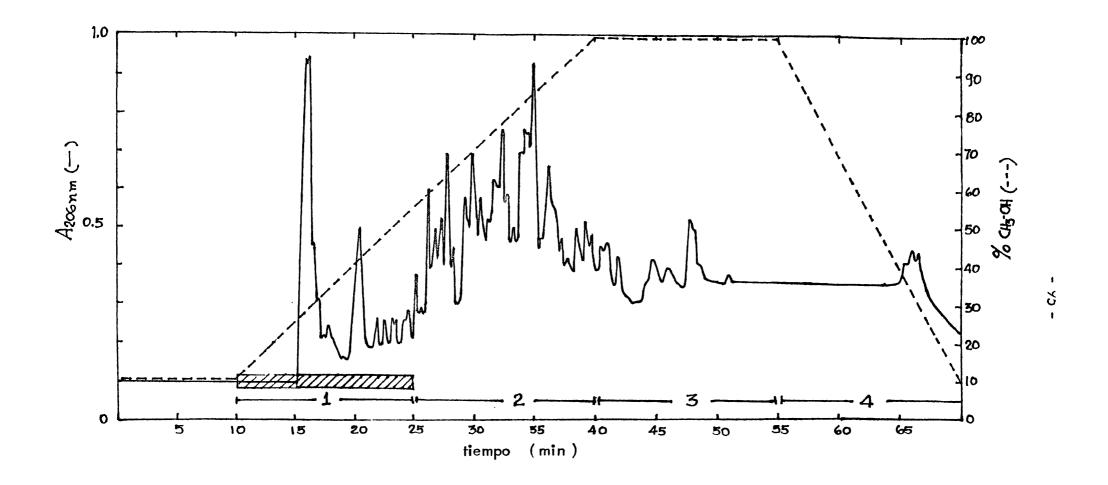


Figura 46) Gráfica representativa de las corridas S - \propto en HPLC, fracción III, Lote 3. Programa 1. Gradiente de metanol 10 - 100% + TFA 5 mM. Se colectó por bloques. La HND se localizó en la zona sombreada.

Los resultados obtenidos mostraron con claridad que bajo las condiciones del programa 1, normona neurodepresora aparece en la zona 1, correspondiente a 10 - 50% de metanol, TFA -1M, en la columna de Ultrasphere-ODS.

Se reunieron todas las zonas 1 correspondientes a estas corridas, por una parte, y por otra zonas 2U y 2V, y se concentraron.

Cuando se concentraron a sequedad las fracciones de las zonas 1 se observó una pastilla nca y cristalina, la cual al resuspenderse en 150 ul de agua daba la impresión de formar solución saturada con sales. Por lo tanto se decidió averiguar si esa muestra en efecto conta sales, y si se podría determinar la presencia de potasio, que se sabe es un ión que puede efferir con el bioensayo.

Se tomaron 5 ul de la solución y se diluyeron a 200 ul con agua, luego se determinó potasio flamometría. El resultado mostró que efectivamente había potasio en una concentración de 87 meq/l. En el control de agua no se detectó el ión. Los cálculos indicaron que en la solun de HND se encontraba potasio a una concentración de 1.00893 ug/ul.

Se calculó si esta concentración de potasio podría afectar al bioensayo tomando en cuenta volumen fina de la muestra que se inyecta a la preparación fisiológica, diluída en la solución Van Harreveld (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 9), la cual contiene 5.36 mM de po
o. Se vió que la molaridad final de potasio se elevaba a 5.683 mM, lo cual no debería de uir en los resultados de la preparación fisiológica, y que por tanto los datos obtenidos de ella fan ser confiables.

Se hizo una cromatografía de alta presión de la fracción que contenía las zonas 2U + 2V o las condiciones del programa 1, registrando a 206 nm: 1.0 AUFS. Se recolectó por bloques. Intividad se halló en la zona 31. En la figura (47) se observa la gráfica de esta corrida 1.

Por otra parte, se decidió volver a cromatografíar a la solución de HND correspondiente a zonas 1, con el fin de colectar ahora cada pico por separado, y ver si era posible asociar la

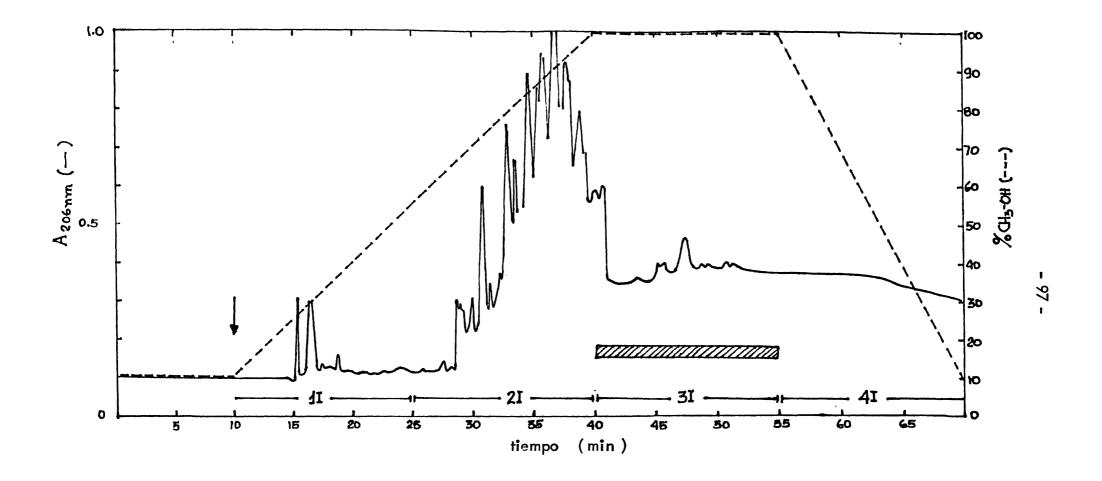


Figura 47) Corrida I en HPLC, (zonas 2U + 2V, fracción III, Lote 3).
Programa 1. Se colectó por bloques. La HND se localizó en la zona sombreada.

ividad biológica con un solo pico en particular. Se dividió a este extracto en tres fracciones aproximadamente 1330 t.o. cada una y se aplicaron las condiciones del programa 1, registrana 206 nm: 1.0 AUFS. Los resultados fueron los siguientes:

Corrida II: se detectó HND en el pico II1 1

Corrida III: se detectó HND en el pico III_{1.1}

Corrida IV: se detectó HND en el pico IV1.1

En la figura (48) se muestra una gráfica representativa de esta serie de corridas. De acuerdo stos resultados la HND eluye en el primer pico que se obtiene bajo las condiciones empleadas, a columna de fase reversa, y se puede separar bien de la mayor parte de los contaminantes.

Por lo tanto se reunieron los tubos II_{1.1}, III_{1.1}, y IV_{1.1} y se concentraron. Con el fin de cular la proporción de sales en esa fracción, se pesó un tubo antes (2.104 g) y después de haconcentrado en él la fracción activa (2.19045 g). Por lo tanto el contenido del tubo pesaba 45 mg. Luego se resuspendió en 300 ul de agua y de ahí se tomó una alícuota de 5 ul a la que e determinó presencia de los iones sodio y potasio por flamometría. El resultado fue que se aron 62 meq/l de sodio y 21 meq/l de potasio. El resultado de los cálculos suponiendo que os iones se encontraran en forma de NaCl y KCl fue de que habría alrededor de 93 mg de sen la solución, lo cual es correlacionable con el valor obtenido por peso. Estos datos indian que la mayor parte de lo que se encontraba en el tubo eran sales, y que la cantidad de hora existente era muy baja.

Se hizo una cromatografía de alta presión, analítica, de 10 ul (120 t.o.) de la muestra con vidad biológica para observar su nivel de pureza, bajo las condiciones del programa 1. En gura (49) se observa el resultado de esta corrida V. La actividad nuevamente apareción en acción V_{1.1}.

Dado que los resultados eran muy reproducibles y la HND siempre eluía al principio bajo las diciones del programa 1, se decidió variar las condiciones, para ver si había algún cambio

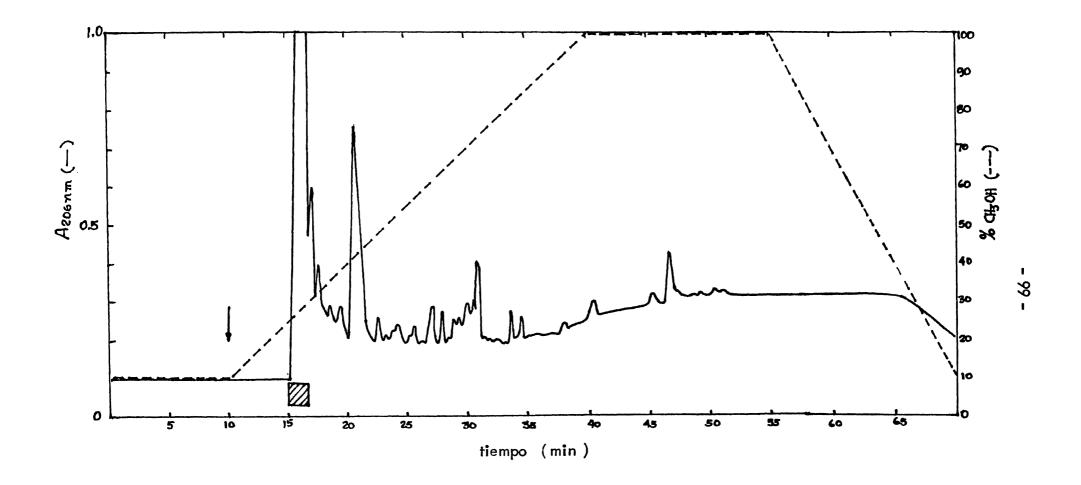


Figura 48) Gráfica representativa de las corridas II – IV en HPLC. Fracción III, Lote 3. Programa 1. Gradiente de metanol de 10 – 100% + TFA 5 mM. Se colectó por picos. La HND se localizó en la zona sombreada.

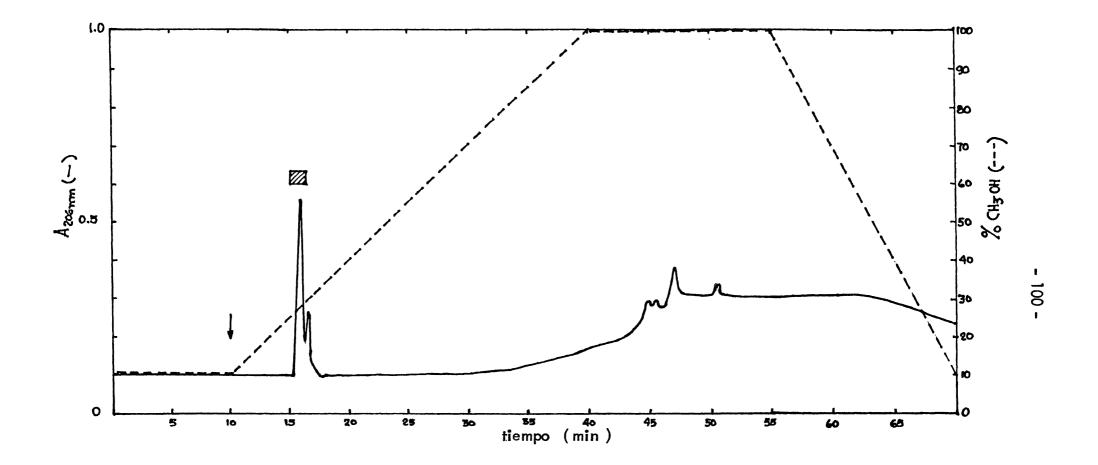


Figura 49) Corrida V en HPLC, analítica. Fracción III, Lote 3.
Programa 1. Gradiente de metanol de 10 – 100% + TFA 5 mM.
Se colectó por picos. La HND se localizó en la zona sombreada.

la posición de elución de la hormona. Por lo tanto se hizo otra cromatografía, analítica, las condiciones del programa 4 (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 20). En la figura)) se ilustra el resultado de la corrida XVI, el cual es básicamente idéntico al obtenido en corrida V. La actividad neurodepresora se localizó en el pico XVII.1. Estos datos indicaban no había diferencia de comportamiento entre las condiciones del programa 1 y del programa y que la hormona era tan hidrofílica que prácticamente no se retenía en la columna y eluía camente con agua + TFA 5 mM.

Entonces se decidió ver si variando el pH de la solución eluyente se conseguía separar al taminante en forma más clara o si se podía retener a la hormona en la columna. Por lo tanto iguieron las condiciones del programa 5, isocrático, utilizando únicamente agua como elute, a pH 5.0, en vez de pH 3.0 que es el que se tenía anteriormente.

El resultado de la corrida XVII se observa en la figura (51). Como se ve estas condiciones nejoran la resolución, y lo que es más, hacen que tanto la hormona como su contaminante scipal eluyan juntos. La HND se localizó en el pico XVII₁.

Se decidió hacer una serie de cromatografías analíticas en una columna de Ultrasphere-ODS, n, nueva, para ver si se mejoraba la resolución. Se hicieron las corridas XVIII a XXII bajo condiciones del programa 5, utilizando como eluyente únicamente H₂O + TFA 5 mM, pH 3.0. a figura (52) se observa una gráfica representativa de esta serie de corridas. La actividad ocalizó en el mismo lugar que en veces anteriores. Como se observa no se mejoró la resolunente la hormona y su contaminante mayoritario.

Con el objeto de tratar de separar más a hormona y contaminante se decidió probar las condines del programa 7 (ver MATERIALES Y METODOS, pag. 21), el cual fue hecho para cuando nieron 2 columnas de Ultrasphere ODS en seie, de manera que se aumentaron las dimensiones a fase reversa al doble: 4.6 x 500 mm. El eluyente fue agua + TFA 5 mM, pH 3.0. En efectió que se aumentaba la resolución. En la figura (53) se muestra una gráfica representativa

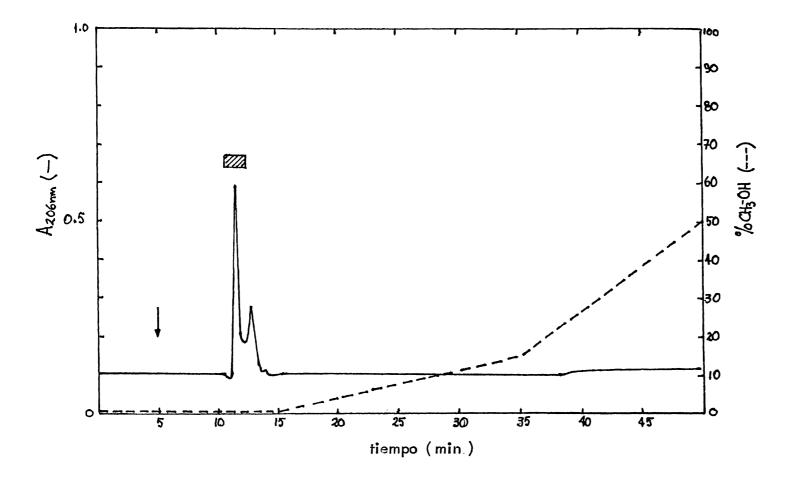


Figura 50) Corrida XVI en HPLC, analítica. Fracción III, Lote 3. Programa 4. Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0; Solvente B: metanol 100% + TFA 5 mM. Se colectó por picos. La HND se localizó en la zona sombreada.

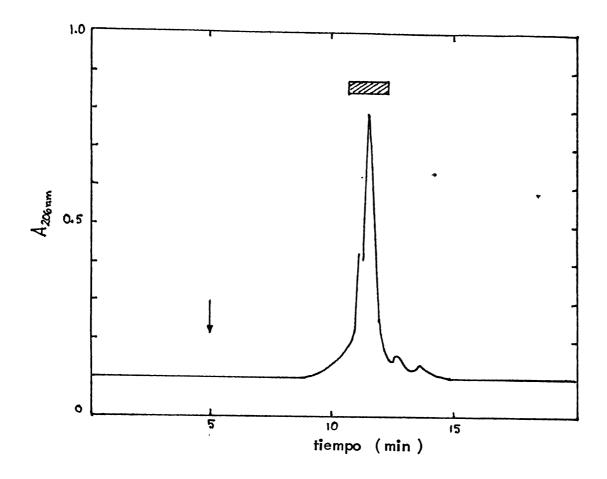


Figura 51) Corrida XVII en HPLC, analítica. Fracción III, Lote 3. Programa 5. Solvente A: agua pH 5.0. La HND se localizó en la zona sombreada.

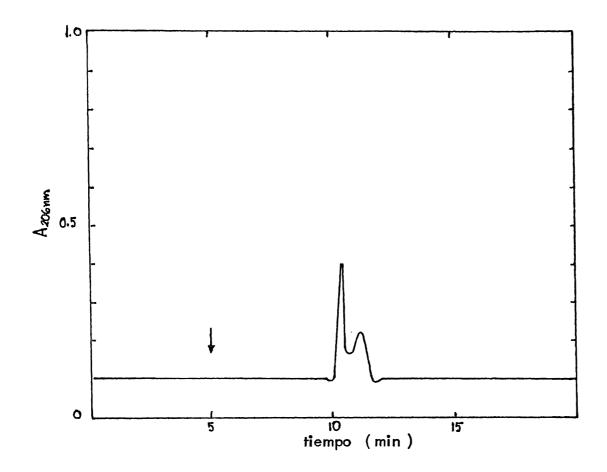


Figura 52) Gráfica representativa de las corridas XVIII - XXII en HPLC.
Programa 5. Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0

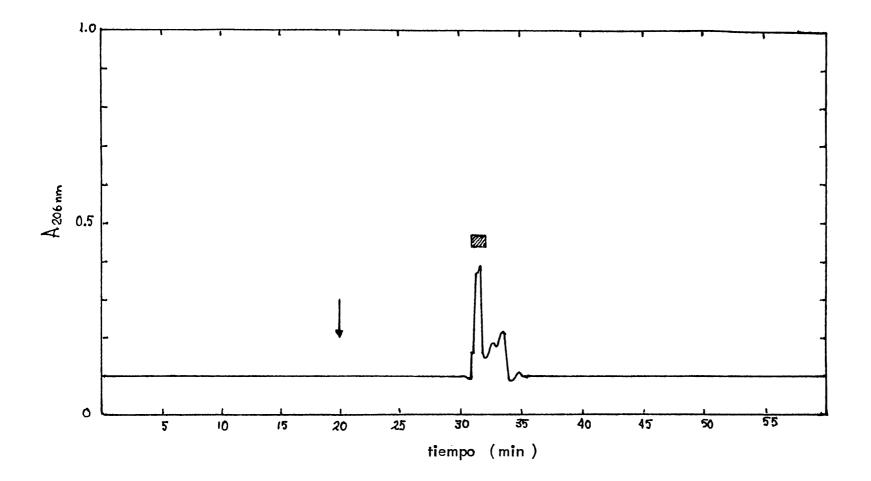


Figura 53) Gráfica representativa de las corridas XXIII - XXXI en HPLC. Programa 7. 2 columnas de U trasphere-ODS en serie. Solvente A; agua + TFA 5 mM, pH 3.0. Se colectó por picos. La HND se localizó en la zona sombreada.

los resultados de las corridas XXIII a XXXI. Como se aprecia en dicha figura se vió que el co correspondiente a la actividad biológica no era simétrico, sino que estaba compuesto por rios componentes. Así mismo se observó que el contaminante se resolvía cuando menos en dos mponentes.

Se reunieron los tubos correspondientes a cada una de las cuatro fracciones separadas, y se ncentraren. Luego se mandaron a bioensayo alícuotas de 50 t.o. de los picos 1, 2, 3 y 4. bioensayo mostró que toda la actividad se había recuperado en la fracción correspondiente al xo 1.

Se probaron otras condiciones, esta vez utilizando como eluyente a acetonitrilo al 5% en etato de amonio 10 mM, pH 7.5, bajo el programa 5 y utilizando solo una columna. El resullo se ilustra en la figura (54). Como se puede observar apareció un solo pico, y en él se hala actividad biológica. Estos resultados correspondieron a las corridas XXXII y XXXIII.

Para averiguar si los picos obtenidos en las dos últimas corridas en efecto se encontraban puse decidió reunirlos y analizarlos nuevamente bajo condiciones ácidas, es decir con agua,
4 5 mM, pH 3.0. El resultado de la corrida XXXIV se observa en la figura (55). Como se
aún se encontró contaminado el pico correspondiente a la actividad biológica. Estos datos
pirieron que los resultados obtenidos en condiciones ligeramente alcalinas eran un artificio
ue la muestra todavía no se encontraba pura.

Como control se hizo una cromatografía analítica de la fracción de HND (pico 1) en condines ácidas, con el programa 5. Tal como lo indica la figura (56), en efecto se observaron picos. La actividad se localizó en el primer pico obtenido en la corrida XXXV.

En vista de que aún se presentaba un contaminante se decidió cromatografiar nue vamente odo el lote del pico 1, bajo las condiciones del programa 5, utilizando agua, TFA 5 mM no eluyente, con la intención de colectar las fracciones por separado, de manera que se pura obtener al pico activo prácticamente libre de contaminantes. Así pues se hicieron las ridas XXXVI a XLV. En la figura (57) se ilustra una gráfica representativa de esta serie.

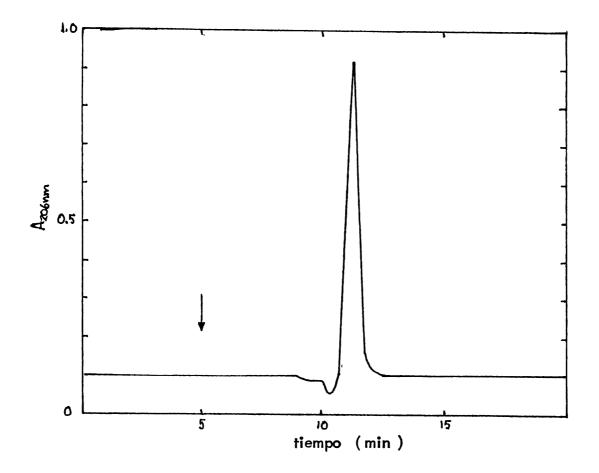


Figura 54) Corridas XXXII – XXXIII en HPLC, analíticas.
Programa 5. Solvente A: acetonitrilo al 5% en
acetato de amonio 10 mM, pH 7.5

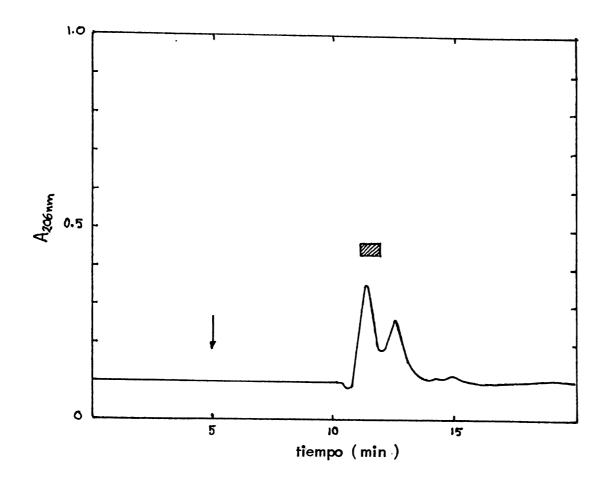


Figura 55) Corrida XXXIV en HPLC, analítica. Programa 5.
Solvente A: agua + TFA 5 mM, p. 3.0. Se colectó
por picos. La HND se localizó en la zona sombreada.

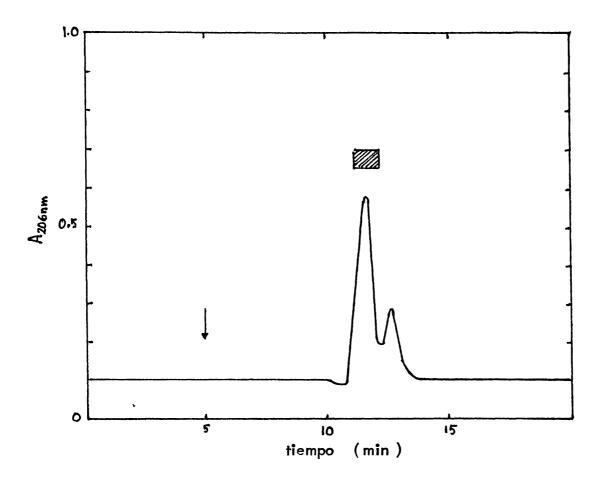


Figura 56) Corrida XXXV en HPLC, analítica, Programa 5.
Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0. Se colectó
por picos. La HND se localizó en la zona sombreada.

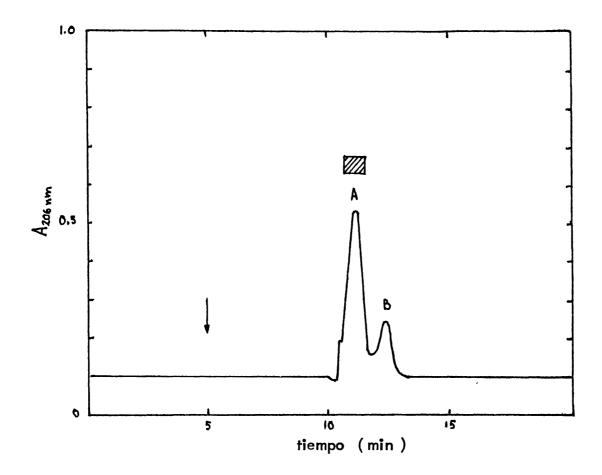


Figura 57) Gráfica representativa de las corridas XXXVI – XLV en HPLC. Programa 5. Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0. Se colectó por picos. La HND se localizó en la zona sombreada.

todas ellas la actividad se encontró en el primer pico (que se denominó pico A). Se reunietodos los tubos correspondientes al pico A por una parte, y los del pico B por otra. Por bioayo se detectó que se había recuperado toda la actividad en la fracción A.

A continuación, se hicieron dos cromatografías analíticas de la fracción A, con 20 y 50 t.o. pectivamente, para ver si ya se encontraba pura la hormona o si el pico estaba formado por más un componente, como parecían sugerir algunas de las corridas anteriores. Las condiciones das fueron las mismas. En la figura (58) se encuentran los resultados de las corridas XLVI (LVII. Sorpresivamente se volvió a observar el pico que contaminaba a la fracción A. Este ultado nos hizo pensar que tal pico tal vez se debía a algún contaminante exógeno, que se uviera introduciendo al sistema en alguna parte del procedimiento.

Para comprobar dicha hipótesis se corrieron los siguientes controles, bajo las mismas condiciocromatográficas.

Corrida XLVIII: 5 ul de solución acuosa utilizada para siliconizar.

Corrida XLIX: 5 ul de solución concentrada para siliconizar (Aquasil)

Corrida L: 5 ul del concnetrado de 1.5 ml de agua, TFA 5 mM que se trató igual los tubos con muestra (congelamiento, calor, concentración, etc.) llevado hasta 10 ul. Los resultados se muestran en la figura (59). Como se ve, aparentemente la solución acuotilizada para siliconizar presenta contaminantes que aparecen en la misma posición que el b. También se mostró con estos experimentos que una de las distorsiones que se veían en racción A es debida a silicón.

En vista de estos resultados se decidió volver a cromatografiar a toda la actividad neurodesora (pico A) en las mismas condiciones, para volver a separar al presunto pico contaminante, o ahora eliminando los tubos siliconizados y colectando en tubos de plástico Eppendorf que requieren siliconización.

Así pues, se efectuaron las corridas Ll a LV, En la figura (60) se muestra una gráfica repre-



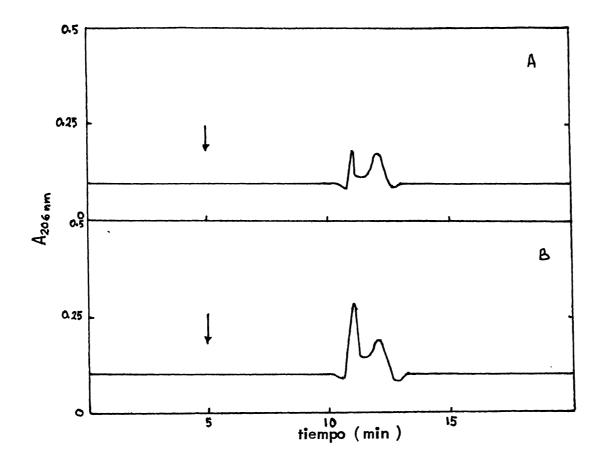


Figura 58) Corridas XLVI – XLVII, analíticas, en HPLC.

Programa 5. Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0

Panel A): 20 t.o.

Panel B): 50 t.o.



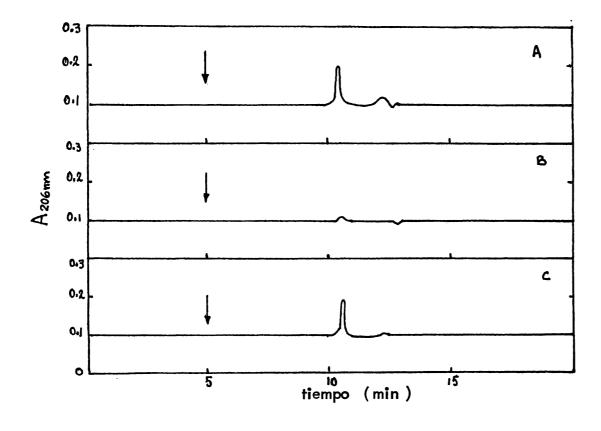


Figura 59) Corridas XLVIII – L en HPLC. Programa 5. Solvente A:
agua + TFA 5 mM, pH 3.0.
Panel A): solución para siliconizar.
Panel B): Aquasil (concnetrado)
Panel C): Lavado de tubo siliconizado.

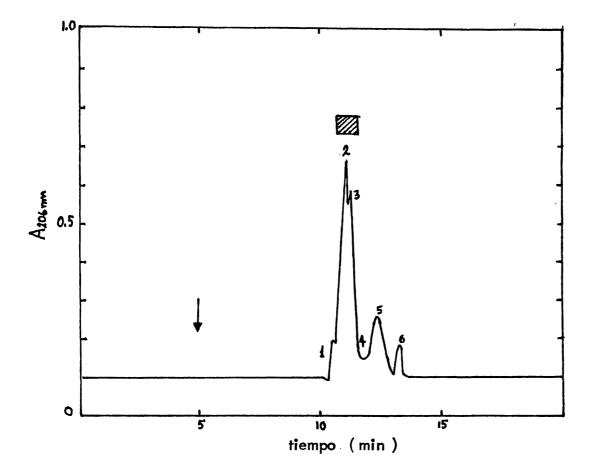


Figura 60) Corridas LI – LV en HPLC, preparativas. Programa 5. Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0. Se colectó en la forma que se indica en la figura. La HND se localizó en la zona sombreada.

rativa de esta serie. Se colectó en la forma indicada en la figura. La actividad se encontró artida en las zonas 2 y 3, por lo que se reunieron en una sola fracción y se concentraron. nismo también se reunieron y concentraron por separado los tubos correspondientes a los pi-1, 4, 5 y 6.

Se hizo una cromatografía analítica bajo las mismas condiciones de una alícuota corresponnte a 50 t.o. y se obtuvieron los resultados que se observan en la figura (61). Como se
de apreciar, nuevamente apareció el pico contaminante, en la misma posición de antes y
londe también eluyó uno de los contaminantes de la solución utilizada para siliconizar. Sin
argo, ya se habían eliminado éstos y se habían utilizado tubos de plástico en donde ya no se
ía usado silicón.

Después de estos resultados se sugirió la posibilidad de que ese contaminante pudiera ser un lucto de degradación de la hormona.

En vista de que no se podía obtener ya ninguna ventaja con la columna de fase reversa, se idió guardar ese lote hasta que se tuvieran en el laboratorio otro tipo de columnas y ast ar el maltrato a la hormona.

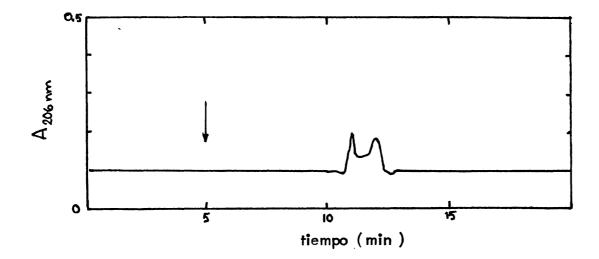


Figura 61) Corrida LVII en HPLC, analítica, 50 t.o. Programa 5. Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0.

TE 4).- Debido a que algunos lotes habían perdido actividad y que se tenía poca cantidad hormona, se decidió iniciar una nueva purificación. Se partió de 1200 g de material congeo, es decir alrededor de 12000 t.o. de <u>Penaeus vannamei</u>. Estos se molieron en las condiciodescritas y se extrajeron los polvos con agua como ya se ha mencionado. En total se utiliza6150 ml de agua los cuales se concentraron hasta 500 ml. Este material se dializó contra
na en la forma indicada. Se obtuvieron 12 l de aguas de diálisis, los cuales se concentraron
ta un volumen de 108 ml que constituyeron el Extracto Crudo.

El extracto crudo se dividió en dos fracciones de 54 ml cada una, correspondientes a 6000 t.o., se denominaron fracción A y fracción B.

La fracción A (6000 t.o.) se empezó a purificar por el método tradicional, cromatografiándoen una columna de Sephadex G-25 fino, bajo las condiciones que se indican. Dimensiones: x 85 cm; flujo: 20 ml/hr; volumen de cada fracción: 8 ml. Se registró a 280 nm: 2.0 AUFS, pmo de costumbre se eluyó con agua. Se hicieron cinco cromatografías de esta fracción, obiéndose los siguientes resultados:

Extracto crudo	Volumen de elución de HND
12 ml (1330 t.o.)	368 - 448 ml
12 ml (1330 t.o.)	376 – 456 ml
12 ml (1330 t.o.)	368 – 456 ml
12 ml (1330 t.o.)	368 - 45 6 ml
6 ml (660 t.o.)	352 - 424 ml

En la figura (62) se observa una gráfica representativa de esta serie. Se concentraron las ciones activas hasta 20 ml.

El extracto de 1aSG25f se cromatografió nuevamente en la misma columna bajo las siguiencondiciones. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 11 ml/hr; volumen de cada fracción: 11 ml; egistró a 280 nm: 2.0 AUFS.

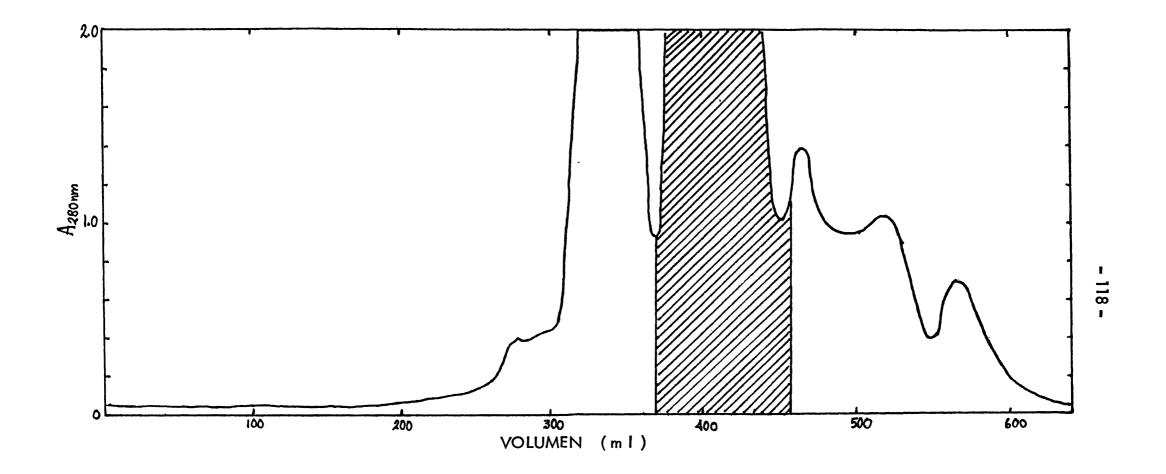


Figura 62) la. Cromatografía en Sephadex G-25 fino. - Fracción A, Lote 4. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 20 ml/hr; volumen de cada fracción: 8 ml; elución con agua. Se localizó la HND en la zona sombreada.

El extracto se dividió en dos partes que se cromatografiaron por separado, dando los siguienresultados:

ElaSG25f

Volumen de elución de HND

10 ml (3000 t.o.) 330 - 418 ml 10 ml (3000 t.o.) 352 - 451 ml

En la figura (63) se muestra una gráfica representativa de estas cromatografías. Las fraccioactivas se concentraron hasta 8.5 ml.

Luego se procedió a cromatografiar el extracto obtenido de 2aSG25f por una columna de hadex G-15, bajo las condiciones que se indican. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 11 ml/hr; men de cada fracción: 5.5 ml; se registró a 280 nm: 2.0 AUFS. La HND eluyó entre 308 - ml. En la figura (64) se muestra la gráfica obtenida. Se concentraron las fracciones activas a 7 ml.

Dicho extracto se recromatografió en la misma columna bajo las siguientes condiciones. Dissiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 8.5 ml/hr; volumen de cada fracción: 3.3 ml; se registró a 280 nm: AUFS. La HND eluyó entre 310 - 344 ml. La gráfica se observa en la figura (65). Las ciones activas se concentraron hasta 2 ml.

El bioensayo reveló que la actividad biológica se había recuperado en su totalidad después stos pasos de purificación.

Aprovechando la experiencia obtenida con el Lote 3, se decidió proseguir la purificación sta fracción A directamente por cromatografía líquida de alta presión, bajo las condiciones programa 1, utilizando un gradiente de metanol de 10 a 100% + TFA 5 mM. Se hicieron cromatografías por separado, correspondiendo cada una a aproximadamente 600 t.o. Se stró a 206 nm: 1.0 AUFS.



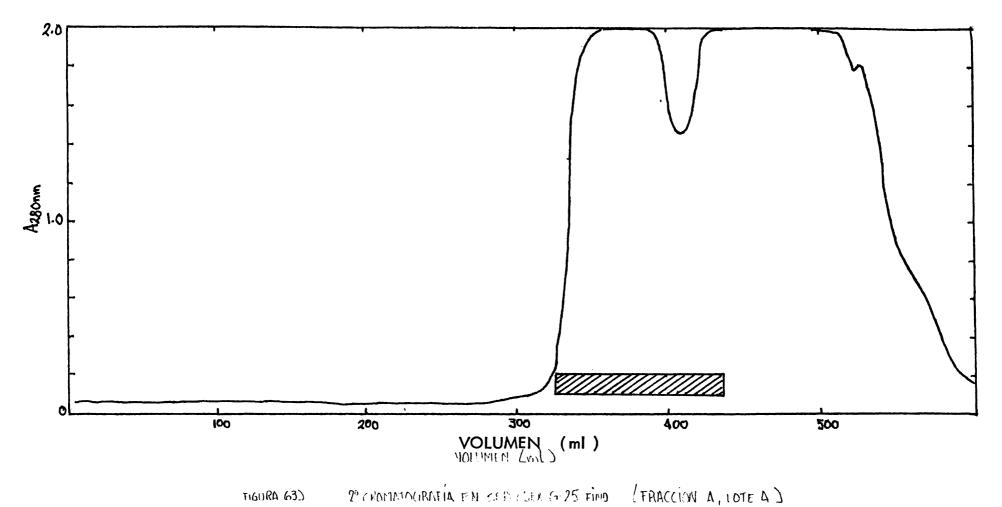


Figura 63) 2a. Cromatografía en Sephadex G-25 fino. - Fracción A, lote 4. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 11 ml/hr; volumen de cada fracción: 11 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.



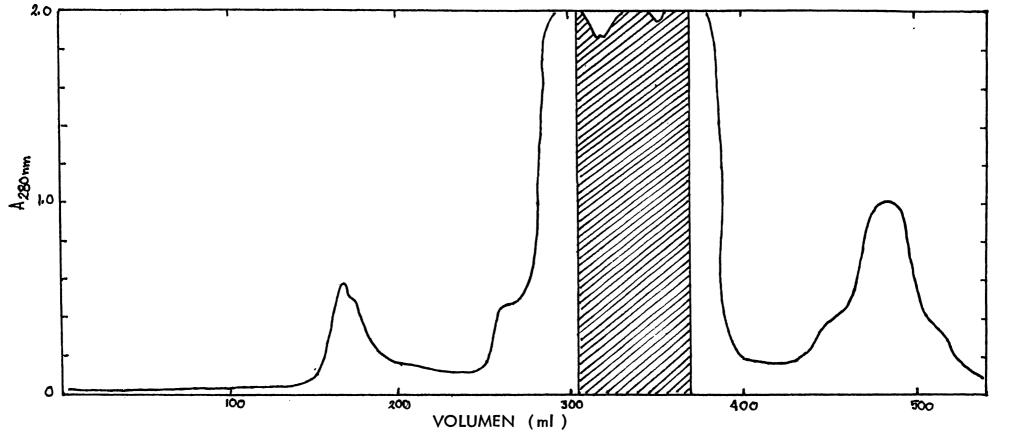


Figura 64)

1a. Cromatografía en Sephadex G-15.- Fracción A, Lote 4.

Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 11 ml/hr; volumen de cada
fracción: 5.5 ml; elución con agua. La HND se localizó en
la zona sombreada.

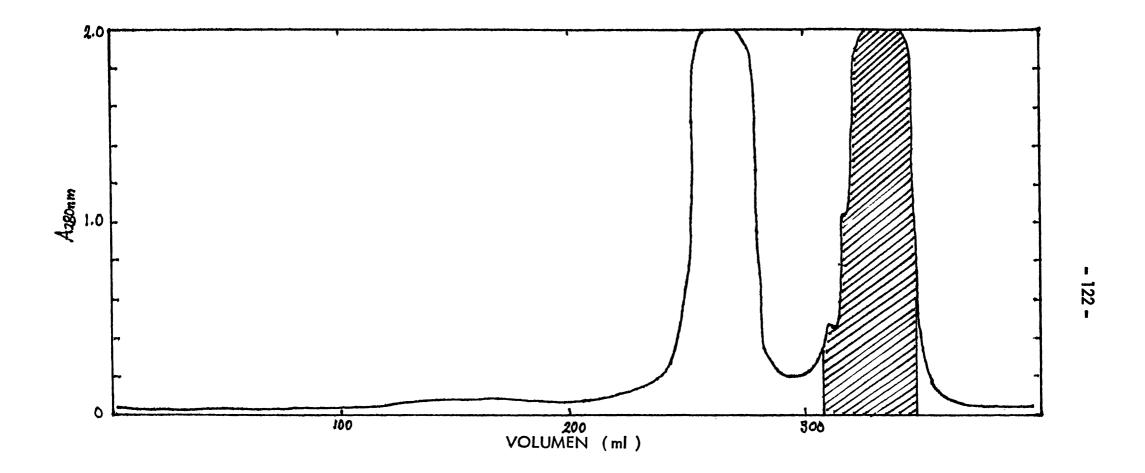


Figura 65) 2a. Cromatografía en Sephadex G-15.- Fracción A, Lote 4. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 8.5 ml/hr; volumen de cada fracción: 3.3 ml; elución con agua. La HND se localizó en la zona sombreada.

En la figura (66) se observa una gráfica representativa de las corridas VI a XV. En todos casos la actividad neurodepresora se localizó en el pico 1.1.

Se reunieron todas las fracciones activas y se concentraron hasta sequedad. Dado que esta ción también mostró una gran cantidad de sales, se decidió desalificarla, utilizando meta-absoluto, en la forma que se indicó previamente (ver MATERIALES Y METODOS, pag.17). obrenadante se concentró para eliminar al metanol y se resuspendió en agua. El bioensayo licó que se había recuperado toda la actividad.

Por lo tanto, se decidió volver a pasar esa muestra por la columna de fase reversa, utilizanzhora el programa 5 y eluyendo con agua, TFA 5 mM, pH 3.0. Se registró a 206 nm: 2.0

-S. En la figura (67) se ve una gráfica representativa de las corridas LVIII a LXXVI.

Todas estas corridas se resolvieron en cinco fracciones, las cuales fueron denominadas & 3,

6, y E. Se reunieron los tubos correspondientes a cada fracción y se concentraron. Debe acionarse que en esta ocasión todos los picos se recogieron en tubos de plástico, para evitar taminarlos con subproductos de la solución usada para siliconizar.

El bioensayo indicó que la HND se encontraba en forma mayoritaria en la fracción corresponte al pico β , y un poco en el pico γ .

Por primera ocasión, la HND pareció retenerse un poco en la columna de fase reversa.

Se tomó el pico δ y se volvió a cromatografiar en la misma columna y bajo las mismas conones. La única variación fue que se aumentó el nivel de sensibilidad del registro a 0.1 AUFS. erfil obtenido en las corridas LXXXVII a XCI se ve en forma representativa en la figura (68). El bioensayo mostró que la actividad se localizaba en los picos 2, 3 y 4; estos datos coincicon el resultado de las cromatografías anteriores y confirman que la HND desalificada el uye a el minuto 9 – 10 después de la inyección de la muestra.

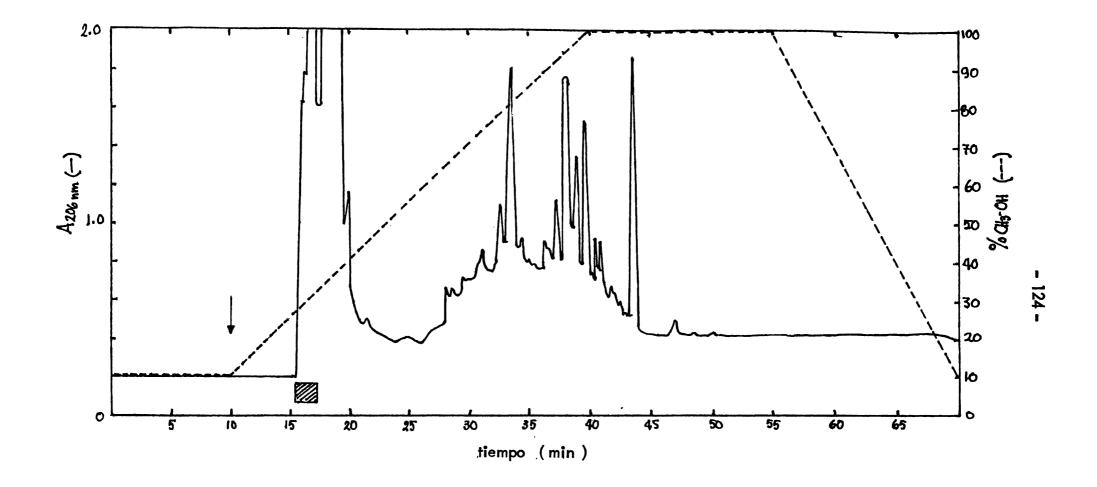


Figura 66) Corridas VI - XV en HPLC, Fracción A, Lote 4. Preparativas.

Programa 1. Gradiente de metanol 10 - 100% + TFA 5 mM.

La HND se localizó en el lugar sombreado.

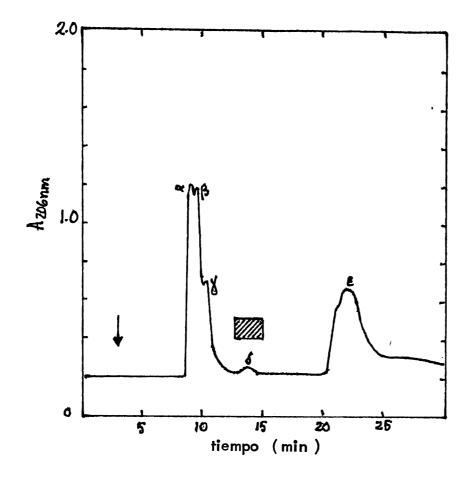


Figura 67) Corridas LVIII – LXXVI en HPLC. Preparativas.
Fracción A, Lote 4. Desalificada. Programa 5.
Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0. Se
colectó por picos. La HND se localizó en la zona
sombreada.

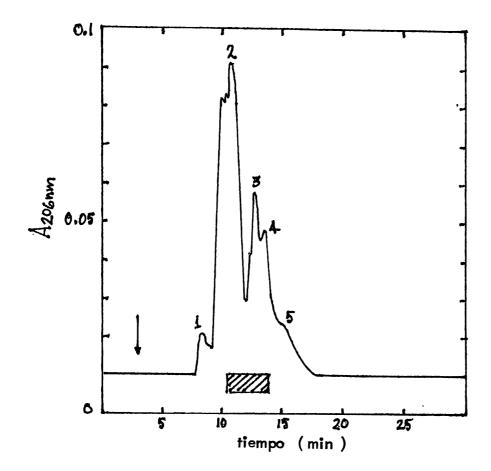


Figura 68) Corridas LXXXVII – XCI en HPLC. Preparativas.
Pico & de la fracción A, Lote 4. Programa 5.
Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0. Se colectó por picos. La HND se localizó en la zona sombreada.

Por otra parte la fracción B (6000 t.o.) del extracto crudo se empezó a purificar por el cedimiento normal. Se hizo una cromatografía en Sephadex G-25 fino bajo las condicioque se expresan. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 20 ml/hr; volumen de cada fracción: ml; se registró a 280 nm: 2.0 AUFS. Los resultados fueron los siguientes:

Extracto crudo	Volumen de elución de HND
12 ml (1500 t.o.)	366 - 434 ml
12 ml (1500 t.o.)	374 - 442 ml
12 ml (1500 t.o.)	348 - 416 ml
12 ml (1500 t.o.)	374 - 442 ml

En la figura (62) se muestra una gráfica representativa de estas corridas. Las fracciones vas se concentraron hasta 7.5 ml.

Dicho extracto se recromatografió en la misma columna bajo las condiciones que se mencio
. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 7 ml/hr; volumen de cada fracción: 7 ml; se registró a nm: 2.0 AUFS. La actividad neurodepres ora eluyó entre 343 - 441 ml. En la figura (63) bserva la gráfica. Se concentraron las fracciones activas hasta 6 ml.

Decidió hacerse un experimento en forma analítica pasando una alícuota de 500 t.o. de esxtracto por un cartucho de Sep-Pak, en la forma en que se mencionó previamente (ver MAIALES Y METODOS, pag. 23). Se buscó por bioensayo en que fracción había eluído la
D y se observó que ésta se encontraba en su totalidad en la fracción eluída con H₂O, TFA
M, pH 3.0.

Se concentró esa fracción y se corrió una alícuota correspondiente a 20 t.o. por cromatograde alta presión bajo las condiciones del programa 5, eluyendo con agua + TFA 5 mM. Al lizar el programa se eluyó con metanol absoluto y se continuó graficando para ver si se han retenido más componentes. En la figura (69) se observa la gráfica obtenida en la corrida

En función de estos resultados se decidió tratar al resto del extracto de 2a SG25f con el no procedimiento. Como la muestra estaba muy concentrada se diluyó hasta 13 ml, se filtró

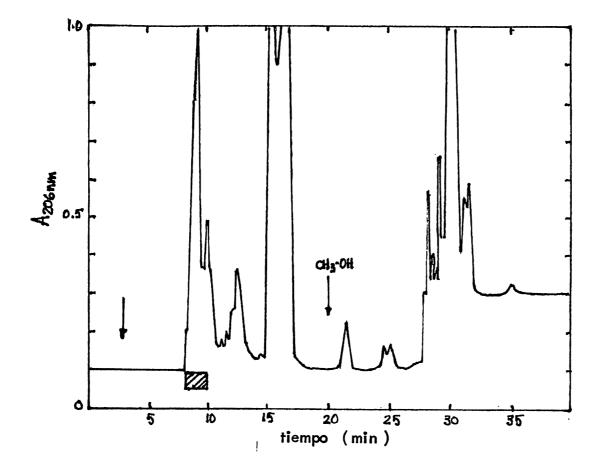


Figura 69) Corrida LVI en HPLC, analítica, 20 t.o. salidos de Sep-Pak. Fracción B, Lote 4. Programa 5. Solvente A: agua + TFA 5 mM, pH 3.0. En el lugar que señala la flecha se empezó a eluir con metanol absoluto + TFA 5 mM. La HND se localizó en la zona sombreada.

Millipore 0.45 um, y se pasó en dos partes por cartuchos de Sep-Pak en la forma indicada.

Las fracciones eluídas de Sep-Pak con agua, TFA 5mM, pH 3.0 se concentraron hasta 2 ml.

r bioensayo se supo que se había recuperado toda la actividad.

El siguiente paso fue pasar a este extracto salido de Sep-Pak por cromatografía líquida de a presión. Se utilizó la columna de fase reversa y el programa 1, con un gradiente de metanol 10 a 100% y TFA 5 mM. Se hicieron en total diez corridas (LXXVII a LXXXVI). En la fi-a (70) se observa una gráfica representativa de esta serie de experimentos. En esta ocasión colectaron las fracciones eluídas en bloques. La actividad neurodepresora se ubicó siemp re las zonas 1, correspondientes a la sección de 10 - 50% de metanol, tal como se había obserto en otras ocasiones.

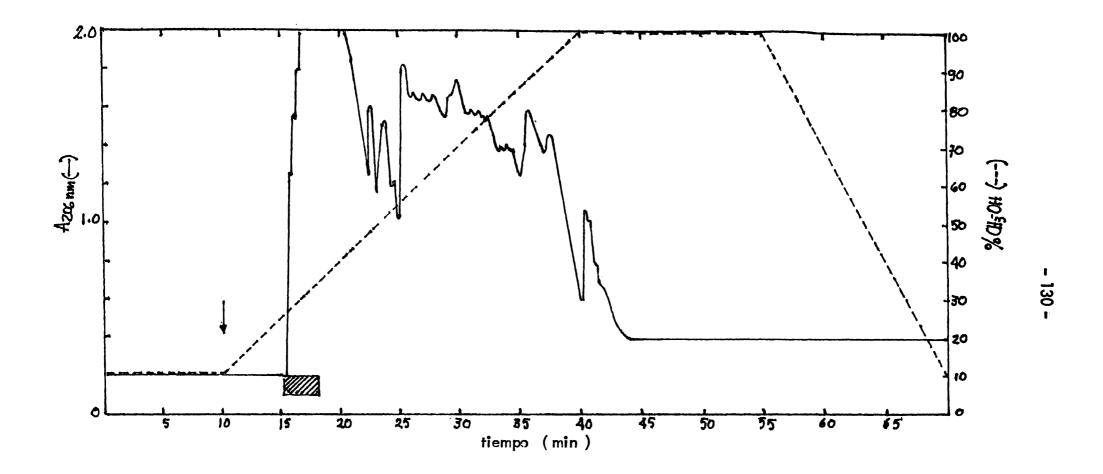


Figura 70) Corridas LXXVII - LXXXVI en HPLC, preparativas. Fracción B, Lote 4, después de Sep-Pak. Programa 1. Gradiente de metanol 10 - 100% + TFA 5 mM. La HND se localizó enla zona sombreada.

DISCUSION

Como se mencionó previamente en la INTRODUCCION (pag. 6) el objetivo fundamental trabajo que estamos realizando sobre la hormona neurodepresora de los crustáceos es el de riguar la estructura primaria de la molécula con la intención de obtener su total caracteriión desde el punto de vista bioquímico. Para conseguir dicho objetivo es necesario contar con preparación de HND que se encuentre completamente pura y homogénea, de manera que los se que se obtengan de ella sean confiables y sean atribuíbles únicamente a esta neurohormona. bién es necesario, para obtener el mismo fin, que la cantidad de material sea suficiente para er llevar a cabo con ella todas las pruebas indispensables para conseguir el objetivo propues-

En nuestro laboratorio se han intentado varios enfoques para lograr obtener una preparación de la que cumpla con todos los requisitos necesarios para el trabajo de elucidación de la estrucprimaria de la hormona. Inicialmente se desarrolló un método puramente electroforético, 21) mediante el cual se obtenía un estado razonable de pureza, pero cuya mayor desvenera que no se podían trabajar grandes cantidades de material de una sola vez. Posteriormendesarrollamos un método que involucraba la utilización de cromatografía por filtración en métodos electroforéticos (14,15,22), que mostró ser capaz de alcanzar un nivel de pusimilar al método anterior, pero con la ventaja de poder purificar mayores cantidades de rial.

Así pues, se decidió utilizar este último método como base para la consecución de una preración abundante de HND pura, y con ese objeto se inició el trabajo con el Lote 1.

El comportamiento de la actividad neurodepresora en las columnas de Sephadex G-25 fino Sephadex G-15 fue completamente reproducible con el que se había observado anteriormente 4). Como se puede observar en los datos reunidos en la Tabla I, el material salido de estas apas de purificación se encontraba 66.5 veces más puro que el extracto crudo y la actividad secífica había aumentado a 96.5 t.o./mg de proteína. Aunque en esta etapa la preparación encuentra con la existencia de una gran cantidad de contaminantes todavía, presenta la ntaja de que el material se encuentra enriquecido en hormona neurodepresora, y además se ede concentrar hasta volúmenes pequeños que se pueden trabajar más fácilmente.

Sabiendo que el extracto salido de los pasos de cromatografía en columna posee todavía a cantidad abundante de material contaminante, y que dicho material es susceptible de sepaión con métodos que aprovechan la presencia de cargas eléctricas en las moléculas, se ensaun nuevo procedimiento que hiciera uso de esas características, para ver si era posible acear el método de purificación.

Así, se probó el comportamiento del extracto semipurificado en una columna de intercambio ico, utilizando CM-celulosa. El resultado obtenido constituyó una sorpresa, puesto que el nocimiento adquirido previamente sobre las características de la hormona (su comportamiento tro en un campo eléctrico), no esperábamos que la HND se retuviera en la columna bajo las ndiciones empleadas.

Sin embargo, como se mostró en la sección de RESULTADOS (pag. 37), aproximadamente 47% de la actividad cromatografiada sí fue retenida y eluyó con una concentración de aceo de amonio entre 370 -435 mM, mientras que el restante 53% fue excluído de la columna o se retuvo. Ambas fracciones mantuvieron su actividad biológica en el bioensayo. Este eximento mostró una dualidad en el comportamiento de la hormona ante las condiciones usadas

a cromatografía de intercambio iónico. Dicho comportamiento es similar al que han presentoros neuropéptidos tratados en condiciones similares, como es el caso de oxitocina, cuante cromatografía en Amberlita, en 0.1% de acetato de amonio, pH 5.0, y en donde únicate se retiene el 50% de la actividad aplicada (35). Asimismo, se ha reportado que la horaque promueve la oviposición (ELH) en Aplysia californica también presenta un comportanto parecido cuando se le cromatografía en Sephadex SP C25 (un intercambiador catiónico), londe el 45% de la hormona marcada se retiene y eluye con el pico que mantiene la activibiológica, mientras que el resto de la marca radiactiva se excluye de la columna (36). posible explicación podría ser que la hormona presenta una gran afinidad por moléculas presente es en el extracto, que poseen características diferentes a la hormona libre, y que una fracteluyera junto con ese otro tipo de moléculas.

Se decidió analizar la fracción que se retuvo en CM-celulosa por métodos electroforéticos. o se mostró en la figura (8) el resultado fue que se obtuvo una sola mancha cloro (+) y idrina (-) en el origen, tanto a pH 1.8 como a pH 10.0. Dichas características se habían blecido previamente para la HND (14). Estos resultados implicaron que se habían elimina-a mayor parte de los contaminantes del extracto salido de Sephadex G-15, por un solo paso ional, el de intercambio iónico.

Sin embargo, cuando se utilizó otro criterio de pureza, como es el de la combinación de troforesis y cromatografía en capa delgada, se observó que el resultado no era tan claro, y más, bajo la cromatografía ascendente en capa delgada se observaron todavía algunos connantes (pag. 40).

Por tal motivo, fue necesario someter al extracto de CM-celulosa a una serie de electroforereparativas sucesivas con el fin de eliminar dichos contaminantes. Después de haber realizastos pasos, se volvió a aplicar la electroforesis y cromatografía en capa delgada como critede pureza. y finalmente se observó una sola mancha con las características conocidas para HND: cloro (+), que se mantiene en el origen en la electroforesis y que migra con un Rf=0.52 la cromatografía.

Durante estos experimentos se observó que había un contaminante que se comportaba en forma a con respecto a la tinción con cloro, ya que aparecía como positivo hasta aproximadamente hora después de haber teñido. Por otra serie de estudios, posteriormente se supo de donde cedía dicho contaminante; éste sale de los extractos del papel de las hojas Whatman 3MM lizadas durante las electroforesis, y se va concentrando a medida que se involucran más pasos ctroforéticos. Luego se encontró la forma de eliminarlo adecuadamente, mediante un lavado naustivo con agua, durante cinco días, en forma descendente (34,37).

El resto del extracto de Sephadex G-15 del Lote 1 se dividió en dos fracciones: A y B. La cción A se recromatografió en Sephadex G-15, este segundo paso permitió eliminar una gran itidad de material contaminante, como lo indica la figura (18). Posteriormente, se decidió uir con el método previamente establecido y mediante el procesamiento electroforético a 4 diferentes se logró obtener una preparación razonablemente pura, de acuerdo al criterio enido de la electroforesis y cromatografía en capa delgada.

Se unieron las dos fracciones que habían sido obtenidas con un grado similar de pureza y stituyeron una fracción de 3000 t.o.

Es de hacer notar que independientemente del camino que se escoja en el proseguimiento de nurificación a partir de la la. cromatografía en Sephadex G-15 (el de intercambio iónico en -celulosa, o el de recromatografía en Sephadex G-15), de todas maneras es indispensable fizar los procedimientos electroforéticos para poder tener una preparación relativamente homo-ea.

Como se mostró en la figura (21), al cromatografiar nuevamente al material purificado en nadex G-15 se obtuvo un pico con el cual coincidía la actividad biológica; sin embargo dipico no fue absolutamente simétrico. Además en un experimento realizado en paralelo, de

preparación de HND de <u>Procambarus bouvieri</u>, que había pasado por las mismas etapas de purizión, se observó que registrando a 206 nm aparecía un "hombro" sobre el pico principal de vidad.

day que hacer notar que este comportamiento no se había observado anteriormente ya que a se había detectado este paso a 206 nm, sino que se había hecho a 254 nm, que es una zon donde la HND no absorbe. La posibilidad de utilizar la detección a 206 nm directamente eluyente de la columna nos hizo pensar que era probable que la preparación no fuera commente homogénea. Sin embargo, todos los métodos de purificación usados no eran capaces esolver en forma determinante y radical ese problema.

Jna tercera pare del material purificado se utilizó para determinar la composición de aminox del péptido, como se mostró en los RESULTADOS (pag. 56). Cuando se analizaron 100 t.o.

a muestra, se vió que aparecían entre 12 - 14 aminoácidos, la mayor parte de ellos se habían
minado por el método de dansilación en otra preparación (14,15,21,22). El análisis de
t.o. mostró que podían existir entre 10 - 15 residuos. Dichos resultados no son excluyentes.

correlacionar dichos datos con las características conocidas de la hormona es necesario haalgunos comentarios: Asp y Glu deben encontrarse como Asn y Gln en la molécula original,
que aparecen como ácidos debido a la hidrólisis ácida usada por este método; las probables

Arg que aparecieron no deben ser partes integrales del péptido ya que son aminoácidos que
unferirían diferente conducta electroforética a la hormona, es probable que su aparición en
ninograma sea debida a contaminación. La existencia de la His tal vez podría explicar el
ortamiento de la hormona en CM-celulosa, ya que al pH utilizado el grupo -NH del imidae encontraría protonado, y dicha carga podría interaccionar con las cargas negativas de la
nna. El resto de los aminoácidos encontrados son congruentes con las características de la
ona, y con análisis realizados con anterioridad.

ambién debe mencionarse que en un control para este experimento se analizó una muestra a concentrado de 100 ml del eluyente de la columna de Sephadex 6-15, llevado hasta 100 ul,

-onde se encontraron varios aminoácidos en proporción elevada, principalmente Ser, Glu y, por lo que el valor obtenido para estos aminoácidos en el péptido no es definitivo.

En base a estos análisis y a los datos de peso molecular realizados previamente (14), se uló la cantidad de proteína existente en la fracción purificada, y se encontró que era de 77 ug. Cuando se extrapolaron estos datos a la totalidad del Lote 1, se obtuvieron los resul-s que se muestran en la Tabla I, en donde se había alcanzado un nivel altísimo de purifión (47,530 veces con respecto al extracto crudo) y en donde la actividad específica tamhabía aumentado mucho (68,966 t.o./mg de proteína).

Los datos del análisis de aminoácidos, sin embargo, deberán repetirse con una muestra en prestado de pureza, para confirmar o corregir los encontrados con esta muestra.

También se realizó un experimento de determinación de la composición de aminoácidos en tro laboratorio, mediante la técnica de dansilación. El método se probó con un péptido codo como es el péptido S de la ribonucleasa. En este sentido es importante señalar que la ica se optimizó hasta el grado de poder determinar el DNS-péptido, el grupo -NH2 termiya la composición de aminoácidos completa, con una sola muestra. Aunque es posible detertodos estos resultados con solo un nanomol de péptido inicial, se propone que el óptimo bitiene con dos nanomoles de material, con el fin de que las manchas correspondientes a los i-aminoácidos sobresalgan perfectamente sobre el medio y sean claramente visibles bajo la ultravioleta,

Cuando se aplicó esta técnica a una alícuota de la hormona purificada se obtuvieron los ltados indicados en la pag. 62. En la primera dansilación se observó una mancha con fluo-encia amarilla que daba la impresión de ser un DNS-péptido (de acuerdo a los resultados de lansilaciones de péptido S de la ribonucleasa, penta-alanina y Leu-Gly-Gly). En caso de o, dicho péptido correspondería a un contaminante de la preparación de hormona, ya que mos que ésta tiene su grupo amino terminal bloqueado (14,15,21,22) y que no podría

-acionar con el cloruro de dansilo. También se observaron manchas correspondientes a DNS-His NS-Asn, sin embargo eran tan tenues que el resultado no es confiable. Asimismo, se observó DNS-Lys en forma muy clara.

Cuando se hidrolizó el material dansilado se observó que desapareció la mancha amarilla, or otra parte, la fluorescencia en la posición de la di-DNS-Lys aumentó con respecto al erimento anterior. Este dato podría sugerir que el responsable de la mancha amarilla es un tido con Lys en su grupo amino terminal.

El análisis de composición por este método no mostró ninguna mancha detectable bajo la luz avioleta. Este dato podría sugerir que se estaba trabajando con cantidades por abajo del mo y que la sensibilidad del método no fue suficiente para detectar resultados.

La tinción con el reactivo de Pauly de una alícuota aplicada en punto concentrado sobre un el filtro fue positiva. Este dato correlaciona con el hallazgo de His en el aminograma. Cuando se recromatografió la muestra purificada en Sephadex G-15, utilizando un flujo o y una columna LKB que permite un mejor sistema de inyección, se observó que la HND eparó de dos contaminantes con absorbencia a 206 nm y a 280 nm. En la segunda de estas natografías se observó que el pico activo biológicamente sólo presentaba absorbencia a nm, pero no a 280 nm. Estos datos correlacionan con el conocimiento que se tenía de la nona en este sentido (14).

Esta muestra se analizó por cromatografía líquida de alta presión, bajo las condiciones del prama 1, obteniéndose los resultados ilustrados en la figura (28). La actividad biológica cayó el primer bloque, correspondiente a la zona de 10 – 50% de metanol. Sin embargo, la actida recuperada fue muy baja con respecto a lo que se había inyectado. También se observó resencia de algunos picos con absorción a 212 nm, lo cual implicaba que la muestra, después ste largo proceso de purificación, aún no se encontraba completamente pura.

En cuanto a la fracción B de 1750 t.o. del Lote 1 salida de Sephadex G-15, que no sufrió -erior purificación, se analizó también por cromatografía líquida de alta presión, bajo las -nas condiciones. La figura (29) hace evidente la cantidad de material contaminante que -de ser separado por este procedimiento, y que había sido eliminado por el proceso utilizado a otra fracción (compáresnse las figuras (28) y (29)). En este último caso, sin embargo, e pudo determinar actividad biológica en ninguna de las fracciones obtenidas, así como poco en los controles positivos de la muestra sin cromatografíar, enviados a bioensayo, lo cual rió que la actividad neurodepresora había sido degradada de alguna forma y que se había lido por completo en esa fracción.

Es importante, en este punto, hacer un paréntesis (que será útil para discutir también otros altados en los lotes posteriores) para mencionar que en la época en que se hicieron estos mos experimentos y algunos correspondientes a los Lotes 2 y 3, se empezó a cambiar la nica de bioensayo para detectar la actividad biológica. Inicialmente se había estado trabado con la preparación que utilizaba a un ganglio de la cadena abdominal, sin embargo, go se montó una preparación en donde se aísla a una motoneurona, del sistema tensoreceptor, hacen los registros directamente de ella. Con esta nueva preparación se postuló que se merifan los niveles de sensibilidad del bioensayo, lo cual posteriormente ha mostrado ser cierto. embargo, durante la etapa de cambio y optimización de la técnica, se obtuvieron una serie esultados erráticos, que en proncipio condujeron a conclusiones falsas en nuestro trabajo de ficación, y que incluso nos llevaron a perder material valioso por haber trabajado con resulza falsos. Cuando nos percatamos de las incongruencias existentes en los registros fisiológicos, muestras que se comportaban muy reproduciblemente en la cromatografía de alta presión, demos hacer una serie de pruebas para confirmar que el nuevo bioensayo estaba reportando dafalsos. Esto se hizo preparando un extracto crudo fresco y mandando como control en diferen-

-orridas, diversas diluciones de dicho material. En efecto se comprobó que los datos no eran listentes.

rinalmente, los datos empezaron a ser congruentes y a reproducirse correctamente, lo cual permitió proseguir nuestro trabajo con un mayor grado de confianza.

Desgraciadamente, en el tiempo que duró la optimización de la técnica en el sistema del preceptor, y antes de que nos percatáramos de los problemas por los que pasaba, se tomaron mas decisiones equivocadas con respecto a qué material se seguía purificando, en algunos s, y en otros a descartar muestras que aparentemente habían perdido su actividad biológica. Es por ello que durante la presentación de los resultados algunos de ellos parecen contradictos. Sin embargo, se pudo volver a tener confiabilidad en el bioensayo y los últimos datos del 3, así como los del Lote 4, han sido sumamente reproducibles.

Por lo que respecta al Lote 2, éste se inició a partir de una preparación que originalmente abía extraído con el objeto de purificar hormona neuroexcitadora. Dado que la hormona neupresora se separa de la neuroexcitadora en el paso de purificación de cromatografía en Sepha-G-15, entonces es posible proseguir la purificación de ambas hormonas por separado a partir mismo material inicial. El proceso de purificación de ambas hormonas en las etapas iniciales emejante, la única diferencia importante es la adición de tiodiglicol al 0.1%, que funciona o antioxidante, en el caso de la purificación de hormona neuroexcitadora, dado que dicha nona es lábil a la oxidación.

Por este motivo, se sometió al extracto a una nueva cromatografía en Sephadex G-15, con ntención de separar a la hormona del tiodiglico l. Sin embargo, por el resultado obtenido a electroforesis a pH 10.0 realizada posteriormente, se observó que aún quedaban remanendel tiodiglicol (lo cual se reconoce por su comportamiento ante la tinción con cloro), que ban interaccionando con la hormona. Así pues, se decidió eliminar el tiodiglicol de la pre-

-ición sometiendo a ésta a una cromatografía ascendente en papel, la cual por estudios antees (34) había mostrado ser muy efectiva para conseguir dicho propósito. Con el objeto de
in en donde se encontraría la hormona bajo esas condiciones, se utilizó como patrón una alíta de HND de Procambarus bouvieri, purificada en nuestro laboratorio, y que sabemos que
comporta igual que la hormona de Penaeus vannamei, por los estudios realizados previamencon ambas hormonas.

Una vez que se eliminó el tiodiglicol se decidió proseguir la purificación de la hormona por -odos electroforéticos, hasta llegar a un estado razonable de pureza.

En estas circunstancias, y sabiendo que todos los métodos empleados anteriormente, con ésta on otras preparaciones, no eran capaces de proporcionar una muestra completamente pura y nogénea, se decidió hacer el intento de finalizar la purificación mediante la técnica de cro-ografía líquida de alta presión, la cual es una herramienta que proporciona grandes posibilies para este tipo de trabajo.

Los primeros pasos en este sentido implicaron la búsqueda de condiciones que permitieran la aración de la hormona, así como su identificación en el nuevo sistema, de manera que una encontradas, se pudieran emplear en forma preparativa, con el objeto de purificar todo el erial que se tenía. Así, se iniciaron una serie de experimentos a nivel analítico, en donde la fracción separada se analizaba posteriormente por bioensayo para localizar la actividad lógica.

Las primeras condiciones ensayadas fueron las del programa A, en donde se utilizaba un diente de acetonitrilo. Bajo estas condiciones la actividad se encontró repartida en los dos neros picos, como lo indica la figura (33). Los mismos resultados se encontraron con las diciones del programa B (véase la figura 34) en donde también se utilizaba un gradiente de tonitrilo. Sin embargo, en esa serie de experimentos no se pudo atribuir con certeza a cual los dos picos se debía la actividad biológica.

Por ello se siguieron probando otras condiciones, como fueron las del programa C, en donde utilizó una mezcla isocrática de metanol al 50 % en agua, con ácido trifluoroacético (TFA) M. En estas condiciones se observó una mejoría en la resolución de los picos, sin embargo poco fue posible asignar con certeza a cual se debía la actividad de HND, ya que en varios erimentos se obtuvieron diferentes resultados, como lo indica la figura (35).

En función de estos resultados, y dado que los reportes de los bioensayos se tornaban confupues en ocasiones se detectaba actividad en varios picos en una sola corrida, se pensó que vez se esclarecería el problema si se cromatografiaban cantidades mayores de material, de nera que se pudiera obtener un resultado más concluyente.

Así, se utilizó el programa D, que implicaba un gradiente de metanol y la adición de TFA M, que se había visto que parecía mejorar la resolución, empleando mayor cantidad de mues-y se obtuvieron los resultados de la figura (36).

En esta ocasión el bioensayo indicó que la actividad se retenía en la columna, y que eluía na concentración de 45% de metanol. Este resultado se repitió en otras ocasiones, aunque todas maneras en algunas fracciones se reportaba un poco de actividad, pero no tan impore e como la de dicho pico.

En estas circunstancias concluímos que estas condiciones eran favorables, y por ello se deciseguir trabajando con metanol, TFA 5 mM. Se decidió hacer el sistema en forma preparativa ara ello se modificó el programa D de manera que quedaran las condiciones expresas en el grama 1.

En estas nuevas condiciones se empezó a purificar el material del Lote 2, observándose un il muy reproducible en todas las corridas, que implicaba que la muestra se podía separar en os componentes, y que era posible por este método, conseguir que la HND se encontrara

En dos ocasiones se hizo el bioensayo de las fracciones eluídas, y la actividad apareció en lico que eluye entre 75 – 80 % de metanol. En vista de la reproducibilidad del sistema, no inviaron más muestras a bioensayo y se siguió colectando esa fracción, que siempre apareció es cromatogramas, hasta terminar de cromatografiar todo el lote.

Cuando se reunieron y concentraron dichas fracciones, se les hizo una determinación de actiid fisiológica por bioensayo, y se reportó qu en dicha muestra no había actividad neurodepre. Se repitió varias veces el bioensayo con el mismo resultado. Estos experimentos fueron hei en la época en que se cambió la técnica de bioensayo, y es muy probable que los resultadas se nidos se hayan visto afectados por los problemas que se mencionaron anteriormente (pag. 138).

Todos estos resultados, aunque no fueron concluyentes, nos dieron la posibilidad de conocer omportamiento de los extractos de hormona, bajo las condiciones empleadas, de manera que omaron, posteriormente, como base para la purificación de otros lotes de hormona.

Con respecto al Lote 3, éste consistió de 9000 t.o. que se purificaron inicialmente en forma lar a los lotes anteriores. Después de la etapa de cromatografía en Sephadex G-15, el lote ividió en tres fracciones: 1, 11, y 111, con el fin de ensayar nuevas posibilidades en el proceiento de purificación.

La fracción I inicialmente se sometió al proceso electroforético ya conocido. El extracto obdo se aplicó a una cromatografía en Bio-Gel P-2 con la intención de fraccionar en lo posible no extracto, ya que este gel tiene una mayor resolución para moléculas pequeñas que el Sedex G-15. El flujo utilizado fue muy bajo, con el objeto de permitir que cualquier separación ble se mantuviera a lo largo de la corrida. Como se observa en la figura (39), en efecto btuvo separación de la HND de otros contaminantes presentes en el extracto.

Al recromatografiar a este material en la misma columna, se observó un pico muy simétrico coincidía con la actividad biológica, dando la impresión de tener la preparación en condines muy homogéneas.

El siguiente paso fue realizar cromatografías de alta presión con esta solución tan purificada, uiendo las condiciones del programa 1, que se habían encontrado en los experimentos con el e 2.

En esta ocasión aún estábamos atribuyendo la actividad biológica al pico que eluye entre - 80% de metanol, bajo las condiciones indicadas. Sin embargo, al cromatografiar una alísta de esta nueva fracción purificada, lo primero que se observó es que dicho pico no apareen el cromatograma. Por lo tanto se decidió ver si había actividad biológica en el extracto
cromatografiado, y el resultado fue positivo.

De hecho, este fue el experimento que nos hizo dudar de los resultados del nuevo bioensayo.

lo tanto se decidió que el resto de las cromatografías de esta fracción se recolectarían por ques, de manera que no perdiéramos nada de material y con el fin de ubicar en forma rápida zona del cromatograma en donde se hallara la hormona, y observar si se confirmaban o no los ultados obtenidos anteriormente. Los primeros experimentos realizados así indicaron que la ividad aparecía en el bloque 3 (figura 41), es decir en la zona de lavado con metanol absolu-Sin embargo, en todos los casos la actividad que se reportó siempre fue muy baja, y aún los atroles no salían en la forma debida. Nuevamente, esta serie de corridas se vió afectada por resultados erráticos del bioensayo durante aquella etapa.

La fracción II de este mismo lote se trabajó en forma diferente a la anterior. Primeramente sometió el material a una cromatografía en Bio-Gel P-2, y también en este caso se separó a hormona de la mayor parte de contaminantes que estaban con ella. Luego se hizo el tratanto elelctroforético a los cuatro diferentes pHs y finalmente el extracto salido de ahí se rematografió en Bio-Gel P-2.

Si se compara la eficacia de los tratamientos efectuados hasta esta etapa en estas fracciones, puede concluir que la fracción I quedó en un mayor estado de pureza que la fracción II. Esta aclusión se ve apoyada también por los cromatogramas obtenidos en las cromatografías de alta sión realizadas con la fracción II, en donde se ve que el número de contaminantes fue mayor. cuanto a la posición de la actividad biológica en este material, con las condiciones del proma 1, los resultados fueron completamente confusos, ya que se encontró actividad, como lo ica la figura (45), en tres de los cuatro bloques recogidos.

Una vez más, estos experimentos fueron hechos durante la época de cambio del bioensayo.

Durante esta serie de experimentos fue cuando se confirmó que el bioensayo no funcionaba rectamente, y por lo tanto se decidió checarlo en forma exhaustiva, con el objeto de no seperdiendo material y de poder llegar a conclusiones definitivas.

En estas circunsatancias se decidió probar si la cromatografía líquida de alta presión funcioà en forma confiable y reproducible con extractos en un estado de menor pureza que los que
abían empleado hasta la fecha. Dado que este sistema permite la resolución de las muestras
iempos cortos, se podría intentar purificar a los extractos en forma más rápida, evitando con
largos procesos de purificación en donde la actividad biológica podría sufrir más percances.

De esta forma se trabajó a la fracción III del Lote 3 bajo las condiciones del programa 1. Los
tados, que se ilustran en la figura (46) mostraron con claridad que la actividad neurodepreeluía en el bloque 1, correspondiente a la zona de 10 - 50% del gradiente de metanol. Por
erimera se encontró que la mayor parte de los resultados eran reproducibles.

r lo tanto se decidió volver a someter a esa fracción bajo las mismas condiciones, pero con la intención de colectar cada pico que apareciera en el cromatograma, para ver si se associar la actividad a un pico en especial. En efecto, como se muestra en la figura (48), vidad neurodepresora apareció en todos los casos en el primer pico que eluía en el croman, mostrando siempre una actividad muy clara. Además en esta serie de corridas no se obtividad en ninguna otra fracción.

otra parte, este primer pico mostró la presencia de una gran cantidad de sales, como se

zionó en la página 96, por flamometría. La mayor cantidad de ellas fueron sales de sodio, que también se detectó potasio en forma importante. Sin embargo, los cálculos realizados en a los datos obtenidos mostraron que la concentración final de estos iones en la solución amordora en que se diluyen las alícuotas enviadas a bioensayo, se mantenía muy cercana a la rinal, y que, por controles realizados, no afectaban el desarrollo del bioensayo.

Los experimentos realizados a nivel analítico en HPLC después del paso de purificación anormostraron que se tenía a un pico con actividad biológica, contaminado con una fracción or que eluía muy cercana a él.

Por lo tanto, se probaron otras condiciones, las del programa 4, en donde se mantiene un la
con H₂O, TFA 5 mM, pH 3.0, únicamente durante 15 minutos y luego se empieza el gra
ite de metanol, en forma muy lenta hasta alcanzar un 15% y luego se sube hasta 50%. Como

ibserva en la figura (50) ambos picos eluyeron totalmente en la zona de lavado con agua,

ual habla de su gran hidrofilicidad y de que no son retenidos en la columna prácticamente

Con estos resultados se concluyó que las condiciones del programa 1, en donde se emplea un tiente de metanol de 10 - 100% funcionan muy bien para eliminar a la mayoría de los contamites que se encuentran presentes en el extracto salido de Sephadex, pero que son insuficientes retener a la hormona o separarla completamente del contaminante remanente.

Por lo tanto, se decidió probar las condiciones del programa 5, empleando como eluyente camente agua, sin adicionar TFA. Este cambio elevaría el pH de 3.0 a 5.0 y con ello se predió determinar si bajo las nuevas condiciones de pH se podrían favorecer un poco las interactes con la columna y ver si alguno de los dos picos se podrían retener un poco más, de maneque existiera mejor separación. El resultado, que se muestra en la figura (51), indicó que resolución no mejoraba, y aún más que ambos picos eluían juntos, perdiendo la poca separan que se había obtenido en condiciones ácidas.

riorada por todo el uso que se le había dado, y que tal vez una columna nueva podría profionar una mejor resolución. Así pues se volvió a utilizar agua + TFA 5 m/m pH 3.0 como ente bajo las condiciones del programa 5, y como se mostró en la figura (52) la resolución ejoró.

l'ambién se intentó separar más a estas dos fracciones utilizando una mayor longitud de fase

sa, para lo cual se unieron dos columna de Ultrasphere-ODS, dando unas dimensiones crográficas de 4.6 x 500 mm. En este caso se observó ligeramente una mayor separación, pero inguna manera algo definitivo. Sin embargo, estos experimentos bajo las condiciones del pro-a 7, mostraron que ambos picos parecían estar formados por varios componentes, ya que mos-n asímetrías e incluso la presencia de "hombros". En vista de estos resultados se decidió co-ar por separado cada una de las fracciones visibles en cuatro porciones. Por bioensayo se minó que la totalidad de la actividad biológica se encontraba en el pico 1.

Se probaron también las condiciones del programa 5, pero eluyendo con una mezcla isocráde acetonitrilo al 5% en acetato de amonio 10 mM, pH 7.5, para ver el comportamiento de alícuota del pico 1. El resultado (figura 54) mostró un solo pico y en él la actividad bioló-. Por este análisis la HND parecía encontrarse finalmente pura. Sin embargo, cuando se matografió dicha fracción nuevamente en condiciones ácidas, se observó que el material sadoblaba otra vez en dos fracciones, lo que indicaba que el resultado obtenido a pH 7.5

Otra vez, se decidió cromatografiar al pico 1 bajo las condiciones del programa 5, con
+ TFA 5 mM y colectar los picos individualmente de manera que pudieran separarse. Al file estas corridas se obtuvieron las fracciones A y B por separado. Supuestamente el pico A,
contenía la actividad biológica, debería encontrarse prácticamente libre del contaminante B.

Cuando se hicieron las cromatografías analíticas de 20 y 50 t.o. se observó, con gran sorsa, que el contaminante B seguía apareciendo. También se observó que su tamaño no variaen comparación con el pico A que sí lo hacía en función de la cantidad analizada. Esto
hizo pensar que tal vez el contaminante B era un contaminante ajeno a la preparación y que
iblemente se estaba introduciendo en alguna parte del procedimiento. Se hicieron los controadecuados y se observó que en efecto la solución utilizada para siliconizar los tubos en los
eles se recogían las muestras mostraban contaminantes que coincidían, uno, con una distorsión
ervada en el pico A, y otro, en la posición del contaminante B.

En dunción de estos resultados se pensó que el contaminante observado era un producto de dedación del material utilizado para siliconizar. Por lo tanto, se decidió volver a separar ambas os bajo las mismas condiciones, pero ahora colectando en tubos de polipropileno que no neceun ser siliconizados. Eso podría solucionar el problema.

Sin embargo, después de haber realizado la separación, al observar a nivel analítico el estade pureza de la preparación, nuevamente se encontró al contaminante B.

Este resultado nos hace pensar en la posibilidad de que la hormona se esté degradando de una forma, y que se separe una fracción inactiva de la fracción que mantiene la actividad.

I forma de comprobar esa hipótesis sería realizando un análisis de composición de aminoácidos pico B y ver, primero si se encuentran aminoácidos, y segundo, en caso positivo ver si la aposición es similar a la del pico A o diferente.

En caso de que no hubiera aminoácidos en esa fracción, entonces no molestaría para el trao de secuenciación y se podría concluir, después de realizar varios criterios de pureza, que
preparación ya está lista para proseguir los estudios de estructura. Eso mismo se concluiría
a composición de aminoácidos fuera similar para el pico A y B.

Sin embargo, si la composición fuera diferente en ambos picos, entonces se debería cambiar

rectica y proseguir la purificación empleando otro tipo de columnas en la cromatografía de presión, dado que las posibilidades de la fase reversa han sido prácticamente agotadas con preparación.

El próximo tipo de columnas que se utilizarán son las que presentan grupos polares unidos a atriz de sílice, como son el -CN y el -NH₂, de manera que se puedan usar en cromatograde fase normal. Es muy probable que la hormona sí sea retenida en esas columnas dado que
e un alto grado de hidrofilicidad. En caso de encontrar un resultado positivo en dichas coas, ese sería el siguiente y, probablemente, último paso de purificación de la hormona neuapresora.

En cuanto al Lote 4, se empezó a preparar utilizando en principio el método tradicional. Se dió separarlo en dos fracciones en la etapa de extracto crudo: A y B, correspondientes a 1 t.o. cada una.

Aprovechando el conocimiento y la experiencia adquiridos con las preparaciones anteriores se ntó alcanzar un grado de purificación de la HND en el menor tiempo posible.

La fracción A se sometió a los pasos de cromatografía en Sephadex G-25 fino y Sephadex 5. Una vez eliminados una gran masa de contaminantes por estos medios se decidió proseguir urificación directamente en cromatografía de alta presión, con las condiciones del programa il igual que sucedió con la fracción III del Lote 3, la actividad neurodepresora eluyó en el er pico, y éste se pudo separar de la mayoría de los contaminantes que se retienen en la coma y que únicamente se desprenden al ir aumentando la concentración de metanol en el grate.

De esta forma, contábamos ya con una preparación sumamente enriquecida con HND, pero londe todavía existían contaminantes. Al igual que se observó con la fracción III del Lote 3, fracción también contenía una gran cantidad de sales. Por lo tanto se decidió desalificarla,

-avechando para ello el conocimiento de que la HND es sumamente soluble en metanol. Como ndicó, el bioensayo reveló que en efecto se había recuperado toda la actividad biológica -aués de haber extraído exhaustivamente con metanol. Este paso funcionó perfectamente y se ieron eliminar las sales que contaminaban a la preparación.

El siguiente paso consistió en fraccionar a este extracto nuevamente en la columna de fase ersa, bajo las condiciones del programa 5. Como se ilustró en la figura (67), la muestra se aró en cinco fracciones que fueron colectadas por separado. La actividad en este caso se pretó en la fracción δ en forma mayoritaria, y un poco en la fracción δ . Por primera vez entramos una mayor retención de la hormona en la columna de octadecilsilano, de manera que à hasta el minuto 9 – 10 bajo las condiciones empleadas. Como se puede observar en la mistigura, la fracción δ constituye una zona con muy baja absorción. Debe tomarse en cuenta en estos experimentos el rango de absorbencia utilizado fue de 2.0 AUFS.

También debemos indicar que en todos los experimentos realizados en esta etapa se utilizaron tubos Eppendorf de polipropileno para recoger las fracciones, con la idea de eliminar por com-o la posibilidad de introducir contaminantes provenientes del silicón.

Se voltrió a cromatografiar el pico de bajo las mismas condiciones, variando únicamente el el de sensibilidad, esta vez a 0.1 AUFS y se obtuvo el panorama mostrado en la figura (68).

ioensayo reveló que la actividad se repartía en los picos 2, 3 y 4, que están muy sobrepuescorrespondiendo su elución nuevamente a unos 9 – 10 minutos desde el momento de la inyec
1. Estos datos confirmaron los resultados obtenidos en el experimento anterior y mostraron que

IND puede ser ligeramente retenida en la columna de fase reversa, aunque de todas maneras sus erísticas hidrofíficas hacen que eluya de la columna únicamente con agua + TFA 5 mM.

Es importante en este punto señalar la diferencia de conducta de la hormona en este sistema ndo la única variable es el contenido de sales en la solución. Cuando existen sales en la so
ón de HND, ésta eluye alrededor de los 6 minutos después de la inyección, prácticamente en

volumen de exclusión. Sin embargo, cuando se la ha desalificado, la hormona se retiene par—
Ilmente y eluye hasta el minuto 9 – 10. Estos datos podrían sugerir una gran interacción entre
Ihormona y las sales, en donde probablemente se está formando una capa de solvatación que

Ja que la hormona se excluya de la columna y por eso aparezca siempre al principio de los
-matogramas.

Ahora bien, en ausencia de sales la hormona es retenida un poco más, de todas maneras la e reversa no es capaz de separarla en un solo pico, puesto que la actividad se vió repartida el cromatograma. Estos datos sugieren que no es posible seguir utilizando a la fase reversa no medio para conseguir una purificación ulterior de esta fracción, y que será necesario pronuevas condiciones, con otras columnas, para conseguir el objetivo deseado.

De cualquier forma, las variaciones realizadas en el procesamiento de la fracción A del e 4 han conseguido llegar mucho más rápidamente a una situación en donde el final se apremucho más cercano, en condiciones en las cuales la hormona no tiene que ser sometida a itos métodos diferentes de purificación, lo cual representa una ventaja en tiempo, por una re, y por la otra, en que se evita un mayor maltrato a la preparación.

Por su parte, la fracción B del Lote 4 se empezó a purificar por el procedimiento de Sephadex 25 fino. El extracto salido de esta etapa fue sometido a un nuevo experimento. Con el cononiento adquirido del comportamiento de la hormona neurodepresora en la fase reversa, se deió intentar un paso preparativo que diera una gran separación. Aprovechando el caracter
roffilico de la hormona y el caracter hidrofóbico de la mayor parte de los contaminantes, se
:idió hacer una separación gruesa de ambos. Para ello se utilizaron los cartuchos de Sep-Pak,
: contienen el material de octadecilsilano y se equilibraron en agua + TFA 5 mM. En efecto,
comprobó que la actividad neurodepresora eluía en el lavado con agua + TFA 5 mM, mientras
: la mayor parte de los contaminantes únicamente se desprendían en presencia de metanol.

esta forma, muy rápida (puesto que el procedimiento no toma más de 15 minutos), se pudoener una fracción sumamente rica en HND.

Dicha fracción se sometió entonces a la cromatografía de alta presión, bajo las condiciones programa 1. Como se ve en la figura (69), la cantidad de contaminantes hidrofóbicos disnuyó en ese extracto. Nuevamente la actividad eluyó en el pico que aparece al principio cromatograma, reproduciendo los resultados que se habían obtenido anteriormente.

El siguiente paso lógico a desarrollar con esta fracción será el de cromatografiar una pequeparte de esta preparación y observar que el resultado esperado en efecto aparezca, es decir
e la actividad se localice en el primer pico. Mientras que el resto de la preparación se someá a tratamiento con metanol, para desalificarla, y al cromatografiarla nuevamente, ver si
ite la observación de que se retiene más en la columna. Si dicho fenómeno vuelve a observaren esta forma, entonces quedará muy claro el efecto que las sales están ejerciendo sobre el
nportamiento de la hormona en la columna de fase reversa.

Este informe ha constituïdo un resumen de los intentos realizados para purificar a la hormona prodepresora de los crustáceos. Aunque en estos momentos no contamos todavía con una prepatión completamente pura para iniciar los trabajos de elucidación de la estructura primaria, sí demos decir que el final se siente ya muy cercano.

Todo el trabajo realizado nos ha dado la posibilidad de conocer en gran medida muchas de características de la hormona, y su comportamiento en diferentes sistemas de purificación. función del conocimiento adquirido, lentamente, sobre ella, es posible ahora para nosotros poner caminos de purificación más sencillos y que en menos tiempo nos lleven a la consecun del objetivo largamente deseado.

Por supuesto, dichos esquemas no podrían haberse sugerido a priori. Ha sido necesario ensayar

oles procedimientos y tomar diferentes alternativas, para que a posteriori estemos en la són de hacer dichas proposiciones.

-abemos ahora de la existencia de sales en los extractos purificados y de la influencia que

en ejercer sobre el comportamiento de la hormona en las columnas de fase reversa, por lo

sería deseable eliminarlas en los primeros pasos del procedimiento de purificación. Esto

a lograrse extrayendo directamente con metanol, durante la obtención del extracto total.

∃ siguiente paso sería la separación de las moléculas de mayor peso molecular de las peque
realizada por el método de diálisis, como se ha hecho hasta la fecha, o por precipitación

¶CA al 15%, que se ha visto no destruye la actividad hormonal y proporciona un extracto

ar al obtenido en la diálisis (datos no publicados).

in función del volumen del extracto crudo obtenido, éste podría, ó no, semipurificarse en promatografía en Sephadex G-15, con la intención de descartar una gran cantidad de ma-l contaminante.

a utilización de los cartuchos de Sep-Pak sería el siguiente paso lógico en este esquema, de era que se eliminarian en forma mayoritaria a los contaminantes hidrofóbicos del extracto. El extracto obtenido, a su vez, estaría listo para trabajarlo directamente en la cromatografiquida de alta presión con una columna de fase reversa, bajo las condiciones del programa 1, el fin de acabar de eliminar a los contaminantes hidrofóbicos.

El probable paso final en la purificación no lo podemos aún hacer tan categórico. Es necesaprobar las posibilidades de las columnas de alta presión que contienen grupos polares, como
CN y el -NH₂, adosados a la matriz, para ver si en condiciones de cromatografía en fase
nal, la hormona puede ser retenida en la columna y separarla en forma definitiva del contaante que ha mostrado ser más persistente.

El esquema propuesto presenta las ventajas de que se podrían manejar grandes cantidades de

Iterial inicial; consta de relativamente pocos pasos de purificación, lo que redundaría en una Iyor eficiencia en la recuperación de la actividad total, ya que esta se maltrataría menos; y almente, lo que es más importante, se tendría una preparación homogénea y completamente ra de hormona neurodepresora.

El paso más inmediato a seguir, sin embargo, es el de acabar de purificar la fracción III del e 3, y las fracciones A y B del Lote 4, que en conjunto suman alrededor de 15000 t.o., mente la cromatografía líquida de alta presión en las columnas de fase normal y demostrar en ma inequivoca que dichas fracciones se encuentren puras.

Con ese material creemos estar en condiciones de obtener la estructura primaria de la hormona urodepresora de Penaeus vannamei (Boone).

BIBLIOGRAFIA

- Kalmus, H. Das aktogram des flusskrebses und seine beeinflussung durch organ .extrackte; Z. Vergl. Physiol. 25: 798 802 (1938).
- Schallek, W. Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish;

 J. exp. Zool. 91: 155 -156 (1942).
- Roberts, T.W. Evidences that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish <u>Cambarus virilis</u>, Hagen; Anat. Rec. (Suppl.) <u>81</u>: 46 47 (1941).
- Edwards, G.A. The influence of eyestalk removal on the metabolism of the fiddler crab; Physiologia comp. Oecol. 2: 34 50 (1950).
- Valente, D. and Edwards, G.A. The regulation of the activity rhythm of the crab

 Trichodactylus petropolitanus; Fac. Filos Cien. Let., Univ. Sao Paulo

 207: 5 12 (1955).
- Naylor, E. and Williams, B.G. Effects of eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in <u>Carcinus</u>; J. exp. Biol. <u>49</u>: 107 116 (1968).
- Aréchiga, H. and Wiersma, C.A.G. Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units; J. Neurobiol. 1: 71 85 (1969).
- Aréchiga, H., Huberman, A. and Naylor, E. Hormonal modulation of circadian neural activity in <u>Carcinus maenas</u> (L.); Proc. R. Soc. Lond. B <u>187</u>: 299 313 (1974).

- Aréchiga, H., Fuentes, B. and Barrera, B. Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. In: J. Sálanki (Ed), Neurobiology of Invertebrates, Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, pp 403 421 (1973).
- Aréchiga, H., Huberman, A. and Martínez-Palomo, A. Release of a neurodepressing hormone from the crustacean sinus gland; Brain Res. 128: 93 108 (1977).
- Aréchiga, H. y Anaya, V. Ritmo circádico en la secreción de la hormona neurodepresora del acocil <u>Procambarus bouvieri</u>; XIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Durango, pp 46 (1976).
- Aréchiga, H., Cabrera-Peralta, C. and Huberman, A. Functional characterization of the neurodepressing hormone in the crayfish; J. Neurobiol. 10: 409 422 (1979).
- Jaros, P.P. Tracing of neurosecretory neurons in crayfish optic ganglia by cobalt iontophoresis; Cell Tiss. Res. 194: 297 302 (1978).
- Arámburo de la Hoz, C. Aislamiento, purificación y caracterización de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del camarón Penaeus vannamei (Boone);

 Tesis Profesional, Facultad de Química, UNAM (1978).
- Huberman, A., Arámburo, C. and Aréchiga, H. Isolation, purification and partial characterization of a neurodepressing hormone from the eyestalks of <u>Penaeus vannamei</u> (Boone); In: Gross, E. and Meienhofer, J. (Eds.) Peptides: Structure and biological functions, Proc. 6th. Am. Pept. Symp., Pierce Chemical Co., Rockford, III. pp 853 855 (1979).
- Huberman, A., Aréchiga, H., Arámburo, C. and González, I. Physiological and electrophoretic identity of neurodeppresing hormone in decapod crustaceans; (en preparación).

-) Arêchiga, H., Williams, J.A., Pullin, R.S.V. and Naylor, E. Cross-sensitivity to neurodepressing hormone and its effect on locomotor rhythmicity in two different groups of crustaceans; Gen. Comp. Endocrinol. 37: 350 357 (1979).
-) Huberman, A., Aréchiga, H. and Arámburo, C. Search for the neurodepressing hormone in a stomatopod, Squilla mantis; Experientia 37: 51 52 (1981).
-) Huberman, A., Arámburo, C. and Aréchiga, H. (en preparación).
-) Cimet Ralsky, A. Aislamiento y purificación de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del acocil <u>Procambarus bouvieri</u> (Ortmann); Tesis Profesional, Facultad de Química, UNAM (1977).
-) De la Rosa Vélez, J. Caracterización de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del acocil <u>Procambarus bouvieri</u> (Ortmann); Tesis Profesional, Facultad de Química, UNAM (1977).
- Huberman, A., Aréchiga, H., Cimet, A., De la Rosa, J. and Arámburo, C. Isolation and purification of a neurodepressing hormone from the eyestalk of <u>Procambarus</u> bouvieri (Ortmann); Eur. J. Biochem. 99: 203-208 (1979).
-) Van Harreveld, A. A physiological solution for freshwater crustaceans; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y. 34: 428 432 (1936).
- University Press, London, pp 526 527 (1969).
- · Ibid., pp 530.
- · Ibid., pp 528.
- Rydon, H.N. and Smith, P.W.G. A new method for the detection of peptides and similar compounds on paper chromatograms; Nature 169: 922 923 (1952).
- und 0-tolidin; J. Chromat. 3: 499 500 (1960).

- Wine, J.J., Mittenthal, J.E. and Kennedy, D. The structure of tonic flexor motoneurons in crayfish abdominal ganglia; J. Comp. Physiol. 93: 315 336 (1974).
- Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response; Anal. Biochem. 48: 422 427 (1972).
- Schwartz, D.P. Glass wool as a potential source of artifacts in chromatography;

 J. Chromatogr. 152: 514 516 (1978).
- Gray, W.R. and Hartley, B.S. A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides;
 Biochem. J. 89: 59 (1963).
- Osborne, N. Microchemical analysis of nervous tissue, 1st. Edition, Pergamon Press, Oxford, pp 58 121 (1974).
- Campos González, R. Estudio de la interacción de la hormona neurodepresora de <u>Penaeus</u>

 <u>vannamei</u> (Boone) con el inhibidor Kunitz de la tripsina obtenido del frijol soya;

 Tesis Profesional, Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Guadalajara,

 (1979).
- Franco y Bourland, R. (comunicación personal).
- Chiu, A.Y., Hunkapiller, M.W., Heller, E., Stuart, D.K., Hood, L.E. and Strumwasser,

 F. Purification and primary structure of the neuropeptide egg-laying hormone

 of Aplysia californica; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6656 -6660 (1979).
- Wynn, V. A peptide-like contaminant of filter paper, Nature 164: 445 (1949).
- Alexandrowicz, J.S. Muscle receptor organs in the abdomen of Homarus vulgaris and Panulirus vulgaris; Quart. Journ. Micr. Sci. Third Series, 92: 163 202 (1951).