

00581

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

facultad de química

CORRELACION ENTRE ACTIVIDAD NEURODEPRESORA Y
DIFERENTES ENTIDADES QUIMICAS PRESENTES EN EL
TALLO OCULAR DE Penaeus vannamei (Boone).

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas
(Bioquímica), presenta

M. en C. Carlos Arámburo de la Hoz.

1 9 8 3

00581
1983

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	página
INTRODUCCION -----	1
+ Generalidades sobre la comunicación interneuronal -----	1
+ Relación entre el Factor Inhibidor y el GABA -----	5
+ Hormona Neurodepresora -----	18
MATERIAL Y METODOS -----	24
+ Limpieza del material de vidrio -----	24
+ Animales -----	24
+ Reactivos -----	24
+ Tinciones -----	24
+ Soluciones amortiguadoras -----	25
+ Bioensayo -----	25
+ Extracción y aislamiento de la acti- vidad neurodepresora -----	26
+ Concentración -----	27
+ Diálisis -----	28
+ Ultrafiltración -----	28
+ Determinación de Na ⁺ y K ⁺ -----	28
+ Desalificación de los extractos -----	28
+ Cromatografía de filtración molecular en gel -----	28
+ Electroforesis en papel -----	28
+ Extracción a partir del papel -----	29
+ Electroforesis analítica en capa delgada -----	29
+ Fraccionamiento de las muestras en Sep-Pak -----	30
+ Cromatografía líquida de alta presión -----	30
+ Digestiones enzimáticas -----	30

	página
+ Determinación de actividad de la tripsina -----	31
+ Determinación de actividad de proteinasa K y pronasa B -----	31
+ Determinación cualitativa de la actividad de las proteasas -----	31
+ Dansilación -----	31
+ Determinación del grupo $-NH_2$ terminal -----	32
+ Determinación cualitativa de la composición de aminoácidos -----	32
+ Determinación enzimática de GABA -----	33
+ Determinación de Taurina -----	33
 RESULTADOS -----	 34
+ Lote P-19 -----	34
+ Lote P-20 -----	59
+ Lote P-21 -----	68
+ Lote P-22 -----	70
+ Lote P-23 -----	105
+ Lote P-24 -----	110
 DISCUSION -----	 113
 CONCLUSIONES -----	 135
 ANEXO I -----	 141
 BIBLIOGRAFIA -----	 145

I N T R O D U C C I O N

GENERALIDADES SOBRE LA COMUNICACION INTERNEURONAL./

La característica de las células excitables (nerviosas y musculares) es precisamente su excitabilidad, es decir su habilidad para generar respuestas activas, con despolarización de la membrana, a ciertos cambios en su ambiente inmediato. Cualquier agente que cambie la excitabilidad de una célula aumenta (excitación) o disminuye (inhibición) la probabilidad de que suceda una respuesta activa de la membrana con despolarización y propagación. En el caso de las células nerviosas tal respuesta se denomina impulso nervioso.

La transmisión sináptica del tipo químico es un medio para influenciar la excitabilidad de las células postsinápticas en un sentido inhibitorio o excitatorio. Sin embargo, las sustancias transmisoras no son los únicos agentes que pueden afectar la excitabilidad de las células, así como la membrana subsináptica es sólo una pequeña parte de la compleja maquinaria celular.

Si se compara el significado de la transmisión sináptica química en relación con la transmisión sináptica eléctrica se vería que ésta última representa la transmisión sináptica genuina, esto es, la transmisión de un impulso eléctrico de una célula nerviosa a otra. Es una característica de la transmisión sináptica eléctrica que un potencial de acción presináptico dispare un potencial de acción postsináptico, que se propaga a través de toda la membrana postsináptica. La transmisión sináptica química, por otra parte, genera potenciales postsinápticos locales, que influyen sobre la excitabilidad de la célula postsináptica. En la mayoría de los casos un impulso presináptico es insuficiente para elevar la excitabilidad a un nivel en donde se suceda una respuesta propagante.

La mayoría de las células musculares y las células nerviosas a lo largo del reino animal responden a los impulsos nerviosos presinápticos con potenciales postsinápticos graduales. Estas respuestas sinápticas están sujetas a una sumatoria extensiva, a la facilitación y a la defacilitación; en otras palabras, las células son capaces de integrar las entradas sinápticas temporales y espaciales.

Es muy importante reconocer que el resultado de la integración, y de cualquier acción transináptica, depende siempre de dos factores: a) el agente actuante (la sustancia transmisora), y b) el sistema de respuesta. La sustancia transmisora puede influenciar la excitabilidad, pero la intensidad de esta influencia depende mucho del estado de excitabilidad que prevalecía justo antes de la llegada de la sustancia transmisora. Si la membrana celular está colocada cerca del umbral de disparo, una o unas cuantas liberaciones de transmisor pueden generar el disparo de la célula postsináptica. Pero el mismo patrón de liberación será inefectivo para provocar el disparo si el nivel de excitabilidad de la célula postsináptica es menor.

La excitabilidad está determinada por numerosos factores, tales como la estructura de la membrana celular (composición proteínica y lipídica), el pH intracelular y extracelular, la tensión de CO₂ y de O₂, la temperatura, el campo eléctrico, la energía disponible para el transporte activo a través de la membrana, las concentraciones de iones internas y externas, y la permeabilidad relativa de la membrana a los iones. La excitabilidad, entonces, puede ser controlada por cualquier agente que influya sobre cualquiera de éstos u otros factores relevantes.

Se usa el término "sustancia moduladora" para cualquier compuesto de origen celular y no sináptico que afecta la excitabilidad de las células nerviosas, y representa un eslabón normal en los mecanismos reguladores que gobiernan la actuación del sistema nervioso (1). Tales sustancias moduladoras pueden afectar las respuestas de las células nerviosas a las acciones transinápticas de las neuronas presinápticas, y pueden alterar la tendencia a la actividad espontánea.

Es importante reconocer que cambios pequeños en la excitabilidad pueden tener efectos profundos sobre la actividad del sistema nervioso central debido al carácter de todo o nada de la generación del impulso nervioso. Una cierta descarga presináptica podría no provocar, normalmente, la generación de impulsos nerviosos postsinápticos, aún cuando incrementaría la excitabilidad postsináptica suficientemente como para que permitiera que otros impulsos que llegaran de otros canales presinápticos dispararan una respuesta. Cualquier factor que eleve la excitabilidad postsináptica puede incrementar la responsividad postsináptica en forma suficiente para hacer que las células respondan a la descarga presináptica que previamente se encontraba por abajo del umbral. Si consideramos a la conducta animal, tal modulación de la excitabilidad postsináptica sería decisiva, porque esto significaría que un agente modulador puede generar ciertos tipos de conducta. No resulta difícil visualizar numerosas situaciones en donde la modulación de la excitabilidad desempeñaría un papel importante (1).

Una sustancia moduladora que provocara un cambio en cualquiera de los siguientes parámetros afectaría profundamente la excitabilidad: 1) cantidad de transmisor liberado presinápticamente; 2) curso temporal de la liberación del transmisor; 3) cantidad de transmisor disponible para reaccionar con el receptor subsináptico; 4) cantidad de receptor subsináptico disponible para la acción del transmisor; 5) curso temporal del cambio de permeabilidad causado por la acción del transmisor (curso temporal del potencial postsináptico); 6)

grado del cambio de permeabilidad causado por el transmisor liberado (proporción del cambio de conductancia a los iones); 7) conductancia de la membrana en reposo de la célula postsináptica; 8) umbral de disparo de la célula postsináptica; 9) potencial de membrana postsináptico (consecuencia de las conductancias relativas a los iones); 10) resistencia intracelular (afecta la constante espacial); 11) grado y constante temporal de acomodamiento.

Las condiciones y procesos que pueden causar cambios en los parámetros que afectan a la excitabilidad, entre otros, son los siguientes: 1) transporte de neurotransmisores, precursores y enzimas asociadas, a lo largo del axón hacia la terminal sináptica; 2) metabolismo celular, en particular la activación enzimática, y la movilización o activación del sustrato; 3) pH celular; 4) tensión intracelular y extracelular de CO_2 y O_2 ; 5) volumen y composición del espacio extracelular; 6) estructura de la membrana y sus características de permeabilidad.

Las sustancias moduladoras pueden tener su origen en una variedad de fuentes. Estas pueden ser: 1) las células nerviosas; 2) las células gliales; 3) las glándulas y células glandulares; 4) las células neurosecretoras; 5) las células endodermales.

Las sustancias moduladoras bien pueden ejercer sus efectos realizando cambios de permeabilidad semejantes a los que efectúan las sustancias transmisoras regulares. Una diferencia importante es que la acción del transmisor está restringida en espacio a la membrana subsináptica, y en tiempo a la duración de la liberación del transmisor. Por otra parte, se puede esperar que los moduladores se encuentren presentes por mayores períodos de tiempo y que afecten a otras regiones fuera de las áreas sinápticas específicas (1).

Desde hace varios años se sabe que la comunicación interneuronal puede ser positiva (excitación de la neurona postsináptica) o negativa (inhibición de la neurona postsináptica), lo cual ha originado la idea de que la actividad del sistema nervioso se regula no sólo por una excitación activa de las neuronas, sino también, y quizá más efectivamente (2,3,4), mediante la inhibición de las neuronas.

Desde un punto de vista bioquímico, la comunicación excitadora o inhibidora significa la liberación de un transmisor químico excitador o inhibidor, respectivamente, y su interacción con un receptor específico situado en la membrana postsináptica. De acuerdo a este concepto, cuando una neurona excitadora se despolariza, se libera un transmisor excitador específico de sus terminales axónicas y, mediante su interacción con el receptor en la neurona postsináptica, el transmisor producirá una despolarización (potencial excitador postsináptico) que, si alcanza el umbral de disparo de esa célula, generará un potencial propagado. La repolarización de la neurona postsináptica, al suspender el estímulo, cesará la liberación del transmisor y, puesto que existe un mecanismo para la eliminación de éste (degradación enzimática, recaptura o difusión), la neurona postsináptica nuevamente se repolarizará. En el caso de la neurona inhibidora parece ocurrir la misma secuencia de eventos presinápticos: cuando se despolariza libera al transmisor inhibidor, el cual interacciona con el receptor específico de la neurona postsináptica. Sin embargo,

en contraposición con el transmisor excitador, el transmisor inhibitor hiperpolarizará a la membrana postsináptica (potencial inhibitor postsináptico), aumentando por lo tanto el grado de despolarización necesario para alcanzar un valor suficiente que genere la producción de un potencial propagado en la neurona postsináptica. Cuando la neurona inhibitora presináptica se repolariza, cesa la liberación del transmisor inhibitor y la neurona postsináptica retornará a su estado normal de polarización después de la eliminación del transmisor inhibitor remanente (5).

Así pues, la diferencia entre comunicación excitadora e inhibitora depende de la naturaleza del transmisor y del receptor, así como de la distribución iónica y el cambio de permeabilidad que ocurre en la membrana de la célula receptora. Para una combinación dada de transmisor y receptor, es decir, una sinapsis determinada, el transmisor originará una excitación cuando los cambios iónicos producidos resulten en una disminución del potencial de membrana (despolarización), y una inhibición cuando dichos cambios iónicos resulten en un aumento en el potencial (hiperpolarización). Es evidente que la interacción transmisor-receptor constituye el mecanismo desencadenador de los cambios en la excitabilidad de la neurona postsináptica, y que tal interacción requiere de una afinidad entre el transmisor y el receptor.

Tomando en cuenta la existencia de los dos tipos de transmisión sináptica, excitadora e inhibitora, es posible tratar de visualizar al menos dos sistemas de regulación de los circuitos en la comunicación neuronal. Se puede postular a una neurona "maestra" o de mando, que puede ser de naturaleza excitadora (sistemas aceleradores) o inhibitora (sistemas frenadores), cuya actividad es hasta cierto punto espontánea, es decir, tiene un ritmo endógeno de actividad. Las neuronas excitadoras no pueden ser postuladas como controladoras o "maestras", a no ser que se acepte que un control se puede ejercer por falta de actividad. En cambio, parece posible que ciertas neuronas inhibitoras "maestras" puedan regular la actividad de los circuitos neuronales, manteniéndolos constantemente inhibidos en mayor o menor grado.

De acuerdo con esta hipótesis de control por inhibición, la neurona "maestra" mantiene constantemente inhibida a las neuronas finales, y éstas disparan cuando dicha neurona "maestra" es inhibida por un sistema excitador. Es decir, la neurona final es excitada por desinhibición. Por otra parte, la inhibición continua ejercida por la neurona "maestra" sobre la neurona efectora puede aumentar cuando un sistema excitador la estimula, lo cual permite compensar o equilibrar al circuito inhibitor, creando un balance entre la excitación y la inhibición. Sin embargo, el punto central del control en el esquema es que en ausencia de actividad de los sistemas inhibidores y excitadores, la neurona efectora no dispara, debido a la inhibición tónica que la neurona "maestra" ejerce sobre ella (6).

A partir del descubrimiento, en diferentes sistemas, de la existencia de vías y sinapsis inhibitoras (7,8,9) se iniciaron una serie de estudios conducentes a la identificación de las sustancias responsables de dicha inhibición, a las que se les pudiera adjudicar todas las características de un transmisor.

RELACION ENTRE EL FACTOR INHIBIDOR Y EL GABA.-

Desde hace varias décadas se han realizado estudios para tratar de identificar a las entidades químicas involucradas con los procesos de inhibición en la comunicación interneuronal, y como resultado se han propuesto diferentes mecanismos en relación a este problema.

En vista de la importancia que tuvieron en la elucidación de las vías y mecanismos inhibidores, a continuación se hace una reseña de los estudios que llevaron a la postulación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) como una de las sustancias responsables de la comunicación inhibitoria en el sistema nervioso de los animales.

Por otra parte, esta revisión es importante en cuanto que, como se verá más adelante, será necesaria para interpretar y discutir muchos de los resultados que se reportan en esta tesis.

Inicialmente, se encontró que los extractos de cerebro y médula espinal de mamíferos contenían una sustancia, a la cual se denominó Factor Inhibidor (Factor I), que en bajas concentraciones ejercía un efecto inhibitorio periférico en crustáceos (10). El Factor I pudo ser encontrado con la ayuda de una preparación sensorial aislada, el tensorreceptor abdominal de los crustáceos, la cual había sido recientemente descrita, tanto anatómica (11) como fisiológicamente (12).

Se observó que el Factor I se encontraba en la médula espinal y en la corteza cerebral de los mamíferos, pero no se pudo localizar en las raíces espinales. Se describió que el Factor I se destruía enzimáticamente por incubación con homogenados de sistema nervioso central, y que la acción óptima de la enzima se encontraba entre pH 7-8.

También se estudió el efecto del Factor I sobre otras preparaciones biológicas. Así, se observó que su acción sobre el corazón del acocil era semejante al efecto de la estimulación del nervio inhibidor del corazón. El Factor I inhibía la actividad espontánea del intestino del acocil, y bloqueaba ahí la acción estimulante de la acetilcolina. Este factor inhibidor también bloqueaba la transmisión neuromuscular en la tenaza del acocil. Su acción inhibitoria y bloqueadora de la acetilcolina también pudo demostrarse utilizando el ileon de cobayo y el de conejo como preparaciones de estudio. La acción del Factor I pudo disociarse de las acciones del potasio, acetilcolina, colina, sustancia P, adrenalina, noradrenalina, serotonina e histamina, las cuales también podrían estar presentes en un dializado crudo de cerebro. Por sus características, se postuló que el Factor I podría representar a un transmisor inhibidor en el cerebro (10).

Posteriormente se pudo establecer que bajas concentraciones del Factor I podían bloquear la transmisión en el ganglio mesentérico inferior y en el ganglio estrellado de gatos y conejos. Sin embargo no se obtuvo ningún efecto en el ganglio cervical superior, y la transmisión neuromuscular en gatos tampoco resultó afectada. Por otra parte, se pudo demostrar que el factor inhibidor se

producía en el cerebro, y no se encontró actividad inhibitora en extractos de hígado, bazo, músculo cardíaco, ganglios simpáticos o nervio ciático (13).

La aplicación tópica del Factor I a la médula espinal expuesta de los gatos mostró que el reflejo patelar monosináptico podía ser completamente abolido en los primeros 5 seg después de la aplicación, mientras que el reflejo flexor polisináptico se aumentaba. Se observó que la inhibición producida sobre el reflejo monosináptico podía bloquearse mediante la administración intravenosa de dosis subconvulsivas de estricnina. Asimismo, se observó que la administración de Factor I en ratones era capaz de protegerlos contra una dosis letal de estricnina. En el mismo estudio, también se pudo constatar que el Factor I no actuaba cuando se administraba por inyección arterial hacia la médula espinal, lo que probablemente indicaba que dicho factor es incapaz de penetrar la barrera hemato-encefálica, ya que también se demostró que no era destruido en la sangre (14).

Como se mencionó anteriormente, la determinación de Factor I de los extractos se hizo mediante el uso del tensorreceptor abdominal de los crustáceos (Cambarus virilis, Cambarus clarkii, Astacus fluviatilis, Pacifastacus sp.), y por ello fue necesario definir una unidad para medir las concentraciones relativas de la sustancia. Una "concentración bloqueadora mínima" de Factor I se definió como la concentración más baja que bloqueaba la actividad de la neurona durante 10 seg. Tal solución podía ser claramente diferenciada de una que contuviera sólo 10% menos del factor inhibitor. La "unidad crustáceo" o u.c. se definió como la cantidad presente en 1 ml de una solución que contuviera una concentración bloqueadora mínima (15).

También se observó que el Factor I se encontraba presente en el cerebro en una forma "oculta" que no es activa para inhibir las descargas espontáneas del órgano tensorreceptor del acocil. Sin embargo, podía liberarse en forma activa mediante tratamiento de los extractos con calor, con ácidos o bases débiles, o en condiciones hipotónicas. Asimismo, se observó que las suspensiones cerebrales aumentaban su contenido de Factor I con el tiempo. En el mismo estudio se determinó que las descargas espontáneas de la neurona tensorreceptora podían ser bloqueadas por hidrolizados de caseína purificada, así como por indicadores como el azul de bromotimol, el timol y el alcanfor, y también por barbitúricos como el pentobarbital, el fenobarbital y el pentotal. Estas sustancias no mostraron ser tan activas como las preparaciones de Factor I obtenidas de cerebro.

La picrotoxina (PTX), en concentraciones bajas, no afectó visiblemente a la actividad espontánea del tensorreceptor, pero en cambio impidió el efecto inhibitor del Factor I. El metrazol mostró un efecto semejante al de la picrotoxina, pero en concentraciones mayores. En cambio la estricnina no mostró ningún efecto. La picrotoxina y el metrazol son agentes convulsivos en el acocil, mientras que la estricnina no lo es. También el etanol, el éter etílico y el salicilato, a concentraciones que no mostraron efectos sobre la actividad espontánea, impidieron la actividad del Factor I sobre el tensorreceptor (15).

Los intentos de purificación del Factor I mostraron que éste era termoes- table, dializable, estable al tratamiento con ácidos y bases, que no se preci- pitaba con acetato de plomo o con ácido perclórico, soluble en agua y en me- tanol, moderadamente soluble en etanol, e insoluble en otros solventes orgáni- cos (10,13,14). Posteriormente se pudo purificar una sustancia a partir del ex- tracto de Factor I proveniente de cerebro bovino. Los polvos de acetona del cerebro se extrajeron con etanol al 70%. El extracto evaporado se precipitó con acetona, se lavó con éter de petróleo y se reextrajo con etanol al 95%. Aprove- chando que el material activo se retenía en resinas de intercambio iónico fuer- tes, tanto ácidas como básicas (Amberlita IR-120, Amberlita IR-410, Dowex-50), pero no en resinas de intercambiadores catiónicos o aniónicos débiles (Amber- lita IRC-50, Amberlita IR-45), se obtuvo una fracción purificada que cristali- zó por evaporación de la solución acuosa.

Por cristalización fraccionada se obtuvieron tres sustancias cristalinas. La fracción que mostró mayor actividad de Factor I (2 ug/ml eran suficientes para bloquear la actividad espontánea del tensorreceptor) se identificó por análisis al infrarrojo, punto de fusión y cromatografía en papel como el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Se encontró que una muestra auténtica de GABA mostraba el mismo efecto inhibitor que el Factor I sobre la preparación del tensorreceptor (16,17).

Otra de las fracciones de esta preparación, insoluble en el etanol al 95%, y que también mostró actividad inhibitora, era bastante soluble en agua y no se intercambiaba en las resinas fuertes. La naturaleza química de esta frac- ción no fue determinada.

En el mismo estudio se encontró que la β -alanina (β -Ala), entre varias sustancias probadas, también mostró actividad de Factor I, aunque con una potencia veinte veces menor que éste.

La existencia del ácido gamma-aminobutírico en el cerebro se había des- crito ya previamente (18,19,20), y se había mostrado que se producía a partir del glutamato por acción de una descarboxilasa (GAD) que utilizaba al fosfa- to de piridoxal como coenzima (21,22,23).

Al igual que el Factor I, se demostró que el GABA era efectivo para prevenir ciertos tipos de convulsiones en los ratones. Asimismo, la inyección de GABA, como de Factor I, en el acocil entero, provocaban que el animal cayera en una parálisis flácida (16).

La actividad de Factor I en cerebro bovino se reportó como equivalente a 150 ug de GABA por gramo de cerebro. Elliot y Florey (15) encontraron al- rededor de 100 u.c. por gramo de hemisferio cerebral fresco, lo cual corres- pondía a cerca de 200 ug/g. Roberts y cols. encontraron casi 400 ug de GABA por gramo de cerebro de ratón adulto (24), y Tallan y cols. reportaron 240 ug/g de cerebro en el gato (25). Por lo tanto parecía haber suficiente GABA en el cerebro como para justificar toda la actividad de Factor I encontrada.

Parecía probable el postular al GABA como un agente relacionado en algunos aspectos de la actividad fisiológica del cerebro y otras estructuras nerviosas, posiblemente como una sustancia transmisora de impulsos inhibitorias, que se liberaba de una forma "oculta" cuando ciertas neuronas inhibitorias disparaban. De forma alterna, se podía visualizar que una concentración de la sustancia libre, variando con las condiciones, se mantuviera en los fluidos tisulares y que ejerciera un efecto moderador sobre la actividad neuronal (17).

Posteriormente se postuló que el Factor I parecía ser la sustancia transmisora de las fibras nerviosas reguladoras inhibitorias que suplementan a las neuronas sensoriales del órgano tensorreceptor del acocil. El Factor I, en concentraciones suficientemente bajas, provocó una caída inmediata en la frecuencia del impulso (período silente), la cual era seguida por un retorno a un valor cercano al nivel de frecuencia previo. La eliminación del Factor I era seguido de excitación y, otra vez, regreso de la frecuencia al nivel medido antes de la aplicación de la sustancia. El curso temporal de estos fenómenos mostró ser idéntico al de las adaptaciones a los decrementos y aumentos repentinos de la tensión aplicada sobre el tensorreceptor (26).

También se demostró que el GABA afecta al potencial de membrana de las neuronas tensorreceptoras del acocil en exactamente la misma forma en que lo hacen las terminales activadas de los axones inhibitorios que hacen contacto sináptico con estas células nerviosas (27).

La perfusión con GABA (1 ug/ml) disminuyó y detuvo el latido cardíaco de *Astacus trowbridgii*. Pero si en el líquido de perfusión se adicionaba picrotoxina (1 ug/ml), entonces el GABA, aún a concentraciones de 10 ug/ml, perdía su efectividad. La estimulación de la fibra inhibitoria del corazón, con frecuencias de 35/seg y mayores, causó la detención total del corazón. Sin embargo, si el corazón se perfundía con picrotoxina (1 ug/ml), la estimulación de la fibra inhibitoria, aún a frecuencias de 100/seg, no fue efectiva. Estos resultados indican que la fibra inhibitoria actuaba liberando un factor inhibitor que podía ser bloqueado por la picrotoxina (28).

Que tal compuesto inhibitor se estaba realmente liberando fue demostrado por el siguiente experimento: se colectó el perfusado mientras se estimulaba a la fibra inhibitoria a una frecuencia de 60/seg, en períodos de 10 seg, con intervalos de 5 seg, durante 2 min. Luego el perfusado se aplicó al propio corazón, que latía normalmente. El perfusado logró disminuir la frecuencia cardíaca en forma considerable. Los perfusados controles, obtenidos cuando no se estimulaba a la fibra, nunca provocaron una disminución en la tasa de latido del corazón. Además, los perfusados inhibitorios no generaron su efecto si se les añadía picrotoxina (1ug/ml) (28).

Otros investigadores reportaron que en la purificación de extractos cerebrales de conejo y de cerdo, probados sobre los sistemas aductor y abductor de la tenaza del acocil *Cambarus virilis*, aislaron más de una sustancia conteniendo algunas de las actividades adscritas al Factor I. Las sustancias encontradas con efecto inhibitor sobre dichos sistemas fueron el GABA, el ácido

glutámico (Glu) y el ácido aspártico (Asp). Probados sobre el corazón del acocil, el Glu presentó un efecto inhibitor, y el Asp un efecto estimulante (29).

En un estudio enfocado a la comparación de los efectos del Factor I y el GABA, llevado a cabo sobre diferentes preparaciones biológicas, se observó que las actividades inhibitoras del Factor I y del GABA eran semejantes y equivalentes en: a) el órgano tensorreceptor del acocil; b) la transmisión neuromuscular en crustáceos; c) la respuesta motora cortical en el gato; y d) protegían de las convulsiones a ratones tratados con estricnina. Sin embargo, se observaron diferencias en el reflejo monosináptico del gato, en donde el Factor I inhibió dicho reflejo mientras que el GABA no presentó ningún efecto. También se observó diferencia en la respuesta del recto de calamar, en donde el Factor I provocó excitación, mientras que el GABA no mostró efectos consistentes. Estos resultados sugirieron que aunque el GABA formaba parte importante del Factor I, debería existir algún otro componente activo que sí mimetizara a Factor I en aquellos sistemas en donde el GABA no lo hizo (31,32). También se describió que el ácido γ -amino- β -hidroxibutírico era muy similar al GABA en sus acciones (32).

En otro experimento, se estimuló eléctricamente al nervio excitador del músculo abductor de la tenaza de Orconectes immunis en forma tetánica hasta que se desarrollaba la contracción muscular. Luego se estimuló al nervio inhibitor de dicho músculo y se observó que la contracción cesaba. Cuando se perfundió al sistema con una solución de picrotoxina, se observó que la contracción no resultaba afectada cuando se estimulaba al nervio inhibitor. Estos experimentos confirmaron que la picrotoxina era capaz de bloquear la inhibición. El grado al cual la inhibición era bloqueada dependía de la concentración de la picrotoxina. A concentraciones de 10^{-6} M, la picrotoxina casi no tuvo efecto, mientras que concentraciones mayores disminuyeron, en forma progresiva, el efecto de la estimulación del nervio inhibitor. Se postuló que la picrotoxina actuaba bloqueando la combinación del transmisor inhibitor con su receptor específico (33).

También se analizaron los mecanismos de la acción inhibitora del GABA sobre la célula tensorreceptora de crustáceos. Se encontró un paralelismo muy estrecho entre los efectos del GABA y los de la inhibición neural. Se observó que ambos inhiben las descargas aferentes causadas al deformar al tensorreceptor cuando se aplica una tensión. Tanto el GABA como el transmisor neural aumentan la conductancia de la célula, disminuyendo por tanto la despolarización causada por la tensión. La hiperpolarización causada por ambos agentes es semejante. Si se reduce o elimina K^+ en la solución extracelular la acción hiperpolarizante, tanto del GABA como del transmisor neural, se ve incrementada. Este efecto paralelo sugirió un mecanismo común. Se sugirió también que la acción del GABA no se confinaba a las áreas inhibitoras subsinápticas, sino que al menos parte de su actividad tenía lugar en una gran porción de las dendritas y en el soma. En este mismo trabajo se reportó también que el ácido gamma-guanidinobutírico (GGBA) presentaba características inhibitoras semejantes a las del GABA sobre el tensorreceptor de los crustáceos, aunque su potencia era 3 a 7 veces menor (34).

De acuerdo con este resultado, se demostró también que el GGBA era un agente sináptico capaz de inactivar a las sinapsis dendríticas en la corteza cerebral, aunque en forma menos selectiva que el GABA, pues inhibía tanto a sinapsis despolarizantes como hiperpolarizantes; mientras que el ácido guanidinoacético (GAA) inhibía, al igual que GABA, sólo a las sinapsis despolarizantes (35). La presencia de GGBA había sido previamente demostrada en tejidos de frutas, invertebrados y vertebrados, incluyendo el cerebro de éstos (36). Asimismo, se había descrito su síntesis mediante una reacción de transamidación entre el GABA y un donador de grupos amidino como la arginina, en mamíferos (37). También se había demostrado previamente que la oxidasa de L-aminoácidos de numerosos equinodermos, crustáceos y moluscos, metabolizaba a la L-arginina dando lugar a la formación del ácido gamma-guanidinobutírico (38). Se postuló que la existencia de un análogo γ -guanidino del GABA, en cerebro de vertebrados, y la interconvertibilidad de estos dos ácidos butíricos mediante reacciones enzimáticas, sugerían que ambos compuestos podían estar cumpliendo alguna función en algunos procesos nerviosos (36).

Se describió que en mamíferos el Factor I se encontraba en altas concentraciones sólo en el sistema nervioso central, pero estaba ausente en los nervios periféricos, en contraste con lo que sucedía en los crustáceos, en donde también se encontraba presente en los nervios periféricos. Estos hechos se interpretaron como un índice de conexión funcional entre el Factor I y las neuronas inhibitorias, puesto que en mamíferos se encontraban neuronas inhibitorias en el sistema nervioso central pero no en el sistema nervioso periférico, mientras que en los crustáceos dichas neuronas existían en ambos sistemas. Con la ayuda del tensorreceptor se determinaron las concentraciones de Factor I en varias estructuras cerebrales de mamíferos, y se encontró que el Factor I se hallaba más concentrado en la materia gris de los centros extrapiramidales, así como en el pedúnculo cerebelar superior, el tracto óptico y el crus cerebri. La materia blanca mostró muy poco contenido de Factor I (39).

El hecho de que el GABA parecía no duplicar las acciones del Factor I en todas las preparaciones probadas en mamíferos (31,32), aunque sí lo hacía en crustáceos, aunado al reporte de que en un extracto de Factor I a partir de cerebro no se pudo encontrar ninguna fracción que contuviera GABA, por criterios cromatográficos (40), sugirieron que debería existir más de una sustancia responsable de las características del Factor I.

Por su parte, en crustáceos se confirmó que el GABA mimetizaba los efectos del transmisor inhibitorio sobre el músculo del acocil, pues este aminoácido inhibía la contracción del músculo abductor de la tenaza y actuaba sobre el potencial de unión en la misma forma que el transmisor inhibitorio, y su acción también era bloqueada por picrotoxina (41).

Se compararon los efectos del GABA y del Factor I sobre las contracciones de varias preparaciones de músculo liso, inducidas por drogas estimulantes, y se observó que ambas sustancias podían inhibir las contracciones producidas por acetilcolina y por nicotina sobre el ileon de cobayo, aunque el GABA no inhibió completamente la contracción, como lo hizo el Factor I. Las contraccio-

nes inducidas por serotonina sobre el fleón de cobayo se inhibieron casi totalmente con concentraciones adecuadas de GABA, pero la altura de la contracción no se vió afectada por el Factor I. Las contracciones provocadas por la gamma-butirotetaina en el mismo bioensayo se inhibieron parcialmente con el GABA, pero fueron potenciadas por el Factor I. El esfago del crizo de mar, estimulado con acetilcolina, fue inhibido por el Factor I pero no se vió afectado por el GABA. Estos resultados apoyaban la sugerencia de que la actividad de los extractos de Factor I, obtenidos de cerebro, no podía ser explicada totalmente por su contenido de GABA (42).

Como se mencionó anteriormente, una buena parte del Factor I en el cerebro se encontraba en una forma unida u "oculta". No se pudo obtener una conclusión definitiva sobre la localización intracelular del Factor I "oculto", ya que éste se liberaba cuando el tejido cerebral se suspendía en los medios que normalmente se usan para la separación de partículas subcelulares. Sin embargo, se observó que la proporción de Factor I "libre" (extraíble con solución salina, sin calor) con respecto al Factor I "oculto" (liberado con calor), en los cerebros de ratas normales era bastante constante. Cuando el tejido cerebral se suspendía en soluciones de sacarosa libres de sales, la mayoría del Factor I oculto se liberaba (43).

Se había descrito que el contenido de GABA en el cerebro de ratas disminuía después del tratamiento de los animales con insulina (44). De la misma manera, se encontró que el contenido total de Factor I disminuía notablemente con dicho tratamiento (43). Asimismo, la administración de carbazidas a ratas producía un decremento en el contenido de GABA cerebral, determinado químicamente (45). En igual forma, se observaron reducciones muy importantes en la actividad total de Factor I después de la administración de tiosemicarbazida y de semicarbazida (43). Se describió que el contenido de Factor I disminuía en los cerebros de ratas que sufrían de coma y convulsiones, después del tratamiento con insulina, y los de ratas que presentaban convulsiones inducidas por hidrazidas. Estos decrementos se llevaron a cabo principalmente en la fracción "oculta" del Factor I. Por su parte, el contenido total de Factor I se vió aumentado por hipoxia, por administración de hidroxilamina y por dosis repetidas de iproniazida. Estos aumentos fueron más marcados en la fracción "libre" de Factor I (43).

Posteriormente se realizó un estudio de la distribución de GABA endógeno entre las diferentes fracciones de centrifugación de homogenados con sacarosa de cerebro de ratón. Se utilizaron suspensiones mitocondriales y microsomas en solución salina amortiguada para unir al GABA marcado con ¹⁴C. Se demostró que tanto el fluido en suspensión como la materia particulada de los sistemas de unión de ¹⁴C-GABA contenían una cantidad mucho mayor de GABA que la adicionada de GABA radiactivo. La actividad específica del GABA unido al final del experimento fue considerablemente menor que la de GABA libre en el líquido de suspensión, indicando que sólo parte del GABA unido finalmente participó en el proceso de unión. Por lo tanto se estableció la existencia de dos "pozas" de GABA unido en la materia particulada final. El incremento en la cantidad total de GABA unido desde el principio hasta el final del proceso de

unión fue menor de lo calculado a partir de la actividad específica del GABA libre y del contenido de ^{14}C -GABA de las partículas, al final del procedimiento. Estos resultados sugirieron que existía algún intercambio entre el GABA unido y el libre, o bien que cantidades apreciables de GABA endógeno se perdían a partir de la materia particulada en el curso del procedimiento (46).

Utilizando al tensorreceptor de Astacus trowbridgii y al esófago del erizo de mar Strongylocentrotus drobachiensis, como sistemas de bioensayo, y la cromatografía bidimensional en papel, empleando diferentes solventes, se pudo separar a un extracto de Factor I, proveniente de cerebro bovino, en dos fracciones claramente diferenciables, las cuales se denominaron fracción A (la de menor Rf) y fracción B (la de Rf mayor). La fracción B podía, en virtud de sus características cromatográficas, compararse con GABA (47). Sin embargo, se había probado que era posible preparar extractos de cerebro que no tuvieran evidencia cromatográfica de la presencia en ellos de GABA, y que de todas maneras retuvieran su actividad total de Factor I, medida en el tensorreceptor del acocil (40). Se demostró que de tres extractos cerebrales preparados para obtener Factor I, dos dieron evidencias cromatográficas de la existencia de GABA, aunque en diferentes proporciones; y la tercera no. Sin embargo, las tres mostraron idénticas actividades sobre el tensorreceptor del acocil. Más tarde se observó que después de un largo almacenamiento, en el extracto que originalmente carecía de GABA, empezó a aparecer éste. Cuando la solución madre de este extracto se estaba terminando, su actividad sobre el tensorreceptor era igual que la de un extracto fresco, y ahora la presencia de GABA era muy evidente. De estas observaciones, y del comportamiento cromatográfico del Factor I, se hicieron las siguientes conclusiones tentativas: a) que la actividad total del Factor I no era dependiente de la presencia de GABA en el extracto de cerebro; b) que el GABA podía formarse durante la preparación de los extractos a partir de algún precursor; y c) que este precursor mostraba actividad de Factor I en aquellas preparaciones biológicas en donde el GABA era inactivo (47).

Se hizo necesario utilizar alguna preparación con el mismo grado general de responsividad que la neurona tensorreceptora al Factor I, pero que no fuera afectada por el GABA. Tal preparación fue el esófago del erizo de mar estimulado por acetilcolina (42). Tanto la fracción A como la fracción B del Factor I bloquearon las contracciones inducidas por la acetilcolina, mientras que el GABA no lo hizo. Por lo tanto debería existir algún otro constituyente en la mancha de mayor Rf además del GABA. Debe mencionarse que la fracción B, y quizá también la fracción A, eran candidatos a estar relacionados con el GABA, ya fuera por que lo produjeran por degradación, o porque se asemejaran estructuralmente. La actividad de ambas fracciones, sobre los dos bioensayos utilizados, se destruyó totalmente al tratarlas con ácido nitroso, de la misma forma que sucedió con la actividad del GABA sobre el tensorreceptor (47).

La gamma-aminobutirilcolina (GABCh) parecía ser una posibilidad interesante, pues se había descrito su existencia en el cerebro de perro, y mostraba algunas propiedades inhibitoras en diferentes sistemas probados, además de que al hidrolizarse, uno de los productos de degradación era el GABA (48).

Las similitudes biológicas de la GABCh con la fracción A fueron muy grandes. Mostró una gran potencia para inhibir las contracciones estimuladas por acetilcolina en el esfago del erizo de mar, y también fue activa sobre el tensorreceptor. La hidrólisis alcalina suave de este compuesto, que produce GABA y colina, destruyó su potencia en el erizo de mar, pero no afectó a la del tensorreceptor. Sin embargo, la evidencia cromatográfica no permitió igualar a la GABCh con ninguna de las fracciones obtenidas a partir del Factor I (47).

Por otra parte, se encontró que tanto el ácido β -guanidinopropiónico (BGPA) como el ácido γ -guanidinobutírico (GGBA) comigraban con la fracción B del Factor I en los sistemas de solventes utilizados. Se demostró que tanto el BGPA como el GGBA llenaban adecuadamente los requisitos de la fracción B, tanto desde el punto de vista cromatográfico, como por su actividad sobre los dos bioensayos utilizados (47). Se postuló como probable que uno de los constituyentes activos del Factor I, al extraerse del cerebro, fuera un derivado guanidilado. El candidato más apropiado, en función de sus características biológicas, cromatográficas y de existencia en los extractos era el GGBA (14, 35, 36, 37, 47, 49).

En la Tabla A se encuentran resumidas algunas propiedades biológicas y químicas de las fracciones obtenidas del Factor I y de los compuestos mencionados arriba.

Posteriormente, se reportó que la fracción A era la forma ionizada de la fracción B (50). También se aisló, de extractos de tejido nervioso central y periférico de crustáceos, una sustancia inhibidora, mediante métodos cromatográficos, a la cual se denominó Sustancia I (2). La Sustancia I parecía ser idéntica a la fracción A del Factor I (51).

Otra serie de estudios se enfocó a la elucidación de las características estructurales que parecían ser necesarias para generar una respuesta inhibitoria en algunos de los diferentes sistemas biológicos que se habían utilizado para describir las características funcionales del Factor I. Por lo tanto se probaron decenas de compuestos, muchos de los cuales presentaban semejanzas estructurales con el GABA. En estos estudios se encontraron compuestos que excitaban y también que inhibían a las diferentes preparaciones, sin embargo, para los fines de esta recopilación únicamente se comentarán los hallazgos relativos a las sustancias inhibitoras.

Así, sobre segmentos aislados de la médula espinal de Bufo marinus se encontraron los siguientes resultados, en donde las potencias de los diferentes compuestos se expresaron comparativamente en relación a la potencia de GABA. Las sustancias probadas se dividieron en tres categorías principales: ácidos aminocarboxílicos, ácidos aminosulfónicos y ácidos guanidinocarboxílicos, ya que el resto de los otros compuestos probados fueron solamente derivados de los miembros de estos grupos. Entre los ácidos ω -aminoalcanocarboxílicos se asoció un pico de actividad depresora con una longitud de cadena de dos átomos de carbono entre el grupo amino y el grupo carboxilo (β -alanina), mientras que en la serie de ácidos ω -aminoalcanosulfónicos la sustancia más activa (ácido

Tabla A.- Resumen de las propiedades biológicas y químicas de las fracciones del Factor I y de algunos compuestos.

	Factor I fracción A 0.2	Factor I fracción B 0.4-0.5	GABA 0.4-0.5	GABCh 0.1-0.2	Arg 0.15	GAA 0.25	BGPA 0.4	GGBA 0.45-0.55
Valores de Rf aprox. en solventes con butanol-ácido								
Valores de Rf aprox. en solventes con butanol-agua	0.2	0.2	0.05	0.05	0.05	0.05	0.15	0.25
Valores de Rf aprox. en fenol acuoso	0.3	0.85	0.75	0.9	0.85	0.7	0.85	0.9
Concentración/ml de solución aplicada para bloquear la descarga del tensorreceptor	0.1 ml*	0.025 ml*	3 ug	10 ug	NA	2 ug	10 ug	10 ug
Concentración/ml en el baño requerida para inhibir al 50% la contracción por ACh del esófago de erizo	0.005ml*	0.1 ml*	NA	1 ug	NA	-	50 ug	50 ug
Reacción con ninhidrina	+	+	+	+	+	-	-	-
Reacción de Dragendorff	+	-	-	+	-	-	-	-
Reacción de Sakaguchi	-	+	-	-	+	+	+	+

*Las concentraciones de Factor I están expresadas como mililitros del extracto acuoso final que se aplicó a los cromatogramas. + = reacción positiva; - = reacción negativa; NA = no presentó actividad. Tomado de la Ref. (47).

3-aminopropanosulfónico) se mostró que los grupos funcionales estaban separados por una cadena de tres átomos de carbono. Este compuesto fue el mayor depresor probado. En la serie de ácidos ω -guanidinoalcanocarboxílicos la mayor actividad se observó cuando solo un átomo de carbono separaba al grupo guanidino del grupo carboxilo (glucociamina), pero probablemente es significativo que otra vez tres átomos (en este caso -C-N-C-) separaran al grupo ácido del grupo amino terminal. Otra de las observaciones interesantes en este trabajo fue que cuando se pudieron probar los isómeros, siempre fue más activo el isómero D que el L. Los compuestos que presentaron mayor actividad depresora en este bioensayo fueron: glicina (Gly), β -Ala, GABA, ácido δ -aminovalérico, N-metil- β -Ala, N,N-dimetil- β -Ala, ácido γ -amino-N-metilbutírico, Taurina (Tau), ácido 3-aminopropanosulfónico, glucociamina, BGPA, D- α -Ala, L-Ala (52).

Cuando los experimentos se llevaron a cabo sobre motoneuronas, células de Renshaw o interneuronas del cuerno dorsal, dentro de la región lumbar de la médula espinal del gato, se observó que algunos compuestos provocaban depresión de la actividad neuronal, entre ellos los siguientes: β -Ala, GABA y Tau, que fueron los más potentes; seguidos por un grupo que consistía de N-metil- β -Ala, ácido γ -amino- β -hidroxibutírico, Gly, α -Ala, ácido δ -aminovalérico y ácido β -aminoisobutírico. Se establecieron algunas relaciones de estructura-actividad con respecto a estas sustancias. La actividad depresora estuvo asociada con un grupo ácido y un grupo básico. La separación óptima de los grupos ácido y básico para la acción depresora fue de dos a tres átomos de carbono. La función ácida podía ser sulfónica o carboxílica. La actividad se perdía si los grupos ácidos o básicos no se encontraban libres, y se reducía o desaparecía por sustitución en algún carbono intermedio de la cadena, o en el grupo amino, dependiendo del tamaño, número y posición de los sustituyentes (53).

Sobre el músculo abductor de la tenaza del acocil Cambarus clarkii se observó que provocaban inhibición de la contracción los siguientes: GABA, ácido δ -aminovalérico, β -Ala, Tau, y GAA. Todos estos compuestos fueron bloqueados en su acción por la picrotoxina, lo que sugirió que éstos mimetizaban al transmisor inhibitor neuronal. También quedó claro que tales sustancias probablemente actuaban en un sitio específico del sistema neuromuscular, pues otros 35 compuestos probados no mostraron ningún efecto (54,55).

Sobre el órgano tensorreceptor abdominal de los crustáceos Orconectes virilis, Procambarus alleni y Homarus americanus, se observaron depresiones de la descarga espontánea provocadas por los siguientes aminoácidos: GABA, β -Ala, ácido δ -aminovalérico, GAA, BGPA, ácido β -guanidinobutírico, GGPA, ácido γ -amino- β -hidroxibutírico y Tau. Se observó que estos aminoácidos repolarizaban a la célula despolarizada hacia su potencial de reposo. Se concluyó que el mecanismo común consistía en incrementar el flujo de iones específicos a través de la membrana de dendritas y del soma. Esta acción fue semejante al mecanismo por el cual actuaba el transmisor inhibitor neuronal sobre la célula sensorial (56).

En otro estudio también sobre el tensorreceptor de Pacifastacus leniusculus, se encontró que la sustancia inhibidora más potente fue la 3-hidroxitiramina, alrededor de cien veces más activa que el GABA. Otros compuestos con actividad depresora fueron el clorhidrato de DL-noradrenalina, el ácido imidazolacético y el BGPA, con actividades semejantes a la del GABA. Se probaron los efectos de la picrotoxina, el dibencileno y la clorpromazina para ver su capacidad bloqueadora contra estos compuestos y contra una preparación cruda de Factor 1. La mayor parte de la actividad del Factor 1, el ácido imidazolacético y el BGPA fue bloqueada por las tres drogas; la picrotoxina fue débilmente efectiva contra la 3-hidroxitiramina pero bloqueó casi totalmente al GABA; y la clorpromazina y el dibencileno no fueron efectivos contra el GABA pero bloquearon casi completamente a la 3-hidroxitiramina. Estos resultados apoyaron la sugerencia de que otras sustancias, además del GABA, estaban contribuyendo a la actividad inhibidora del Factor 1 (57). Más tarde se añadió a esta serie de compuestos la homotaurina, reportándose que presentaba 1.3 veces la potencia del GABA. También se mencionó que había una especificidad de especie con respecto a la 3-hidroxitiramina, pues ésta era activa sobre tensorreceptores de Pacifastacus leniusculus y de Procambarus clarkii, pero no tenía efecto sobre Orconectes propinquus ni Procambarus blandingi (58).

También se mostró que sobre potenciales evocados directamente en la corteza de gato y en sinapsis aferentes del nucleus gracilis, tenían un efecto inhibitor el Factor 1, el GABA, el BGPA y el GGPA. Sin embargo los reflejos monosinápticos al estiramiento y la transmisión en el ganglio mesentérico inferior sólo fueron inhibidos por el Factor 1, pero no por los otros compuestos (59).

Sobre un bioensayo muy sensible como lo era el intestino de acocil, se encontró que las contracciones inducidas por acetilcolina se podían inhibir con GABA, GAA, ácido γ -amino- β -hidroxibutírico, Asp, Glu, glutamato monosódico, GABCh, β -Ala y Tau. La acción inhibidora de estos compuestos se bloqueaba por la picrotoxina (60).

En un extracto de nervios enteros de los quelípedos de Cancer magister se observó que éste causaba inhibición del impulso en el tensorreceptor. Este resultado no pudo obtenerse con extractos que contenían solamente fibras sensoriales o fibras motoras. En cambio los extractos provenientes de fibras inhibitoras sí podían deprimir la descarga del tensorreceptor. Se pensó que el Factor 1 de los crustáceos era una característica exclusiva de las fibras inhibitoras, y que de hecho constituía al transmisor de las neuronas inhibitoras en los crustáceos (61).

Como ya se mencionó antes, se había observado que tanto el GABA como algunos de sus análogos imitaban las acciones del transmisor inhibitor en diferentes sistemas, y varios estudios ya se habían realizado a este respecto sobre la unión neuromuscular de los crustáceos (62,63,64,65), en las sinapsis del tensorreceptor y en el sistema nervioso central (34,66,67). Estos datos sugirieron que el GABA o algún compuesto relacionado estuvieran involucrados en la inhibición neural.

Se hizo un extracto de la cadena ganglionar abdominal, incluyendo al ganglio supraesofágico, de Homarus americanus, y el dializado se sometió a diversos pasos de purificación, incluyendo la cromatografía en papel y la electroforesis a diferentes pHs. Se identificaron a las siguientes sustancias: GABA, Tau, betaína, Ala y β -Ala, las cuales además presentaron actividad inhibidora sobre el músculo abductor del acocil (68). Esta era la primera ocasión en que se describía la existencia de estos compuestos en el sistema nervioso central de los crustáceos.

Luego se amplió este estudio buscando en el sistema nervioso periférico de los crustáceos, para ver si existían compuestos que pudieran inhibir la unión neuromuscular del acocil, y el resultado fue que se encontraron diez sustancias con tales características. Además de las cinco mencionadas en el párrafo anterior, también se identificaron homarina, Gln y Asp. y dos sustancias no identificadas. De todas ellas el GABA mostró la potencia más alta. Se determinó que el contenido de GABA en los tejidos nerviosos periféricos se incrementaba junto con la proporción de axones inhibidores conocidos (69).

Se aislaron dos axones eferentes de la tenaza de Homarus americanus, uno excitador y uno inhibidor y se analizaron para tratar de cuantificar su contenido de GABA y de los otros nueve compuestos inhibidores de la sinapsis, que se describieron arriba. El contenido de GABA en el axón inhibidor fue de aproximadamente el 0.5% de su peso húmedo, mientras que no fue posible detectar GABA en el axón excitador. Por lo tanto el GABA debía estar confinado en los nervios inhibidores. Los otros compuestos, con la posible excepción de la β -Ala, se encontraron en ambos tipos de neuronas (70).

De la misma forma se analizaron tres tipos de axones inhibidores y siete tipos de axones excitadores para conocer su contenido de GABA, mediante un método enzimático muy específico (119-122). Se encontró que los axones inhibidores contenían una concentración muy alta de GABA, de aproximadamente 0.1 M, mientras que los axones excitadores contenían menos del 1% de esa cantidad. También se analizaron algunos axones sensoriales y fibras "gigantes" del sistema nervioso central, y se observó que sus niveles de GABA eran comparables a los de las fibras excitadoras (71,72).

Posteriormente se demostró que existía liberación de GABA en respuesta a la estimulación del nervio inhibidor en tres uniones neuromusculares diferentes de Homarus americanus. Las cantidades liberadas de GABA fueron dependientes de la frecuencia de estimulación y de la duración del período de estímulo. La cantidad promedio de GABA recuperado por estímulo estuvo en el orden de 1×10^{-14} moles. El GABA no se liberó por estimulación de los nervios excitadores o en respuesta a la estimulación del nervio inhibidor, cuando la transmisión neuromuscular estaba bloqueada al exponer al tejido a un medio bajo en calcio (73).

HORMONA NEURODEPRESORA.-

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

En los crustáceos, el papel de factores endócrinos sobre la ritmicidad locomotora fue propuesto inicialmente por la observación de que la extirpación de los tallos oculares resultaba en la abolición del ritmo circadiano de actividad en el acócil Potamobius astacus (74), en donde se inducía un estado de hipocactividad continua por este método, y la inyección de un extracto de tallos oculares provocaba un aumento en la actividad.

Posteriormente, se reportó que en Procambarus clarkii y Cambarus diogenes (75), y en Orconectes virilis (76), la extirpación de los tallos oculares también inducía un cambio en el nivel de actividad motora de estos animales, pero en este caso se obtenía un estado continuo de hiperactividad, mientras que la inyección de extractos frescos de tallos oculares provocaban una disminución en dicha actividad motora.

Más tarde, estas últimas observaciones se han descrito también en varias especies de crustáceos, como son Uca (77), Trichodactylus (78) y Carcinus maenas (79). En todos estos, como en Orconectes y Cambarus, se ha propuesto que una hormona inhibidora de la actividad locomotora es producida por el tejido neurosecretor del tallo ocular. Se sabe que el tallo ocular contiene a un órgano neurohémico, originalmente descrito por Hanström como una glándula (80), que se denomina glándula sinusal y que ahora se sabe que está constituida por un conglomerado de terminaciones neurosecretoras, las cuales se encuentran en estrecho contacto con un seno sanguíneo. Este órgano se ha estudiado en un gran número de especies de crustáceos, su estructura básica parece ser común en todos los decápodos, y se sabe que contiene varios neuropéptidos (81).

Desde el punto de vista electrofisiológico, se han descrito fluctuaciones circadianas en la respuesta de elementos sensoriales en fase con el ritmo circadiano de la actividad motora (82), y se ha visto que los extractos crudos de tallos oculares deprimen la actividad eléctrica espontánea en varios elementos sensoriales y motores en el sistema nervioso del acócil Procambarus bouvieri (83), tanto en animales intactos, como en ganglios aislados y en células nerviosas aisladas.

En Carcinus maenas, la supresión parcial inducida por extractos de tejido nervioso sobre la actividad de neuronas a varios niveles de integración, es similar a la actividad disminuida que se observa durante la fase diurna del ciclo circadiano espontáneo. En este mismo organismo, la depresión diurna de la actividad neuronal es inducida por la liberación de un agente hormonal, el cual es una molécula pequeña, termoestable y de naturaleza peptídica (84). Debido al efecto que presenta este agente sobre la actividad neuronal, se le ha designado con el nombre de Hormona Neurodepresora (HND).

Se ha reportado que el sistema nervioso de los crustáceos es capaz de proporcionar cantidades mensurables de HND, específicamente el que forma parte del tallo ocular, y el del ganglio supraesofágico. La cantidad de actividad de HND en ambos órganos es diferente, conteniendo el tallo ocular de 3 a 5 veces más la cantidad de HND que se puede obtener del ganglio supraesofágico. Dentro del tallo ocular, se reportó que la mayor parte de la actividad neurodepresora se encontraba confinada en el sistema médula interna-glándula sinusal. Cuando se diseccionó selectivamente a la glándula sinusal se observó que más del 90% de la actividad de la fracción médula interna-glándula sinusal se localizaba en dicho órgano. De hecho, se encontró que la glándula sinusal contenía alrededor del 65% de toda la actividad de HND existente en el sistema nervioso del acocil (85).

Se ha descrito que la mayor cantidad de HND se encuentra en el tallo ocular. También se halla en el ganglio supraesofágico pero en una concentración mucho menor. Asimismo, también se ha observado un poco de actividad en los ganglios torácicos y en cantidades muchísimo más pequeñas en la cadena abdominal. Igualmente, se ha identificado su presencia en la hemolinfa del acocil (86).

Cuando se separan los tallos oculares del resto del animal, se ha observado que la concentración de HND en las diferentes estructuras (ganglio supraesofágico, ganglios torácicos, ganglios abdominales y hemolinfa) disminuye constantemente hasta desaparecer al cabo de cuatro días. Sin embargo, a partir del quinto día se empieza a observar una recuperación que rápidamente alcanza los niveles basales (86), siendo el efecto mucho más predominante en el ganglio supraesofágico y en los ganglios torácicos, que en la cadena abdominal.

En algunos experimentos diseñados para localizar el sitio de síntesis de HND, se separaron varios segmentos del sistema nervioso central del acocil, y se depletaron de su contenido de HND, por lavado exhaustivo con solución salina o por agitación durante 30 min, o en el caso del tallo ocular, por separación de la glándula sinusal. Después los fragmentos se incubaron en un medio con aminoácidos y se tomaron muestras a diferentes tiempos. Después de cinco horas de incubación la actividad de HND en el tallo ocular retornó al nivel que se había determinado antes de la escisión de la glándula sinusal. Se encontró mucho menor actividad sintética en el ganglio supraesofágico y en los ganglios torácicos, y no se pudo observar ninguna en los ganglios abdominales. De hecho se observó que la glándula sinusal misma no fue capaz de sintetizar HND (86,87).

Se ha sugerido que el lugar primordial de síntesis de la HND es el órgano X, localizado en la médula terminal del tallo ocular. Los axones provenientes del órgano X corren distalmente para terminar en la glándula sinusal (88). Las neurosecreciones son transportadas a lo largo de estos axones en forma de gránulos cuyos tamaños varían entre 300 - 1200 Å. Su liberación probablemente involucra un proceso de exocitosis, estimulado por una despolarización de las terminales.

Se sabe que las terminales neurosecretoras en la glándula sinusal son excitables. La liberación de HND parece ser estimulada por la excitación de los axones neurosecretores, y se encontró que la aplicación de pulsos eléctricos de 1 msec de duración, en un rango de voltaje de 0.1 a 10 volts provocaban la liberación de HND de la glándula sinusal, obteniéndose la saturación con 1 V. También se estudiaron los efectos de la frecuencia de estimulación y se obtuvo un valor óptimo entre 1 y 10 pulsos por seg (85).

De la misma manera, se ha estudiado el efecto del potasio sobre la inducción de la liberación de HND en la glándula sinusal, y se ha observado que las soluciones con 40 mM de K^+ estimulan la liberación máxima de HND, en presencia de calcio. Una característica común a la liberación de los transmisores sinápticos o de los productos de neurosecreción es su dependencia de la penetración de calcio durante el período de activación. En el caso de la liberación de HND de la glándula sinusal, también se ha observado que el calcio desempeña un papel relevante en dicha liberación, ya que ésta es inhibida con soluciones carentes de Ca^{++} , aún en presencia de K^+ 40 mM (85).

Desde el punto de vista morfológico, se ha observado por microscopía electrónica que la liberación de HND de las terminales neurosecretoras de la glándula sinusal ocurre por exocitosis de gránulos. Cuando se midió la cantidad de HND liberada en función de la concentración de K^+ , se observó que era aproximadamente paralela a la depleción de gránulos en las terminales neurosecretoras (85). Se cree que la dependencia de la liberación de HND con respecto al calcio pueda estar relacionada con la exocitosis, ya que este ión no está involucrado en la generación de potenciales de acción en los axones neurosecretores.

Puesto que el grupo de neuronas en las que se ha estudiado mejor el efecto de HND son las motoneuronas de los flexores abdominales superficiales, se intentó estudiar el mecanismo de acción de HND en ellas. En estas neuronas se ha postulado la presencia de una bomba electrogénica de sodio como la responsable del control del potencial de membrana (89), y por lo tanto se investigó si tal mecanismo se veía afectado por la HND. Se observó que la ouabaína, un inhibidor del transporte de la ATPasa de Na^+-K^+ , era capaz de bloquear el efecto depresor de HND sobre la actividad espontánea de una motoneurona (f-5) en el tercer ganglio abdominal. El efecto de HND también se bloqueó en soluciones libres de K^+ , en las que la ATPasa dependiente de Na^+ y de K^+ es inactiva (90). Se postuló la hipótesis de que la HND producía un efecto hiperpolarizante a través de la estimulación de una bomba electrogénica de sodio (87, 91).

Puesto que las motoneuronas flexoras abdominales son muy pequeñas para obtener penetraciones confiables, prolongadas, se utilizó el axón medial gigante. Esta es una interneurona de comando que se sabe que participa en la generación del movimiento de la cola durante el reflejo de escape. Se ha descrito una bomba electrogénica de sodio en esta célula, y se vio que la aplicación tónica de diferentes concentraciones de HND produjeron hiperpolarizaciones relacionadas con la dosis, las cuales podían ser bloqueadas con la ouabaína, la cual a su vez era capaz de despolarizar a la membrana. Estos resultados se interpretaron como que la HND aumentaba el umbral de disparo y por

lo tanto hacía que el axón se volviera menos excitable. No se detectaron cambios en la velocidad de conducción ni en la conductancia de la membrana bajo la acción de la HND (87).

Con el fin de explorar la posibilidad de una mediación de los nucleótidos cíclicos en el efecto de la HND, se estudiaron las consecuencias de las modificaciones en los niveles intracelulares de AMPc y GMPc. La aplicación de dibutiril-AMPc, el cual es capaz de penetrar la membrana celular, mostró un efecto bloqueador sobre la actividad de la hormona. Se obtuvieron los mismos resultados con la aplicación de teofilina y cafeína, las cuales son drogas que se sabe aumentan la concentración intracelular de AMPc al inhibir la actividad de la fosfodiesterasa. Opuestamente, la aplicación de dibutiril-GMPc pareció mimetizar los efectos de HND. Aún más, cuando se combinaron concentraciones bajas de HND y GMPc, se hizo aparente un efecto sinérgico. De estos resultados se propuso que el aumento en los niveles intracelulares de GMPc, y/o la disminución de los de AMPc participaban en la respuesta fisiológica inducida por la HND (87).

Se ha reportado que la secreción de la HND en Procambarus bouvieri posee un ritmo circadiano, por medio de la medición de su concentración en el sistema nervioso a diferentes horas del ciclo nictameral. Los resultados indican que: a) en animales colocados en ciclos normales de iluminación o en oscuridad constante durante más de 24 horas, la curva de concentración-respuesta para HND muestra títulos entre 100 y 200% más altos para esta hormona durante la fase diurna que en la fase nocturna; b) en animales colocados en oscuridad continua, después de haber estado sometidos durante una semana a ciclos naturales de luz y oscuridad, la actividad de HND, determinada en intervalos de 3 hrs, alcanza títulos más altos en las muestras tomadas en la fase diurna, coincidiendo las transiciones entre ambas fases con las del ciclo nictameral; c) la sensibilidad de la neurona f-5 a una concentración dada de HND también fluctúa a lo largo del nictámero, siendo mayor cuando la neurona se encuentra en la fase nocturna del ciclo (92).

Estos resultados sugirieron que la producción de HND en los crustáceos participaba en la modulación de la excitabilidad neuronal, particularmente en relación al ciclo de 24 hrs.

Cuando se investigaron los efectos de la inyección de extractos de tallos oculares sobre la conducta locomotora de Carcinus maenas, se observó que si dichos extractos se aplicaban justo antes de la aparición del pico nocturno de actividad locomotora, su contenido era capaz de abolir tal actividad (87). Estos resultados se confirmaron también en Nephrops norvegicus (93). Este tipo de observaciones indicaron un efecto prolongado de la sustancia, compatible con una función hormonal.

En experimentos in vitro se describió que el efecto depresor podía ser mantenido por largos períodos de tiempo, de hecho, tan largos como la HND se encontrara presente en el baño. Aún después de horas de exposición continua a la hormona, es posible observar una completa reversibilidad del efecto después de remover la sustancia. El tiempo necesario para la recuperación total fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición a la HND. Es-

tos datos revelaron que la HND no produce una desensibilización apreciable (87).

Puesto que la HND se ha encontrado en la hemolinfa, y dado el efecto prolongado que induce, se ha propuesto que su papel fisiológico es el de una sustancia moduladora que controla el nivel de excitabilidad en el sistema nervioso de los crustáceos; y es muy probable que se encuentre involucrada en la expresión de la ritmicidad circadiana. Se ha postulado que para los crustáceos con actividad nocturna, la iluminación fuerte y prolongada ejerce una influencia inhibitoria sobre la locomoción (94). Es posible, por lo tanto, que durante la transición de la noche al día, se libere HND a la circulación y participe en la inducción de la quiescencia característica de la fase diurna del ciclo circadiano.

Por otra parte, también se han realizado estudios para conocer la distribución de la HND en los invertebrados, a lo largo de la escala filogenética. Así se ha identificado que existe un cruzamiento fisiológico y el mismo comportamiento bioquímico entre la HND del acocil Procambarus bouvieri y la HND del camarón Penaeus vannamei (95,96). De igual forma, se han encontrado los mismos resultados con toda una serie de especies de crustáceos decápodos, tanto marinos como fluviales, lo que hizo que se postulara que la presencia de esta hormona era una característica común a todos los crustáceos decápodos (97). Dicha proposición fue confirmada también en Nephrops norvegicus y Carcinus maenas (98).

Otros crustáceos también mostraron la misma actividad, como el estomatópodo Squilla mantis (99) y un isópodo terrestre Oniscus asellus; además se encontró actividad neurodepresora en un molusco (Nerita scabricosta), un anélido (Lumbricus terrestris) y un insecto (Periplaneta americana) (100,101), que pertenecen a diferentes phyla.

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

Desde el punto de vista bioquímico, se describió la purificación y caracterización parcial de las hormonas neurodepressoras de Procambarus bouvieri y Penaeus vannamei. Inicialmente se alcanzó un grado razonable de pureza con la HND del acocil por métodos electroforéticos únicamente (102,103), pero la mayor desventaja de este método era que no se podían trabajar grandes cantidades de material. Posteriormente, se diseñó un método que involucraba pasos de purificación por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25 y Sephadex G-15), junto con pasos electroforéticos en papel (pH 1.8, 3.5, 6.0 y 10.0); que fueron aplicados tanto para la purificación de HND de P. bouvieri (104), como para la de P. vannamei (95,96), y en ambos se alcanzó un nivel razonable de pureza (alrededor de 4×10^4 sobre el nivel del extracto crudo).

Los trabajos de caracterización realizados llevaron a postular que la HND era un péptido pequeño, susceptible a la acción de enzimas proteolíticas, termoestable; dializable; compuesto únicamente por aminoácidos que le confieren características de neutralidad ante un campo eléctrico, a todos los pHs probados, como son: Asn, Ala, Val, Ser, Gln, Gly, Thr, Leu/Ile, y Pro; que tiene un peso molecular aproximado de 1200 y que se encuentra bloqueado en ambos extremos, con la posibilidad de que se trate de un péptido cíclico (87,95,96, 103,104,105).

Posteriormente se describió que estos resultados se habían obtenido con preparaciones que aún presentaban contaminantes, pues al utilizar métodos de análisis más potentes que los anteriormente usados, éstos salieron a relucir. Por lo tanto se dedicaron esfuerzos para conseguir la purificación de la hormona por métodos de mayor resolución, como lo fue la cromatografía líquida de alta presión (CLAP). Con ella se establecieron las pautas para conseguir la purificación definitiva de la HND (106).

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados de los esfuerzos conducentes a la purificación de la HND por CLAP, así como algunas de sus características bioquímicas y fisicoquímicas. También se presentan datos sobre la posible identidad de la actividad neurodepresora del camarón Penaeus vannamei (Boone), y se discute su probable relación con el llamado Factor I.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Limpieza del material.— Todo el material de vidrio utilizado en este trabajo fue lavado previamente con una mezcla sulfonítrica (H_2SO_4 : HNO_3 , 1:1, v/v). Después se enjuagó el material con agua bidestilada y desionizada. Posteriormente se trató con una solución de Aquasil (Pierce) al 1%, v/v.

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

Para los bioensayos se utilizaron acociles de la especie Procambarus bouvieri (Ortmann), traídos de Uruapan, Mich., o bien Procambarus clarkii (Giffard), procedentes de Chihuahua.

Reactivos.— Todos los reactivos usados fueron del mejor grado de pureza existentes en el mercado. En la preparación de las soluciones, así como en todos los procesos en general, se usó agua purificada a través de un aparato Nanopure (SYBRON/Barnstead). La resistividad del agua obtenida después de este proceso fue de 15 a 18 megohms-cm.

En el caso de los solventes utilizados en la cromatografía líquida de alta presión, únicamente se utilizaron solventes grado HPLC (Fisher o J.T. Baker).

Tinciones.—

a) Método de la ninhidrina.— Se empleó como agente localizante ninhidrina al 0.25% en acetona (107).

b) Método del cloro.— Este método es muy útil para el caso de aminoácidos, aminoácidos con el grupo amino bloqueado y para péptidos (108). Para realizar esta técnica se siguió el método de Rydon-Smith (109,110). Para mayores detalles consúltese (95).

Soluciones amortiguadoras.-

- 1) Solución amortiguadora pH 1.8.- Esta solución se preparó utilizando ác. fórmico:ác. acético glacial:agua, en las proporciones 1:4:45, v/v/v.
- 2) Solución amortiguadora pH 10.0.- Esta solución se preparó usando carbonato de amonio 0.1 M y ajustando a pH 10.0 con amoniaco.
- 3) Solución amortiguadora pH 3.5.- Esta se prepara mezclando piridina:ác. acético glacial:agua, en las proporciones 1:10:89, v/v/v.
- 4) Solución amortiguadora pH 6.0.- Se prepara usando piridina:ác. acético glacial:agua, en las proporciones 46:4:950, v/v/v.
- 5) Solución fisiológica de Van Harreveld, para crustáceos (11), consistente en: NaCl 0.2 M, CaCl₂·2H₂O 0.02 M, KCl 0.00536 M, MgCl₂ 0.0026 M, NaHCO₃ 0.0023 M, ajustado a pH 7.5 con HCl 0.1 N.

Bioensayo.- Todos los experimentos fisiológicos y bioensayos se realizaron en el laboratorio del Dr. Hugo Aréchiga, del Depto. de Fisiología y Biofísica del CINVESTAV (ver agradecimientos).

La actividad de la hormona neurodepresora fue probada *in vitro* por su efectividad en reducir la frecuencia de descarga de una neurona aislada, del sistema tensorreceptor abdominal (11) del acocil Procambarus bouvieri o de Procambarus clarkii.

El órgano tensorreceptor del acocil, RM₁, al igual que el RM₂, consiste de una neurona sensorial adosada a una sola fibra muscular. A diferencia de RM₂, que muestra una adaptación rápida a la tensión, RM₁ da lugar a frecuencias constantes de impulsos nerviosos cuando se mantiene una tensión constante sobre la fibra muscular. Puesto que los impulsos nerviosos son casi perfectamente rítmicos, aún los cambios más pequeños en sus frecuencias, pueden observarse fácilmente (12).

Cada lado de cada segmento abdominal del acocil contiene un par de receptores, RM₁ y RM₂. Se disecaron éstos bajo el microscopio, inmersos en solución de Van Harreveld, quitando toda la musculatura y tejido conectivo adyacentes.

Posteriormente, la preparación aislada se transfirió a una poza en donde se le succionó con un microelectrodo para hacer un registro extracelular de la actividad eléctrica de RM₁, al aplicar una pequeña tensión. La preparación se irrigó constantemente con solución de Van Harreveld, goteada por gravedad desde un recipiente a temperatura ambiente (19°-21°) y sacada de la cámara de registro por la aplicación de una presión reducida.

El flujo de la solución salina fue detenido por espacio de un minuto, como período control, y luego se introdujo la sustancia de prueba, con jeringa, y se observó su efecto durante un minuto. Posteriormente se restauró el flujo normal.

La frecuencia de descarga de RM₁ fue medida por alimentación de picos después de una preamplificación (Gras-P-G-12) a un reductor de frecuencia (112) y alternativamente con un multicanal marca TMC. En este caso la forma de onda de los picos fue modificada por un circuito RC, para lograr la señal aceptable por el multicanal. Los picos fueron registrados en papel (polígrafo Grass, modelo 7) y proyectados en un osciloscopio (Tektronix 502), simultáneamente.

En algunos casos, con fines comparativos, se utilizó otro método de bioensayo que consistió en el registro extracelular de la actividad espontánea de la rama superficial de la tercera raíz de un ganglio abdominal, generalmente el tercero, con un electrodo de succión (85). Esta rama contiene seis axones motores que innervan a los músculos flexores abdominales superficiales. Cinco de estas unidades son tónicamente activas. Las mediciones de frecuencia de descarga espontánea se hicieron sobre la motoneurona f-5, de acuerdo a la terminología de Wine y cols. (113).

La actividad neurodepresora se cuantificó usando una escala arbitraria. La frecuencia de descarga de la neurona f-5 mostró, a temperatura constante, fluctuaciones espontáneas de minuto a minuto, dentro de un límite de 10% del valor promedio. Bajo la sustancia de prueba, cualquier depresión que sobrepasara ese nivel se tomó como efecto positivo, y cada reducción del 1% en la frecuencia de descarga se consideró como una unidad de actividad neurodepresora.

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

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

Extracción y aislamiento de la actividad neurodepresora.- Con los lotes P-19, P-21, P-22, P-23 y P-24, se siguió el procedimiento que se ha descrito previamente (95), con ligeras modificaciones. En breve, dicho procedimiento se realizó en el cuarto frío y consistió en triturar a los tallos oculares liofilizados, congelados a -70°, en un molino para carne que tenía una criba cuyos orificios medían 2.6 mm de diámetro, preenfriado a -70°, y utilizando trocitos de hielo seco como abrasivo.

Los polvos obtenidos se resuspendieron con tres volúmenes de agua a 80°, y se calentaron en baño maría manteniendo una temperatura de 75°, durante 3 minutos. Luego se colocaron en un recipiente con agua con hielo para bajar la temperatura. Este tratamiento fue hecho con el fin de inactivar a las proteasas propias del extracto.

Se extrajeron los polvos con agua, a 40°, agitando mecánicamente durante 30 minutos, y luego se centrifugó a 4200 x g (cabezal GSA, Sorvall RC-5B), durante 30 minutos, a 4°. Se recogieron los sobrenadantes y los precipitados se reextrajeron nuevamente, utilizando la misma metodología. Este procedimiento se repitió 4 ó 5 veces. Al final de las extracciones se reunieron todos los sobrenadantes obtenidos y se concentraron en un evaporador rotatorio.

En un caso particular (Lote P-20) la extracción de la actividad neurodepresora se realizó de la siguiente manera: al polvo obtenido de la molienda de los tallos oculares, en la forma previamente descrita, se le extrajo directamente con metanol absoluto, agitando durante 1 hr, a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó en una centrífuga MSE a 700 x g, durante 30 minutos, a 8°. Se separaron los sobrenadantes y los precipitados volvieron a extraerse; por el mismo procedimiento. La operación se repitió seis veces.

En este mismo lote, los precipitados se almacenaron a -70° en el Revco, y los sobrenadantes se reunieron y se concentraron en el evaporador rotatorio. El concentrado se centrifugó a 16800 x g (cabezal GSA, Sorvall RC-5B), durante 30 minutos, a 4°, para eliminar a un precipitado que se formó. Dicho precipitado se extrajo con agua y posteriormente se centrifugó bajo las mismas condiciones. Los precipitados remanentes se congelaron a -70°, mientras que los sobrenadantes acuosos se reunieron con los sobrenadantes metanólicos obtenidos en el paso anterior. La mezcla se liofilizó hasta sequedad obteniéndose una pasta anaranjada.

Las pastas secas fueron extraídas con éter de petróleo, durante 1 hr, con agitación, en el cuarto frío. Luego se repitió la operación. Se centrifugó a 700 x g en la MSE, 30 minutos, a 4°, y se separaron los sobrenadantes del precipitado. Los precipitados obtenidos se volvieron a extraer con éter de petróleo, en la misma forma, y se separó el sobrenadante del precipitado.

Los precipitados se extrajeron con metanol absoluto durante 1 hr, con agitación, a 4°. Se obtuvo, después de centrifugar, un sobrenadante café, translúcido, y un precipitado blanco. Los sobrenadantes se concentraron en el evaporador rotatorio y se dializaron (ver adelante) contra metanol, en el cuarto frío. El material que salió de la bolsa de diálisis se concentró a sequedad, y los sólidos obtenidos se resuspendieron en agua.

Posteriormente esta solución fue extraída con cloroformo, durante 30 min, a temperatura ambiente, obteniéndose una fase acuosa (superior) amarilla, una interfase cremosa, blancuzca, y una fase orgánica (inferior) rosácea. Se liofilizó la fase acuosa y luego se resuspendió en agua.

Concentración.— En el caso de volúmenes mayores obtenidos de las extracciones o en la etapa de obtención del extracto crudo, se concentró hasta la consecución de volúmenes pequeños en un evaporador rotatorio, marca Buchler.

En el caso de las fracciones obtenidas de las columnas de cromatografía en gel, o las salidas de electroforesis, fueron concentradas por liofilización en un aparato marca Virtis.

Las muestras obtenidas de la cromatografía líquida de alta presión se concentraron en un evaporador centrífugo al vacío, marca Savant.

Diálisis.— Todos los extractos totales obtenidos fueron dializados directamente contra agua, a 4°. Invariablemente, la actividad neurodepresora se localizó en la fracción que salía de la bolsa, a la cual se le denominó dializado. Al material que se mantenía dentro se le llamó contenido interior de la bolsa de diálisis. El procedimiento se realizó haciendo cambios cada dos hrs, y generalmente se realizaban cuatro cambios. Las membranas utilizadas fueron de la marca Spectrapor, con rango de corte de 13,600 de PM. En alguna ocasión se usaron membranas con rango de corte de 1000 de PM.

Ultrafiltración.— En los experimentos que requirieron ultrafiltración, esta se realizó utilizando membranas UM-05, de Amicon, que tenían un rango de corte de 500 de PM.

Determinación de Na⁺ y K⁺.— El contenido de iones (principalmente Na⁺ y K⁺) se determinó en forma automática mediante flamometría, en un flamómetro IL-343 (Instrumentation Laboratory, Inc.). Dichas mediciones se realizaron en el Depto. de Nefrología y Metabolismo Mineral del INNSZ.

Desalificación de los extractos.— Con el fin de eliminar a las sales que acompañaban a las preparaciones de actividad neurodepresora se siguió el procedimiento que a continuación se menciona. Las muestras se liofilizaron a sequedad. El precipitado obtenido se extrajo con volúmenes variables de metanol absoluto (en función del volumen del extracto), agitando 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 700 x g, durante 15 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y los precipitados se extrajeron nuevamente con metanol. El procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente se descartaron los precipitados y los sobrenadantes metanólicos se evaporaron a sequedad. El residuo obtenido se resuspendió en agua. Se tomaron alícuotas para bioensayo con la finalidad de observar si se había recuperado toda la actividad inicial.

Cromatografía de filtración molecular en gel.— Algunos extractos se sometieron, para su fraccionamiento, a cromatografía de filtración molecular (95, 106). Se utilizó una columna LKB, mod. 2137-026, conteniendo Sephadex G-25 fino o Sephadex G-15. En este procedimiento se utilizó un espectrofotómetro de flujo Uvicord S, un colector de fracciones Ultrorac 7000, y un graficador mod. 6520-7/8, todos de LKB.

Los parámetros y condiciones de cada corrida cromatográfica se hallan indicados en la sección de RESULTADOS.

Electroforesis en papel.—

a) **Electroforesis analítica a mediano voltaje.**— Se utilizó una celda tipo Durrum, marca Beckman, modelo R. La fuente de poder utilizada fue de marca Beckman, modelo Duostat. Las condiciones empleadas fueron las que a continuación se mencionan. El soporte empleado fueron tiras de papel Whatman 3 MM, de 3 x 31 cm, o bien tiras dobles de 6 x 31 cm; tiempo de saturación: 30 min; tiempo de corrida: 120 min a pH 1.8 y 100 min a pH 10.0; voltaje aplicado: 300 volts (9.6 v/cm).

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

b) Electroforesis preparativa a mediano voltaje.- En estos experimentos se utilizaron el mismo tipo de celdas y fuente de poder que en el caso de las electroforesis analíticas. Las condiciones también fueron las mismas, con la única diferencia que el soporte empleado fueron hojas de papel Whatman 3 MM, de 29 x 31 cm.

Después de cada corrida, se cortó un extremo de la hoja y se tiñó por el método deseado. Una vez identificadas las manchas, se recortaron tiras a lo ancho de la hoja y de ahí se procedió a extraer a las fracciones separadas.

c) Electroforesis preparativa a alto voltaje.- En esta técnica se empleó un tanque de electroforesis marca Savant, tipo Michl, modelo LT48, y una fuente de poder de alto voltaje, también Savant, modelo HV-5000. Las condiciones que se usaron fueron las que a continuación se mencionan. El soporte consistió en hojas de papel Whatman 3 MM, de 70 x 46 cm; tiempo de enfriamiento de la cámara: 60 min; tiempo de corrida: 120 min; voltaje: 1000 volts (14.2 v/cm); amortiguador de pH 1.8.

Después de la electroforesis se trató a las hojas en la forma en que se describe adelante.

Extracción a partir del papel.- El proceso de extracción de las diferentes bandas obtenidas después de la electroforesis preparativa consistió en lo siguiente: a lo largo de toda la hoja de papel se marcaron tiras transversales de 1 cm de grosor (ó 2 cm, dependiendo el caso). Se procedió a numerar las tiras de la forma que a continuación se menciona. Partiendo del origen, hacia el cátodo (polo negativo) se usó un signo "menos" (-) y el número correspondiente. Por ejemplo: (-1) significa que va desde 0 hasta -1 hacia el lado negativo; (-2) significa que va desde -1 hasta -2, y así sucesivamente. Hacia el ánodo (polo positivo) se usó el mismo tipo de numeración pero con un signo "más" (+).

Ya numeradas las tiras, se recortaron en pequeños pedacitos, los cuales se depositaron en adaptadores de plástico para tubos de centrifuga, a los que previamente se había colocado un poco de fibra de vidrio en el fondo, lavada según el método de Schwartz (114). Luego se embebieron los pedazos de papel con 1 ml de agua y se centrifugaron a 900 x g, 15 minutos, a 4°. Se efectuaron 5 lavados a cada tubo. Los filtrados correspondientes se reunieron y concentraron en el evaporador rotatorio o por liofilización hasta un volumen determinado.

Electroforesis analítica en capa delgada.- Se utilizó una cámara marca Camag, tipo Pastuska, modelo ECF6/TLE-69-E. La muestra se aplicó sobre placas de celulosa MN300 (Analtech), de 250 micras de espesor, de 20 x 20 cm.

La corrida se llevó a cabo durante 45 minutos, aplicando 500 volts (25V/cm), con el amortiguador de pH 1.8. Al finalizar la electroforesis se secó la placa con aire caliente durante 15 minutos, y luego a 60° en el horno, durante 30 minutos. Posteriormente se tiñó la placa por el método del cloro. Para mayores detalles consúltese (95).

Fraccionamiento de las muestras en Sep-Pak.- Algunos lotes, en la etapa de extracto crudo, se sometieron a una separación gruesa mediante quimioadsorción utilizando los cartuchos de Sep-Pak (Waters Associates) que contienen octadecilsilano (C₁₈) como material activo.

El procedimiento consistió en insertar a los cartuchos en jeringas de 10 ml y lavarlos con 10 ml de metanol absoluto con el fin de que se activaran. Luego, sin permitir que se secaran, se equilibraron con 10 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 5 mM en agua. En seguida se aplicó la muestra correspondiente y al terminar de pasar ésta se siguió lavando con TFA 5 mM en agua (10 ml). Posteriormente se lavó el cartucho con 10 ml de TFA 5 mM en metanol al 50%, e inmediatamente después se hizo un lavado con TFA 5 mM en metanol absoluto.

Se recogió cada uno de los lavados en tubos separados, y posteriormente se concentraron en el evaporador centrífugo al vacío con el fin de disminuir el volumen y eliminar completamente los restos de metanol y TFA.

Cromatografía líquida de alta presión (CLAP).- Los diversos experimentos de CLAP se llevaron a cabo en un aparato Altex, modelo 332, que posee dos bombas modelo 110A, con un microprocesador modelo 420, y un inyector de muestras modelo 210. Para la detección se utilizó un espectrofotómetro de flujo Uvicord S, de LKB. Los resultados se graficaron y analizaron en un integrador de datos Altex, modelo C-R1A.

Todas las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente, en columnas de fase reversa Ultrasphere-ODS, con dimensiones de 4.6 x 250 mm, con diámetro de partículas de 5 µm.

En el Anexo 1 se indican los programas utilizados durante los diversos experimentos de CLAP, y la forma en la que se introdujeron los datos en el microprocesador (ver pag. 141).

En todos los casos las soluciones que se utilizaron en la CLAP fueron previamente filtradas a través de membranas de 0.22 µm (Millipore), y desgasificadas en un baño ultrasónico (Branson) con aplicación de vacío.

Todas las muestras que se cromatografiaron fueron filtradas en membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm, en dispositivos de plástico (BioAnalytical Systems) que permiten la filtración durante un período de centrifugación, con el fin de eliminar cualquier partícula precipitada que pudiera interferir gravemente en el desempeño de las cromatografías.

Digestiones enzimáticas.- Se incubaron alícuotas de las fracciones que mostraron actividad neurodepresora, en distintas etapas de purificación con las siguientes enzimas proteolíticas: pronasa B (Calbiochem), proteinasa K

(Sigma) y tripsina TPCK (Sigma).

Se preparó una solución de tripsina TPCK (1 mg/ml) en amortiguador de NH_4HCO_3 30 mM, pH 8.0. También se hizo una solución de proteinasa K (1 mg/ml) en NH_4HCO_3 30 mM, pH 7.7. La pronasa B se preparó en una solución de 1 mg/ml en NH_4HCO_3 30 mM, pH 7.7. En algunos experimentos se utilizó una solución de pronasa B (1 mg/ml) en solución de Van Harrevel, pH 7.5.

El procedimiento general para las incubaciones fue el siguiente: la muestra se disolvió en 200 ul del amortiguador indicado, y se agregaron 50 ul de la solución de enzima correspondiente. Se incubó a 37°, durante 4 hrs, agitando los tubos cada hora. La reacción fue detenida por inactivación con calentamiento a 75°, 3 min, y luego se enfrió rápidamente en agua con hielo para precipitar a la proteína desnaturalizada. (En algunas ocasiones se prefirió detener la reacción agregando 10 ul de ácido fórmico al 88%). Luego se centrifugaron los tubos a 5000 rpm (microfuga Beckman) durante 10 min, y los sobrenadantes se evaporaron a sequedad. En todos los casos se determinó el efecto de la digestión enzimática sobre la actividad neurodepresora utilizando al bioensayo.

Determinación de actividad de la tripsina.- Se siguió la técnica descrita en el manual de enzimas de Worthington (115), con las siguientes modificaciones: el sustrato usado fue α -N-benzoyl-arginil-etil-éster HCl (BAEE) (Sigma), el pH fue de 7.6, el volumen final de reacción fue de 3.2 ml, y la longitud de onda utilizada fue de 253 nm.

Determinación de actividad de proteinasa K y pronasa B.- Se siguió el método de Laskowski (116).

Determinación cualitativa de la actividad de las proteasas.- En los experimentos de digestión enzimática llevados a cabo durante las diferentes etapas de purificación de la actividad neurodepresora, se incluyeron una serie de controles para asegurar que las enzimas se encontraban activas, en donde se observaba dicha actividad en forma cualitativa. Tales controles consistieron en lo siguiente: se incubó caseína al 1% en NH_4HCO_3 30 mM, pH 7.7 (o en solución de Van Harrevel) en presencia o ausencia de la enzima proteolítica que estaba siendo usada. En otra serie, a esta mezcla se le adicionó una alícuota de la fracción del extracto, para ver si éste podría, per se, inhibir la actividad enzimática. La digestión enzimática se realizó en las mismas condiciones ya descritas (ver arriba), y al final de la incubación se agregaron 50 ul de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (ó 10 ul de HCOOH al 88%).

En los controles que no tenían enzima se obtuvo un precipitado blanco abundante correspondiente a la caseína desnaturalizada, mientras que aquellos que se incubaron con la enzima no mostraron ningún precipitado.

Dansilación.- Se siguió el método de Gray y Hartley (117) con algunas pequeñas modificaciones (118). La técnica se desarrolló así:

- Se utilizaron tubos de vidrio de 6 x 50 mm.
- Se cubrieron los tubos con papel aluminio.

- Se colocaron alícuotas de la muestra y se evaporaron a sequedad con corriente de nitrógeno.
- Se resuspendió el residuo en 5 ul de NaHCO_3 0.05 M, pH 10.0 (ajustado con NaOH).
- Se agregaron 5 ul de acetona.
- Se agregaron 10 ul de una solución de DNS-Cl 0.01 M en acetona.
- Se incubó a 37° , 30 minutos.
- Se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno.
- Se resuspendió en 10 ul de la mezcla acetona:ác. acético (3:2, v/v).
- Se hicieron aplicaciones en punto sobre placas de poliamida (Analtech) de 3 x 3 cm, con micropipetas alargadas a la flama.
- Se corrieron microcromatografías bidimensionales en cualquiera de los dos siguientes sistemas de solventes:
 - Sistema A: 1a. dimensión = ác. fórmico:agua (1.5:100, v/v).
 - 2a. dimensión = benceno:ác. acético (4.5:1, v/v).
 - Sistema B: 1a. dimensión = ác. fórmico:agua (1.5:100, v/v).
 - 2a. dimensión = n-butanol:heptano:ác. acético (3:3:1, v/v/v).
- Se secaron las placas con el calor de un foco de 100 watts y posteriormente con una corriente de aire frío y luego aire caliente.
- Se observaron las placas bajo luz UV y se identificaron las manchas fluorescentes.

Determinación del grupo $-\text{NH}_2$ terminal.- Después de dansilar a un péptido por el método descrito arriba, los productos dansilados se disolvieron en HCl 6 N, y se sometieron a hidrólisis durante 24 hrs, a 110° , después de haber sellado los tubos a la flama.

Después de la hidrólisis se evaporó el HCl con corriente de nitrógeno (in vacuo), se resuspendió el contenido del tubo en 25 ul de agua y nuevamente se evaporó; esta operación se realizó tres veces. Luego se resuspendió en 10 ul de la mezcla acetona:ác. acético (3:2, v/v) y se hicieron aplicaciones en punto sobre las placas de poliamida. Se corrieron las cromatografías en alguno de los sistemas de solventes señalados. De esta forma se pudo obtener la identificación del grupo amino terminal de un péptido.

Determinación cualitativa de la composición de aminoácidos.- Se tomó el remanente del producto hidrolizado (véase párrafo anterior), y se sometió nuevamente a una dansilación, siguiendo el mismo procedimiento que se describió anteriormente. Al observar las placas bajo la luz UV se obtiene la composición de aminoácidos del péptido original.

De esta forma, con una sola muestra (generalmente 2 a 3 nanomoles) de material, se pueden obtener tres datos: 1) la visualización del DNS-péptido, para ver si se encuentra puro; 2) la identificación del grupo amino terminal; y 3) la composición de aminoácidos del péptido.

Determinación enzimática de GABA.— El contenido de GABA de algunas fracciones se analizó mediante una técnica enzimática, utilizando la preparación comercial de Gabasa (Sigma), obtenida de *Pseudomonas fluorescens*. El principio del método consiste en la medición del NADPH producido cuando el GABA es metabolizado a succinato por la preparación enzimática bacteriana (119,120,121). Con el fin de aumentar la sensibilidad de la determinación, el NADPH se oxidó químicamente a NADP y se midió fluorométricamente, siguiendo la técnica de Lowry y cols. (122).

Las determinaciones de GABA fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Ricardo Tapia, del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, de la UNAM.

Determinación de Taurina.— Algunas muestras fueron analizadas para ver su contenido de taurina, siguiendo el método de Gaitonde y cols. (123). La Tau se separó mediante cromatografía de intercambio iónico en Dowex 50W-X8 y Dowex 1-X8, y luego se hizo reaccionar con ortoftalaldehído en presencia de urea y de iones fosfato. Se acidificó la mezcla con ácido acético y se formó un producto morado que se leyó a 560 nm.

Estas determinaciones se hicieron en el laboratorio de la Dra. Herminia Pasantes-Morales, del CIFIC, de la UNAM.

R E S U L T A D O S

A continuación se describen, en forma secuencial, los resultados obtenidos con cada uno de los diferentes lotes a partir de los cuales se intentó purificar y caracterizar a la hormona neurodepresora (HND) de Penaeus vannamei (Boone).

En cada uno de ellos se trató de aprovechar la experiencia adquirida en lotes anteriores (consúltese 95,106) con el fin de alcanzar el objetivo deseado en menor tiempo y con menor número de pasos en el esquema de purificación. Esta es la razón por la cual se encontrarán algunas modificaciones introducidas en cada lote.

Como se podrá observar a lo largo de la exposición de estos resultados, los datos proporcionados por cada lote conducen a la misma conclusión.

LOTE P-19.- Se empezó con alrededor de 6000 tallos oculares (t.o.) congelados de Penaeus vannamei (Boone), los cuales se molieron en las condiciones descritas y se extrajeron los polvos con agua como ya se ha mencionado (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 26). En total se utilizaron 3 l de agua, los cuales fueron concentrados hasta 250 ml. Este material se dializó contra agua en la forma indicada (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 28). El dializado obtenido ocupó un volumen de 6 l, el cual se concentró en el evaporador rotatorio hasta 54 ml, que constituyeron el extracto crudo. Por bioensayo (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 25) se determinó que se había recuperado toda la actividad neurodepresora.

El extracto crudo (6000 t.o.) se empezó a purificar por el método tradicional (95), cromatografiándose en una columna de Sephadex G-25 fino, bajo las condiciones que se mencionan en el pie de la figura N° 1. El extracto se dividió en cinco partes y se cromatografió cada una por separado. La actividad se localizó por bioensayo, tomando alícuotas de 100 ul de cada tercer tubo.

En este experimento se obtuvieron los siguientes resultados:

Extracto crudo (P-19)	Volumen de elución de la actividad neurodepresora
12 ml (1330 t.o.)	368-456 ml
12 ml (1330 t.o.)	368-456 ml
12 ml (1330 t.o.)	368-448 ml
12 ml (1330 t.o.)	376-456 ml
6 ml (660 t.o.)	352-424 ml

En la figura N° 1 se observa una gráfica representativa de las obtenidas en esta serie. Se colectaron las fracciones activas y se concentraron hasta 20 ml. Se denominó a este extracto P-19,1SG25.

El extracto P-19,1SG25 se cromatografió nuevamente en la misma columna, disminuyendo el flujo con el fin de mejorar la resolución y permitir que se separaran más sus componentes. Las condiciones de la cromatografía se muestran en el pie de la figura N° 2. El extracto se dividió en dos partes que se cromatografiaron por separado. Al final de las cromatografías se tomaron alícuotas de 100 ul de cada tercer tubo y se buscó la actividad neurodepresora por bioensayo, obteniéndose los siguientes resultados:

Extracto P-19,1SG25	Volumen de elución de la actividad neurodepresora
10 ml (3000 t.o.)	330-418 ml
10 ml (3000 t.o.)	352-451 ml

En la figura N° 2 se muestra una gráfica representativa de estas cromatografías. Las fracciones activas se concentraron hasta 8.5 ml y se denominó a este extracto P-19,2SG25.

Luego se procedió a cromatografiar al extracto P-19,2SG25 por una columna de Sephadex G-15, bajo las condiciones que se indican en el pie de la figura N° 3, en la cual se muestra la gráfica obtenida en este paso. Las fracciones activas, encontradas por bioensayo, se concentraron hasta 7 ml. A esta fracción se le denominó P-19,1SG15.

Este último extracto se recromatografió en la misma columna, bajo las condiciones que se muestran en el pie de la figura N° 4. Como se puede observar en dicha figura la actividad neurodepresora eluyó entre 310-344 ml. Las fracciones activas se concentraron hasta 2 ml, y se denominó a este extracto P-19,1SG15.

Por bioensayo se demostró que la actividad biológica se había recuperado en su totalidad después de estos pasos de purificación.

Aprovechando la experiencia obtenida con lotes anteriores (106), se decidió proseguir la purificación de la fracción P-19,2SG15 directamente por cromatografía.

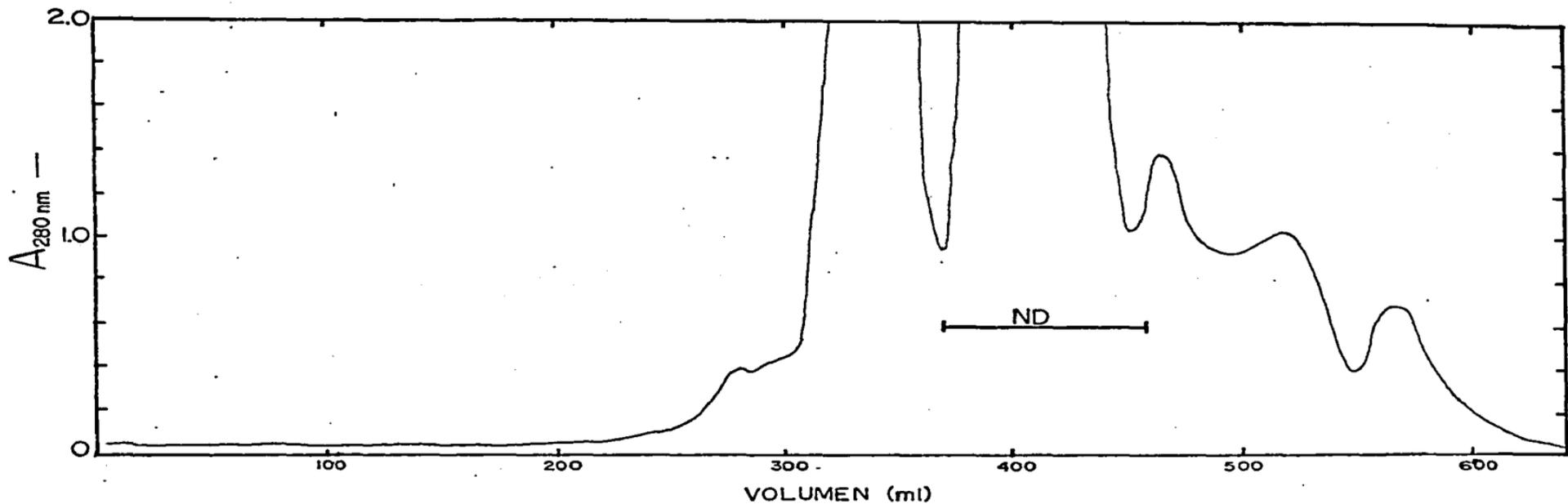


Figura N° 1.- 1ª cromatografía en Sephadex G-25 fino. Lote P-19, equivalente a 1330 t.o. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 20 ml/hr; volumen de cada fracción: 8 ml. La elución con agua. ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. En la referencia (95) se puede encontrar una cromatografía analítica que permite visualizar todos los componentes de este extracto.

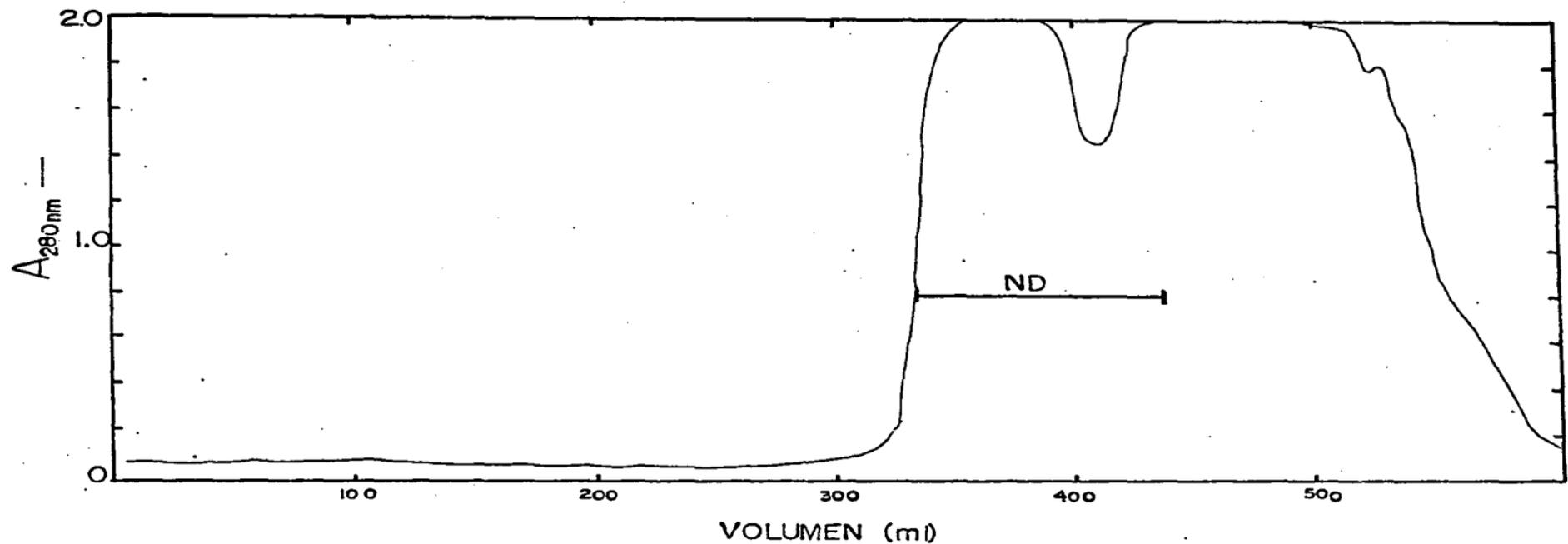


Figura N° 2.- 2ª cromatografía en Sephadex G-25 fino. Extracto P-19,15G25, equivalente a 3000 t.o. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 11 ml/hr; volumen de cada fracción: 11 ml. La elución se hizo con agua. ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil.

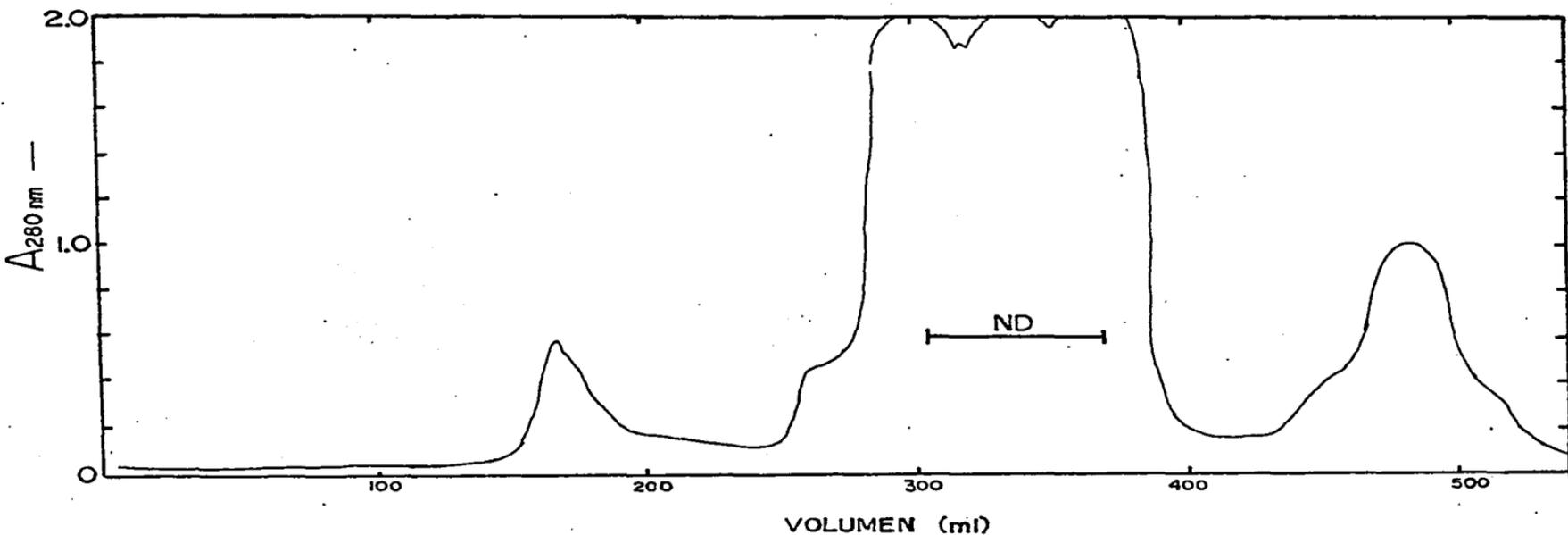


Figura N° 3.- 1ª cromatografía en Sephadex G-15. Extracto P-19,2SG25, equivalente a 6000 t.o. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 11 ml/hr; volumen de cada fracción: 5.5 ml. La elución se hizo con agua. ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil.

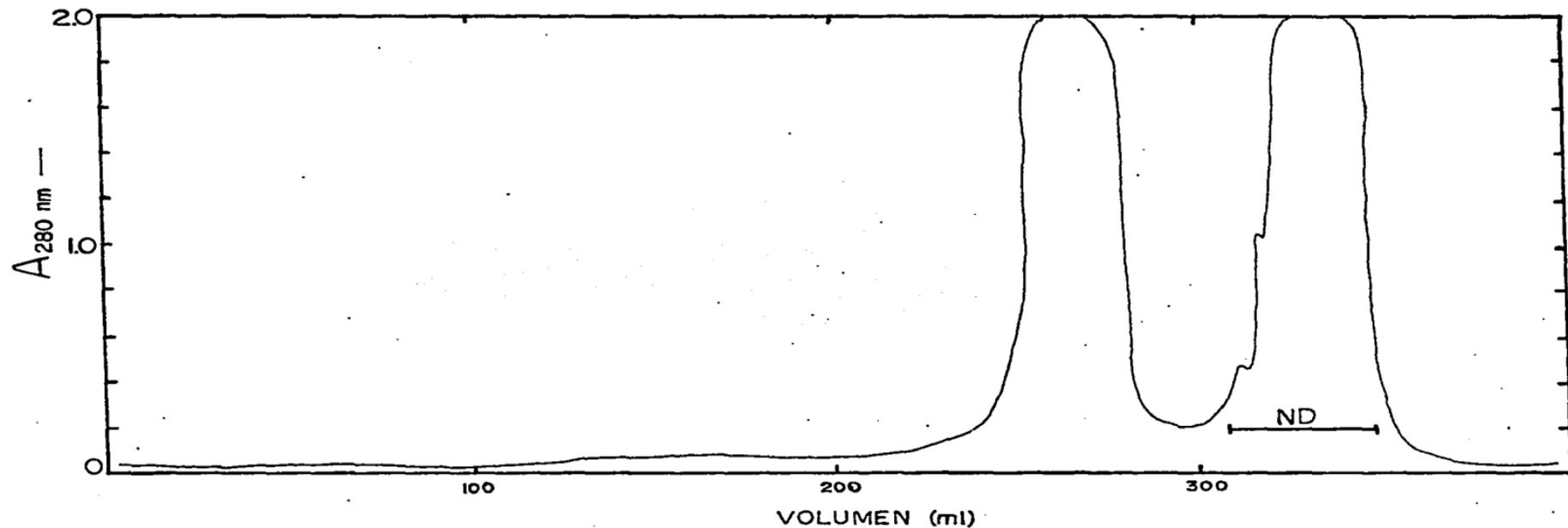


Figura N^o 4.- 2^a cromatografía en Sephadex G-15. Extracto P-19.1SG15, equivalente a 6000 t.o. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 8.5 ml/hr; volumen de cada fracción: 3.3 ml. La elución se hizo con agua. ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil.

tografía líquida de alta presión (CLAP), bajo las condiciones del programa 2 (ver ANEXO 1, pág. 142). Las condiciones de esta serie de experimentos se encuentran indicados en el pie de la figura N° 5. Se concentraron las fracciones evaporando el metanol y el TFA en el evaporador centrífugo al vacío (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 28), y una vez resuspendidas en agua, se tomaron alícuotas para el bioensayo con el fin de localizar a la actividad biológica.

En la figura N° 5 se observa una gráfica representativa de esta serie de corridas. En todos los casos la actividad neurodepresora se localizó en la primera fracción que se recogió. A esta fracción se le llamó P-19,2SG25,CLAP₁.

Se reunieron las fracciones activas de las diferentes corridas y se concentraron hasta sequedad. El bioensayo indicó que se había recuperado toda la actividad neurodepresora original. Dado que la fracción P-19,2SG25,CLAP₁ mostró una gran cantidad de sales, se decidió desalificarla, utilizando metanol absoluto, en la forma que se indicó previamente (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 28). Los sobrenadantes se concentraron para eliminar al metanol y se resuspendió el residuo en agua. Nuevamente el bioensayo mostró que la recuperación de la actividad neurodepresora había sido total. Se denominó a este extracto como P-19,2SG15,CLAP₁d.

Se decidió volver a pasar a esa muestra por CLAP en la columna de fase reversa, utilizando el programa 3 (ver ANEXO 1, pág. 142). En la figura N° 6 se ve una gráfica representativa de todas las cromatografías de esta serie. Todas estas corridas se resolvieron en cinco fracciones, las cuales fueron denominadas α , β , γ , δ y ϵ . Se reunieron los tubos correspondientes a cada fracción y se concentraron. El bioensayo indicó que la actividad neurodepresora se encontraba en forma mayoritaria en la fracción correspondiente al pico δ , y un poco en el pico γ .

A la fracción del pico δ se le llamó P-19,2SG15,CLAP₁d₂ δ y se observó que ésta, por primera vez, parecía retenerse un poco en la columna de fase reversa, pues eluyó alrededor de 9-10 minutos después de la inyección.

Se tomó a la fracción P-19,2SG25,CLAP₁d₂ δ y se volvió a cromatografiar en la misma columna, bajo las mismas condiciones. La única variación fue que se aumentó el nivel de sensibilidad del registro a 0.1 AUFS. El perfil obtenido en esta serie de cromatografías se ve en forma representativa en la figura N° 7. El bioensayo mostró que la actividad neurodepresora se localizaba en los picos 2, 3 y 4; estos datos coincidieron con el resultado de las cromatografías anteriores y confirmaron que la actividad neurodepresora, una vez desalificada, eluía hasta el minuto 9-10 después de la inyección de la muestra.

La fracción P-19,2SG15,CLAP₁d₂ δ se cromatografió otra vez por CLAP, en fase reversa, bajo las condiciones del programa 4 (ver ANEXO 1, pág. 143). Como se puede apreciar en la figura N° 8, representativa de esta serie de experimentos, se obtuvieron, además de los picos debidos al artificio de inyección, dos picos que no aparecieron en la corrida control (blanco de solventes). Uno de ellos, el que eluyó al principio sin retenerse en la columna, se denominó fracción P-19,2SG15,CLAP₁d₂ δ 3₁, (B-1); y el otro que se retuvo muy ligeramente en la columna, se denominó P-19,2SG25,CLAP₁d₂ δ 3₅, (B-5).

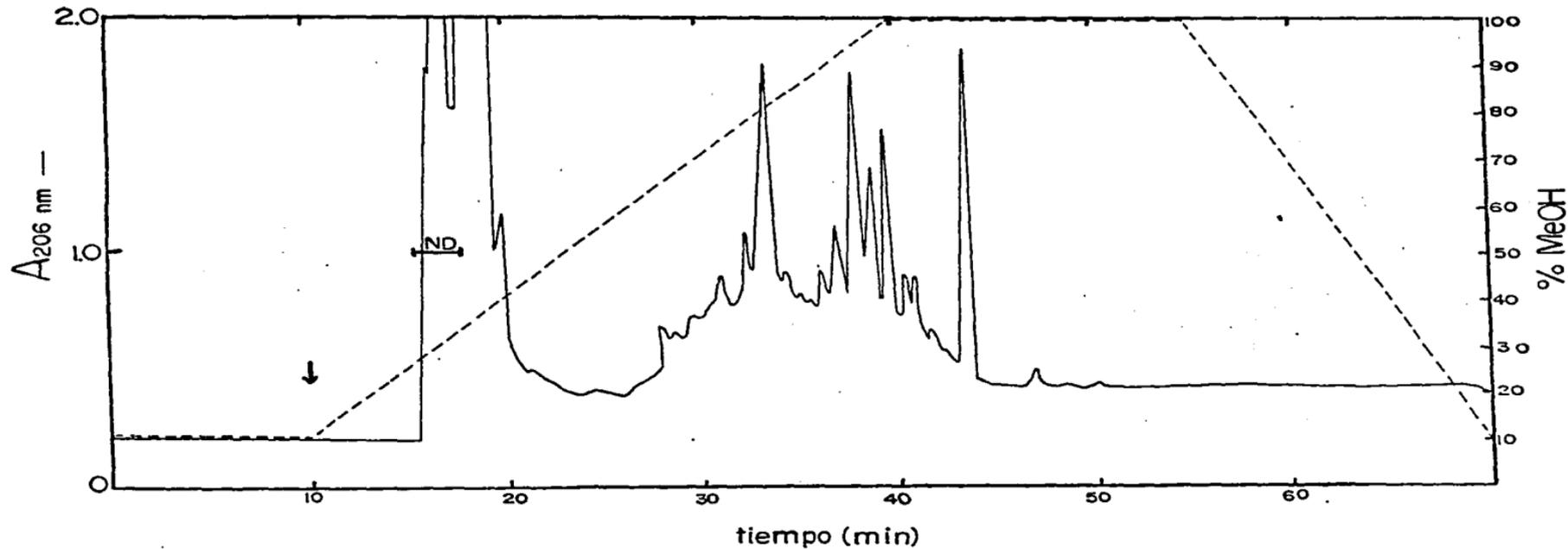


Figura N° 5.- CLAP de la fracción P-19,2SG15, equivalente a 600 t.o. Programa 2 (ver ANEXO I, pág. 142). Solvente A: TFA 5 mM en metanol al 10%, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

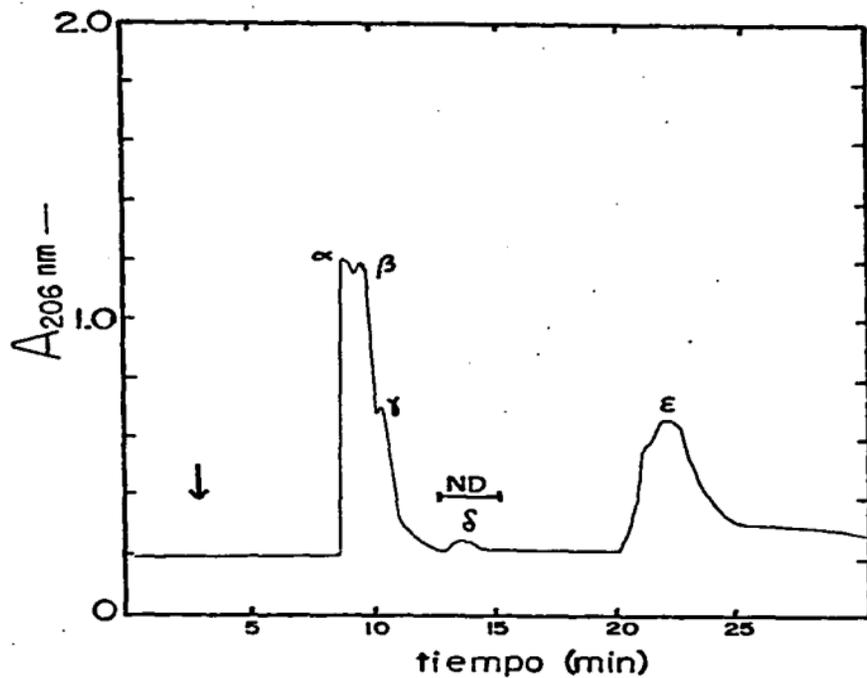


Figura N° 6.- CLAP de la fracción P-19,2SG15-CLAP₁d. Programa 3 (ver ANEXO 1, pág. 142). Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se colectó por picos. ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

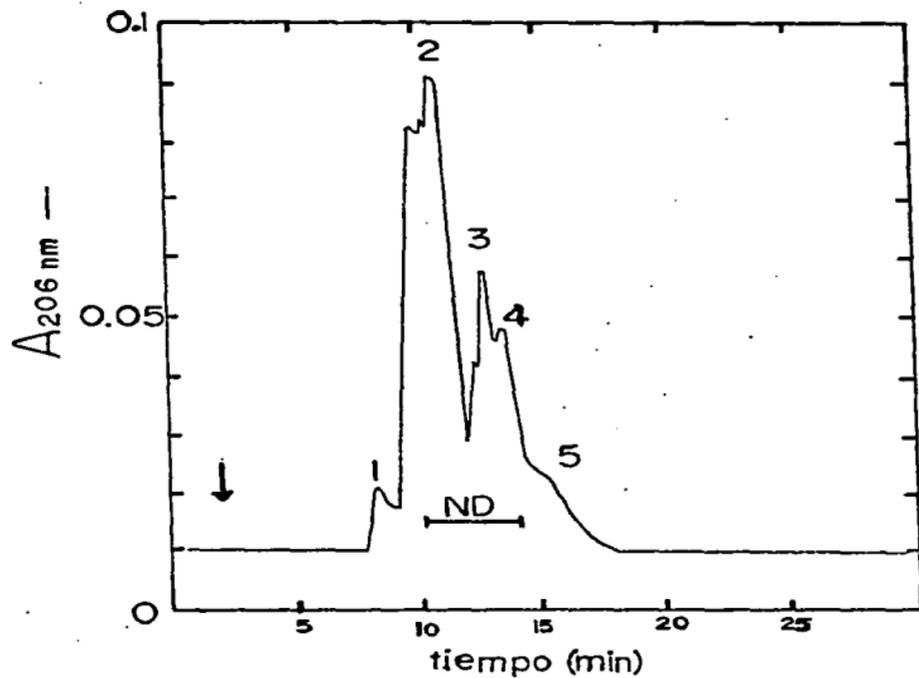


Figura N° 7.- CLAP de la fracción P-19,2SG15-CLAP1, d2g. Programa 3 (ver ANEXO 1, pág. 142). Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se colectó por picos. ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

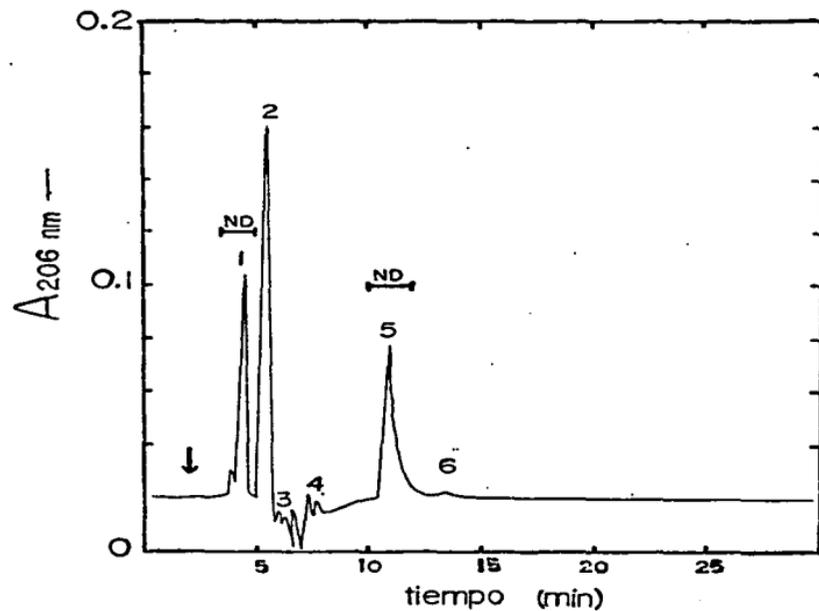


Figura N° 8.- CLAP de la fracción P-19,2SG15-CLAP1, d2g. Programa 4 (ver ANEXO 1, pág. 143). Solvente A: TEAF 10 mM, pH 3.5. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se colectó por picos. ND: fracciones que presentaron actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acicil. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

El bioensayo mostró que había actividad neurodepresora en los tubos B-1 y B-5. Esta serie de experimentos confirmaron que se podían separar por CLAP dos fracciones, provenientes de los t.o. de Penaeus vannamei (Boone), que provocaban un efecto neurodepresor sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal de Procamburus clarkii (Girard).

A continuación se realizaron cromatografías analíticas de los dos picos obtenidos en el paso anterior, que mostraron actividad biológica, para ver si se encontraban perfectamente separados el uno del otro. Se aplicó una cantidad pequeña de cada uno y se cromatografiaron bajo las mismas condiciones. En la figura N° 9 se observa el resultado de la cromatografía del pico B-1. Como se puede observar, apareció en la misma posición que antes, es decir no retenido en la columna, y un poco antes del artificio de inyección que se observó también en el blanco de solventes. No se apreció ningún pico en la zona de B-5.

La figura N° 10 por su parte, muestra el cromatograma obtenido cuando el pico B-5 se cromatografió en las mismas condiciones. Como se puede apreciar nuevamente se observó un pico en el minuto 9-10 posterior a la inyección, correspondiente a B-5, mientras que en la zona de B-1 no se observó prácticamente nada.

Otra vez, la actividad biológica recayó en estos dos picos, y la recuperación fue cuantitativa.

Los tubos correspondientes a cada fracción (B-1 y B-5) se concentraron a sequedad, eliminando los restos de formiato de trietilamina (TEAF), y finalmente se resuspendieron en 200 ul de agua, quedando a una concentración de 30 t.o./ul.

Debe mencionarse que una vez que se purificaron ambas fracciones, por la metodología ya descrita, su actividad biológica empezó a decaer rápidamente, y al cabo de dos semanas su identificación biológica se hizo muy confusa, pues los resultados del bioensayo ya no fueron claros.

A diferencia de lo que pasaba durante casi todo el proceso de purificación, en donde la actividad biológica se mostró siempre muy estable, cuando se llegó al último paso de CLAP, al separar a B-1 y B-5, la actividad de éstos desapareció muy rápidamente.

Puesto que en esta preparación se encontraron dos picos con actividad neurodepresora (B-1 y B-5), lo cual no se había observado anteriormente en otros lotes, y dado que este extracto no pasó por electroforesis en ninguna parte del proceso de purificación, tal como se hacía antes (95), se decidió realizar una electroforesis analítica en capa delgada para ver si se observaba en alguna de las fracciones algún comportamiento diferente a lo ya establecido, o bien para ver si se comportaban en forma semejante.

Las condiciones de la electroforesis fueron las que ya se mencionaron (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 29), y se realizó a pH 1.8. Se corrieron alí-

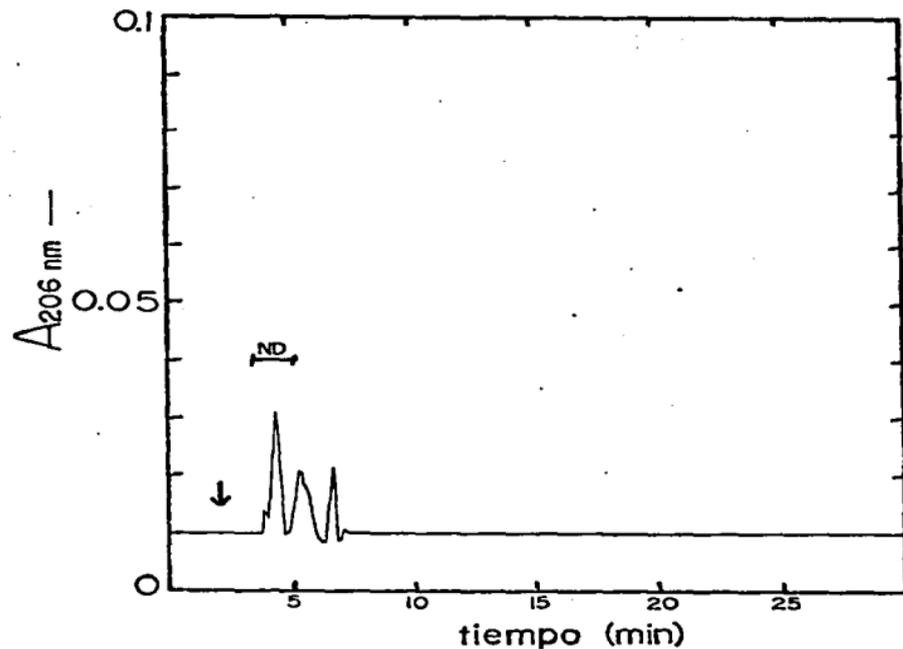


Figura N° 9.- CLAP analítica de la fracción P-19 B-1: Programa 4 (ver ANEXO 1, pág. 143). Solvente A: TEAF 10 mM, pH 3.5. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μm (4.6 x 250 mm). Se colectó por picos. ND: fracción que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de la inyección. Los últimos picos corresponden al arteificio de inyección y también aparecen en el blanco.

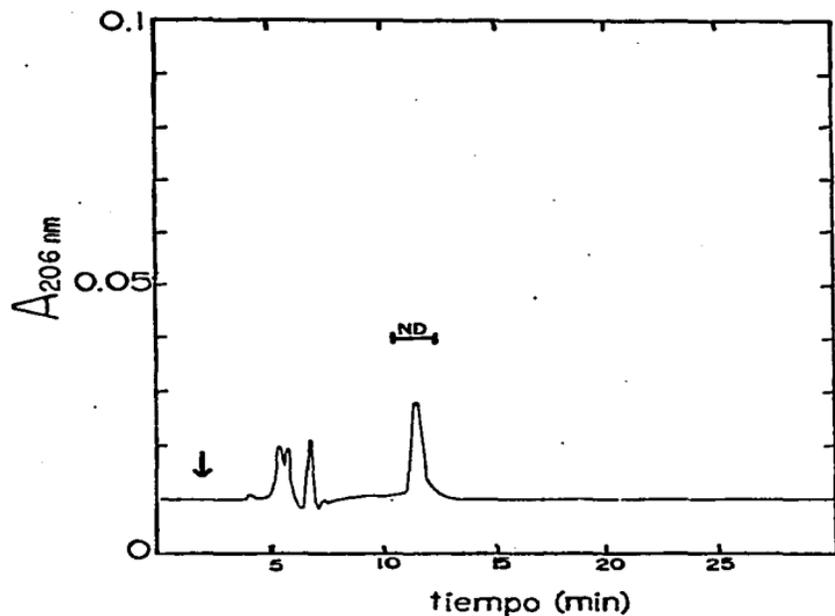


Figura N° 10.- CLAP analítica de la fracción P-19 B-5. Programa 4 (ver ANEXO 1, pág. 143). Solvente A: TEAF 10 mM, pH 3.5. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se colectó por picos. ND: fracción que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de la inyección. Los primeros picos corresponden al artificio de inyección y también aparecen en el blanco.

cuotas de B-1 y B-5 (correspondientes a 150 t.o.) y además se colocó un patrón de GABA (5 ug) para observar su comportamiento en estas condiciones. En la figura N° 11 se puede observar el resultado de este experimento. La tinción con cloro (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 24) mostró únicamente una mancha correspondiente al GABA, a -6.5 cm alejada del origen, es decir que corrió hacia el ánodo, tal como se esperaría por las condiciones ácidas empleadas.

Sin embargo, no apareció ninguna mancha correspondiente a B-1 ni a B-5 en ninguna parte de la placa. Este hecho se interpretó como que probablemente había tan poco material de cada uno, que la técnica no fue lo suficientemente sensible como para detectarlas.

En vista de que ambos picos parecían estar limpios, por el criterio de CLAP, y supuesto que la cantidad existente de ellos era muy reducida (de acuerdo a los resultados del experimento anterior), se decidió no gastar mayor cantidad de material en otras pruebas, sino que se iba a emplear para tratar de averiguar su composición química.

Con este fin se optimizó la técnica de dansilación (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 31). Inicialmente se corrieron los diferentes patrones de DNS-aminoácidos (DNS-aa) por separado, para confeccionar un mapa de todos ellos sobre las placas de poliamida, al mismo tiempo de conocer sus migraciones cromatográficas bajo las condiciones empleadas. En la figura N° 12 se puede observar el mapa que se obtuvo y que incluye a 31 DNS-productos.

A continuación se tomaron como controles positivos al péptido S de la ribonucleasa y a la cadena A de la insulina (bovina). Se colocaron 3 nanomoles de cada uno en tubos separados, y un blanco de reactivos. Con este material se trató de obtener la siguiente serie de datos: a) visualizar al DNS-péptido, para ver si se encontraba puro; b) identificar al grupo amino terminal; y c) conocer la composición de aminoácidos del péptido.

En la figura N° 13 se pueden apreciar los resultados de la dansilación inicial. En el caso del blanco de reactivos sólo se observaron DNS-OH y DNS-NH₂ que son los subproductos de la reacción. En el caso del péptido S de la ribonucleasa y de la cadena A de la insulina, además de los subproductos mencionados, se observaron sendas manchas con fluorescencia amarilla en el punto de aplicación, lo que indicaba que ambos péptidos se habían dansilado y que, dado su tamaño, no habían sido capaces de migrar en las condiciones cromatográficas empleadas. El hecho de que apareciera una sola mancha sugería que ambos péptidos se encontraban puros y que no había productos de degradación. Debe mencionarse que de los 10 ul en que se había resuspendido el material dansilado, solamente se hicieron 15 aplicaciones con la micropipeta, lo que equivale a 0.5 ul; por lo tanto, se estaban visualizando alrededor de 150 picomoles del DNS-péptido.

Posteriormente, se evaporó con corriente de nitrógeno el contenido de los tubos y se hizo una hidrólisis ácida para identificar al grupo amino terminal

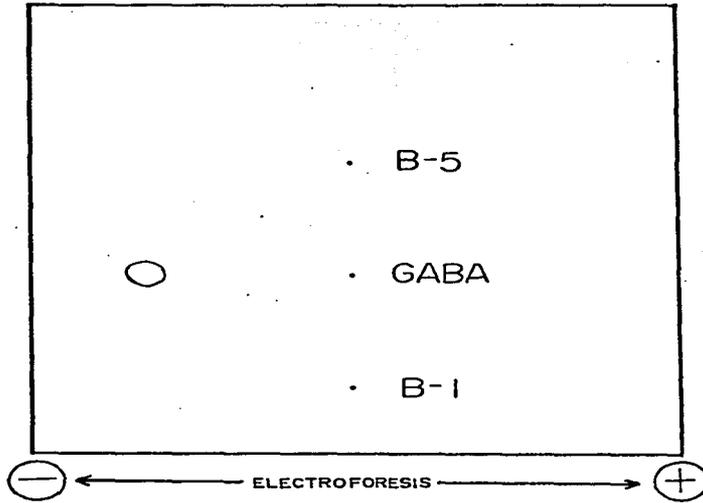


Figura N° 11.- Electroforesis analítica en capa delgada. Se corrieron 150 t.o. de la fracción B-1, 150 t.o. de la fracción B-5 y 12 ug de GABA, los cuales se aplicaron en el origen (puntos en el esquema). Placa de celulosa MN300; amortiguador: ác. fórmico:ác. acético: agua (1:4:45,v/v/v), pH 1.8; tiempo de corrida: 45 min; voltaje: 500 v. Tinción por el método del cloro.

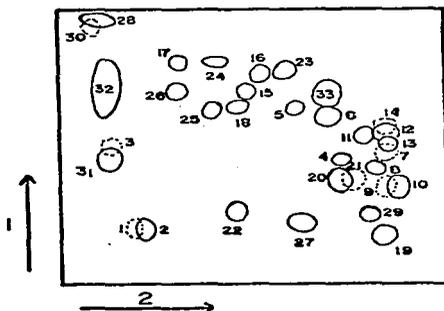


Figura N° 12.- Mapa general de DNS-aminoácidos. Cromatografía en placas de poliamida (3 x 3 cm); 1ª dimensión: ác. fórmico:agua (1.5:100,v/v); 2ª dimensión: benceno:ác. acético (4.5:1,v/v). 1) DNS-Cys; 2) DNS-cistina; 3) DNS-CysSO₃; 4) DNS-Met; 5) DNS-Gly; 6) DNS-Ala; 7) DNS-Val; 8) DNS-norVal; 9) DNS-Leu; 10) DNS-Ile; 11) DNS- α -NH₂-butírico; 12) DNS-GABA; 13) DNS-Pro; 14) DNS- β -Ala; 15) DNS-OH-Pro; 16) DNS-Thr; 17) DNS-Ser; 18) DNS-Tyr; 19) N,O,di-DNS-Tyr; 20) DNS-Phe; 21) DNS- β -Phe; 22) DNS-Trp; 23) DNS-Gln; 24) DNS-Asn; 25) DNS-Glu; 26) DNS-Asp; 27) di-DNS-Lys; 28) ϵ -DNS-Lys; 29) DNS-His; 30) DNS-Arg; 31) DNS-Tau; 32) DNS-OH; 33) DNS-NH₂. Algunos DNS-productos se muestran con líneas punteadas para favorecer su identificación.

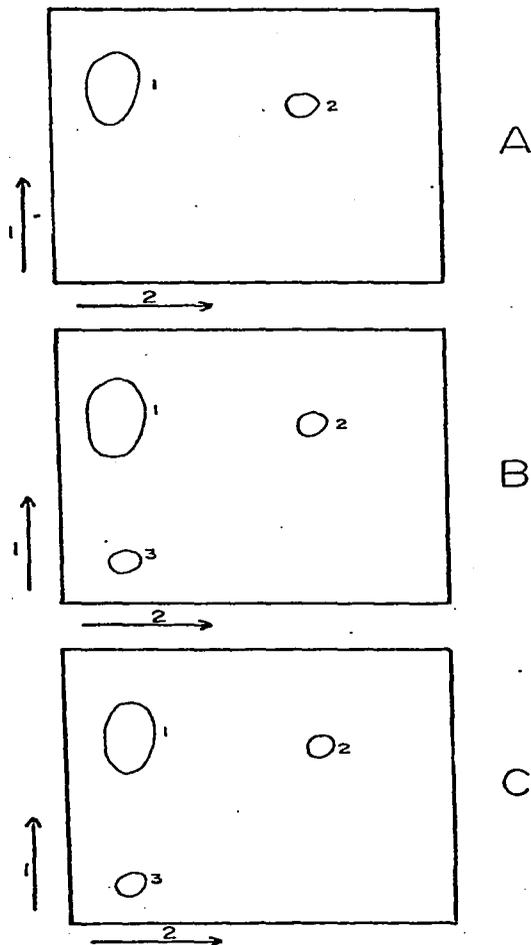


Figura N° 13.- Densificación. A) Blanco de reactivos; B) 3 nmoles de cadena A de la insulina; C) 3 nmoles de péptido S de la ribonucleasa. 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-péptido. Cromatografía en placas de poliamida (3 x 3 cm); 1ª dimensión= ác. fórmico:agua (1.5:100,v/v); 2ª dimensión= benceno:ác. acético (4.5:1,v/v).

(ver MATERIAL Y METODOS, pág. 32). Después de correr las cromatografías se obtuvo el resultado que se observa en la figura N° 14. En el caso del blanco de reactivos sólo se observaron DNS-OH y DNS-NH₂. En el caso del péptido S de la ribonucleasa, además de éstos, se observaron di-DNS-Lys y ε-DNS-Lys. Este resultado implica que Lys es el grupo amino terminal del péptido, y que además existe alguna otra Lys interior. En cuanto a la cadena A de la insulina se observaron, aparte de los subproductos, DNS-Gly y O-DNS-Tyr, lo que quiere decir que Gly es el grupo amino terminal y que existe alguna Tyr interior.

Se evaporó otra vez el contenido de los tubos y se sometió su contenido a una nueva dansilación, con el fin de obtener la composición de aminoácidos (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 32). La figura N° 15 nos muestra el resultado de los productos de la hidrólisis y dansilación.

En el caso del blanco de reactivos se observó, además de los subproductos normales, una mancha tenue correspondiente a DNS-Gly. Este hecho se explica sabiendo que el ácido acético contiene a Gly como contaminante, por lo que después de haber evaporado la mezcla de acetona:ác. acético, y al hacer la segunda dansilación, es de esperarse que se encontrara este resultado.

Por lo que respecta al péptido S de la ribonucleasa se observaron los siguientes productos: DNS-Arg, DNS-Ser, DNS-Thr, DNS-Asp, DNS-Glu, DNS-Ala, DNS-Phe, DNS-Met, di-DNS-Lys y DNS-His. Esta composición de aminoácidos corresponde muy bien con lo que se conoce de la estructura primaria de este péptido, que es la siguiente:

Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser-Ser-Thr-Ser-Ala-Ala

Por supuesto la Gln aparece como DNS-Glu debido a la desamidación que se produce durante la hidrólisis ácida.

En cuanto a la cadena A de la insulina se observaron los siguientes productos: DNS-Ser, DNS-Asp, DNS-Glu, DNS-Gly, DNS-Val, DNS-Leu/DNS-Ile, DNS-CysSO₃ y N,O-di-DNS-Tyr. Esta composición concuerda con la estructura primaria de éste péptido, que es la siguiente:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Ala-Ser-Val-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn

Los resultados mostraron que la técnica estaba optimizada, por lo que se decidió aplicarla con las fracciones B-1 y B-5 que se habían obtenido por CLAP. Se utilizó el equivalente a 1000 t.o. de cada uno de ellos. Se colocó también un blanco de reactivos como control negativo y al péptido S de la ribonucleasa como control positivo.

La dansilación directa del material produjo los siguientes resultados, que se muestran en la figura N° 16: el blanco mostró DNS-OH y DNS-NH₂, como siempre. En la placa correspondiente a B-1 sólo se observó DNS-OH, al igual que en la correspondiente a B-5. Este dato indicó que no había ningún grupo dan-

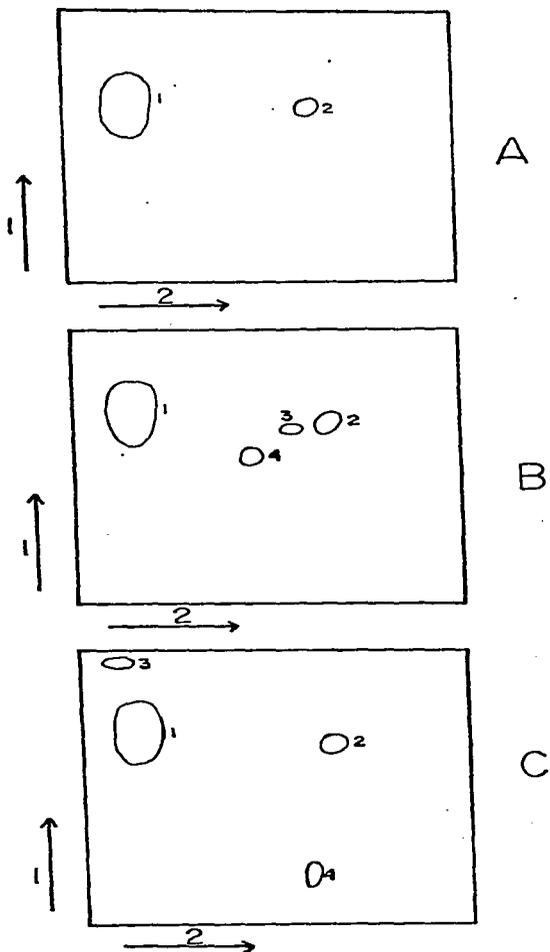


Figura N° 14.- Dansilación e hidrólisis. A) Blanco de reactivos; 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; B) Cadena A de la insulina: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-Gly; 4) O-DNS-Tyr. C) Péptido S de la ribonucleasa: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) ε-DNS-Lys; 4) di-DNS-Lys. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se indicaron en la Fig. N° 13.

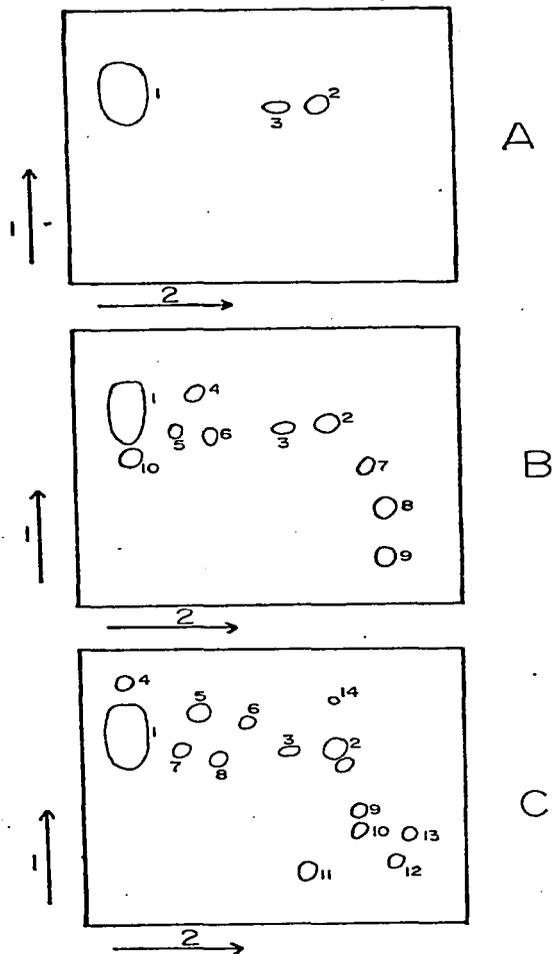


Figura N° 15.- Hidrólisis y dansilación. A) Bco. de reactivos: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-Gly. B) Cadena A de la insulina: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-Gly; 4) DNS-Ser; 5) DNS-Asp; 6) DNS-Glu; 7) DNS-Val; 8) DNS-Leu/11e; 9) N,O, di-DNS-Tyr; 10) DNS-CysSO₃. C) Péptido S de la ribonucleasa: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-Gly; 4) DNS-Arg; 5) DNS-Ser; 6) DNS-Thr; 7) DNS-Asp; 8) DNS-Glu; 9) DNS-Met; 10) DNS-Phe; 11) di-DNS-Lys; 12) DNS-His; 13) contaminante no identificado; 14) DNS-Metsulfona. Las condiciones cromatográficas fueron similares a las de la Fig. N° 13.

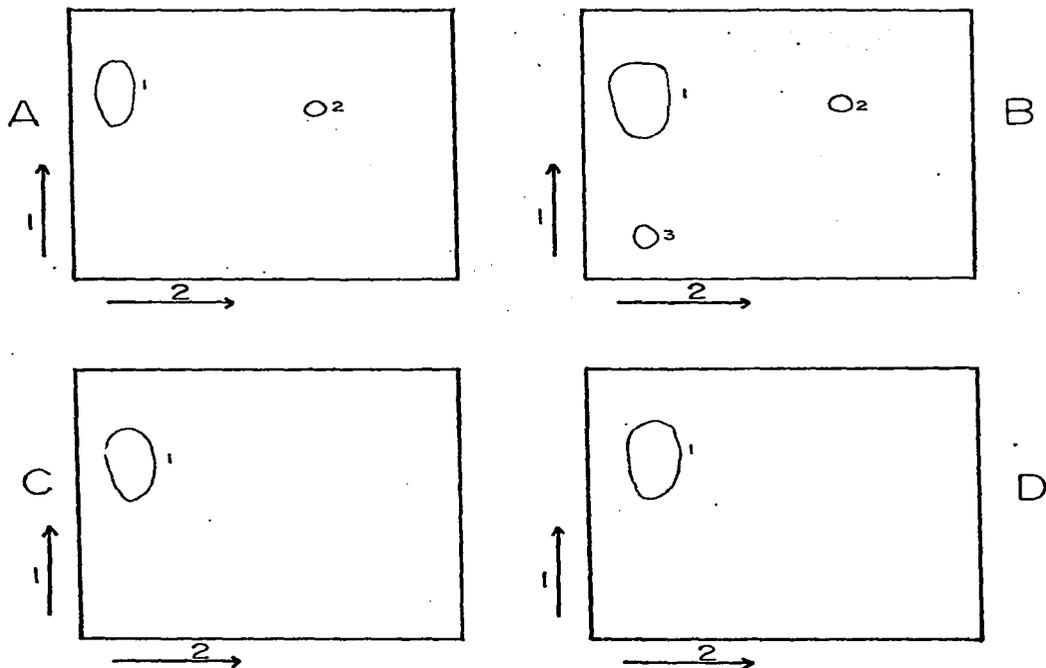


Figura N° 16.- Dansilación. A) Blanco de reactivos: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; B) Péptido 5 de la ribonucleasa: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-péptido. C) Fracción P-19 B-1: 1) DNS-OH. D) Fracción P-19 B-5: 1) DNS-OH. Cromatografía en placas de poliamida (3 x 3 cm); 1ª dimensión= ác. fórmico:agua (1.5:100,v/v); 2ª dimensión= benceno:ác. acético (4.5:1,v/v).

silable en estas condiciones. En cambio en la placa correspondiente al péptido S de la ribonucleasa se observó la mancha amarilla del DNS-péptido, en el origen, lo que indicó que la dansilación si había funcionado.

Posteriormente se hidrolizó el contenido de los tubos en la forma ya indicada. En la figura N° 17 se observa el resultado obtenido. Nuevamente en el blanco, en B-1 y en B-5 no se observaron manchas adicionales, mientras que la placa correspondiente al control positivo mostró di-DNS-Lys y ξ -DNS-Lys, tal como se esperaba, lo que indicó que la hidrólisis sí se había llevado a cabo.

Se realizó la segunda dansilación del material, como ya se ha descrito y se obtuvieron los resultados que se aprecian en la figura N° 18. El blanco mostró los subproductos normales, más una mancha tenue de DNS-Gly, cuya aparición ya se explicó.

La placa correspondiente a B-1 mostró DNS-OH, DNS-NH₂, DNS-Gly y una pequeña mancha verde, a la altura de DNS-GABA en la primera dimensión, pero un poco más a la derecha en la segunda dimensión. No se correlacionó a esa mancha con ningún DNS-aa identificado en esa zona. También se observó una mancha difusa, gris amarillenta arriba de DNS-OH, que no fue identificada con los patrones que se tenían. En resumen no se observó ningún mapa de aminoácidos que pudiera revelar la composición del pico B-1.

En cuanto al pico B-5, lo único diferente que se observó fue una mancha muy tenue arriba y a la derecha de DNS-NH₂, que tampoco comigró con ninguno de los DNS-aa identificados anteriormente. En este caso tampoco se obtuvo ningún resultado de composición de aminoácidos.

La placa del péptido S de la ribonucleasa, en cambio, mostró el patrón de DNS-aa que lo caracteriza, en forma clara y concluyente. Estos datos indicaron que el procedimiento se había realizado óptimamente.

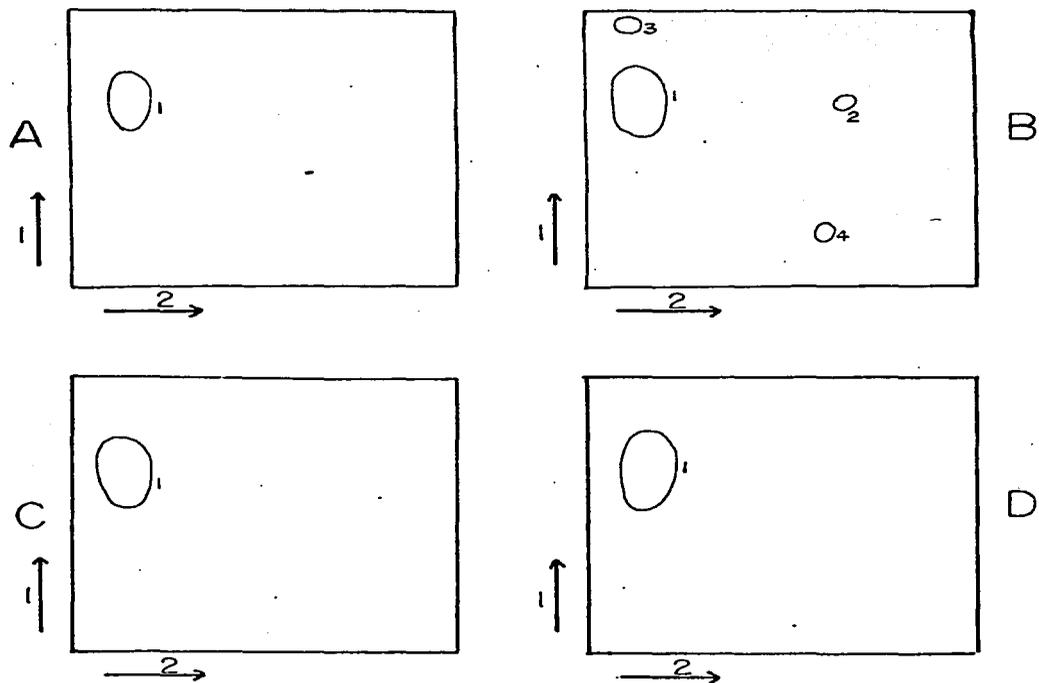


Figura N° 17.- Dansilación e hidrólisis. A) Blanco de reactivos: 1) DNS-OH. B) Péptido S de la ribonucleasa: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) ϵ -DNS-Lys; 4) di-DNS-Lys. C) Fracción P-19 B-1: 1) DNS-OH. D) Fracción P-19 B-5: 1) DNS-OH. La hidrólisis de los productos dansilados se llevó a cabo en HCl 6 N, durante 24 hrs., a 110°, en tubos sellados a la flama. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se mencionaron en la Fig. N° 16.

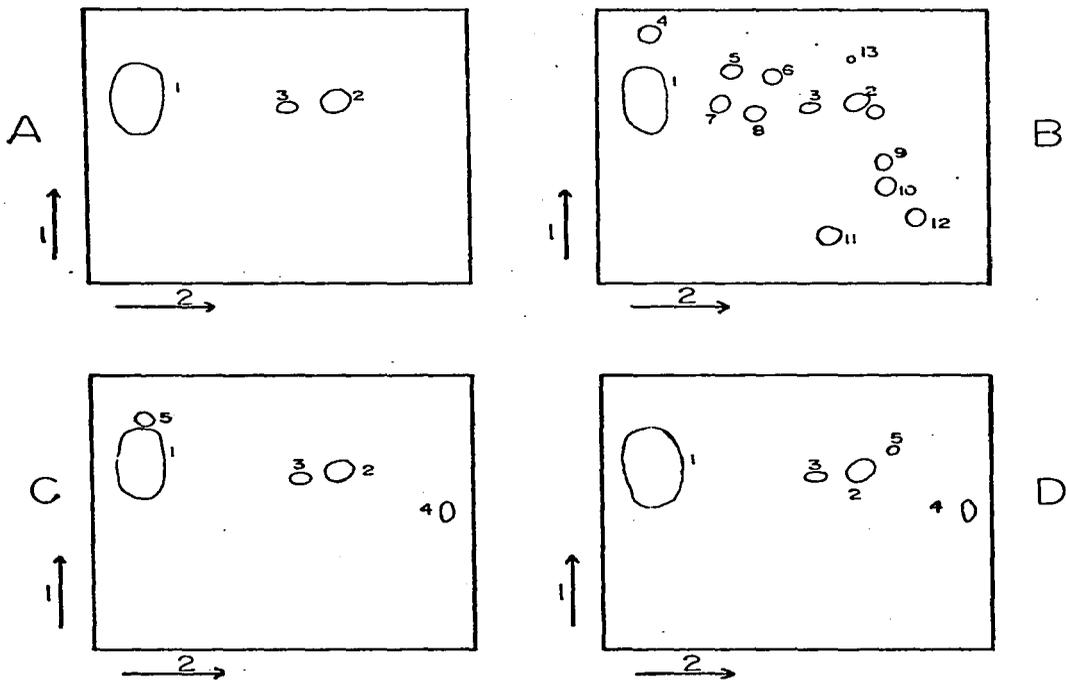


Figura N° 18.- Hidrólisis y dansilación. A) Blanco de reactivos: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-Gly. B) Péptido S de la ribonucleasa: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-Gly; 4) DNS-Arg; 5) DNS-Ser; 6) DNS-Thr; 7) DNS-Asp; 8) DNS-Glu; 9) DNS-Met; 10) DNS-Phe; 11) di-DNS-Lys; 12) DNS-His; 13) DNS-Metsulfona. C) Fracción P-19 B-1: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-Gly; 4) DNS-B-1a; 5) DNS-B-1b. D) Fracción P-19 B-5: 1) DNS-OH; 2) DNS-NH₂; 3) DNS-Gly; 4) DNS-B-5a; 5) DNS-B-5b. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se mencionaron en la Fig. N° 16.

LOTE P-20.- Se partió de 739 g de material liofilizado. Tomando en cuenta que 100 t.o. liofilizados pesan en promedio 3.546 g, se calculó que se empezaba con alrededor de 20,900 t.o. El material se trituró en la forma ya descrita (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 27) y los polvos, que ocuparon un volumen de 1.5 l, se empezaron a extraer con metanol absoluto. En total, durante las extracciones se utilizaron 7 l de metanol.

Se prosiguieron las extracciones con éter de petróleo, metanol, la diálisis y la extracción con cloroformo, en la forma que ya se explicó previamente. Se tomaron alícuotas para bioensayo de las diferentes fracciones obtenidas en esta serie de extracciones con solventes orgánicos.

Los bioensayos se hicieron sobre la preparación de tensorreceptor abdominal (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 25). Cuando alguna fracción mostraba efecto neurodepresor, se repetía el bioensayo con otra alícuota de la misma fracción, pero en presencia de picrotoxina (PTX) 10^{-4} M. La picrotoxina es un alcaloide que interacciona reversiblemente con el receptor a GABA, y se comporta como un antagonista de dicho aminoácido. Esta medida se adoptó porque el tensorreceptor abdominal, entre otras cosas, es sensible a GABA (ver INTRODUCCION), y de esta forma se intentó discriminar la actividad de éste, con respecto a la actividad de HND.

La mayor parte de la actividad neurodepresora se encontró en la fracción acuosa de la extracción con cloroformo, y dicha actividad se mantuvo a pesar de la presencia de la PTX 10^{-4} M. A dicha fracción se le denominó P-20,1-1; De acuerdo a los datos del bioensayo se recuperó prácticamente toda la actividad original del extracto.

La fracción P-20,1-1 se liofilizó a sequedad y luego se resuspendió en 25 ml de agua, dando una solución café.

Se sometieron alícuotas de la fracción P-20,1-1 a digestiones enzimáticas con pronasa B y proteinasa K (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 30) con el objeto de verificar si la actividad neurodepresora de esta fracción se perdía por acción de las proteasas.

Los resultados mostraron que la actividad neurodepresora de la fracción P-20,1-1 se manifestaba igual en ausencia y en presencia de las enzimas, y que dicho efecto no se abolía por acción de la PTX 10^{-4} M.

Se decidió proseguir la purificación de este extracto por medio de cromatografía por filtración molecular en Sephadex G-15, bajo las condiciones que se indican en la figura N° 19. Al final de la cromatografía se tomaron alícuotas de 20 ul de cada cuarto tubo para localizar la actividad biológica por bioensayo. Dicha actividad eluyó entre 240-372 ml. Se reunieron las fracciones activas y se liofilizaron. A este extracto se le llamó P-20,1-1,S_{1a}, y se resuspendió en 16 ml de agua.

En esta etapa se hizo una electroforesis semianalítica en papel, a pH 1.8 (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 29), de 500 ul del extracto P-20,1-1,S_{1a} y se sometió a 1000 volts durante 1 hr. Después de secar la hoja se recortó en la forma ya indicada y se extrajo con agua cada una de las bandas separadas (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 29). Los filtrados se liofilizaron a sequedad.

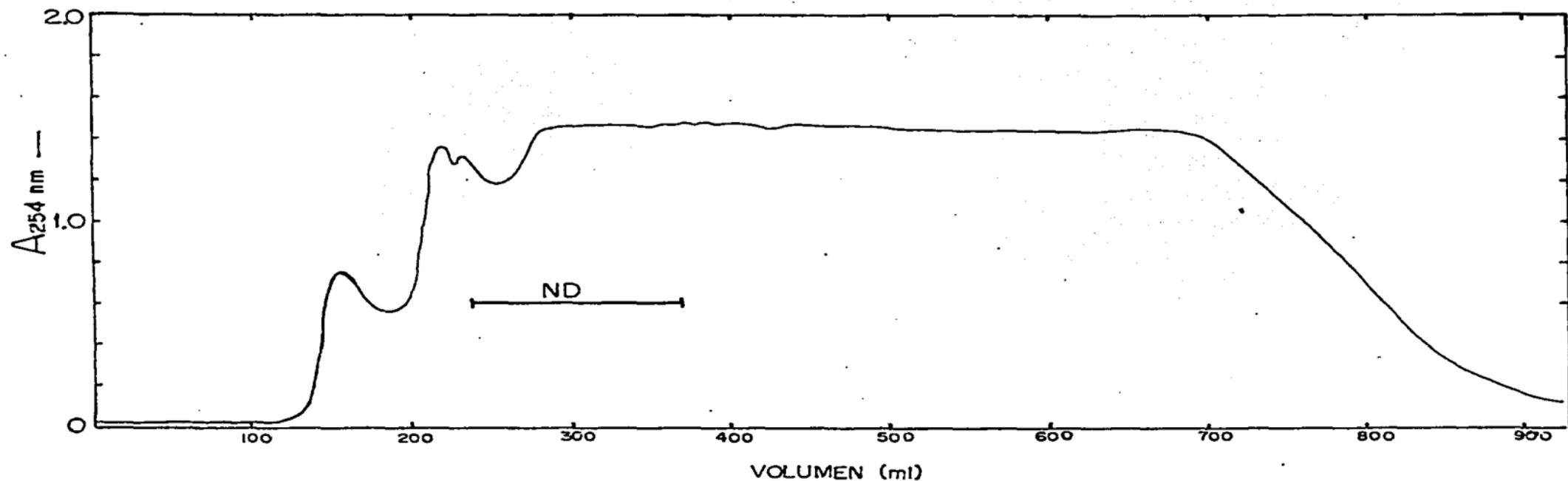


Figura N° 19.- Cromatografía en Sephadex G-15 de la fracción P-20.1-1, equivalente a 5000 t.o. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 12 ml/hr; volumen de cada fracción: 6 ml. La elución se hizo con agua. ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil.

dad y luego se resuspendieron con 1 ml de agua. Se tomaron alícuotas correspondientes a 10 t.o. para realizar el bioensayo. El resultado indicó que la actividad neurodepresora se encontraba en -1, es decir que se había quedado en el origen. Dicha actividad se mantuvo en presencia de PTX 10^{-4} M.

Se decidió entonces hacer un fraccionamiento grueso por quimioadsorción en Sep-Pak (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 30). Se diluyó el extracto P-20, I-1, S_{1a} con agua hasta un volumen de 27 ml y se dividió al material en cinco partes. Se activaron cinco cartuchos de Sep-Pak en la forma indicada anteriormente. En esta ocasión únicamente se lavó con agua y cuando terminó de eluir el material no retenido se inició el lavado con metanol absoluto. Ambos lavados se recogieron por separado y se liofilizaron a sequedad. La mayor cantidad del material inicial se presentó en la fracción no retenida, lavada con agua en el Sep-Pak. A esta fracción se le llamó P-20, I-1, S_{1a}, SP_n y a la que eluyó con metanol P-20, I-1, S_{1a}, SP_m.

La actividad neurodepresora se encontró en la fracción P-20, I-1, S_{1a}, SP_n. Puesto que la cantidad de material en dicha fracción todavía era muy abundante, se decidió someterla a otra cromatografía en Sephadex G-15, pero variando las condiciones de elución, utilizando HCCOH 1 M. En la figura N° 20 se observa el cromatograma obtenido en esta corrida.

Se ensayaron alícuotas de cada tercer tubo para localizar a la actividad biológica, y se observó que ésta eluyó entre 260-324 ml. La actividad se mantuvo en presencia de PTX 10^{-4} M. Se liofilizó el extracto y se le denominó P-20, I-1, S_{2a}, SP_n.

Se dializó una alícuota correspondiente a 1000 t.o. del extracto obtenido en el paso anterior, a través de una membrana Spectrapor con rango de corte de 1000 de PM (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 28). Se tomaron alícuotas correspondientes a 15 t.o. tanto del dializado como del contenido interior de la bolsa, y se probaron en el bioensayo. Los resultados mostraron que toda la actividad neurodepresora se encontraba en el dializado. Dicha actividad se mantuvo en presencia de PTX 10^{-4} M. También se observó que la mayor parte del material se había salido de la bolsa, y que por lo tanto la actividad neurodepresora todavía se encontraba muy contaminada después de este paso.

También se ultrafiltró a una alícuota de P-20, I-1, S_{2a}, SP_n (1000 t.o.) a través de una membrana UM-05, de Amicon (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 28), la cual presenta un rango de corte de 500 de PM. Se liofilizaron las dos fracciones obtenidas, y después de resuspenderlas en agua se probaron en el bioensayo. La actividad neurodepresora se encontró en la fracción ≤ 500 de PM, y se mantuvo a pesar de la PTX 10^{-4} M. No se detectó actividad en la fracción > 500 de PM. Nuevamente, la mayor parte de la masa se encontró en la fracción con un peso molecular menor de 500.

Se decidió proseguir la purificación del extracto P-20, I-1, S_{2a}, SP_n por electroforesis en papel, a pH 1.8, utilizando el sistema de mayor capacidad con que contábamos, con hojas de 46 x 70 cm (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 29). Se corrieron alícuotas de 500 ul bajo las condiciones indicadas anteriormente, con la intención de no sobrecargar al papel.

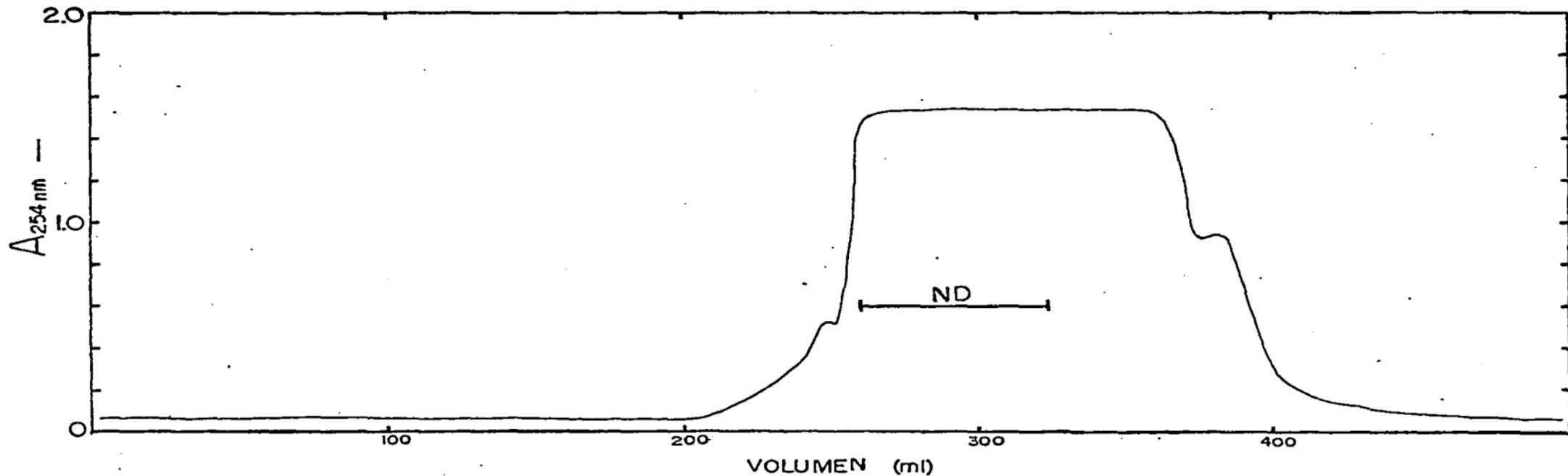


Figura N° 20.- Cromatografía en Sephadex G-15 de la fracción P-20,1-1-S₁₂,SP_n, equivalente a 10,000 t.o. Dimensiones: 2.6 x 85 cm; flujo: 8 ml/hr; volumen de cada fracción: 4 ml. La elución se hizo con HCOOH 1 M. ND: zona que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil.

Después de las electroforesis, se secaron las hojas y se recortaron las siguientes bandas: de +0.5 a -0.7 como origen; de +0.5 a +1; y de -0.7 a -1.2. Después de cluir del papel, liofilizar, resuspender y probar en el bioensayo, se observó que la actividad se encontraba en el origen, por lo que se denominó a esta fracción P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o.

Se sometieron alícuotas (10 t.o.) de los extractos P-20,1-1,S_{2a},SP_n y P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o a hidrólisis enzimática con pronasa B, proteinasa K y tripsina TPCK para ver si, después de haber eliminado una buena parte del material contaminante con respecto al extracto crudo, ahora sí se podía observar algún efecto de las proteasas sobre la actividad neurodepresora.

Los resultados indicaron que la actividad neurodepresora de ambos extractos no desaparecía por acción de las enzimas proteolíticas. Los controles realizados para verificar la actividad de las enzimas mostraron que éstas se encontraban activas, y que los extractos ensayados, per se, no inhibían la actividad enzimática.

Por razones que se mencionan más adelante (ver DISCUSION, pág. 119) se decidió comparar la actividad del extracto P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o en el bioensayo de cadena ganglionar abdominal (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 26), así como en el tensorreceptor abdominal, que era el que se venía usando durante todo el proceso de purificación.

Se observó que la fracción P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o ejercía un efecto neurodepresor sobre ambos bioensayos, y que su actividad era resistente a la digestión con enzimas proteolíticas.

Se decidió someter al extracto P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o a una electroforesis preparativa en papel a pH 10.0, para tratar de eliminar a otros contaminantes. Después de recortar las bandas a lo ancho del papel y de eluirlas, se tomaron alícuotas para bioensayo con la finalidad de localizar a la actividad neurodepresora.

Se encontró actividad biológica en las bandas -2, +5 y +7, por lo que se denominaron a estas fracciones como P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10₋₂; P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10₊₅; y P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10₊₇. La actividad de estas fracciones se mantuvo en presencia de PTX 10⁻⁴ M.

Se consideró que las fracciones P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10₊₅ y P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10₊₇ podrían contener la misma actividad pues en la primera fue en donde se encontró más concentrada y en la última parecía haber muy poca actividad neurodepresora, además de que ambas eran bandas contiguas en el electroforetograma. Se siguió trabajando sólo con la banda que poseía mayor actividad.

Se decidió analizar a las dos fracciones que se habían separado con la electroforesis de pH 10.0 por CLAP, utilizando para ello el programa 5 (ver ANEXO 1, pág. 143). En esta ocasión se recogieron fracciones por bloques, de cuatro minutos cada una.

En la figura N° 21 se muestra una gráfica representativa de las corridas en las que se analizó a la fracción P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10+5. Se concentraron las fracciones a sequedad y después de resuspender en agua se tomaron alícuotas para bioensayo. Se encontró que toda la actividad del extracto se hallaba en la primera fracción de la cromatografía. Se denominó a esta fracción como P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10+5,CLAP₁. Con PTX 10⁻⁴ M el efecto fue semejante.

En cuanto al extracto P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10-2 se observó, tal como lo muestra la figura N° 22, que la actividad también caía en la primera fracción del cromatograma, por lo que se le llamó P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10-2,CLAP₁. Otra vez, la actividad se mantuvo en presencia de PTX 10⁻⁴ M.

Debe mencionarse que la actividad a que se hace referencia en los dos párrafos anteriores fue encontrada sobre el tensorreceptor y sobre la cadena ganglionar.

Cuando se sometió al extracto P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10-2 a una CLAP analítica, bajo las condiciones del programa 6 (ver ANEXO 1, pág.14*), se obtuvo un perfil como el que se muestra en la figura N° 23. Como se puede apreciar bajo las condiciones de esta corrida únicamente apareció material con absorbencia a 206 nm en la parte isocrática del programa, es decir al principio de la corrida.

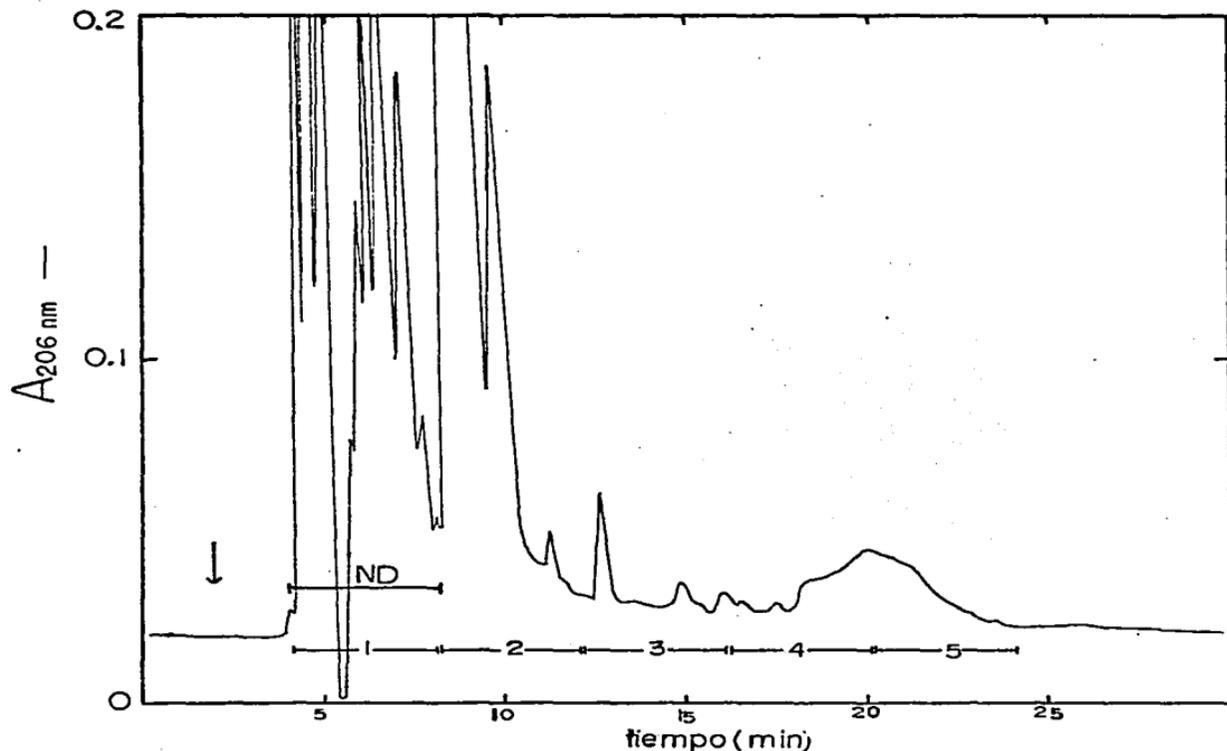


Figura N° 21.- CLAP analítica de la fracción P-20,1-1,S₂₀,SP_h,1.8₀,10₄₋₅ (50 t.o.). Programa 5 (ver ANEXO 1, pág. 143). Solvente A: TEAF 10 mM, pH 3.5. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 \times 250 mm). Se recogió por bloques en la forma que se indica. ND: fracción que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

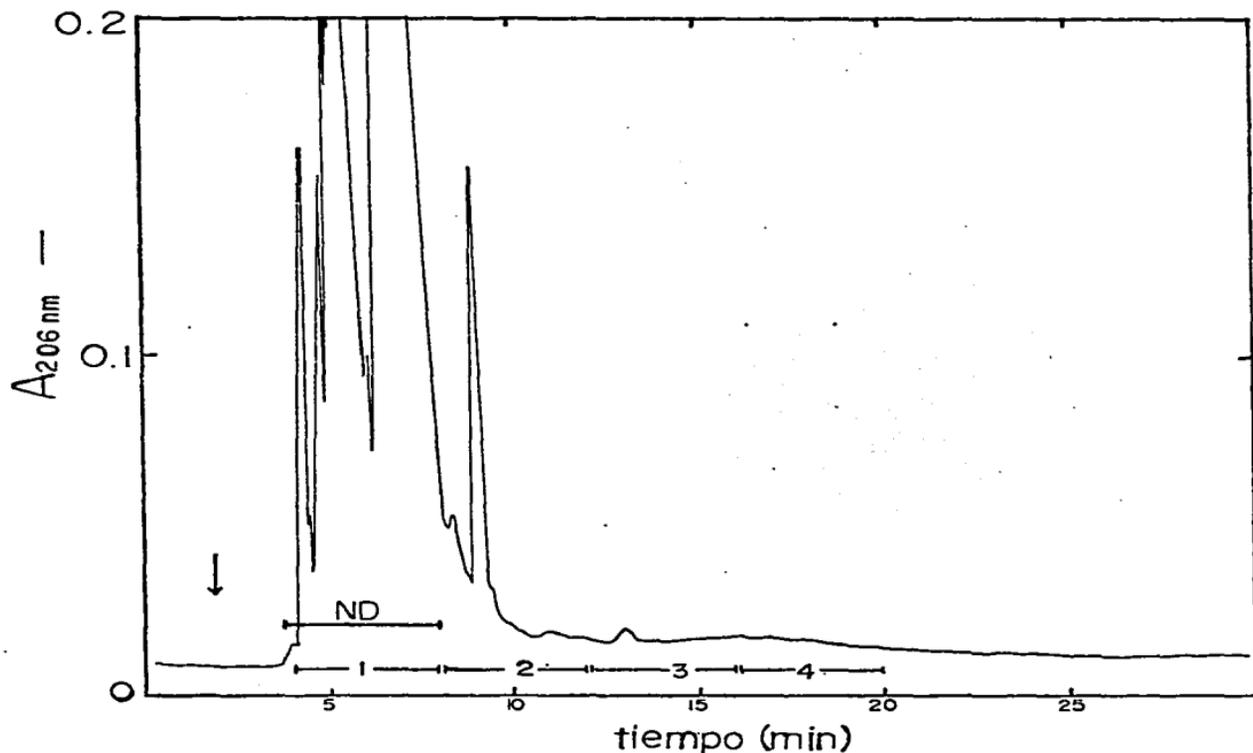


Figura N° 22.- CLAP analítica de la fracción P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10₂ (50 t.o.). Programa 5 (ver ANEXO 1, pág. 143). Solvente A: TEAF 10 mM, pH 3.5. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se recogió por bloques en la forma que se indica. ND: fracción que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

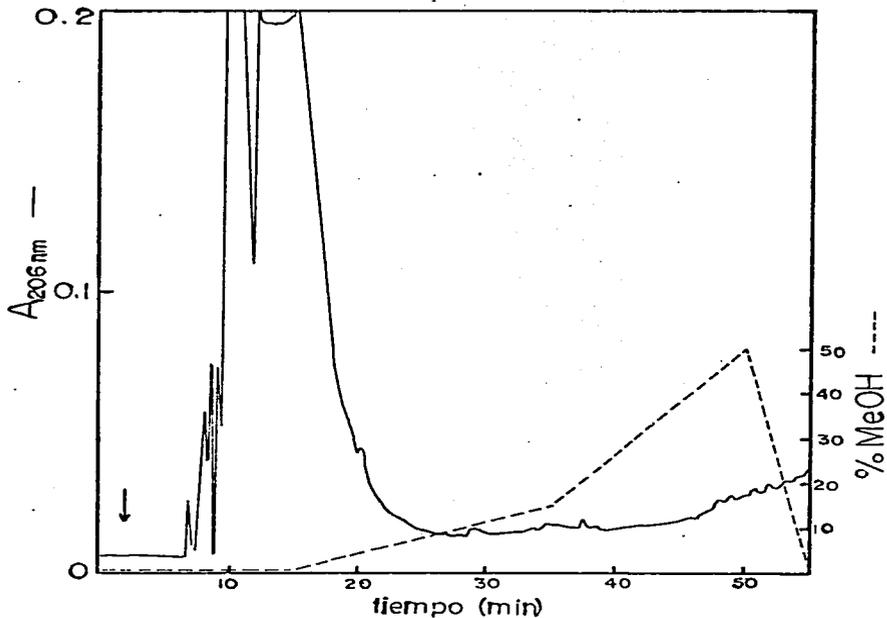


Figura N° 23.- CLAP analítica de la fracción P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10-2 (80 t.o.). Programa 6 (ver ANEXO I, pág. 144). Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). La flecha indica el momento de la inyección.

LOTE P-21.— Se inició la extracción con 70 g de t.o. liofilizados, los que correspondieron a aproximadamente 2000 t.o. Se trituró el material y se extrajeron los polvos con agua, tal como ya se ha descrito. En total se utilizaron 2 l de agua; los sobrenadantes se concentraron hasta 110 ml. Este extracto se dializó contra un total de 2.5 l de agua, obtenidos después de cuatro cambios. El dializado se concentró hasta 90 ml. Como se observó un precipitado al concentrar, se decidió eliminarlo por centrifugación a 16,800 x g, durante 30 minutos, a 4°. El volumen total obtenido para el extracto crudo fue de 84 ml.

Alícuotas de este extracto crudo (10 t.o.) se sometieron a digestión enzimática con pronasa B, en la misma forma que ya se ha mencionado previamente. Los controles mostraron que la enzima se encontraba perfectamente activa. Cuando se hizo el bioensayo de las muestras se observó que sobre el tensorreceptor todas presentaban actividad neurodepresora, es decir las tratadas con enzima y las no tratadas, y que la PTX 10^3 Mno bloqueaba dicho efecto.

Se ensayaron alícuotas de las mismas muestras sobre la cadena ganglionar abdominal, sin embargo los resultados obtenidos fueron bastante irregulares pues no se pudo obtener ningún registro aceptable, debido a las grandes variaciones espontáneas que se generaban en esta preparación. Por lo tanto, no se tuvo confianza en los resultados de esta preparación.

Se tomó el equivalente a 500 t.o. del extracto crudo y se sometió a una separación gruesa por Sep-Pak. En total se utilizaron cinco cartuchos. El material eluido con agua, que no se retuvo en el Sep-Pak, se liofilizó a sequedad y luego se resuspendió en 40 ml de metanol absoluto con el objeto de desalificar al extracto. Después de centrifugar, el sobrenadante se liofilizó a sequedad y luego se resuspendió en 3 ml de agua. Se llamó a este extracto P-21, I. La mayor parte del material insoluble en esta extracción con metanol correspondió a sales. Por su parte, el material que eluyó del Sep-Pak con el lavado de metanol absoluto se concentró a sequedad y luego se resuspendió en 1 ml de agua. Se denominó a esta fracción P-21, II.

Nuevamente se repitieron los experimentos de digestión enzimática con pronasa B, pero con P-21, I y P-21, II como sustratos. Las muestras se probaron en los dos bioensayos.

Cuando se probó al extracto P-21, I sobre el tensorreceptor en presencia de PTX 10^{-4} M se obtuvo una depresión intensa. El mismo grado de actividad se obtuvo con la fracción incubada con pronasa B.

Por su parte, cuando se probó al extracto P-21, I sobre la cadena ganglionar también se observó un efecto neurodepresor. Sin embargo, la alícuota de P-21, I que se incubó con la enzima no mostró ningún efecto depresor.

En cuanto al extracto P-21, II, éste no mostró actividad bajo ninguna condición en ninguno de los dos bioensayos.

Estos datos, que se obtuvieron por duplicado, parecían indicar que en la fracción P-21, I existían al menos dos sustancias con diferente susceptibilidad

a la digestión enzimática, pues una perdió su actividad cuando se la incubó con pronasa B mientras que la otra no lo hizo. Además, los resultados sugirieron que los bioensayos eran específicos para cada una de las sustancias, de tal manera que con el tensorreceptor se podía observar al material resistente a la digestión enzimática, mientras que con la cadena ganglionar se visualizaba al material sensible a la pronasa B.

Posteriormente, y con el objeto de caracterizar mejor el comportamiento de la fracción P-21,1 en el Sep-Pak se hizo lo siguiente: después de activar al cartucho se pasó nuevamente a esta fracción (2 ml) por el Sep-Pak, luego se recogieron en un tubo los primeros 2 ml que eluyeron y se denominó a esta fracción como P-21,1₁. Se empezó a lavar el cartucho con 10 ml de agua, y el lavado, que se recogió en otro tubo, se llamó P-21,1₂. Finalmente se lavó con metanol absoluto y la fracción, que se recogió por separado, se denominó P-21,1₃.

Después de concentrar y eliminar al solvente se repitió la digestión enzimática con pronasa B y nuevamente se analizaron las muestras por bioensayo. Los resultados mostraron que toda la actividad biológica se encontraba en la fracción P-21,1₁, tanto en la cadena ganglionar como en el tensorreceptor, aún en presencia de PTX 10^{-4} M.

Sobre la cadena ganglionar se observó, aunque no con la misma claridad que en el experimento anterior, que la actividad neurodepresora desaparecía en los tubos que se habían incubado con pronasa B. Sobre el tensorreceptor en cambio, todas las muestras presentaron efecto depresor.

Los controles de la digestión enzimática, con caseína como sustrato, salieron como se esperaba, mostrando que la pronasa B estaba activa.

Debe mencionarse que estos experimentos fueron los últimos que se pudieron realizar justo antes de que los animales mostraran claramente que se encontraban enfermos. Cuando se quisieron repetir estos últimos bioensayos que se relatan, ya no fue posible obtener ningún resultado confiable pues las preparaciones biológicas mostraban una grandísima variabilidad y, un poco después, ni siquiera se podían obtener registros a partir de ellas.

Esta situación duró casi tres meses, durante los cuales no se pudo obtener ningún resultado confiable.

Cuando, finalmente, se recuperaron los animales y ya se podían obtener registros aceptables, nuevamente se repitieron los últimos experimentos que se describieron, y en esa ocasión los resultados mostraron que tanto la cadena ganglionar como el tensorreceptor reconocían al mismo material neurodepresor, y que éste no perdía su actividad cuando se digería con pronasa B.

En ninguno de los experimentos que se hicieron posteriormente se pudo volver a reproducir el resultado de que existía un material sensible a la digestión enzimática, por lo que los datos obtenidos con este lote deben tomarse con mucha precaución.

LOTE P-22.— Se inició la extracción con 70 g (2000 t.o.) de material liofilizado, en la forma que ya se ha mencionado. Los polvos obtenidos de la trituración se extrajeron con un total de 450 ml de agua. Dicho volumen se concentró en el rotavapor hasta 55 ml. Este material se dializó contra agua, haciendo cambios cada 2 hrs. Después de cuatro cambios, se colectaron 600 ml de dializado, los cuales se concentraron hasta 30 ml, lo que constituyó el extracto crudo.

Se decidió ultrafiltrar al extracto crudo por una membrana UM-05 de Amicon, con un rango de corte de 500 de PM. La fracción mayor de 500 de PM, P-22>500, se concentró durante la ultrafiltración hasta 6 ml, mientras que la fracción menor de 500 de PM, denominada P-22<500, que originalmente se recogió en 24 ml, se concentró en el rotavapor hasta 9 ml.

Se probó la actividad de las dos fracciones sobre el tensorreceptor y se observó que ambas presentaban neurodepresión. El mismo efecto se observó cuando se realizó el bioensayo sobre la cadena ganglionar.

Por otra parte se decidió medir la concentración existente de sales en los diferentes extractos, con el fin de poder evaluar el grado de filtración que se había conseguido. Las determinaciones se hicieron sólo para Na^+ y K^+ , en forma automática (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 28).

El extracto crudo presentó 24.9 meq de Na^+ en los 30 ml que ocupaba, y 6.75 meq de K^+ en el mismo volumen. Después de la ultrafiltración la fracción P-22>500 tuvo 3.45 meq de Na^+ y 0.49 meq de K^+ en los 6 ml del extracto. Por su parte la fracción P-22<500 presentó 21 meq Na^+ y 4.908 meq K^+ en los 9 ml que ocupaba.

En vista de que aún existía cierta proporción de sales en la fracción mayor de 500 de PM, se decidió someterla a otra ultrafiltración para asegurar que la mayor parte del material de nuestro interés estuviera en un solo compartimiento. La parte mayor de 500 de PM quedó con 0.6 meq de Na^+ en 4 ml, mientras que la menor de 500 quedó con 2.295 meq Na^+ en 9 ml.

En vista de la gran cantidad de sales que presentaron las fracciones con peso molecular menor de quinientos se decidió desalificarlas, por el método ya descrito. Inicialmente se liofilizaron a sequedad y luego se extrajeron con 20 ml de metanol absoluto, con agitación durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 700 x g para recoger los sobrenadantes. Dichos sobrenadantes se evaporaron a sequedad y luego se resuspendieron en agua. Los precipitados también se resuspendieron en agua.

Luego se midió nuevamente la cantidad de sales remanente en cada una de las fracciones. El extracto menor de 500 de la primera ultrafiltración dió lo siguiente: fracción soluble en metanol, 5.1 meq Na^+ y 0.783 meq K^+ , en 3 ml; la fracción insoluble en metanol, 14.5 meq Na^+ y 3.51 meq K^+ , en 10 ml. En cuanto a la fracción menor de 500 de PM de la segunda ultrafiltración los resultados fueron: 1.56 meq Na^+ y 0.355 meq K^+ en 1.5 ml, en la fracción soluble en metanol; y 0.21 meq Na^+ y 0.075 meq K^+ en la fracción insoluble en metanol (3 ml).

Estos datos mostraron que se habían logrado retirar, mediante este procedimiento, alrededor del 70% de las sales que contenían los extractos.

Se reunieron y concentraron las fracciones menores de 500 de PM y se resuspendieron en 3 ml de agua, lo cual constituyó la fracción P-22<500d.

Se hizo una digestión enzimática con pronasa B de la fracción P-22<500d, que era en donde se encontró la actividad biológica, y se probó en el bioensayo tanto sobre cadena ganglionar como sobre tensorreceptor.

Los resultados mostraron que la actividad neurodepresora se mantuvo, en los dos bioensayos, a pesar de la incubación con pronasa. Por los controles con caseína se supo que la enzima estaba activa.

Se decidió seguir la purificación del extracto P-22<500d por electroforesis en papel (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 29).

En la Tabla N° 1 se observan resumidos los resultados obtenidos en esta serie de experimentos, bajo las condiciones que se indican en el pie de dicha Tabla.

También se hizo una electroforesis analítica en papel del extracto P-22<500d para comprobar si se obtenía el mismo patrón de manchas que en la electroforesis preparativa. Las condiciones fueron las mismas, con la variante de que se usaron tiras simples de papel Whatman 3 MM (3 x 29 cm) y que se aplicaron 5 t.o. por tira. Como control, en una tira se colocaron 25 ug de GABA.

En la figura N° 24 se observa el patrón de manchas obtenido cuando se observaron las tiras con luz UV, y con la tinción con ninhidrina. Los resultados mostraron que bajo estas condiciones el GABA se movió 9 cm hacia el cátodo. Como puede apreciarse en las tiras correspondientes al extracto, se separaron varias bandas, tanto fluorescentes al UV, como positivas a la ninhidrina, migrando la mayor parte de ellas hacia el cátodo y dos hacia el ánodo. Este resultado no concordó con el obtenido en las electroforesis preparativas, en donde sólo se observaron bandas positivas en +1 y -1 (ver Tabla N° 1). Estos datos indicaron que las electroforesis preparativas no se llevaron a cabo en condiciones óptimas y que por lo tanto no existió una buena migración de las muestras.

En vista de que los resultados del bioensayo mostraron actividad neurodepresora en una porción muy grande de la hoja de electroforesis preparativa (desde +1 hasta -5), se decidió volver a pasar por electroforesis preparativa en papel, a pH 1.8, a las diferentes bandas activas, cada una por separado, intentando ahora aplicar las muestras más diluidas para tratar de mejorar la resolución del sistema. Las condiciones fueron las mismas que ya se mencionaron, solo que ahora se colocaron aproximadamente 65 t.o. en cada hoja.

En la Tabla N° 2 se observan resumidos los resultados obtenidos en esta serie de experimentos.

Tabla N^o 1.- Separación electroforética a pH 1.8 del extracto P-22<500d, y localización de la actividad neurodepresora.

EXTRACTO P-22<500d, 11.8	FRACCIONES ELECTROFORETICAS									
	+5	+3	+1	-1	-3	-5	-7	-9	-11	
Actividad neurodepresora	n	n	(p)	(p)	(p)	(p)	n	n	n	
Reacción con ninhidrina	n	n	(p)	(p)	n	n	n	n	n	
Observación con luz UV	n	n	(p)	(p)	n	n	n	n	n	

Electroforesis preparativa en papel a pH 1.8. Tiempo de saturación: 30 min; tiempo de corrida: 120 min; voltaje: 300 volts (9.6 v/cm); amortiguador de pH 1.8; soporte: hojas de papel Whatman 3 MM (29 x 31 cm). Se aplicaron 140 t.o. a cada hoja. Después de la electroforesis se secaron las hojas a 60° y se recortaron bandas de 2 cm c/u, las cuales se eluyeron con agua (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 29). El bioensayo se realizó sobre el tensorreceptor abdominal, n = no presentó actividad; (p) = mostró efecto neurodepresor. Se observaron los márgenes de las hojas bajo la luz UV, n = negativo; (p) = mostró fluorescencia o absorción a la luz UV. Se tiñeron los márgenes con ninhidrina al 0.25% en acetona, n = no dió reacción; (p) = reacción positiva a la tinción.

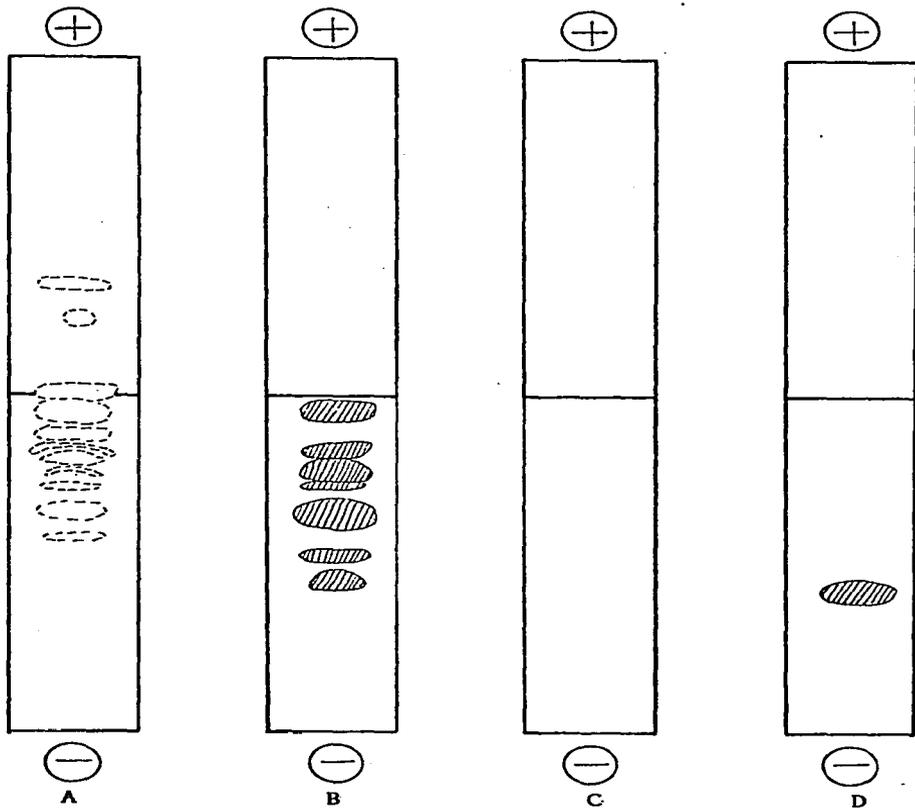


Figura N° 24.- Electroforesis analítica a pH 1.8. A y B: 5 t.o. de la fracción P-22<500d. A: observación bajo la luz UV; B: tinción con ninhidrina. C y D: GABA (25 ug). C: observación bajo la luz UV; D: tinción con ninhidrina. Soporte: tiras simples de papel Whatman 3 MM (3 x 29 cm); tiempo de corrida: 120 min; voltaje: 300 volts (9.6 v/cm); amortiguador= ác. fórmico:ác. acético:agua (1:4:45,v/v/v), pH 1.8.

Tabla N° 2.- Separación electroforética a pH 1.8 de las diferentes fracciones obtenidas durante la 1ª electroforesis de pH 1.8, del extracto P-22<500d, y localización de la actividad neurodepresora.

E X T R A C T O	FRACCIONES ELECTROFORETICAS									
	+7	+5	+3	+1	+1	-3	-5	-7	-9	-11
P-22<500d, 11.8 ₋₁ , 111.8 Act. neurodepresora	n	n	n	(p)	(p)	(p)	(p)	n	n	(p)
P-22<500d, 11.8 ₋₃ , 111.8 Act. neurodepresora	n	n	n	n	(p)	n	n	n	(p)	n
P-22<500d, 11.8 ₋₅ , 111.8 Act. neurodepresora	n	n	(p)	n	n	n	n	n	(p)	n
P-22<500s, 11.8 ₊₁ , 111.8 Act. neurodepresora	n	n	n	(p)	(p)	n	n	n	n	n

Electroforesis preparativa en papel a pH 1.8. Tiempo de saturación: 30 min; tiempo de corrida: 120 min; voltaje: 300 volts (9.6 v/cm); amortiguador de pH 1.8; soporte: hojas de papel Whatman 3 MM (29 x 31 cm). Se aplicaron 65 t.o. a cada hoja. El bioensayo se realizó sobre el tensorreceptor abdominal, n = no presentó actividad, (p) = mostró efecto neurodepresor.

Una vez aisladas, las fracciones que se mostraron en la Tabla N° 2 se sometieron a digestión con pronasa B, y luego se analizaron con los dos bioensayos. Ninguna de las fracciones probadas perdió su actividad neurodepresora por efectos de la enzima.

Se decidió hacer una electroforesis analítica en papel, a pH 10.0, de las fracciones obtenidas en la segunda electroforesis de pH 1.8, para observar si este paso podría ser una buena alternativa para continuar la purificación. En las figuras N° 25 y N° 26 se pueden observar los patrones de manchas obtenidos para cada una de las fracciones ensayadas. Asimismo se incluyó también un control de GABA para conocer su comportamiento electroforético bajo las condiciones empleadas.

En el caso del GABA se observó que migró 1.5 cm hacia el ánodo. Por su parte cada una de las fracciones provenientes de pH 1.8 se resolvió en varias bandas discretas, lo que indicó que la electroforesis a pH 10.0 era una buena opción para proseguir la purificación.

Así pues, se inició la purificación a nivel preparativo, a pH 10.0, de las fracciones activas obtenidas a pH 1.8. Los resultados de esta serie de corridas se encuentran resumidos en la Tabla N° 3, junto con las condiciones empleadas. En todos los casos los bioensayos se realizaron en presencia de $PTX 10^{-4}$ M.

De acuerdo con los resultados obtenidos durante esta serie de experimentos (ver Tablas N° 1, N° 2 y N° 3), se hizo evidente que se habían separado cuatro fracciones, electroforéticamente distinguibles, que presentaban actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor. Por lo tanto se decidió reunir a las fracciones equivalentes con el objeto de no tener fragmentado al material. Así, las fracciones obtenidas fueron:

P-22<500d, 11.8₋₁, 111.8₋₁, 10_{-1.5}

P-22<500d, 11.8₋₁, 111.8₋₃, 10_{-1.5}

P-22<500d, 11.8₋₁, 111.8₋₃, 10_{-2.5}

P-22<500d, 11.8₋₁, 111.8₊₁, 10₊₅

P-22<500d, 11.8₋₁, 111.8₋₁, 10₊₅

P-22<500d, 11.8₋₁, 111.8₋₃, 10₊₇

P-22<500d, 11.8₊₁, 111.8₊₁, 10₊₇

P-22<500d, 11.8₊₁, 111.8₋₁, 10₊₇

La suma de estas fracciones se denominó P-22 Ia.

Al conjunto de estas fracciones se le llamó P-22 Ib.

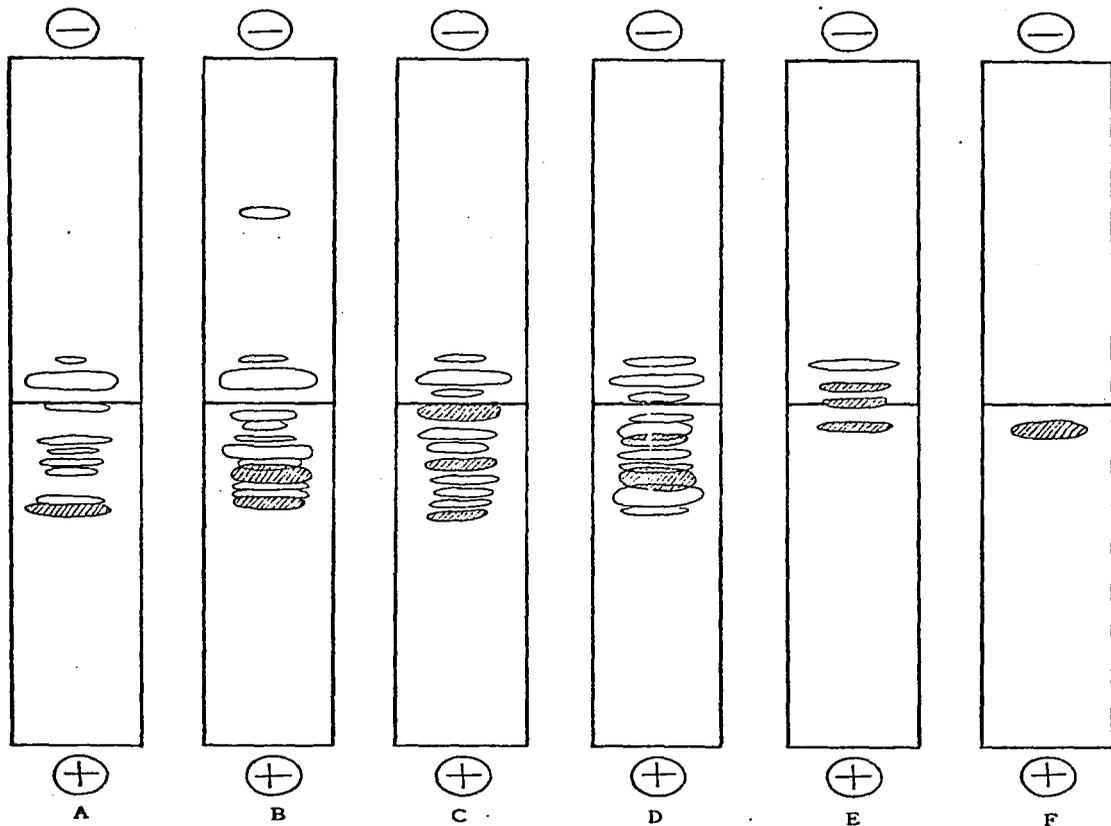


Figura Nº 25.- Electroforesis analítica a pH 10.0. A) P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₁; B) P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₁; C) P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₃; D) P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₅; E) P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₄; F) GABA. Soporte: tiras simples de papel Whatman 3 MM (3 x 29 cm); tiempo de corrida: 100 min; voltaje: 300 volts (9.6 v/cm); amortiguador= (NH₄)₂CO₃ 0.1 M, pH 10.0. Las bandas sombreadas representan la tinción con ninhidrina. Las bandas vacías representan la observación bajo la luz UV.

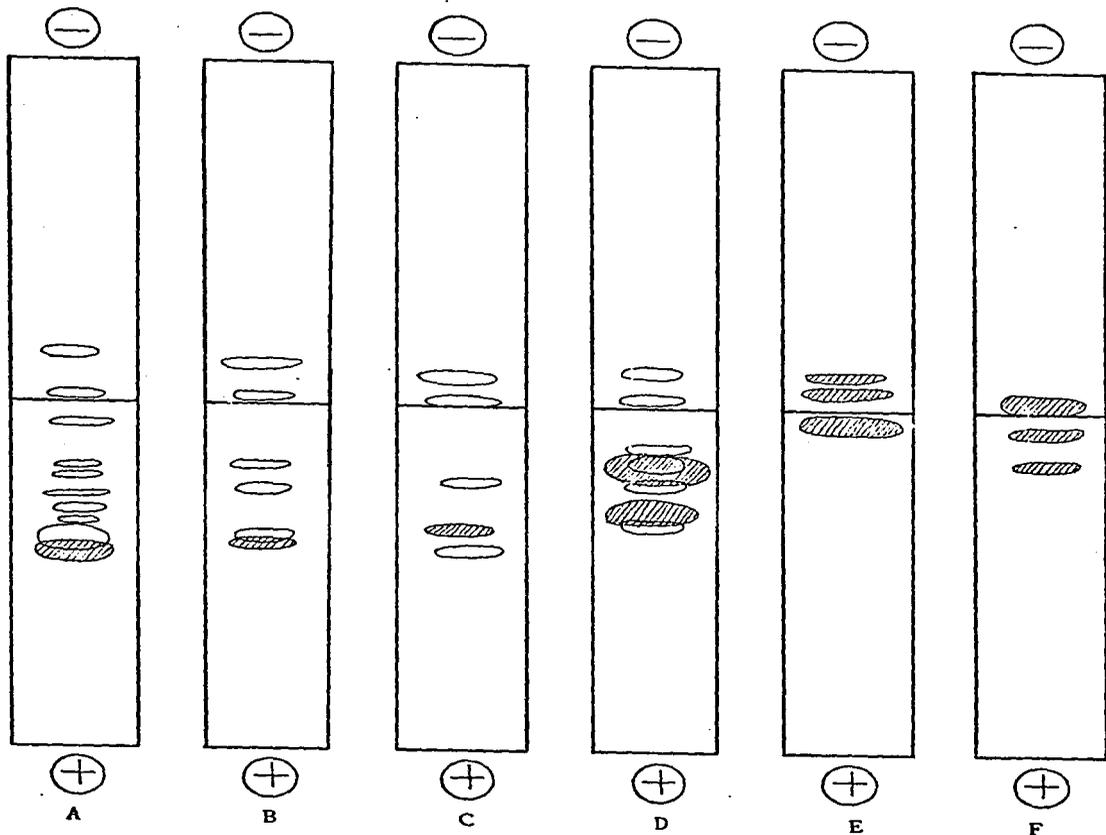


Figura N° 26.- Electroforesis analítica a pH 10.0. A) P-22<500d,11.8₊, 111.8₋₁; B) P-22<500d,11.8₊,111.8₊; C) P-22<500d,11.8₋₃,111.8₋₁; D) P-22<500d,11.8₋₃,111.8₋₅; E) P-22<500d,11.8₋₃,111.8₋₉; F) P-22<500d,11.8₋₅, 111.8₋₉. Las condiciones electroforéticas fueron las mismas que se mencionaron en la Fig. N° 25. Las bandas sombreadas representan la tinción con ninhidrina. Las bandas vacías representan la observación bajo la luz UV.

Tabla N° 3.- Separación electroforética a pH 10.0 de las diferentes fracciones obtenidas después de la 2ª electroforesis a pH 1.8, del extracto P-22<500d, y localización de la actividad neurodepresora.

E X T R A C T O	FRACCIONES ELECTROFORETICAS									
	+9	+7	+5	+3	+1	-1	-3	-5	-7	-9
P-22<500d, I1.8 ₋₁ , I11.8 ₋₁ , 10	o	n	(p)	n	n	(p)	n	o	n	n
P-22<500d, I1.8 ₋₁ , I11.8 ₋₃ , 10	o	(p)	n	n	n	(p)	(p)	o	o	o
P-22<500d, I1.8 ₋₁ , I11.8 ₊₁ , 10	n	n	(p)	n	n	n	n	o	n	n
P-22<500d, I1.8 ₋₁ , I11.8 ₋₅ , 10	o	n	n	n	n	(p)	(p)	o	o	o
P-22<500d, I1.8 ₋₁ , I11.8 ₋₁₁ , 10	o	n	n	(p)	(p)	(p)	n	o	o	o
P-22<500d, I1.8 ₋₃ , I11.8 ₋₁ , 10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
P-22<500d, I1.8 ₋₃ , I11.8 ₋₉ , 10	n	n	n	(p)	(p)	n	n	n	n	n
P-22<500d, I1.8 ₋₅ , I11.8 ₊₃ , 10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
P-22<500d, I1.8 ₋₅ , I11.8 ₋₉ , 10	n	n	n	(p)	(p)	n	n	n	n	n
P-22<500d, I1.8 ₊₁ , I11.8 ₊₁ , 10	n	(p)	n	n	n	n	n	n	n	n
P-22<500d, I1.8 ₊₁ , I11.8 ₋₁ , 10	n	(p)	n	n	n	n	n	n	n	n

Electroforesis preparativa en papel a pH 10.0. Tiempo de saturación: 30 min; tiempo de corrida: 100 min; voltaje: 300 volts (9.6 v/cm); amortiguador de pH 10.0; soporte: hojas de papel Whatman 3 MM (29 x 31 cm). Se aplicaron 65 t.o. a cada hoja. El bioensayo se realizó sobre el tensorreceptor abdominal, o = no se probó; n = no presentó actividad; (p) = mostró efecto neurodepresor.

P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₅,10_{-1.5}

P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₅,10_{-2.5}

Denominada P-22 11

P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₁₁,10_{-1.5}

P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₁₁,10₊₁

P-22<500d,11.8₋₁,111.8₋₁₁,10₊₃

P-22<500d,11.8₋₅,111.8₋₉,10₊₁

P-22<500d,11.8₋₅,111.8₋₉,10₊₃

P-22<500d,11.8₋₃,111.8₋₉,10₊₁

P-22<500d,11.8₋₃,111.8₋₉,10₊₃

A la suma de estas fracciones
se le denominó P-22 111.

Una vez reunidas las fracciones, se decidió pasar alícuotas equivalentes a 50 t.o. cada una, bajo condiciones analíticas, por electroforesis tanto a pH 1.8 como a pH 10.0, con el fin de corroborar que, una vez aisladas, la migración de cada una correspondía a los datos obtenidos previamente. Así se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla N° 4.

En esta etapa se descubrieron algunas irregularidades con el comportamiento de la picrotoxina que se había estado usando (ver DISCUSION, pág.123), pues se hizo evidente que en algunos casos se estaban obteniendo resultados falsos positivos en el bioensayo, ya que muestras que supuestamente debían ser bloqueadas en su acción, como el GABA, seguían deprimiendo a pesar de la presencia del antagonista.

Inicialmente se observó que las soluciones de picrotoxina "envejecían", y que ya a los cuatro días de haberse preparado presentaban menos de la mitad de efectividad para bloquear el efecto inhibitorio de la misma dosis de GABA. Por lo tanto se decidió preparar soluciones frescas para cada bioensayo.

También se observó que la picrotoxina, cuando se empezaba a usar inmediatamente después de preparar la solución, mostraba menor actividad que si se la dejaba equilibrar durante 30 a 60 minutos. Por lo tanto se optó por preparar las soluciones de picrotoxina antes de empezar a disecar al tensorreceptor.

Por otra parte, se decidió realizar una curva de sensibilidad del tensorreceptor al GABA, utilizando diferentes concentraciones de éste. Las concentraciones que se probaron fueron desde 1×10^{-7} M hasta 1×10^{-3} M. Se observó que existían algunas diferencias en cuanto a la sensibilidad de diferentes tensorreceptores, debidas probablemente a la variabilidad biológica intrínseca de

Tabla N° 4.- Análisis electroforético de las fracciones que presentaron actividad neurodepresora sobre el tensorreceptor abdominal.

FRACCION	pH 1.8	pH 10.0
P-22 Ia	-3,-4	-1
P-22 Ib	-1,-2	+7
P-22 II	-3,-4	-2
P-22 III	-10	+1,+2

Las condiciones electroforéticas fueron las mismas que ya se mencionaron anteriormente (ver Tablas N° 1, N° 2 y N° 3) con la única diferencia que el soporte utilizado fueron tiras simples de papel Whatman 3 MM (3 x 31 cm). Después de las electroforesis se recortaron bandas de 1 cm y se eluyeron con agua. Un signo "menos" (-) representa migración hacia el cátodo, mientras que un signo "más" (+) representa migración hacia el ánodo. Los números indican los centímetros de migración a partir del origen. Las fracciones se identificaron por bioensayo, sobre el tensorreceptor abdominal, en presencia de PTX 10^{-4} M.

cada unidad, pero sin embargo se pudo apreciar que a partir de concentraciones 1×10^{-5} M de GABA ya se obtenían respuestas notorias de neuroinhibición. Se debe hacer notar que las soluciones a las que se hace referencia tenían dichas concentraciones afuera de la poza de ensayo, pero al aplicarse sobre la preparación se diluían con la solución que bañaba a la neurona, por lo que las concentraciones activas eran 3 a 5 veces menores de lo que se mencionan.

Posteriormente se hicieron una serie de experimentos para probar qué dosis de picrotoxina podía bloquear los efectos de GABA. Para ello se decidió ver primero si las soluciones de PTX a concentraciones de 1×10^{-4} M y 1×10^{-3} M no desensibilizaban la respuesta del tensorreceptor después de aplicarlas varias veces en forma consecutiva. Se observó que la picrotoxina generaba una ligera excitación cuando se aplicaba a una concentración de 1×10^{-4} M y que dicha excitación era un poco mayor cuando se aplicaba a una concentración de 1×10^{-3} M. Si después de lavar a la PTX de la preparación se probaban dosis de GABA de 1×10^{-4} M y 1×10^{-3} M, se obtenían depresiones de la misma magnitud que cuando se aplicaban antes de poner a la PTX en contacto con el tensorreceptor. Por lo tanto se concluyó que la PTX no hacía menos sensible a la preparación biológica (cuando menos en forma inmediata) en cuanto a su respuesta frente al GABA.

También se demostró que la picrotoxina fresca a una concentración de 1×10^{-3} M podía bloquear perfectamente el efecto del GABA 1×10^{-3} M.

En la Tabla N° 5 se resumen los resultados correspondientes a esta serie de experimentos.

Se decidió volver a probar en el bioensayo la actividad de las fracciones P-22 1a, P-22 1b, P-22 111 y P-22 111, en ausencia y en presencia de PTX 3×10^{-3} M fresca. Los resultados obtenidos se ven en la Tabla N° 6.

Como se puede observar de los resultados de la Tabla N° 6, las fracciones P-22 1b y P-22 111 fueron bloqueadas en su efecto por la PTX 3×10^{-3} M, mientras que con las fracciones P-22 1a y P-22 111 no sucedió lo mismo, a las dosis probadas.

Se decidió diluir a la mitad la concentración de estas fracciones y se volvieron a probar en el bioensayo. Los resultados mostraron que el extracto P-22 la mantuvo su efecto neurodepresor aún en presencia de PTX 3×10^{-3} M, mientras que la fracción P-22 111 fue bloqueada en forma efectiva por la PTX. De acuerdo a estos resultados sólo la actividad de P-22 1a permanecía en presencia de PTX, mientras que las otras son bloqueadas.

Por lo tanto, se decidió seguir trabajando con P-22 1a ya que su efecto parecía diferenciarse de las otras fracciones.

Se hizo una dansilación, por el método ya descrito, de 5 ul del extracto P-22 1a (equivalente a 5 t.o.) para ver si había material dansilable y observar al mismo tiempo el nivel de contaminación que podría tener dicha muestra, después de los pasos de purificación a los que se había sometido.

Tabla N° 5.- Comparación de la actividad de las soluciones "envejecidas" y "frescas" de picrotoxina, en función de su capacidad para bloquear el efecto depresor de GABA.

P I C R O T O X I N A (nanomoles)	G A B A (nanomoles)							
	62.5	100	125	200	250	300	400	600
SOLUCION "ENVEJECIDA" (cuatro días)								
600	sí	-	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SOLUCION "FRESCA"								
100	sí	sí	sí	sí	-	-	NO	NO
200	sí	sí	sí	sí	sí	sí	NO	NO
600	sí	sí	sí	sí	sí	sí	-	NO

Los bioensayos se realizaron sobre el tensorreceptor abdominal del acocil.
 - = no se probó; sí = fue capaz de bloquear el efecto de GABA; NO = no fue capaz de bloquear el efecto de GABA.

Tabla N° 6.- Efecto neurodepresor de las fracciones obtenidas a partir del Lote P-22 de Penaeus vannamei, sobre el tensorreceptor.

FRACCION	sin PTX	con PTX $3 \times 10^{-3} M$
P-22 Ia	+	+
P-22 Ib	+	-
P-22 II	+	-
P-22 III	+	+

Se aplicaron 25 ul (25 t.o.) de cada fracción. El signo (+) representa efecto neurodepresor, mientras que el signo (-) indica que la actividad neurodepresora fue bloqueada por acción de la picrotoxina.

En la figura N° 27-1 se muestra un esquema de los resultados obtenidos en dicho experimento. Como se puede observar aparecieron cuatro manchas, tres de ellas fluorescentes y la otra no fluorescente, además de los subproductos normales DNS-OH y DNS-NH₂. La mancha A presentó una fluorescencia verde amarillenta muy intensa al principio, pero con el tiempo (algunas horas) cambió su coloración y se observó como una mancha azul en la periferia con un centro blanco-amarillento. La mancha B, por su parte, además de ser la más abundante, presentó una intensa absorción al UV, no se dansila y se observó de un color negruzco; esta mancha mostró las mismas características que la Homarina. En cuanto a la mancha C, ésta presentó la coloración normal de un DNS-aa y se ubicó ligeramente por abajo de la posición habitual de la di-DNS-Lys. La mancha D se observó muy tenuemente, de color verduzco, y no se pudo identificar con ningún DNS-aa.

Estos mismos resultados se volvieron a obtener cuando se hicieron diferentes aplicaciones sobre las placas de poliamida, lo único que varió fue la intensidad de cada una de las manchas, dependiente de la cantidad aplicada.

Posteriormente se hidrolizó el remanente de la muestra, con HCl, en la forma que ya se ha explicado. Luego de correr las micromatografías se observó el resultado que se muestra en la figura N° 27-2. Como se puede apreciar, además de los subproductos normales se observó la mancha intensa negruzca correspondiente a la mancha B del párrafo anterior (probablemente Homarina), y también las manchas C y D. Sin embargo, desapareció la mancha A, mostrando por ello labilidad a la hidrólisis ácida.

Luego, cuando se redansiló el material hidrolizado se obtuvo el panorama que se muestra en la figura N° 27-3. Como se puede observar el panorama fue semejante al obtenido inicialmente, volviendo a aparecer la mancha A que había desaparecido en el paso anterior. Este dato indicó que el material A dansilado es lábil a la hidrólisis ácida, pero no se descompone dicho material, puesto que al redansilar nuevamente se obtiene la misma mancha en la misma posición, y con las mismas características (al paso del tiempo cambia su coloración, como ya se dijo). Por supuesto, las manchas B, C y D se siguieron observando.

Se trató de identificar a la mancha A con alguno de los DNS-aa ya conocidos (ver pág. 50). Para ello se comparó el corrimiento cromatográfico, bajo las mismas condiciones, de DNS-GABA; DNS-Val, DNS-β-Ala, DNS-α-NH₂-butírico y DNS-Pro, los cuales son productos que migran a una posición semejante a la de la mancha A. También se mezclaron alícuotas de la muestra P-22 la dansilada con alícuotas de cada uno de los DNS-aa mencionados, para ver si juntos comigraban a la misma posición. En la figura N° 28 se pueden observar los resultados de estos experimentos.

Como se puede apreciar, de todos los probados solamente DNS-Pro coeluyó con la mancha A, y no fue posible observar ninguna separación ni aún cuando la cantidad aplicada fue muy pequeña.

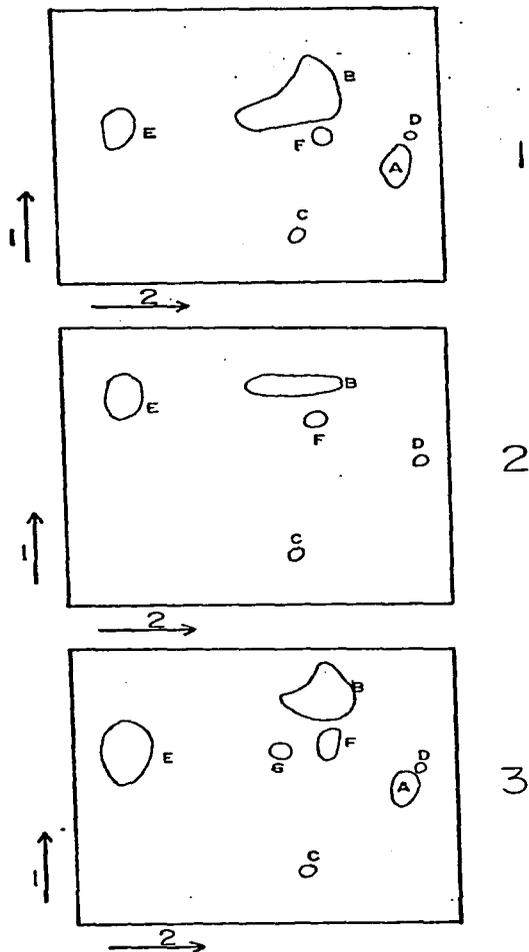


Figura N° 27.- Análisis de la fracción P-22 Ia. 1) Dansilación de la fracción P-22 Ia; las manchas llevan el nombre con el que se les menciona en el texto; E) DNS-Oil; F) DNS-Nil₂. La mancha B comigra a la posición de nomarina, y como ésta, no se dansila; la mancha C presenta un corrimiento parecido a di-DNS-Lys. 2) Dansilación e hidrólisis; nótese que desapareció la mancha A. 3) Hidrólisis y dansilación. Nuevamente apareció la mancha A; G) DNS-Gly. Placas de poliamida (3x3 cm); 1ª dimensión= ác. fórmico:agua (1.5:100,v/v); 2ª dimensión= benceno:ác. acético (4.5:1,v/v).

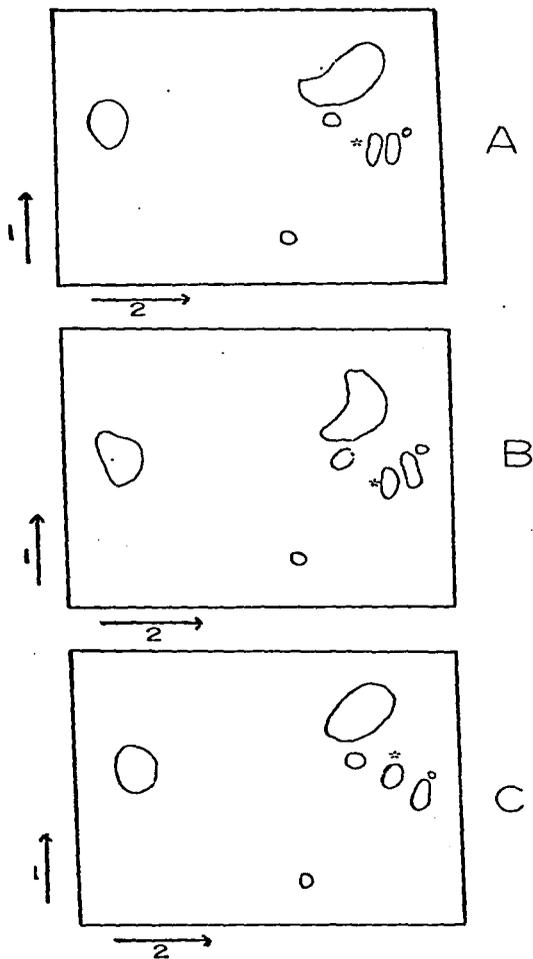


Figura N° 28.- Comparación de la migración cromatográfica de los productos danielados de la fracción P-22 Ia y diversos DNS-aminoácidos.
A) Mezcla de DNS-1a y DNS-GABA (*); B) Mezcla de DNS-1a y DNS-Val (*);
C) Mezcla de DNS-1a y DNS- α -NH₂-butírico (*).

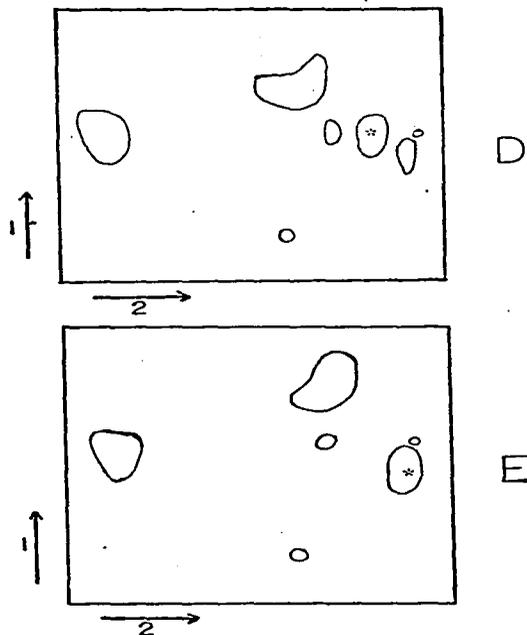


Figura N° 28 (continuación).- Comparación de la migración cromatográfica de los productos dansilados de la fracción P-22 1a y diversos DNS-aminoácidos. D) Mezcla de DNS-Ia y DNS- β -Ala (*); E) Mezcla de DNS-Ia y DNS-Pro (*). Como se puede observar solamente DNS-Pro coeluyó con la mancha A de la fracción P-22 1a. Cromatografía en placas de poliamida (3 x 3 cm); 1ª dimensión= ác. fórmico:agua (1.5:100,v/v); 2ª dimensión= benceno:ác. acético (4.5:1,v/v).

En un experimento posterior se observó que la DNS-Pro también mostraba labilidad a la hidrólisis ácida, y que desaparecía su coloración después de este tratamiento, al mismo tiempo que aparecía una mancha correspondiente a DNS-OH, como producto de la hidrólisis, la cual no se había visualizado antes de la hidrólisis. Estos resultados se muestran esquemáticamente en la figura N° 29.

También se decidió dansilar algunas catecolaminas y sus metabolitos para descartar si alguna de ellas podría presentar algunas características semejantes a alguno de los componentes de la mezcla P-22 Ia. Por lo tanto se procedió a dansilar alícuotas de epinefrina, norepinefrina, normetafrina, metanefrina, imipramina, ácido vanillilmandélico, ácido 3,4-dihidroxi mandélico, ácido homovanílico, ácido 5-hidroxiindol-3-acético y 3-hidroxitiramina.

Como era de esperarse, cada una de estas sustancias mostró más de un DNS-producto, debido a las diferentes posiciones en que pueden reaccionar con el DNS-Cl (grupos $-NH_2$ y $-OH$). De todas ellas solamente la DNS-metanefrina mostró una mancha con características similares a las de la mancha A de la mezcla P-22 Ia. Cuando se corrieron juntas alícuotas de DNS-metanefrina y de DNS-P-22 Ia, se observó que aunque efectivamente comigraban bajo las mismas condiciones, se podía observar una especie de promontorio en la mancha A, lo que posiblemente indicaba que se trataba de dos materiales diferentes. Los resultados de estos experimentos se esquematizan en la figura N° 30.

Posteriormente se hizo un experimento, a nivel analítico, que consistió en cromatografiar una alícuota de 5 ul de P-22 Ia, por CLAP, bajo las condiciones del programa 6 (ver ANEXO 1, pág. 144), utilizando un gradiente de metanol en ácido trifluoroacético (TFA) 5 mM. Como se puede apreciar en la figura N° 31 el material se desdobló en ocho fracciones principales; cada una se colectó por separado y además también se recogieron las zonas en donde no aparecieron picos.

Después de evaporar el solvente en el que estaba cada fracción, se decidió dansilar cada una de ellas para tratar de identificar a las manchas obtenidas durante la dansilación de P-22 Ia con las fracciones obtenidas en la cromatografía de alta presión. Se pudo establecer claramente que el pico 4 del cromatograma contenía a las manchas A y C, mientras que la mancha B estaba totalmente incluida en el pico 5.

En vista de que en la CLAP se visualizó un mayor número de componentes de la mezcla P-22 Ia que los que se habían visto en el experimento de su dansilación, se decidió proseguir la purificación del extracto por CLAP.

Se hicieron una serie de cromatografías a nivel semipreparativo con el fin de conseguir material suficiente de cada fracción para poder analizar por bioensayo en cual se localizaba la actividad neurodepresora del extracto P-22 Ia.

Cuando se probó el equivalente a 12.5 t.o. sobre el tensorreceptor se observó actividad neurodepresora en la fracción P-22 Ia, CLAP₄. Dicha actividad

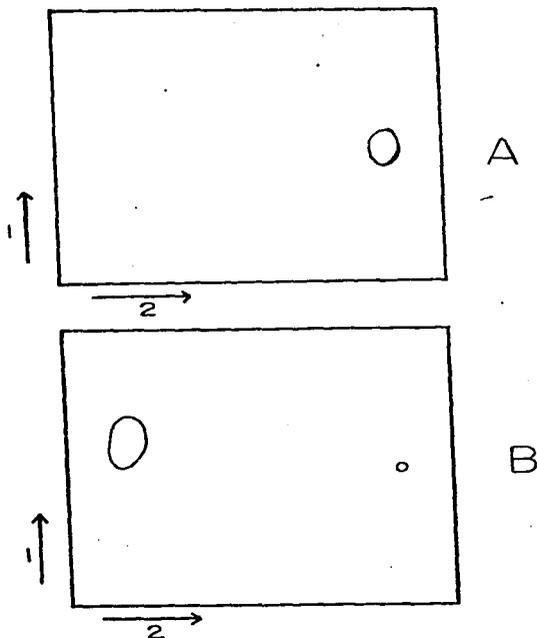


Figura N° 29.- Comportamiento de la DNS-Pro ante la hidrólisis ácida. A) DNS-Pro. B) DNS-Pro después de hidrólisis con HCl 6 N, durante 24 hrs., a 110°. Nótese como disminuyó la mancha correspondiente al DNS-aa y en cambio apareció DNS-OH, como producto de la hidrólisis. Cromatografía en placas de poliamida (3 x 3 cm); 1ª dimensión=ác. fórmico:agua (1.5:100,v/v); 2ª dimensión= benceno:ác. acético (4.5:1,v/v).

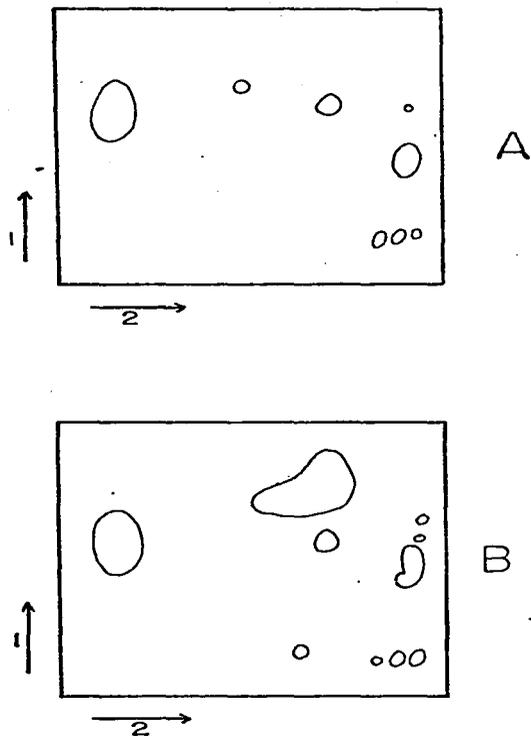


Figura N° 30.- Dansilación. A) Productos de la dansilación de metanefrina. B) Mezcla de DNS-1a y DNS-metanefrina. Como se puede observar, la mancha A de la fracción P-22 la (ver Fig. N° 27) comigra con uno de los DNS-productos de la metanefrina (*). Cromatografía en placas de poliamida (3 x 3 cm); 1ª dimensión= ác. fórmico:agua (1.5:100,v/v); 2ª dimensión= benceno:ác. acético (4.5:1,v/v).

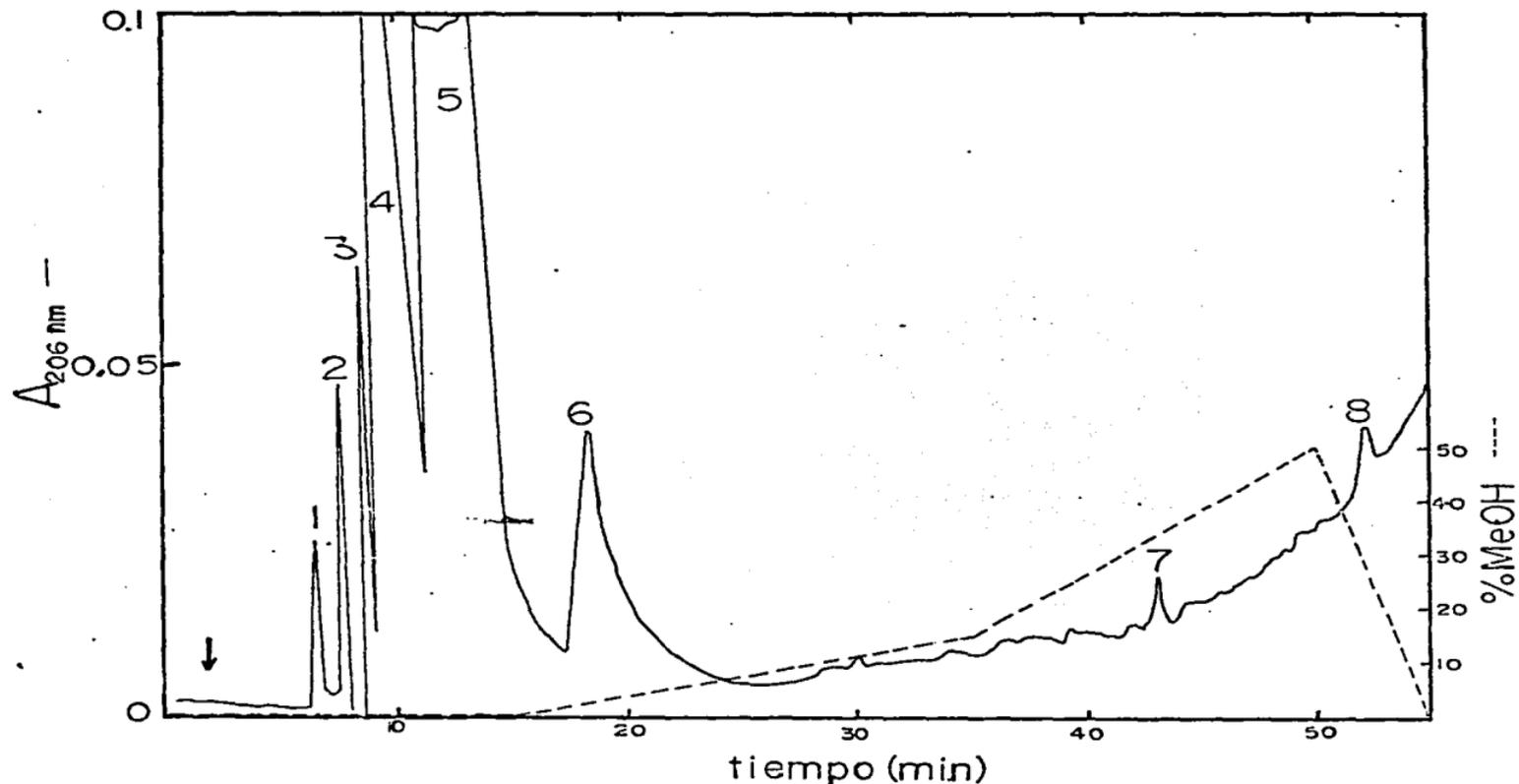


Figura N^o 31.- CLAP analítica de la fracción P-22 Ia (5 t.o.). Programa 6 (ver ANEXO I, Pág. 144). Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μm (4.6 x 250 mm). La flecha indica el momento de inyección de la muestra. Se colectaron los picos por separado y su contenido se utilizó para análisis por dansilación.

fue totalmente abolida cuando la misma cantidad se inyectó en presencia de PTX 1×10^{-3} M. Fue necesario aplicar el equivalente a 25 t.o. del pico P-22 la, CLAP_B para observar un efecto neurodepresor apreciable, pero no se pudo ensayar en presencia de PTX, puesto que fue indispensable colocar toda la muestra que se llevaba para visualizar el efecto.

La siguiente ocasión se llevó el equivalente a 50 t.o. obtenidos también por CLAP bajo las condiciones ya descritas, y que se expresan en la figura N° 32, en esta ocasión se inyectó, sin PTX, el equivalente a 25 t.o. y bajo estas circunstancias se encontró actividad neurodepresora en las fracciones P-22 la, CLAP₂, P-22 la, CLAP₃, y P-22 la, CLAP₄. Las depresiones observadas en estas fracciones fueron bloqueadas, totalmente, cuando se hizo el experimento en presencia de PTX 1×10^{-3} M. Por su parte, otra vez fue necesario aplicar toda la muestra (50 t.o.) de P-22 la, CLAP_B para poder notar efecto depresor en esta fracción, y por lo tanto no se tuvo oportunidad de observar su efecto en presencia de picrotoxina.

En la Tabla N° 7 se puede observar, en forma resumida, los tiempos de retención y volúmenes de elución de cada uno de los componentes que se separaron a partir del extracto P-22 la mediante CLAP en las condiciones descritas.

Es obvio, de los resultados obtenidos, que los primeros seis picos salieron de la columna durante la parte isocrática del programa, lo que quiere decir que se eluyeron solamente con TFA 5 mM en agua. Los picos P-22 la, CLAP₇ y P-22 la, CLAP₈, en cambio, se retienen fuertemente en la columna y solo eluyeron cuando la concentración de metanol en el gradiente fue relativamente elevada.

También se puede observar que los picos que eluyeron en forma temprana contenían aproximadamente el 99% de la masa total de P-22 la, mientras que el pico P-22 la, CLAP_B contenía entre 0.5 a 1% del material cromatografiado, tal como resultó por el análisis de integración de los picos por área bajo la curva.

Los resultados de CLAP mostraron que el extracto P-22 la se descompone en varios componentes, de los cuales cuatro mostraron actividad neurodepresora en ausencia de picrotoxina sobre el tensorreceptor abdominal. De estas cuatro fracciones, tres perdieron su efecto depresor en presencia de picrotoxina, y eluyeron al principio de la cromatografía, con TFA 5 mM en agua, pH 3.0. El cuarto componente de interés, se retuvo bastante en la columna de fase reversa, y también mostró neurodepresión, pero sólo cuando se administraba en grandes cantidades. En esta etapa, debido a la poca cantidad de muestra con la que se contaba no fue posible conocer su comportamiento frente a la picrotoxina.

Se decidió obtener mayor cantidad de la fracción P-22 la, CLAP_B con el objeto de probar si la digestión enzimática con pronasa B afectaba su comportamiento fisiológico. Para ello se incubó el equivalente a 50 t.o. de P-22 la, CLAP_B en presencia de pronasa B, y por supuesto una alícuota de la misma fracción sin enzima, para que sirviera como control positivo en el bioensayo.

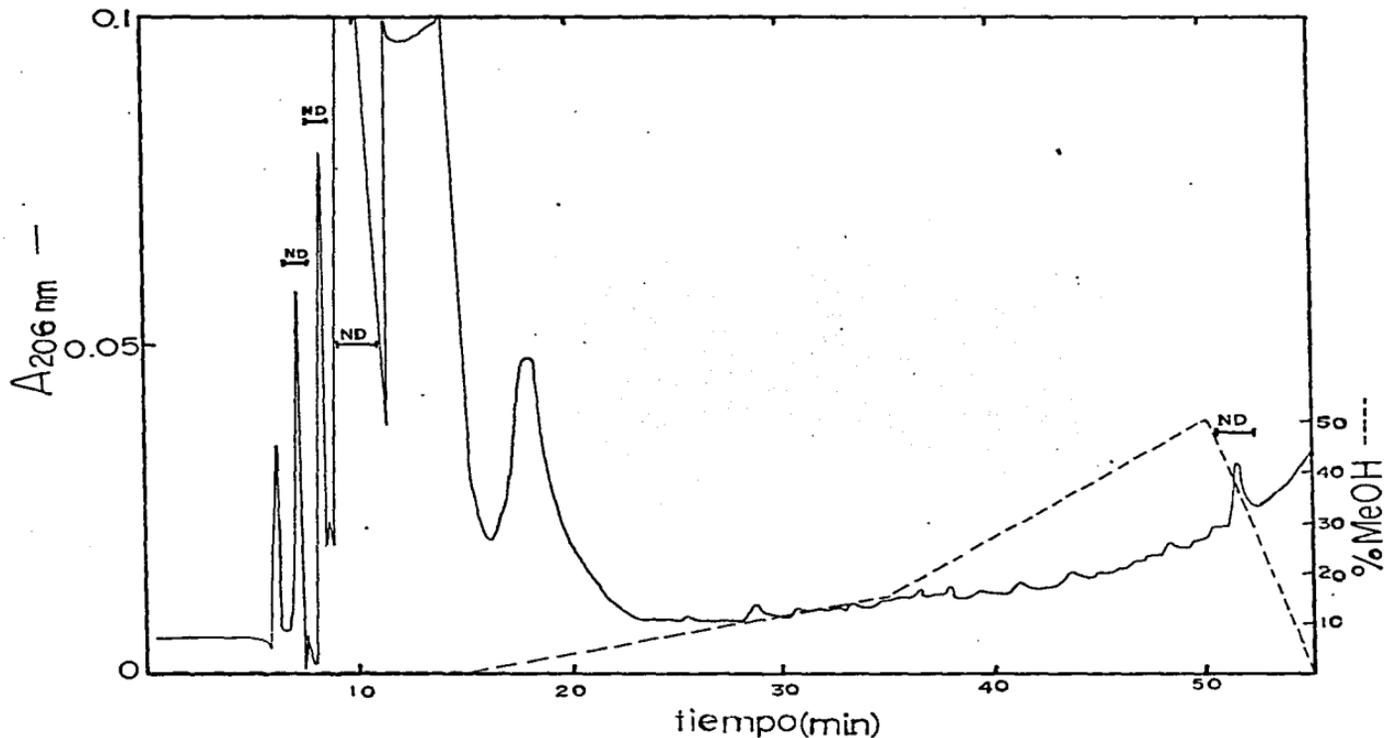


Figura N° 32.- Localización de la actividad neurodepresora después de fraccionar al extracto P-22 la por CLAP. ND: fracciones que presentaron actividad en el bioensayo. Las condiciones fueron las que se indicaron en la Fig. N° 31.

Tabla Nº 7.- Características cromatográficas de los componentes de P-22 Ia en CLAP.

FRACCION	tiempo de retención (min)	volumen de elución (ml)
P-22 Ia,CLAP ₁	4.77	2.385
P-22 Ia,CLAP ₂	5.97	2.985
P-22 Ia,CLAP ₃	6.97	3.485
P-22 Ia,CLAP ₄	8.58	4.290
P-22 Ia,CLAP ₅	12.58	6.290
P-22 Ia,CLAP ₆	16.48	8.240
P-22 Ia,CLAP ₇	41.1	20.550
P-22 Ia,CLAP ₈	49.6	24.800

Para la cromatografía se utilizaron las condiciones del programa 6 (ver ANEXO 1, pág. 144). Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM en metanol. Se registró a 206 nm. Columna: Ultrasphere ODS-5 um (4.6 x 250 mm).

Los controles de la digestión enzimática, con caseína como sustrato, mostraron que la enzima se encontraba activa.

Los resultados del bioensayo sobre el tensorreceptor fueron negativos para la muestra tratada con enzima así como para la muestra que fungió como control positivo, indicando que la fracción P-22 la, CLAP_g se había inactivado espontáneamente, por lo que la ausencia de actividad neurodepresora en la muestra tratada con pronasa B careció de significado.

En vista de que durante la purificación electroforética se habían obtenido varias fracciones con actividad neurodepresora (P-22 la, P-22 Ib, P-22 II y P-22 III), se hicieron algunos experimentos para tratar de caracterizar a dichos materiales. Sabiendo, por la literatura, que existen algunas sustancias, principalmente aminoácidos, que pueden tener ciertos efectos sobre el tensorreceptor abdominal de los crustáceos, se decidió estudiar a una gama de posibles candidatos para ver si alguno de ellos podría relacionarse con alguna de las fracciones obtenidas del lote P-22.

De esta forma se realizaron electroforesis analíticas, en papel, de los siguientes aminoácidos: GABA, Tau, β -Ala, Ala, Gln, Asp, Lys, Pro, Gly, Glu y Homarina; así como de las catecolaminas dopamina y metanefrina, a pH 1.8, bajo las condiciones que se indican en la figura N° 33, en donde se muestran los resultados obtenidos cuando se tiñeron las tiras con ninhidrina.

También se corrieron alícuotas de las mismas muestras por electroforesis analítica a pH 10.0. En la figura N° 34 se pueden observar los resultados que se obtuvieron después de la tinción con ninhidrina, bajo las condiciones empleadas.

Los datos aportados por esta serie de experimentos se encuentran reunidos en la Tabla N° 8, con fines de mayor claridad.

Además de las sustancias mencionadas, se añadieron a la lista arginina y betaína para probar su efecto en el bioensayo. Se determinó la capacidad de inhibir la frecuencia de disparo del tensorreceptor aplicando dosis que varían entre 20 y 1000 nanomoles de las sustancias que se estaban estudiando. De todas ellas se encontró que producían neurodepresión notoria las siguientes: GABA, Tau, Gln, β -Ala, Arg y Asp.

Con mucho, la mayor potencia neurodepresora se encontró en el GABA, y después le siguió la Tau. La actividad de los otros aminoácidos fue bastante menor.

El efecto neurodepresor obtenido con los aminoácidos mencionados fue bloqueado totalmente cuando éstos se aplicaron sobre el tensorreceptor tratado con PTX 3×10^{-3} M, lo que probablemente indicó que todos ellos ejercían su acción a través del receptor a GABA.

Por su parte, cuando se sometieron a la CLAP, bajo las condiciones del programa 6, se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla N° 9.

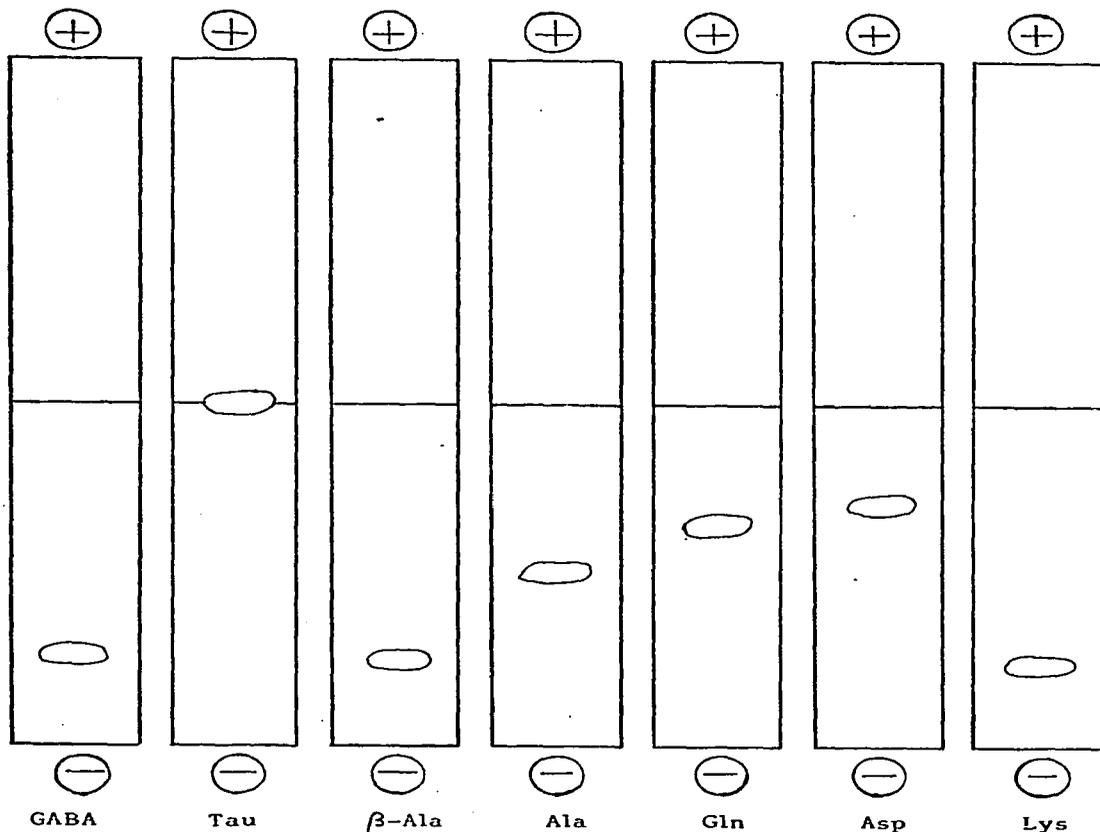


Figura N° 33.- Electroforesis analítica a pH 1.8 de diversos amino-ácidos. Soporte: tiras simples de papel Whatman 3 MM (3 x 29 cm); tiempo de corrida: 120 min; voltaje: 300 volts (9.6 v/cm); amortiguador= ác. fórmico:ác. acético:agua (1:4:45,v/v/v), pH 1.8. Tinción con ninhidrina.

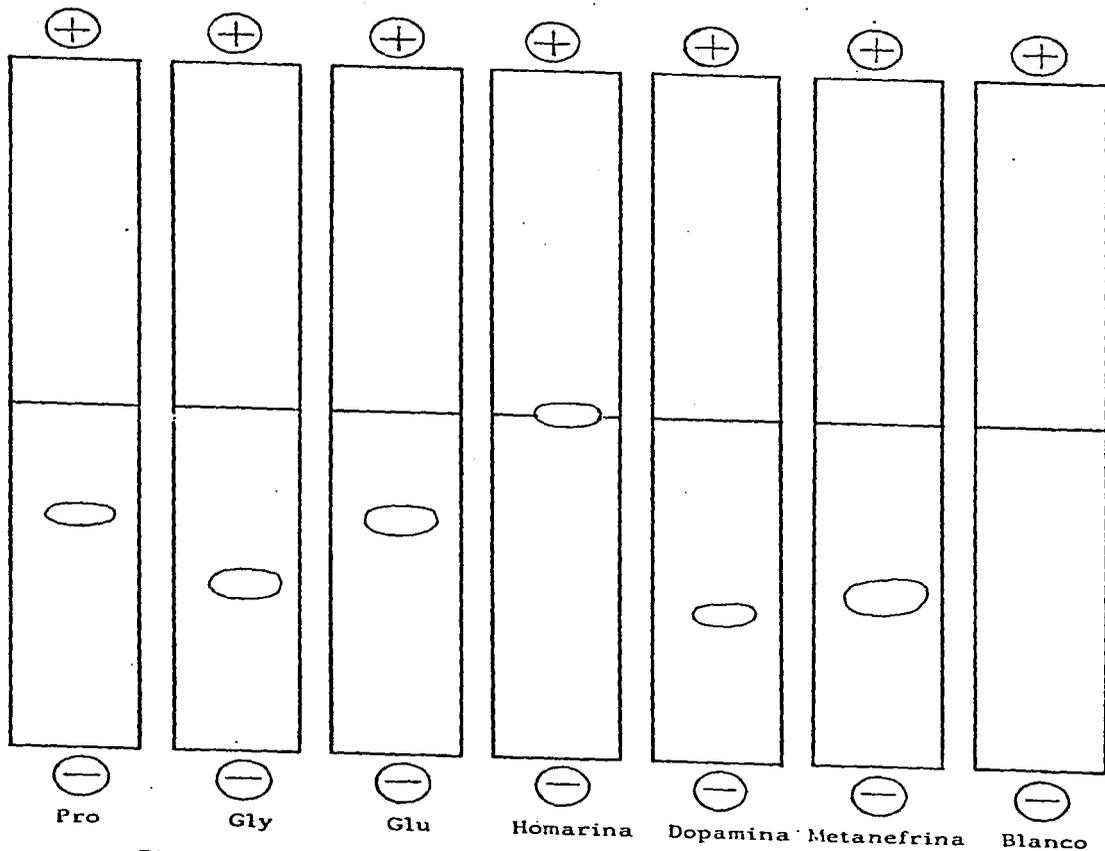


Figura N° 33 (continuación).- Electroforesis analítica de diversos aminoácidos, a pH 1.8. Las condiciones electroforéticas fueron las mismas que se indicaron en la figura anterior. Tinción con ninhidrina. La homarina fue negativa a la reacción con la ninhidrina, pero se localizó por su absorbencia bajo la luz UV.

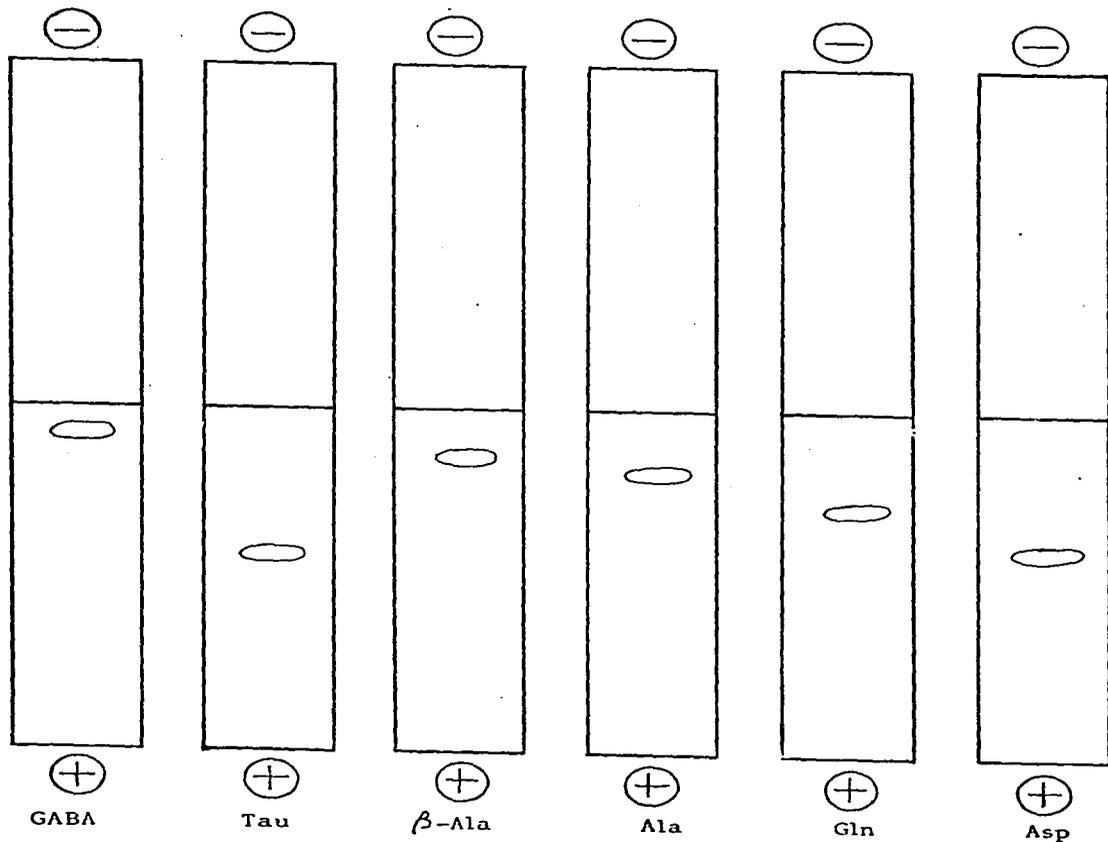


Figura N° 34.- Electroforesis analítica a pH 10.0 de diversos amino-ácidos. Soporte: tiras simples de papel Whatman 3 MM (3x29 cm); tiempo de corrida: 100 min; voltaje: 300 volts (9.6 v/cm); amortiguador= $(\text{NH}_4)_2 \text{CO}_3$ 0.1 M, ajustado a pH 10.0 con amoníaco. Tinción con ninhidrina.

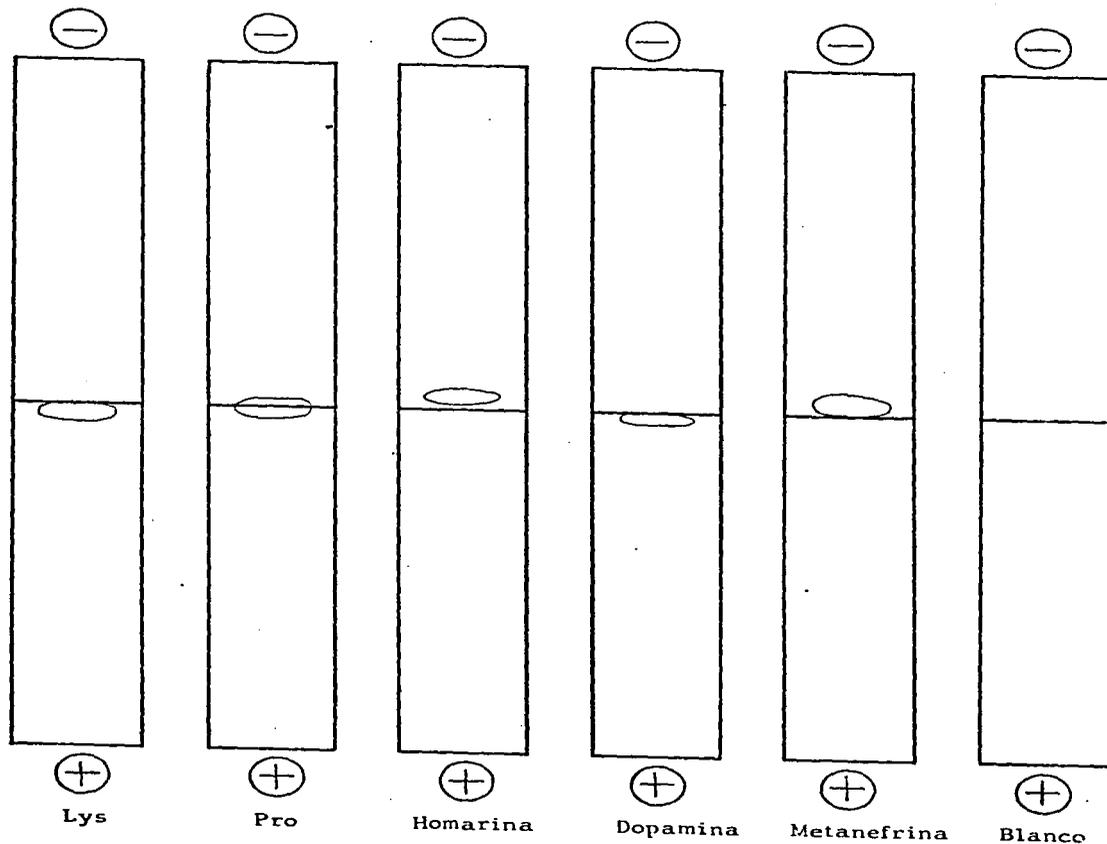


Figura N° 34 (continuación).- Electroforesis analítica a pH 10.0 de diversos aminoácidos. Las condiciones electroforéticas fueron las mismas que se indicaron en la figura anterior. Tinción con ninhidrina. La homarina fue negativa a la reacción con la ninhidrina, pero se localizó por su absorbencia bajo la luz UV.

Tabla N° 8.- Migración electroforética de diversos aminoácidos y catecolaminas a pH 1.8 y pH 10.0.

COMPUESTO	pH 1.8	pH 10.0
GABA	-11	+2
Taurina	origen	+7
β -Alanina	-11	+2
Glutamina	-6	+5
Ac. aspártico	-5	+7
Lisina	-12	+1
Prolina	-5	origen
Homarina	origen	-1
Glicina	-8	*
Ac. glutámico	-5	*
Dopamina	-9	+1
Metanefrina	-8	-1

Condiciones electroforéticas.- Tiempo de saturación: 30 min; tiempo de corrida: 120 min, a pH 1.8; y 100 min a pH 10.0; voltaje: 300 volts (9.6 v/cm); soporte: tiras simples de papel Whatman 3 MM (3 x 31 cm); se aplicaron 200 nmoles de cada muestra. Las tinciones se hicieron con ninhidrina. Un signo "menos" (-) representa migración hacia el cátodo, mientras que un signo "más" (+) indica migración hacia el ánodo. Los números indican los centímetros de migración a partir del origen, bajo las condiciones empleadas. * No se realizó.

Tabla N° 9.- Características cromatográficas de diferentes aminoácidos y catecolaminas por CLAP.

COMPUESTO	tiempo de retención (min)	volumen de elución (ml)
Glicina	6.24	3.12
Glutamina	6.72	3.36
GABA	9.25	4.625
Prolina	9.55	4.75
Homarina	11.51	5.75
Taurina	14.72	7.36
Dopamina	28.45	14.225
Metanefrina	35.62	17.81

Para la cromatografía se utilizaron las condiciones del programa 6 (ver ANEXO 1, pág. 144). Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM en metanol. Se registró a 206 nm. Columna: Ultrasphere ODS-5 μ m (4.6 x 250 mm).

Como puede observarse de dichos resultados, todos los aminoácidos probados eluyeron durante la parte isocrática del programa, con TFA 5 mM en agua, pH 3.0; mientras que las catecolaminas se retuvieron más fuertemente en la columna y eluyeron sólo cuando se incrementó la concentración de metanol.

Posteriormente, se decidió estudiar si en alguna de las fracciones obtenidas en este lote (P-22 Ia, P-22 Ib, P-22 II y P-22 III) se podía determinar la presencia de GABA y de Tau, por métodos más específicos.

En el caso de GABA, este se midió enzimáticamente, en la forma ya descrita (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 33). En la figura N° 35 se muestran los resultados de la curva patrón en la cual se interpolaron los resultados obtenidos con los extractos.

Como se puede observar, los datos mostraron la existencia de GABA en todas las fracciones ensayadas. Las determinaciones se hicieron sobre alícuotas equivalentes a 10 t.o., y los valores resumidos se encuentran resumidos en la Tabla N° 10.

Por su parte, también se hizo una determinación de taurina, por el método ya mencionado (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 33), sobre la fracción P-22 Ib, y se encontró una concentración de 4.72 umoles en 10 t.o. No se determinó en el resto de las fracciones.

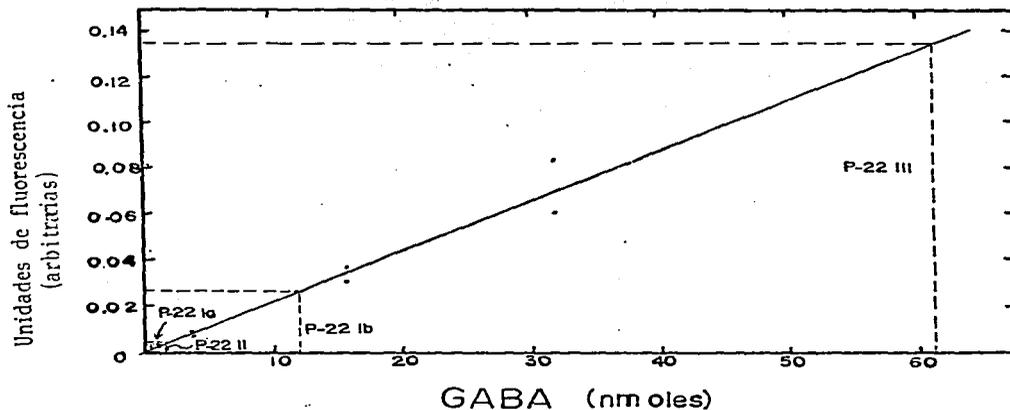


Figura N° 35.- Determinación enzimática de GABA. Se siguió el método de jakoby y cols. (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 33) utilizando una preparación comercial de GABAsa. El NADPH producido cuando el GABA es metabolizado a succinato se oxidó químicamente para formar NADP, el cual se midió fluorométricamente, de acuerdo a la técnica de Lowry y cols. (122). La curva patrón se realizó con 0.5, 1.0, 4.0, 16.0 y 32.0 nanomoles de GABA puro. Los valores obtenidos con las muestras problema se interpolaron en la gráfica. Las determinaciones se hicieron en ausencia y en presencia de Ca^{++} .

Tabla N° 10.- Cuantificación de GABA en las diversas fracciones aisladas del lote P-22, que mostraron actividad neurodepresora.

EXTRACTO (10 t.o.)	GABA (nmoles)
P-22 Ia	2
P-22 Ib	12.25
P-22 II	1.8
P-22 III	61

La determinación se llevó a cabo utilizando el método enzimático de Jakoby y cols., modificado (ver MATERIAL Y METODOS, pág 33).

LOTE P-23.— Se inició la extracción con 20 g de material liofilizado (aproximadamente 570 t.o.), siguiendo los pasos que ya se describieron anteriormente (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 26). En total se utilizaron 260 ml de agua para extraer al material pulverizado. Dicho volumen se concentró por liofilización hasta 30 ml, y luego se dializó vs. agua, a 4°, y se recogió un volumen total de 350 ml, después de cuatro cambios. Este volumen se concentró en el rotavapor hasta 15 ml, constituyendo este material el extracto crudo.

Posteriormente se sometió al extracto crudo a una separación por quimioadsorción en Sep-Pak, en la misma forma que ya se indicó previamente (ver MATERIAL Y METODOS, pág. 30). Se activaron tres cartuchos y el extracto crudo se repartió entre ellos. Al material que se eluyó directamente con TFA 5 mM se le llamó P-23,SP-1; el lavado con TFA 5 mM en metanol al 50% se denominó P-23,SP-2; y la fracción que se obtuvo cuando se eluyó con TFA 5 mM en metanol absoluto se llamó P-23,SP-3.

Las tres fracciones obtenidas de esta forma se concentraron en el rotavapor y cuando se tuvieron en volúmenes pequeños se transfirieron a tubos eppendorf para seguirse concentrando en el evaporador centrífugo al vacío, con el fin, también, de eliminar a los solventes volátiles. Se guardó especial cuidado en no dejar que las muestras se evaporaran a sequedad, para evitar adsorciones inespecíficas a las paredes de los tubos.

Se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones para bioensayo, con el fin de ubicar en cuál de ellas se localizaba la actividad neurodepresora.

La fracción P-23,SP-1 mostró una actividad biológica muy importante cuando se aplicó el equivalente a 2 t.o. sobre el tensorreceptor. Al inyectar una alícuota semejante, pero ahora en presencia de PTX 1×10^{-3} M, se volvió a observar la misma neurodepresión.

La fracción P-23,SP-2 mostró excitación cuando se aplicó el equivalente a 10 t.o. sobre el tensorreceptor.

Por su parte, la fracción P-23,SP-3 mostró una actividad depresora notoria cuando se aplicó el equivalente a 30 t.o. del extracto. La actividad neurodepresora de esta fracción persistió a pesar de la presencia de PTX 1×10^{-3} M, con una cantidad semejante de t.o.

Debe hacerse notar sin embargo, que cuando se repitió este último experimento, siete días después, aunque todavía se observó una ligera neurodepresión cuando se aplicó el equivalente a 30 t.o., el efecto fue totalmente bloqueado por la picrotoxina.

Se hizo entonces un experimento control en donde se trató a un cartucho de Sep-Pak en la misma forma que se había hecho durante el fraccionamiento del extracto crudo, sólo que en esta ocasión únicamente se hicieron los lavados correspondientes, pero sin aplicar ninguna muestra. Se tomó una alícuota del lavado con TFA 5 mM en metanol absoluto y se realizó el bioensayo; el resultado fue que se observó depresión de la frecuencia de disparo del tensorreceptor.

Se hicieron cromatografías de alta presión, bajo las condiciones del programa 6 (ver ANEXO 1, pág. 144), de las tres fracciones obtenidas después de la separación en Sep-Pak. Se recogieron las fracciones eluidas de la columna de fase reversa por bloques, de la siguiente manera: bloque A, del minuto 2 al minuto 25; bloque B, del minuto 25 al minuto 48; y bloque C, del minuto 48 al minuto 55.

En la figura N° 36 se muestra una gráfica representativa del perfil obtenido a 206 nm cuando se cromatografió al extracto P-23,SP-1 por CLAP. Como se puede observar aparecieron una gran cantidad de picos, sobre todo al principio de la corrida. Se recogieron, como se dijo, tres fracciones: P-23,SP-1, CLAP-A; P-23,SP-1,CLAP-B; y P-23,SP-1,CLAP-C. Cuando se probaron en el bioensayo la única que mostró actividad neurodepresora fue la fracción P-23,SP-1, CLAP-A, y dicha actividad permanecía a pesar de la presencia de PTX 1×10^{-3} M. Sin embargo, cuando esta fracción se diluía su efecto sí era bloqueado por la picrotoxina.

A su vez, cuando se cromatografió el extracto P-23,SP-2 bajo las mismas condiciones, se obtuvo un perfil como el que se observa en la figura N° 37. Aquí el panorama se mostró más limpio que con el extracto anterior, apareciendo un número menor de picos. Se recogieron tres fracciones: P-23,SP-2,CLAP-A; P-23,SP-2,CLAP-B; y P-23,SP-2,CLAP-C. Cuando se analizaron alícuotas de estas fracciones en el bioensayo se observó actividad neurodepresora en P-23,SP-2, CLAP-A, la cual, sin embargo, fue totalmente abolida cuando se probó en presencia de PTX 1×10^{-3} M. Ninguna de las otras dos fracciones presentaron efecto sobre la preparación.

Finalmente, los resultados obtenidos cuando se cromatografió el extracto P-23,SP-3 bajo las condiciones descritas, se muestran en la figura N° 38. Al recoger por bloques se obtuvieron las fracciones P-23,SP-3,CLAP-A; P-23,SP-3, CLAP-B; y P-23,SP-3,CLAP-C. No se encontró actividad biológica en ninguna de estas fracciones.

Debe mencionarse que en esta ocasión se trató de prevenir la adsorción de cualquier posible material a las paredes de los tubos, utilizando para ello albúmina sérica bovina (BSA) al 1%, ya fuera en solución junto con el extracto a ensayar, o bien cubriendo previamente las paredes de los tubos con una capa de albúmina y luego secando las paredes con corriente de nitrógeno. Los resultados obtenidos fueron semejantes a los que se tuvieron en ausencia de albúmina.

Toda esta serie de experimentos mostró que la única actividad neurodepresora que se mantuvo estable y dió resultados reproducibles fue la que apareció en el bloque A del extracto eluido con TFA 5 mM en agua, pH 3.0, en el Sep-Pak. Cuando dicha fracción se diluía, el efecto se bloqueaba con la picrotoxina.

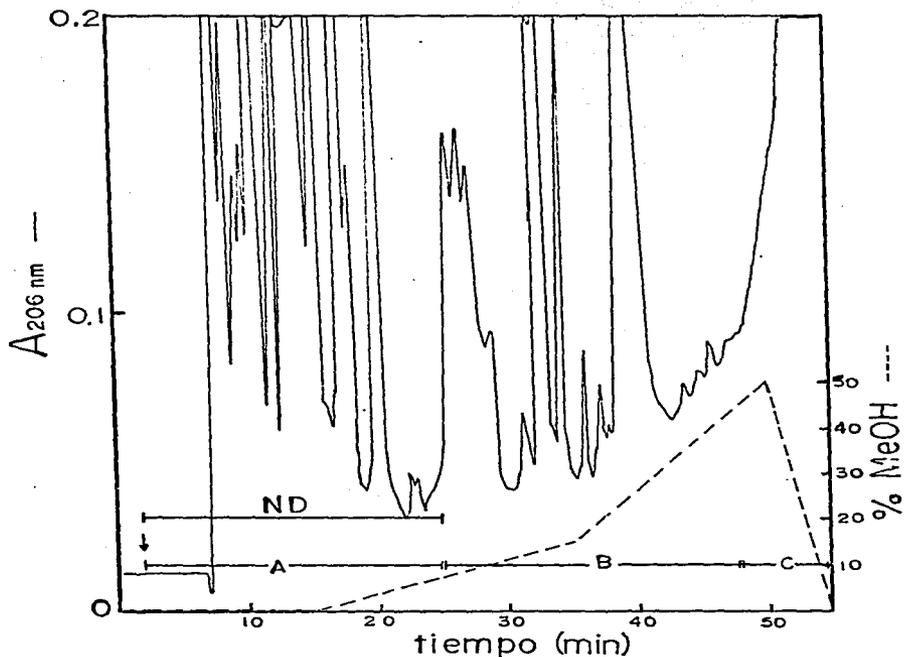


Figura N° 36.- CLAP analítica de la fracción P-23,SP-1 (10 t.o.). Programa 6 (ver ANEXO I, pág. 144) Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se recogió por bloques en la forma que se indica. ND: bloque que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de la inyección.

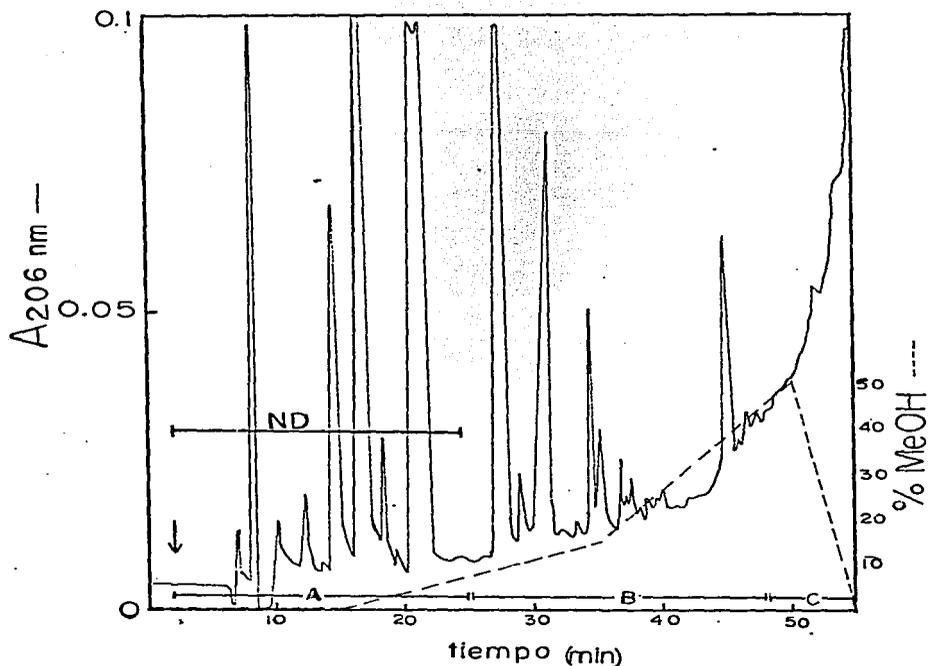


Figura N° 37.- CLAP analítica de la fracción P-23,SP-2 (20 t.o.). Programa 6 (ver ANEXO 1, pág. 144). Solvente A: TFA 5 ml en agua, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se recogió por bloques en la forma que se indica. ND: bloque que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

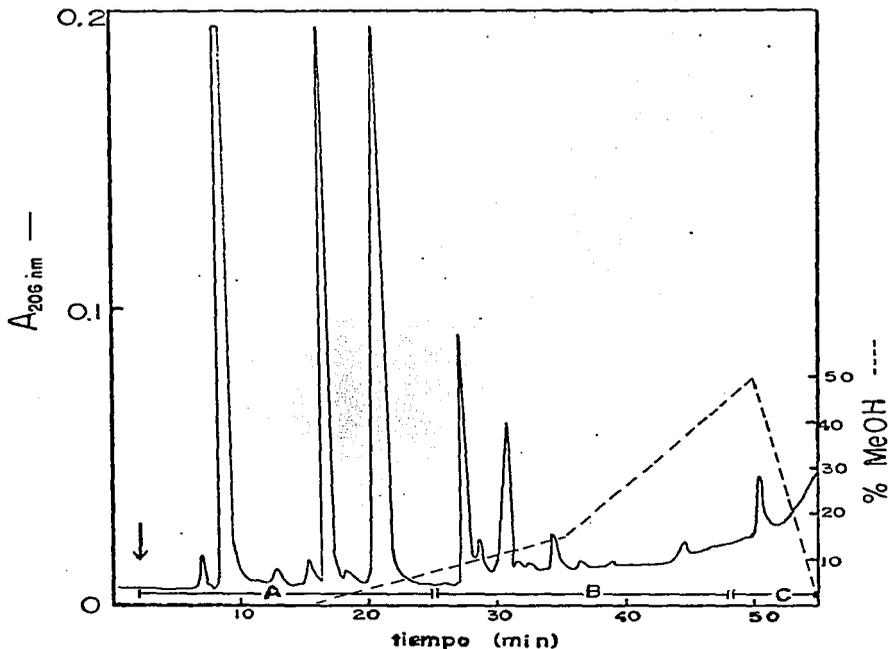


Figura N° 38.- CLAP analítica de la fracción P-23,SP-3 (20 t.o.). Programa 6 (ver ANEXO I, pág. 144). Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se recogió por bloques en la forma que se indica. Ningún bloque presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

LOTE P-24.- Se partió de 40 g (aproximadamente 1150 t.o.) de material liofilizado, el cual se trituró y extrajo con agua en la forma que ya se ha descrito. En total se obtuvieron 440 ml de sobrenadantes acuosos, los cuales se concentraron por liofilización hasta 110 ml. Este volumen se dializó vs. agua, utilizando un total de 800 ml, después de cuatro cambios. El dializado se concentró en el evaporador rotatorio hasta un volumen de 23 ml, el cual constituyó el extracto crudo.

Se tomaron alícuotas del extracto crudo para bioensayo, consistentes en 2, 1, y 0.5 equivalentes de t.o. Las tres concentraciones dieron efectos neurodepresores prácticamente saturantes. Cuando cada una de estas concentraciones se probó en presencia de PTX 1×10^{-3} M, el efecto neurodepresor persistió.

Se fraccionó al extracto crudo por quimioadsorción en Sep-Pak, utilizando la metodología que ya se describió previamente. Se activaron seis cartuchos, los que se separaron en dos grupos de tres cada uno, con el objeto de tratar a los lavados de un grupo en la misma forma que se hizo con el lote P-23; mientras que a los lavados del otro grupo se les adicionaría albúmina sérica bovina al 1% desde las primeras etapas de concentración para tratar de proteger a cualquier material susceptible de adsorberse a los tubos.

Así después de haber hecho los lavados respectivos se obtuvieron las siguientes fracciones: P-24,A,SP-1; P-24,A,SP-2; y P-24,A,SP-3, las cuales fueron procesadas sin ningún tratamiento especial; y P-24,B,SP-1; P-24,B,SP-2; y P-24,B,SP-3, que fueron las tratadas con BSA al 1%.

Previamente se había hecho un experimento para determinar cuál era la concentración máxima de metanol a la cual la albúmina todavía era perfectamente soluble, y se encontró que en concentraciones de metanol por abajo del 50% no había ningún problema con la solubilidad de dicha proteína. Por lo tanto, el procedimiento que se siguió fue concentrar a las fracciones hasta una tercera parte de su volumen original y luego se restituyó dicho volumen agregando agua, de manera que en los casos más drásticos la concentración de metanol fuera de alrededor del 30%. En ese momento se adicionaba la BSA y se seguía concentrando en la forma acostumbrada.

Posteriormente se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones y se probaron en el bioensayo para analizar en cuáles se encontraba la actividad neurodepresora.

En el caso de las fracciones P-24,A,SP-1 y P-24,B,SP-1 se probaron alícuotas correspondientes a 2, 1, y 0.5 t.o. En todos los casos se encontró una actividad neurodepresora sumamente importante, la cual se mantuvo en presencia de PTX 1×10^{-3} M. Sin embargo, al diluir la muestra y aplicar el equivalente a 0.25 t.o. la actividad mostrada por este extracto fue totalmente bloqueada por la picrotoxina.

En cuanto a las fracciones P-24,A,SP-2 y P-24,B,SP-2 no se encontró actividad ni aún cuando se aplicaron 20 t.o.

En el caso de las fracciones P-24,A,SP-3 y P-24,B,SP-3 tampoco fue posible detectar ningún rastro de actividad neurodepresora cuando se probaron 2, 10, 20 y 60 t.o. inclusive.

Estos resultados mostraron que toda la actividad neurodepresora que se encontró en el extracto crudo apareció en la fracción lavada con TFA 5 mM en agua, en el Sep-Pak. No se observó actividad en las otras dos fracciones. En esta ocasión no se reprodujo el efecto mostrado por la fracción P-23,SP-3, ni aún cuando esta vez se protegió al material con BSA al 1%, desde el principio.

Se hizo una cromatografía líquida de alta presión, con el extracto P-24, A,SP-1, bajo las condiciones del programa 7 (ver ANEXO 1, pág.144). En la figura N° 39 se muestra el perfil obtenido a 206 nm. La diferencia en este caso, con respecto al programa 6 que se había venido utilizando, es que ahora se llevó la concentración de metanol hasta 100% en el gradiente. En esta ocasión se recogieron cuatro fracciones: P-24,A,SP-1,CLAP-A (minuto 2-26); P-24,A,SP-1,CLAP-B (minuto 26-46); P-24,A,SP-1,CLAP-C (minuto 46-55); y P-24,A,SP-1,CLAP-D (minuto 55-80).

Se añadió BSA al 1% a cada fracción una vez que la concentración de metanol fue menor del 50%, con el fin de minimizar la adsorción inespecífica.

Se realizó el bioensayo con alícuotas de cada fracción, correspondientes a 2 t.o. cada una. Los datos mostraron que, a una dosis de 0.5 t.o. la fracción P-24,A,SP-1,CLAP-A mostró una neurodepresión muy intensa, la cual no fue totalmente bloqueada por la PTX 1×10^{-3} M. Al diluir la muestra a la mitad y aplicar el equivalente a 0.25 t.o. se vió que la picrotoxina sí bloqueaba en forma efectiva la actividad de esta muestra.

No se detectó ningún tipo de actividad neurodepresora en el resto de las fracciones P-24,A,SP-1,CLAP-B; P-24,A,SP-1,CLAP-C ni P-24,A,SP-1,CLAP-D.

Estos datos mostraron que toda la actividad neurodepresora que se encontró en la fracción P-24,SP-1 apareció en P-24,A,SP-1,CLAP-A, que es la zona del programa en donde se hace el lavado isocrático con TFA 5 mM en agua. También se observó que la PTX bloqueó dicho efecto cuando la muestra se aplicó suficientemente diluida.

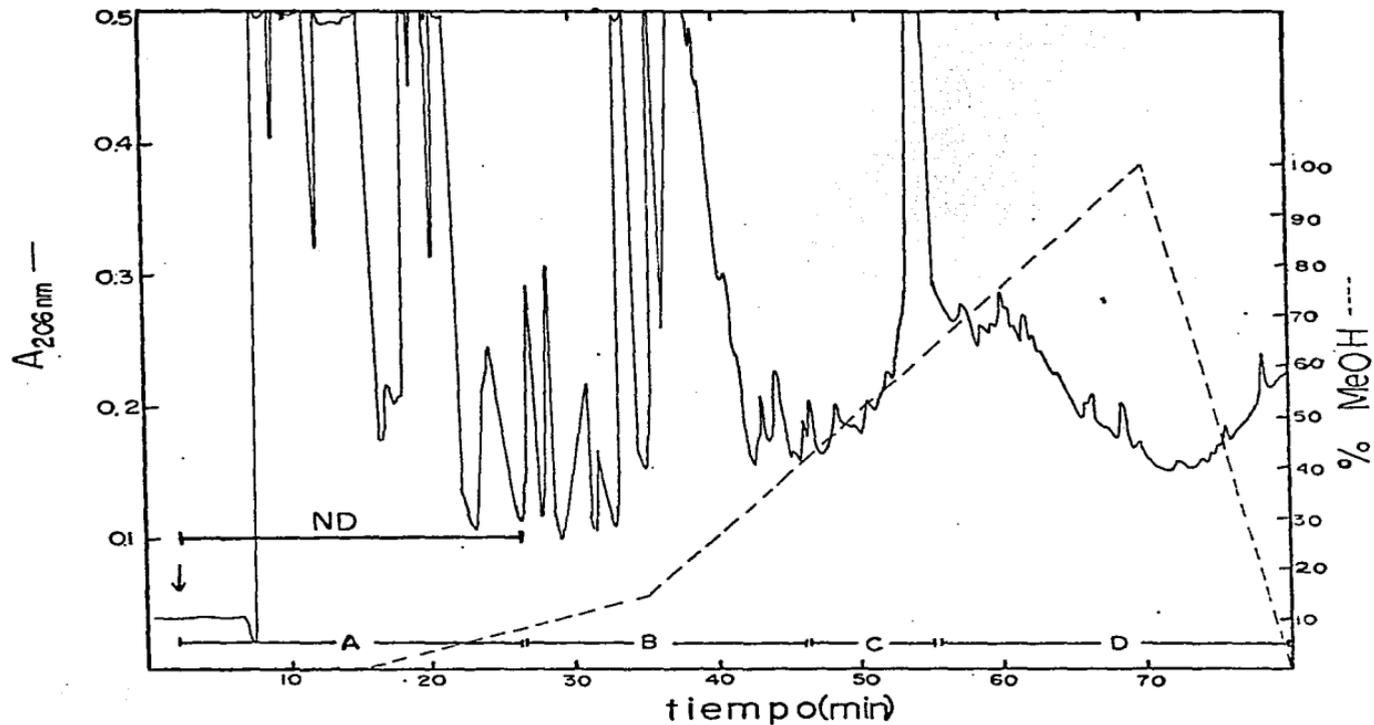


Figura N° 39.- CLAP de la fracción P-24,A,SP-1 (10 t.o.). Programa 7 (ver ANEXO 1, pág. 144). Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Solvente B: TFA 5 mM. en metanol absoluto. Columna: Ultrasphere-ODS, 5 μ m (4.6 x 250 mm). Se recogió por bloques en la forma que se indica. ND: bloque que presentó actividad neurodepresora sobre el bioensayo del tensorreceptor abdominal del acocil. La flecha indica el momento de inyección de la muestra.

D I S C U S I O N

Durante los últimos años se ha trabajado intensamente en nuestro laboratorio con el fin de poder elucidar la naturaleza química de la llamada Hormona Neurodepresora (HND), la cual, como se mencionó en la INTRODUCCION (ver pág. 22) parece ser una sustancia neuromoduladora que controla la excitabilidad neuronal en los crustáceos, y que además parece estar involucrada en el ritmo circadiano de la actividad locomotora en estos organismos.

Originalmente se había descrito que el agente responsable de esta actividad era una molécula peptídica; dializable; termoestable; constituida únicamente por aminoácidos neutros (Asn, Ala, Val, Ser, Gln, Gly, Thr, Leu/Ile, Pro); probablemente bloqueada en ambos extremos (con la posibilidad de una estructura cíclica); y con un PM aproximado de 1200 (95,104).

La metodología de purificación utilizada con los extractos de donde se obtuvo esta información consistió básicamente en cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25 fino y Sephadex G-15) y en electroforesis de mediano voltaje, en papel (pH 1.8, 10.0, 3.5 y 6.0), y se utilizaron como criterios de pureza la electroforesis y cromatografía en capa delgada, la cromatografía descendente en papel, la electroforesis de alto voltaje y la dansilación (95). El bioensayo que se empleó durante dicha purificación fue el de la disminución de la frecuencia de descarga espontánea de la neurona f-5 en la tercera raíz del tercer ganglio de la cadena ganglionar abdominal del acocil.

Este bioensayo trae consigo varios problemas, entre ellos el que presenta una variabilidad muy grande, y difícilmente controlable, de la frecuencia de disparo espontánea; además, en ocasiones es difícil registrar únicamente a f-5, por lo que muchas veces se mezclaban las señales de las otras neuronas que acompañan a f-5 en la misma raíz. Por otra parte, debido a las propias características anatómicas de esta preparación, en donde existe una gran cantidad de tejido conectivo, la difusión de los extractos de prueba, hasta la neurona de interés, podía ser muy lenta, y generalmente se hacía necesario inyectar concentraciones relativamente elevadas de cada muestra, para poder apreciar los efectos en forma clara. Este problema hacía que la sensibilidad de la preparación fuera muy baja.

Todos estos factores influyen, sin duda alguna, sobre la reproducibilidad, la exactitud, la sensibilidad y la confiabilidad del método: características, todas éstas, que deben estar siempre controladas para el desarrollo de una buena técnica de bioensayo, junto con el criterio de la especificidad.

Por estos motivos, se decidió cambiar de preparación biológica como herramienta para localizar, identificar y cuantificar a la HND en los extractos de crustáceos. Dicha preparación la constituyó el órgano tensorreceptor abdominal del acocil, el cual demostró ser una preparación mucho más sensible, reproducible y exacta en las determinaciones, aunque, como se explicará más tarde, carece de especificidad, lo que pone en juego la confiabilidad. Sin embargo, de este punto no nos percatamos hasta que nuestras investigaciones se encontraban en una etapa avanzada, por lo que este método de bioensayo se utilizó en la mayor parte de los experimentos que se reportan en esta tesis.

Por otra parte, cuando se dispuso, en nuestro laboratorio, de técnicas más potentes de separación y resolución, como lo fue la cromatografía líquida de alta presión (CLAP), se hizo evidente que los extractos de HND, con los que se habían obtenido los datos arriba mencionados, se encontraban aún en presencia de contaminantes que no habían podido ser eliminados con las técnicas de purificación empleadas previamente.

En este sentido es importante mencionar la existencia de la hormona concentradora del pigmento rojo (HCPR), en la glándula sinusal de los tallos oculares de los crustáceos. Como su nombre lo indica, esta hormona concentra el pigmento que se localiza en los eritróforos que existen en la hipodermis de estos animales. Se sabe que esta cromatoforotropina es un octapéptido, con ambos extremos bloqueados, cuya estructura primaria es la siguiente:



Esta estructura fue confirmada por síntesis química y por ensayo biológico, tanto la hormona pura como la sintética fueron activas en el orden de picogramos, para concentrar el pigmento de los eritróforos (128,129,130). También se ha reportado que el Na^+ es necesario para obtener una respuesta máxima, y que la ouabaína inhibe dicha respuesta, mientras que la tetrodotoxina la aumenta (131). A medida que el pigmento rojo se concentra en presencia de esta hormona, el potencial de membrana del eritróforo se hiperpolariza (132).

Es muy posible que los extractos de HND contuvieran a la HCPR como contaminante, pues de acuerdo a los datos de la literatura su comportamiento en Sephadex G-25 es muy parecido al de la hormona neurodepresora, además de que se trata de un péptido neutro, que no migraría en las condiciones electroforéticas que se usaron en la purificación de la HND. Por otra parte, la composición de aminoácidos que se obtuvo para la HND (ver pág. anterior) es muy parecida a la que se obtendría por hidrólisis ácida de la HCPR.

Por lo tanto, se iniciaron trabajos conducentes a la purificación de la actividad neurodepresora mediante CLAP (106). Los resultados de estos trabajos mostraron, a pesar de un período de confusión debido principalmente al cambio de bioensayo, que la actividad neurodepresora prácticamente salía al principio de la columna de fase reversa, bajo diferentes sistemas cromatográficos y, así, se sentaron las bases para la purificación de dicha actividad (106).

Se utilizaron las experiencias adquiridas en los trabajos previos para que, a partir de nuevos lotes de tallos oculares de *Penaeus vannamei* (Boone), se intentara conseguir la purificación y la elucidación de la naturaleza química de la molécula responsable de la actividad neurodepresora en estos crustáceos decápodos.

De esta manera, se empezó la purificación del lote P-19, equivalente a 6000 t.o., por el método tradicional. El comportamiento de la actividad neurodepresora en las columnas de Sephadex G-25 fino y Sephadex G-15 fue similar al que se había obtenido en preparaciones anteriores (95,106). En ambos tipos de columnas se decidió recromatografiar al material eluido activo, bajo condiciones en las que se disminuía el flujo con respecto a la primera cromatografía, con el fin de aumentar la resolución de ambos sistemas, de manera que se obtuvieran fracciones más enriquecidas en actividad neurodepresora y que contuvieran menos contaminantes (compárense las figuras N° 3 y N° 4). Por medio del bioensayo se demostró que se había recuperado la totalidad de la actividad neurodepresora después de estas separaciones, en la fracción P-19,2SG15.

Posteriormente, aprovechando la capacidad resolutoria de la CLAP, se decidió procesar a la fracción P-19,2SG15 directamente con esta técnica. Cuando se emplearon las condiciones del programa 2, se observó que la actividad neurodepresora se mantenía en la fracción P-19,2SG15,CLAP₁ (ver figura N° 5). La ubicación de la actividad en dicha posición correspondía perfectamente con los resultados obtenidos en preparaciones previas (106). De esta forma con los resultados métodos empleados se pudieron eliminar rápidamente una gran cantidad de contaminantes inactivos.

Luego al someter a este extracto a la CLAP, pero ahora bajo las condiciones del programa 3, se observó que la muestra se desdoblaba en varias fracciones, y que la mayor parte de la actividad neurodepresora se ubicaba en la fracción P-19,2SG15,CLAP₁,d_{2g} (fig. N° 6). Debe mencionarse que el extracto que se utilizó en esta serie de cromatografías se desalificó antes de someterlo a esta separación. Aparentemente la ausencia de sales permitió que la actividad se retuviera un poco más en la columna, saliendo hasta el minuto 9 - 10 después de haber inyectado la muestra. En experimentos previos, cuando los extractos todavía contenían sales, se notaba que la actividad neurodepresora eluía más temprano. Por lo tanto se hacía recomendable que todos los extractos se desalificaran previamente a su separación por CLAP.

Al cromatografiar a la fracción P-19,2SG15,CLAP₁,d_{2g} bajo las condiciones del programa 4 se obtuvieron, como se mostró en la figura N° 8, dos picos perfectamente separados, B-1 y B-5, los cuales mostraron actividad neurodepresora. Esta fue la primera ocasión en donde, por CLAP, se observaban dos fracciones, provenientes del mismo extracto, que deprimían en forma semejante la frecuencia de descarga espontánea del tensorreceptor de los crustáceos.

En los experimentos esquematizados en las figuras N° 9 y N° 10 se demostró, a nivel analítico, que ambas fracciones se habían separado y que, bajo esas condiciones de CLAP, se encontraban homogéneas. Los otros picos que aparecieron en esos cromatogramas se debieron al artificio de inyección y apa-

recieron también en las corridas control, en donde no se aplicaba muestra alguna. De esta forma se demostró que la fracción B-1 eluía justo al principio de la columna de fase reversa, mientras que la fracción B-5 se retenía hasta el minuto 9-10 después de la inyección. Estos resultados fueron sumamente reproducibles cuando se purificó de esta forma al resto del extracto. Se demostró, repetidamente, que la actividad biológica se encontraba en ambas fracciones.

Debe mencionarse, sin embargo, que una vez puros, la actividad de estas fracciones decayó muy rápidamente, y que al cabo de unas pocas semanas las muestras ya no presentaron actividad.

Esta conducta resultó sorprendente pues hasta antes de este paso de purificación final, la actividad neurodepresora se había mostrado muy estable, y en presencia de contaminantes, se sabía que la estabilidad era muy grande, y que incluso se podía observar actividad después de muchos meses de almacenamiento. Estos datos nos sugirieron que, una vez purificadas, la estabilidad de estas dos fracciones es muy frágil.

A pesar de que iban perdiendo su actividad biológica, de todas maneras se decidió seguir trabajando con estas fracciones, pensando que, tal como se había demostrado por CLAP, ya estaban puras y que se podían utilizar para el trabajo químico aún sin que tuvieran actividad.

Cuando se analizaron ambas fracciones, B-1 y B-5, por electroforesis analítica, de mediano voltaje, en capa delgada, no se pudo revelar ninguna mancha mediante la tinción con cloro. En cambio, el control de 5 ug de GABA que se había colocado fue perfectamente visible (véase la figura N° 11). Este resultado se interpretó como que la cantidad existente de cada fracción era demasiado pequeña, y quedaba por abajo de la sensibilidad del método de tinción. En la CLAP estos componentes eran visibles porque se estaba registrando a 206 nm con una sensibilidad muy alta (0.1-0.2 AUFs).

Se pensó en utilizar otra herramienta de análisis sobre estas fracciones. Dicha herramienta la constituyó la dansilación. Para ello se optimizó el método de tal manera que con sólo tres nanomoles de material se pudieran obtener los siguientes datos: a) visualización de la pureza del péptido; b) determinación del grupo amino terminal; y c) composición de aminoácidos (cualitativa). Se utilizaron como patrones al péptido S de la ribonucleasa y a la cadena A de la insulina bovina. Como se puede observar en las figuras N° 13, N° 14 y N° 15, el método fue lo suficientemente sensible como para obtener estos datos, y con la cantidad empleada aún quedó remanente como para comprobar la identificación de los DNS-aa en diferentes sistemas cromatográficos. De esta manera, las modificaciones realizadas sobre este método mostraron que se tenía una técnica muy poderosa para obtener este tipo de datos con una cantidad muy pequeña de muestra.

La dansilación, y la hidrólisis de B-1 y B-5 no mostraron ninguna mancha apreciable (ver figuras N° 16 y N° 17). En cuanto a los resultados de hidrólisis y dansilación ambas muestras mostraron una mancha con fluorescencia verde, de poca intensidad, a la altura de DNS-GABA en la pri-

mera dimensión, pero más a la derecha en la segunda dimensión. En ese momento no se pudo correlacionar a esa mancha con ningún DNS-aa identificado en esa zona. También en ambas se observó DNS-Gly, pero como ya se explicó anteriormente, dicha mancha aparece por contaminación que presenta el ácido acético comercial con Gly, y puesto que las extracciones se habían hecho en el mismo tubo, al redansilar la muestra se esperaba que dicha mancha apareciera. El blanco de reactivos mostró también la presencia de DNS-Gly. La fracción B-1, por su parte, también mostró una mancha difusa, gris amarillenta, sobre la posición de DNS-OH; y la fracción B-5 una mancha tenue, arriba y a la derecha de DNS-NH₂. Ninguna de éstas se pudo correlacionar con algún DNS-aa.

Por otra parte, el control positivo que se realizó simultáneamente, con el péptido S de la ribonucleasa salió tal como se esperaba, indicando que el método sí había funcionado.

Existían dos posibles explicaciones para estos resultados: 1) que la cantidad utilizada en el experimento (1000 t.o.) estaba muy por abajo de lo que se pensaba que debería haber, de manera que la técnica no tenía la sensibilidad suficiente y por ello no se veía nada; o bien que el (o los) péptido(s) ya puro(s) se había(n) adsorbido a las paredes de los tubos que lo(s) contenía(n), y por lo tanto no hubo nada que se dansilara (esto también podría explicar el decremento en la actividad biológica, después de que se purificaron B-1 y B-5); 2) que las fracciones utilizadas en este experimento sí estaban presentes pero no contenían aminoácidos (no eran péptidos) y por lo tanto no se podían detectar por esta técnica.

Se decidió verificar la primera hipótesis y se pensó que debido a que los tallos oculares poseían cantidades minúsculas de hormona sería necesario hacer extracciones a partir de decenas de miles de t.o. para obtener cantidades apreciables de material que, una vez purificado, sí nos permitiera llevar a cabo los estudios de estructura.

Con este fin se empezó la extracción del lote P-20, consistente en alrededor de 20,900 t.o. En esta ocasión se pretendió hacer uso de algunas de las características de solubilidad de la HND para tratar de acelerar el procedimiento de aislamiento de la hormona, ya que de haberse realizado con agua, como normalmente se hacía, la cantidad de contaminantes y de material extraído hubiera sido demasiado voluminoso, lo que llevaría a períodos muy largos de procesamiento.

Por ello, la extracción de los polvos liofilizados de t.o. se hizo con metanol. El aspecto del extracto fue diferente al que se obtenía con agua. Luego se implementaron las extracciones con diferentes solventes orgánicos. La mayor parte de la actividad neurodepresora se encontró en la fracción acuosa de la extracción con cloroformo, y se denominó P-20,1-1. De acuerdo a los datos del bioensayo se recuperó prácticamente toda la actividad original del extracto. Dicha actividad se mantenía a pesar del uso de la picrotoxina 10⁻⁴ M, y no desaparecía por incubación con pronasa B ni con proteinasa K.

El comportamiento de la actividad neurodepresora ante las enzimas proteolíticas fue sorprendente, pues el resultado esperado era que la actividad desapareciera por acción de la degradación enzimática. Como esto no sucedió se pensó que tal vez por la gran concentración de contaminantes en la muestra las enzimas no habían actuado adecuadamente, quedando también la posibilidad de que algún componente del extracto provocara cierta inhibición sobre la actividad enzimática.

Antes de hacer más experimentos para elucidar lo que estaba sucediendo con las enzimas, se decidió llevar a cabo algunos pasos de purificación para eliminar la mayor cantidad de contaminantes posible, de manera que las incubaciones enzimáticas fueran más limpias. Por supuesto, debe tenerse en mente que en este caso las sales no constituían un problema, puesto que la extracción original se hizo en metanol, y por lo tanto el contenido en sales del extracto era bajo.

Así, se hizo una cromatografía en Sephadex G-15, con agua, y la elución de la actividad neurodepresora correspondió, gruesamente, a los resultados obtenidos en preparaciones anteriores. Las fracciones activas se reunieron y concentraron, y se denominaron P-20, I-1, S₁₂; el volumen ocupado por esta fracción (16 ml) era muy grande para proseguir su purificación directamente por CLAP, por lo que se decidió probar otras estrategias.

Inicialmente se pasó al material por cartuchos de Sep-Pak, en donde por quimioadsorción se pretendió separar al extracto. Sin embargo, se observó que la actividad neurodepresora coelufa con la mayor parte del material contaminante, el cual no era retenido por la matriz de octadecilsilano y se lavaba directamente con agua. La fracción retenida, que se eluyó posteriormente con metanol fue muy pequeña, en cuanto a la cantidad de masa separada, y no presentó actividad biológica sobre el tensorreceptor.

Por lo tanto, se decidió volver a fraccionar al extracto P-20, I-1, S₁₂, SP_n en la columna de Sephadex G-15, pero ahora eluyendo con HCOOH 1 M y con un flujo menor, con la esperanza de que bajo estas condiciones se pudiera eliminar cierta parte de los contaminantes y que el extracto se hiciera más manejable. Como se puede observar en la figura N° 20 efectivamente se eliminó una buena cantidad de material, y la actividad neurodepresora, P-20, I-1, S₁₂, SP_n eluyó aproximadamente en la misma posición que lo había hecho antes.

También se decidió probar si la diálisis en membranas de poro controlado (con un corte de 1000 de PM), o la ultrafiltración a través de membranas con un corte de 500 de PM, se podrían utilizar para limpiar más al extracto, de manera que se pudiera tener a la HND en un compartimiento separado de la mayor parte del material contaminante.

Nuevamente, los resultados fueron sorprendentes ya que en ambos casos la actividad neurodepresora apareció en el compartimiento de menor peso molecular. Estos resultados implicaban que el peso molecular de la sustancia responsable de la actividad biológica era menor de 500 y, por lo tanto, este dato se oponía a los resultados obtenidos con preparaciones anteriores en donde se

había determinado que la HND tenía un PM de alrededor de 1200. Este dato último se había obtenido por comparación del volumen de elución de la HND en una columna de Sephadex G-15, la cual se había calibrado con la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH, PM = 1181) y con cianocobalamina (PM = 1355.5) (95). La elución de estos patrones se llevó a cabo con agua, o sea en condiciones en donde no se eliminan los efectos de adsorción inespecífica que puede presentar el Sephadex, por lo que es muy posible que cuando menos el LH-RH se haya adsorbido a la columna, y que eluyera más tarde. Por lo tanto, el valor de PM para la HND obtenido de este modo es dudoso.

También se observó que la mayor cantidad de masa del extracto P-20,1-1, S_{2a}, SP_h se ubicó en el compartimiento de menor peso molecular, por lo que ninguno de estos pasos constituía una ventaja en esta etapa de la purificación.

Se decidió hacer uso de la electroforesis para tratar de avanzar en la purificación. Después de buscar en qué parte del papel se localizaba la HND se encontró que ésta aparecía en el origen, a pH 1.8, lo cual concordaba con los resultados de preparaciones anteriores. Se denominó P-20,1-1, S_{2a}, SP_h, 1.8_o a esta fracción.

Como ya se habían eliminado muchos contaminantes con respecto a la etapa de extracto crudo, se pensó que era necesario ver si bajo estas nuevas condiciones se podía observar el hecho de que las enzimas proteolíticas inactivarían a la HND. El bioensayo mostró que la actividad neurodepresora se mantenía después de la incubación con proteasas, y se vió que los controles realizados para confirmar la acción de las enzimas habían dado los resultados esperados. No se podía por lo tanto explicar este hallazgo en función de que las proteasas se hubieran inactivado. En consecuencia, se empezó a pensar en la posibilidad de que la molécula responsable de la actividad neurodepresora no fuera un péptido, como se había propuesto.

La otra posibilidad sería que además del péptido hubiera alguna otra sustancia, de naturaleza no peptídica, que tuviera alguna de las características fisiológicas que se habían atribuido originalmente a la HND.

Se decidió investigar la conducta de esta fracción sobre los dos bioensayos disponibles, el de la cadena ganglionar y el del tensorreceptor, para comprobar si los resultados se reproducían en ambos sistemas. Se observó que la fracción P-20,1-1, S_{2a}, SP_h, 1.8_o producía neurodepresión en los dos bioensayos, y que, como se esperaba, a la cadena ganglionar había que aplicarle mayor cantidad que al tensorreceptor para poder ver el efecto claramente.

Cuando se probaron alícuotas de este extracto tratadas con proteasas se observó que la actividad biológica era resistente a la degradación proteolítica, y que la neurodepresión obtenida era de la misma magnitud que los extractos no digeridos. Los controles, como de costumbre, dieron los resultados esperados, indicando que las enzimas se encontraban activas.

Cuando se sometió al extracto activo a electroforesis preparativa, a pH 10.0, se obtuvieron dos fracciones, claramente diferenciables, que presentaban

actividad neurodepresora. Estas fracciones se denominaron P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10-2 y P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10+5, en función del corrimiento presentado en esta electroforesis. Se debe mencionar que en este experimento, como en los anteriores, la determinación de la actividad biológica en el tensorreceptor se hizo en presencia de PTX 10⁻⁴ M, y se observó que dicha actividad se mantenía.

Estos datos mostraron, nuevamente, el hallazgo de dos fracciones neurodepresoras, ahora por criterios electroforéticos. Una de ellas (P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10-2) parecía corresponder a la HND que se había descrito previamente, por sus características de neutralidad a pHs extremos; mientras que la otra (P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10+5) mostraba un comportamiento totalmente novedoso.

Se decidió procesar a ambas muestras mediante CLAP, utilizando para ello el programa 5, en donde se eluía isocráticamente con TEAF 10 mM, pH 3.5. Como se puede observar en las figuras N° 21 y N° 22 la actividad neurodepresora de ambos extractos se localizó en el primer bloque que se colectó, lo que hizo evidente que tales actividades prácticamente no se retenían en la columna de fase reversa, bajo las condiciones empleadas. Desde este punto de vista, el comportamiento de estas dos fracciones era semejante al obtenido con el lote P-19, en donde, como ya se dijo, se obtuvieron dos fracciones neurodepresoras por CLAP, que salían al principio de la columna.

Las dos fracciones obtenidas electroforéticamente a partir del lote P-20, después de ser cromatografiadas por CLAP como se indicó, mostraron actividad neurodepresora sobre los dos bioensayos, y ambas se mantuvieron en presencia de PTX 10⁻⁴ M.

También se analizó a la fracción P-20,1-1,S_{2a},SP_n,1.8_o,10-2 con las condiciones del programa 6 y se observó material con absorbencia a 206 nm sólo en la parte isocrática del programa, sin que hubiera evidencia de que hubiera algo que se retuviera en la columna y que eluyera con concentraciones crecientes del solvente orgánico, en este caso metanol. Estos últimos resultados, como se verá más adelante, coincidieron con los obtenidos para otros lotes.

En resumen, los datos obtenidos del lote P-20 indicaron que en los extractos de t.o. del camarón blanco del Pacífico se podían aislar dos fracciones con actividad neurodepresora, con un PM menor de 500, resistentes a la digestión con proteasas y cuyas características electroforéticas, una neutra a pH 1.8 y pH 10.0, y la otra neutra a pH 1.8 pero con migración hacia el ánodo a pH 10.0, permitían su separación. El comportamiento de ambas en CLAP indicaba que casi no se retenían en la columna usada, bajo las condiciones en que se estudiaron. Ambas fracciones ejercieron efectos neurodepresores sobre los dos bioensayos utilizados.

En vista de que los datos sobre la naturaleza peptídica de la HND se habían hecho anteriormente sobre la cadena ganglionar abdominal (95), y en vista de los problemas que se habían tenido durante la etapa de transición de un bioensayo a otro (106), se decidió revalorar los hallazgos obtenidos du-

rante esta última preparación (en donde se introdujeron modificaciones al método original) con los de una preparación fresca, extraída en la misma forma que con la técnica tradicional.

Así, se empezó la extracción del lote P-21, correspondiente a aproximadamente 2000 t.o., calentando inicialmente para desnaturalizar a las enzimas proteolíticas y luego se empleó agua para extraer. El extracto crudo que se obtuvo se sometió a digestión enzimática con pronasa B. Los controles mostraron que la enzima se encontraba activa, sin embargo no se observó pérdida de la actividad neurodepresora sobre el tensorreceptor. Sobre la cadena ganglionar no se obtuvieron resultados claros y objetivos, puesto que existió una gran variabilidad de la frecuencia en todas las cadenas que se probaron.

Se decidió procesar a una alícuota de este extracto en Sep-Pak, para tratar de mejorar las condiciones de pureza de la muestra. Nuevamente se encontró que la actividad biológica se recuperaba en la fracción no retenida en el cartucho y cluída únicamente con agua. Este extracto se desalificó para disminuir el contenido de sales que podrían interferir con los bioensayos. A diferencia de la preparación anterior (P-20), ésta contenía una gran cantidad de sales pues el extracto se hizo en agua.

Cuando se probó el efecto de la incubación con pronasa B sobre la actividad de la fracción P-21,1 se observó una depresión intensa sobre el tensorreceptor, aún en presencia de $PTX 10^{-4} M$.

En cambio, sobre la cadena ganglionar abdominal la fracción P-21.1 digerida no mostró ningún efecto neurodepresor, mientras que una alícuota no digerida sí era efectiva para disminuir la frecuencia de disparo espontánea.

Estos resultados parecieren reproducirse cuando las condiciones de separación en el Sep-Pak fueron optimizadas, aunque el efecto en esta ocasión no fue tan claro, ya que no todos los triplicados dieron el mismo resultado.

La obtención de estos datos parecía indicar que en el extracto P-21 existían al menos dos sustancias con diferente susceptibilidad a la digestión enzimática, pues una perdía su actividad cuando se la incubaba con pronasa B, mientras que la otra no lo hacía. Pero además, los resultados parecían sugerir que los bioensayos eran específicos para cada una de las sustancias, puesto que en el tensorreceptor se podía visualizar a la sustancia resistente a la proteólisis, mientras que la cadena ganglionar identificaba al material sensible a la digestión enzimática. Esta suposición, incluso, parecía explicar por qué antes se había asociado a la HND con un péptido, pues el ensayo utilizado era el de la cadena ganglionar (sobre una motoneurona), y por qué cuando se empezó a utilizar al tensorreceptor (una neurona sensorial) como método de ensayo rutinario, únicamente se encontraba material neurodepresor de naturaleza no peptídica.

Sin embargo, estos experimentos se hicieron justo antes de que los animales mostraran claramente que se encontraban enfermos. Una de las consecuen-

cias de dicha enfermedad era que no se podían obtener registros confiables de sus neuronas; además, el tejido se volvió muy friable y se desgarraba muy fácilmente. Posteriormente, incluso, ni siquiera se pudieron obtener registros de la actividad neuronal. Está por demás mencionar que los experimentos realizados durante esa época fueron totalmente caóticos, y que no se les podía tener ninguna confianza.

Cuando, después de tres meses, los animales mostraron signos de recuperación y ya se podían obtener registros aceptables, nuevamente se repitieron los últimos experimentos descritos y no se pudieron reproducir los resultados que se mencionaron. Todas las veces que se probaron los extractos sobre los dos bioensayos, en ausencia y en presencia de enzimas proteolíticas, el resultado fue siempre el mismo: actividad neurodepresora sobre ambas preparaciones biológicas, resistentes a la digestión enzimática.

Se concluyó que los resultados iniciales obtenidos con la cadena ganglionar podían no ser confiables en función de que probablemente los animales ya se encontraban enfermos cuando se realizaron esos experimentos.

En vista de los resultados obtenidos con los dos lotes anteriores, se decidió volver a iniciar una nueva preparación, pequeña, con el fin de confirmar o descartar si en efecto existía un péptido con las características de la HND.

Así se inició la preparación del lote P-22, correspondiente a 2000 t.o., haciendo la extracción acuosa, después de haber calentado para desnaturalizar a las proteasas. El extracto crudo que se obtuvo se sometió directamente a ultrafiltración a través de una membrana con un rango de corte de 500 de PM. Esto se hizo para ver si desde la etapa del extracto crudo se podía reproducir el dato de que la sustancia responsable de la actividad neurodepresora era menor de 500 de PM. Después de dos ultrafiltraciones se demostró que la mayor cantidad de actividad neurodepresora había atravesado la membrana, indicando que en efecto su PM era igual o menor de 500. Fue posible ver el grado de filtración alcanzado midiendo el contenido de sales en ambos compartimientos. Se observó que después de las dos ultrafiltraciones, el contenido en sales, medidas como Na^+ y K^+ , en el compartimiento mayor de 500, era menor del 2.5 % de la cantidad original. Como la actividad biológica se ubicaba en el mismo compartimiento que las sales, fue necesario desalificar al extracto. Mediante la extracción de la fracción liofilizada con metanol absoluto, se observó que se podían eliminar alrededor del 70% de las sales.

La digestión enzimática con pronasa B de la fracción P-22<500d no tuvo ningún efecto sobre la actividad neurodepresora, en esta etapa del extracto, en los dos bioensayos utilizados. La cadena ganglionar abdominal en este caso, no mostró que hubiera alguna molécula susceptible de proteólisis, que perdiera su actividad biológica.

Luego se inició el fraccionamiento electroforético del extracto P-22<500d, a pH 1.8 en papel. La primera serie de electroforesis realizadas seguramente se hicieron con sobresaturación del soporte, pues la resolución fue muy pobre

y prácticamente no hubo separación de bandas. Este efecto probablemente fue provocado por haber concentrado mucho al extracto P-22<500d, con la idea de no tener que hacer una cantidad exorbitante de electroforesis, como hubiera pasado con una solución más diluida. Cuando se compararon los resultados de las electroforesis preparativas con los de una electroforesis analítica (ver fig. N° 24), se observó que existía una gran diferencia y que la segunda sí había resuelto bien a los diferentes componentes de la mezcla.

Al analizar por bioensayo en donde había quedado la actividad biológica en las hojas de electroforesis preparativas, se observó una zona muy grande que presentaba actividad, desde +1 hasta -5, dividido en cuatro bandas.

Se decidió volver a someter a electroforesis a pH 1.8 a cada una de las fracciones activas, pero ahora optimizando las condiciones, de manera que no se entorpeciera el corrimiento de las bandas. Lo que se hizo fue aplicar menor cantidad de muestra en el origen, aunque esto implicara un mayor número de electroforesis para poner todos los extractos en el mismo nivel.

Una vez que se analizaron por bioensayo las fracciones obtenidas a pH 1.8, todas aquellas que fueron activas se sometieron a electroforesis a pH 10.0 y se repitió el proceso. Todos estos experimentos se mostraron resumidos en las Tablas N° 1, N° 2 y N° 3.

La electroforesis a pH 10.0 mostró ser un medio eficaz para separar a varios contaminantes, tal como se puede observar en las figuras N° 25 y N° 26.

Después de analizar cuidadosamente los resultados de las electroforesis se pudo apreciar claramente que existían cuatro fracciones con actividad neurodepresora, lo cual resultaba sorprendente, pues era la primera ocasión en que se encontraban tantas bandas con una acción semejante. Tales fracciones fueron P-22 Ia, P-22 Ib, P-22 II y P-22 III.

Los comportamientos electroforéticos de cada una de las fracciones se muestran en la Tabla N° 4. Estos datos se obtuvieron al volver a someter a electroforesis, a los respectivos pHs, a alícuotas de cada una de las fracciones, con el fin de constatar si en condiciones de mayor pureza presentaban el mismo comportamiento. Y se demostró que así fue. Aún más, se hizo un experimento en donde se mezclaron alícuotas de cada fracción, y después de separarlas por electroforesis, se analizaron por bioensayo; el resultado fue que se obtuvo neurodepresión en cada una de las posiciones correspondientes a cada banda, lo cual confirmó que después de haber sido separadas, al volverse a mezclar, podían volver a separarse en la misma forma, y sin menoscabo de su actividad.

Vale la pena, en este punto, abrir un paréntesis para hacer algunas consideraciones sobre el uso que se estaba haciendo de la picrotoxina en los bioensayos. Inicialmente se había empezado a utilizar a la picrotoxina en forma rutinaria en los bioensayos porque sabíamos, de acuerdo a los reportes de la literatura, que el GABA podía provocar neurodepresión sobre el órgano ten-

sorreceptor de los crustáceos, y como la picrotoxina es un antagonista del GABA, pues al parecer interacciona con el receptor de GABA provocando una inhibición no competitiva (124), mediante la administración de la droga se pretendía deshacerse del ruido que pudieran causar las fracciones que contuvieran GABA.

La concentración de PTX que se estuvo utilizando durante mucho tiempo fue la de 10^{-4} M, basados en la información que se había adquirido previamente durante la estandarización del bioensayo, en el laboratorio del Dr. Hugo Aréchiga, del Depto. de Fisiología y Biofísica, del CINVESTAV, en el IPN.

Durante la purificación de los diferentes extractos, y en particular en el lote P-22, nos percatamos por algunos controles que se enviaban a bioensayo, que la picrotoxina no estaba cumpliendo adecuadamente sus funciones, pues no era capaz de suprimir la inhibición generada por GABA en el tensorreceptor.

Se hizo una curva de sensibilidad del tensorreceptor al GABA, para ver desde qué concentraciones se podía observar efecto depresor. Se observó que el umbral variaba de acuerdo a los diferentes tensorreceptores usados, pero es probable que esos cambios en la sensibilidad se explicaran en función de la propia variabilidad biológica intrínseca de cada unidad y de cada organismo. No obstante, se pudo establecer que a partir de concentraciones de 10^{-5} M de GABA ya se obtenían respuestas evidentes de neurodepresión. A medida que se aumentaba la concentración de GABA, el efecto era más impresionante, y el período para alcanzar la recuperación total era más largo.

Luego se evaluó la concentración adecuada de picrotoxina para contrarrestar los efectos de GABA, y en función de los resultados que se mostraron en la Tabla N° 5, se decidió que en lo consiguiente se usarían concentraciones en el orden de 10^{-3} M de picrotoxina.

Se puede apreciar, por dichos resultados, que parece existir una especie de "umbral" de concentración por abajo del cual la picrotoxina puede bloquear a concentraciones equimolares de GABA, e incluso en relación 1:2; sin embargo, una vez sobrepasado dicho "umbral", la picrotoxina ya no puede bloquear al GABA en una relación mol a mol. Este resultado probablemente se explique por una conjugación de la ley de acción de masas por una parte, y por la afinidad del receptor por su sustrato natural, en contraposición con la afinidad que muestre por la picrotoxina.

Las concentraciones de 1×10^{-3} M y 3×10^{-3} M de picrotoxina no parecieron provocar ningún daño sobre la preparación biológica, y tampoco desensibilizaron al receptor de GABA, puesto que se podía volver a obtener la misma respuesta del tensorreceptor una vez que se lavaba la preparación, se eliminaba la picrotoxina del medio, y se volvía a someter a la misma dosis de GABA. El único efecto que mostró la aplicación de la PTX sobre el tensorreceptor fue una ligera excitación (dependiente de la concentración).

Se hizo también la observación de que las soluciones de picrotoxina "envejecían" y que ya al cabo de cuatro días habían perdido más de la mitad de

su capacidad de bloquear al GABA en el tensorreceptor. Se debe mencionar que una buena parte de los resultados de bioensayo realizados hasta esta época se habían obtenido con soluciones de picrotoxina "envejecidas", y que por lo tanto, cuando se ha mencionado que la actividad neurodepresora de una fracción se mantenía a pesar de la presencia de picrotoxina, en realidad queda la duda de si ese resultado fue válido o no, dependiendo de cuanto tiempo tuviera la solución desde su preparación.

Cuando nos percatamos de esta situación, se le sugirió a la persona responsable de realizar los bioensayos que se utilizara picrotoxina fresca para cada bioensayo, con el fin de evitar, en la medida de lo posible, los resultados falsos positivos.

Posteriormente, también nos dimos cuenta de que las soluciones recién preparadas de picrotoxina presentaban menor actividad bloqueadora, que cuando se probaban después de 30-60 minutos de haberse preparado. Tal vez esta conducta se explique pensando que este tiempo de "activación" es necesario para que la molécula se hidrate perfectamente y alcance su configuración activa en solución. Para controlar este factor se optó por preparar la solución de PTX antes de empezar a disecar al tensorreceptor.

El hecho de haber trabajado durante algún tiempo con soluciones "envejecidas" de picrotoxina, y el que la concentración de dichas soluciones estuviera por abajo de las condiciones óptimas para bloquear con un mayor margen de seguridad la interacción con el receptor de GABA, hizo posible que durante el procesamiento inicial del lote P-22 se hubieran identificado cuatro fracciones electroforéticamente distinguibles, que poseían actividad neurodepresora sobre el tensorreceptor.

La única forma de tener éxito en la purificación de una sustancia biológicamente activa, cuando no se poseen otros métodos para localizarla, es por medio del seguimiento de su actividad biológica (por bioensayo), eliminando las fracciones inactivas y prosiguiendo el procesamiento de aquellas fracciones que muestran actividad. Esta fue la razón por la cual tuvimos que rastrear a la actividad neurodepresora a todo lo largo de las hojas de electroforesis, con el consecuente hallazgo de que existían cuatro fracciones neuroinhibidoras. Bajo las condiciones empleadas no había forma, desde el punto de vista fisiológico, de diferenciar a una actividad de la otra.

Cuando se solucionaron los problemas de la picrotoxina y se adquirió confianza en su efectividad para bloquear al GABA, se sometieron alícuotas de las fracciones P-22 Ia, P-22 Ib, P-22 II y P-22 III a bioensayo sobre el tensorreceptor en ausencia y en presencia de PTX 3×10^{-3} M. Tal como se reportó en los resultados de la Tabla N° 6, las cuatro fracciones deprimieron al tensorreceptor en ausencia de la PTX. Sin embargo, cuando se probaron con PTX, las fracciones P-22 Ib y P-22 II perdieron su efecto inhibitorio, lo que indicó que éste había sido bloqueado. En cambio, las fracciones P-22 Ia y P-22 III mantuvieron su efecto.

Nos preguntamos, en respuesta a estos resultados, si el efecto depresor de P-22 Ia y P-22 III se debía a otro mecanismo que no involucraba al receptor de GABA, o si lo que estábamos viendo era resultado de una mayor concentración que no dejara actuar eficazmente a la picrotoxina. Se decidió diluir a estas muestras y aplicar solamente la mitad de lo inyectado en el experimento anterior; al poner la picrotoxina se observó que la actividad de la fracción P-22 III en efecto se bloqueaba, mientras que la de la fracción P-22 Ia se mantenía.

Estos datos indicaban, para la fracción P-22 III, que los efectos observados eran dependientes de la concentración, y que una vez que ésta disminuía, la picrotoxina podía bloquearla fácilmente.

En cambio, la actividad de la fracción P-22 Ia no se vio afectada por este tratamiento. Puesto que esta fracción mostraba un comportamiento diferente al de las otras fracciones, en cuanto a su resistencia al bloqueo con la picrotoxina, se pensó que probablemente el mecanismo de acción de esta fracción era distinto al de las otras, y que tal vez no se estaba implicando al receptor de GABA en la respuesta del tensorreceptor a la aplicación de esta muestra.

Por lo tanto, se decidió que la fracción P-22 Ia era la que, en determinado caso, podría seguirse considerando como HND, y concentramos en dicha fracción nuestros estudios.

Al dansilar a P-22 Ia como se mostró en la figura N° 27, solamente se observaron cuatro manchas adicionales a los subproductos normales de la reacción.

La mancha A, además de ser muy abundante, mostraba cambios en su coloración con el transcurso del tiempo, pasando de una fluorescencia verde amarillenta al principio, y luego se observaba como una mancha azulosa en la periferia con un centro blanco-amarillento. Esta mancha desapareció después de la hidrólisis ácida, sin embargo, al redansilar al material remanente en el tubo se volvió a observar en la misma posición y con las mismas características de coloración, lo que indicaba que el DNS-producto era lábil a las condiciones de hidrólisis, pero que no se descomponía la molécula original (por lo tanto dicha mancha no debería corresponder a un péptido, puesto que de ser así se hubieran observado manchas correspondientes a DNS-aa y hubiera desaparecido por completo la mancha A, aún bajo las condiciones de redansilación).

En cuanto a la mancha B, ésta no se dansiló, sino que mostró una absorbencia muy intensa a la luz UV, lo cual le daba un aspecto negruzco. El material de esta mancha era tan abundante que de alguna forma alteraba un poco el corrimiento de las otras manchas, sobre todo en la primera dimensión. Dicha mancha no sufrió alteraciones por la hidrólisis ácida y se observó siempre con las mismas características. Debe mencionarse aquí que en un experimento realizado posteriormente, al dansilar a homarina pura se observó una mancha que presentaba las mismas características que la mancha B, por lo que es muy probable que la identidad de dicha mancha corresponda a homarina.

La mancha C, por su parte, mostró un comportamiento más o menos parecido al de di-DNS-Lys, aunque corrió un poco menos en la primera dimensión. Se debe mencionar que una mancha con las mismas características se había observado en una preparación anterior de IIND (106).

Finalmente, la mancha D, que fue muy tenue, se ubicó en una posición arriba y a la derecha de la mancha A, no cambió sus características después de los diferentes tratamientos, y siempre se observó igual. No se encontró ningún DNS-aa que comigrara a esa posición.

Es importante recalcar que en el caso de la fracción P-22 la, no se observaron nuevos productos dansilables después de la hidrólisis ácida, lo cual parecía indicar que en dicha fracción no había ningún péptido que por hidrólisis rindiera aminoácidos.

Se comparó el comportamiento de la mancha A con algunos DNS-aa que se sabía que migraban a una posición cercana a la de dicha mancha, para ver si se podía identificar con alguno de ellos. Como ya se mencionó anteriormente, se probaron DNS-GABA, DNS-Val, DNS- β -Ala, DNS- α -aminobutírico y DNS-Pro. Con el fin de comparar mejor el corrimiento de cada uno de estos productos con la mancha A, se decidió aplicar ambos en el origen, de manera que corrieran al mismo tiempo, bajo las mismas condiciones.

Como se mostró en la figura N° 28 el único DNS-aa que comigró exactamente con la mancha A fue DNS-Pro.

Un resultado que apoya en forma indirecta a la identificación de la mancha A con DNS-Pro, fue que se sometió ésta última a la hidrólisis ácida, y en efecto se observó que la mayor parte del producto desaparecía, generándose DNS-OH, el cual sería un producto de la hidrólisis, y el cual no se había visualizado antes de la hidrólisis puesto que se estaba trabajando con el patrón puro de DNS-Pro (véase la figura N° 29).

Por otra parte, se ha reportado que la Pro puede estar jugando algún papel neuroactivo en los anélidos (133).

También se decidió hacer un experimento de dansilación con algunas catecolaminas y sus metabolitos, con el fin de observar si algún DNS-derivado de éstas podría corresponder a la mancha A. En total se probaron diez sustancias, y de ellas solamente la metanefrina dió un DNS-producto que parecía comigrar con la mancha A, aunque no completamente, como se puede observar en la figura N° 30. Existe también la evidencia de que la mancha A no podría corresponder a metanefrina porque ésta, como se esperaría, da varios DNS-productos, derivados de las diferentes combinaciones que se obtendrían al reaccionar el DNS-Cl con los diferentes grupos $-NH_2$ y $-OH$ que tiene la molécula de metanefrina.

Se analizó la fracción P-22 la por CLAP, utilizando las condiciones del programa 6, y se observó que a 206 nm se podían visualizar ocho picos (ver la figura N° 31). Se colectaron estos picos por separado y luego se dansilaron,

para ver si se podía relacionar a alguno de estos picos con las diferentes manchas que se habían visto antes por dunsilación de la misma fracción. En efecto se pudo establecer que el pico 4 del cromatograma contenía a las manchas A y C, mientras que la mancha B estaba totalmente incluida en el pico 5. Ambos picos, como se puede observar en la figura N° 31 salen de la columna durante el periodo isocrático del programa usado.

Puesto que el programa 6 de la CLAP mostró que se podía separar a la fracción P-22 Ia en ocho componentes, se utilizó el mismo sistema en forma semipreparativa con el fin de obtener mayor cantidad de cada uno de los componentes de dicha fracción, para poder estudiarlos por separado.

Cuando se probaron sobre el tensorreceptor el equivalente a 12.5 t.o. de cada pico se observó actividad neurodepresora en la fracción P-22 Ia, CLAP₄ (correspondiente al pico 4 de la figura N° 31). Dicha actividad fue totalmente bloqueada cuando se aplicó la misma dosis en presencia de PTX 1×10^{-3} M. A la misma concentración ningún otro pico mostró actividad biológica. Sin embargo, al inyectar el equivalente a 25 t.o. de la fracción P-22 Ia, CLAP₈, sí se pudo observar un efecto neurodepresor.

Posteriormente se aplicaron dosis más grandes de cada pico, para ver si los resultados mencionados en el párrafo anterior eran reproducibles. Cuando se inyectó el equivalente de 25 t.o. se encontró actividad neurodepresora en las fracciones P-22 Ia, CLAP₂, P-22 Ia, CLAP₃ y P-22 Ia, CLAP₄. La actividad de estas fracciones fue totalmente suprimida en presencia de PTX 1×10^{-3} M. Sólo cuando se aplicó el equivalente a 50 t.o. se pudo ver algún efecto neurodepresor en la fracción P-22 Ia, CLAP₈ (véase la figura N° 32).

Estos resultados fueron interesantes pues se debe recordar que originalmente la fracción P-22 Ia se había mostrado resistente al efecto de la picrotoxina; sin embargo, al separarse en sus componentes se observó que varios de ellos poseían actividad neurodepresora sobre el tensorreceptor, pero dicha actividad fue bloqueada por la picrotoxina, por lo cual es posible pensar que la resistencia a la picrotoxina, observada en la muestra no fraccionada, se debía a la suma de las actividades de sus componentes, los cuales probablemente estaban ejerciendo un efecto sinérgico cuando se encontraban mezclados.

En cuanto a la fracción P-22 Ia, CLAP₈ vale la pena hacer algunos comentarios. Este pico eluyó en una posición en donde claramente se mostraba que estaba fuertemente retenido en la columna de fase reversa, ya que fue necesario que la concentración de metanol fuera elevada para que cluyera. En una ocasión anterior se había observado, con otra preparación, que en una posición semejante eluía un pico con actividad neurodepresora sobre la cadena ganglionar abdominal (106). Sin embargo tal pico no apareció consistentemente en otras preparaciones diseñadas para obtener HND. Y lo que es más, aún en la preparación en donde sí apareció, cuando se colectó y probó nuevamente en el bioensayo ya no mostró actividad biológica.

Durante la purificación del lote P-22, nos llamó la atención que en CLAP apareciera un pico con las características de la fracción P-22 Ia, CLAP₈, pues

en determinado momento ése podría ser el candidato para identificarlo con la HND, en base a experiencias anteriores. Sin embargo, consistentemente se observó que era necesario inyectar grandes cantidades de esta fracción para obtener respuestas más bien pobres, mientras que con los otros componentes se necesitaban dosis más pequeñas para obtener respuestas casi saturantes, por lo que la mayor parte de la actividad de la fracción P-22 Ia no se podía atribuir a su contenido de P-22 Ia, CLAP_g.

El hecho de que siempre se tenía que poner mayor cantidad del pico 8 que de los otros, en el bioensayo, para observar su actividad neurodepresora, imposibilitó estudiar su comportamiento ante la picrotoxina, debido a la escasa cantidad de muestra con la que se contaba.

Se decidió abordar el problema con otro enfoque. Para ello se purificó suficiente fracción P-22 Ia, CLAP_g, por el método establecido, y se decidió hacer una digestión con pronasa B, para ver si se le podía atribuir un carácter peptídico a esta sustancia.

Los resultados del bioensayo fueron negativos tanto para la alícuota digerida, como para el control positivo que no se había incubado con la enzima. Una de las explicaciones para este resultado es que la fracción P-22 Ia, CLAP_g se hubiera inactivado espontáneamente y por eso no se veía actividad, aún cuando se estaban aplicando el equivalente a 50 t.o. sobre el tensorreceptor. Sin embargo, en este punto vale la pena mencionar que el tiempo transcurrido entre la purificación de esta fracción por CLAP a partir de P-22 Ia, su incubación y su ensayo en el tensorreceptor, fue muy corto (no sobrepasó las 36 hrs), y uno hubiera esperado ver al menos un poco de actividad, en función de experiencias previas.

La otra explicación, por supuesto, para estos resultados, es que dicha fracción era inactiva desde el principio, y que lo que algunas veces se veía en el bioensayo era una respuesta falsa positiva.

Es importante mencionar aquí que, en experimentos paralelos realizados con extractos de glándulas sinusales de Procambarus bouvieri y de Procambarus clarkii, que se prepararon para obtener HND y hormona hiperglucemiante, y que sobre el tensorreceptor mostraban un efecto neurodepresor, al purificarlos por CLAP bajo las mismas condiciones del programa 6, nunca se encontró algún pico con las características cromatográficas del pico P-22 Ia, CLAP_g de Penaeus vannamei, y sí, en cambio, se obtuvieron picos en la zona isocrática del programa, los que al colectarse y probarse mostraron neurodepresión en el bioensayo (datos no publicados). Este punto es relevante puesto que anteriormente se había demostrado que la HND de Penaeus vannamei se comportaba, físicoquímicamente, en forma idéntica a la HND de Procambarus bouvieri (95). Si la fracción P-22 Ia, CLAP_g de P. vannamei hubiera correspondido a la HND, hubiera debido esperarse que en P. bouvieri y P. clarkii se encontrara una fracción con características cromatográficas semejantes, pero no fue así.

En cambio, en lo que sí coincidieron los extractos provenientes de las tres especies, fue en que todas mostraron actividad neurodepresora sobre el

tensorreceptor, y que los picos responsables de dicha actividad se encontraron siempre al principio de los cromatogramas.

Puesto que durante la purificación electroforética se habían obtenido varias fracciones con actividad neurodepresora (P-22 11, P-22 1b, P-22 11 y P-22 111) se hicieron una serie de experimentos para tratar de caracterizar a dichos materiales. Ya sabíamos, por la literatura, que existen algunas sustancias, principalmente aminoácidos, que pueden presentar ciertos efectos sobre el tensorreceptor abdominal de los crustáceos (56,57,58). Se decidió estudiar una gama de posibles candidatos para ver si alguno de ellos podría correlacionarse con alguna de las fracciones del lote P-22.

Los criterios que se establecieron para la identificación fueron los siguientes: a) que mostraran el mismo comportamiento electroforético, tanto a pH 1.8 como a pH 10.0, que las fracciones referidas; b) que provocaran neurodepresión sobre el tensorreceptor abdominal; c) que mostraran el mismo comportamiento ante la picrotoxina, que las fracciones mencionadas; y d) que presentaran las mismas características cromatográficas en CLAP.

Los resultados de estos diferentes experimentos se mostraron resumidos en las Tablas N° 8 y N° 9. Así, desde el punto de vista electroforético, se pudo establecer una asociación entre las sustancias probadas y las fracciones obtenidas, de la siguiente forma: la Pro mostró un comportamiento parecido a las fracciones P-22 1a y P-22 11; la Tau mostró una conducta similar a P-22 1b; el GABA, β -Ala, Ala, Lys y dopamina, mostraron características semejantes a P-22 111. La homarina, por su parte, se mostró totalmente neutra a ambos pHs, lo que la asemeja a una de las características descritas previamente para la HND.

Desde el punto de vista del criterio cromatográfico en CLAP, bajo las condiciones del programa 6 se puede decir lo siguiente: la Gln mostró un comportamiento similar a P-22 1a, CLAP₃; tanto GABA como Pro mostraron un tiempo de retención que se ubicaría en el lugar en donde aparece P-22 1a, CLAP₄; y la homarina se comportó en forma parecida a P-22 1a, CLAP₅.

Sobre el tensorreceptor produjeron una neurodepresión muy notoria los siguientes: GABA, Tau, Gln, β -Ala, Arg y Asp, en orden descendente en cuanto a su potencia inhibitoria. La actividad de todos ellos fue bloqueada cuando se realizó el bioensayo en presencia de PTX 3×10^{-3} M.

También se hizo una determinación de GABA en las cuatro fracciones obtenidas, por un método enzimático muy específico, el cual sólo reconoce a GABA, y en mucho menor medida al ácido gamma-amino-beta-hidroxitbutírico. Tal como se mostró en la Tabla N° 10, se encontró GABA en las cuatro fracciones obtenidas del lote P-22, en diferentes proporciones. La fracción P-22 111 fue la que mostró una mayor cantidad de GABA, como era de esperarse por el comportamiento electroforético de esta sustancia a los pHs utilizados. Sin embargo, es notable la observación de que en las otras fracciones también se detectó GABA, sobre todo porque su conducta electroforética difiere de la del aminoácido. Esto

quiere decir que a pesar de la gran cantidad de electroforesis que se realizaron para separar a las distintas fracciones, no se pudo conseguir eliminar totalmente al GABA de ellas.

Aunque es posible que no se haya recuperado la cantidad total de GABA que se encontraba originalmente en los t.o., por pérdidas durante el procesamiento electroforético, principalmente, si uno suma las cantidades encontradas en cada una de las fracciones del lote P-22, se obtiene la cantidad de 77.05 nmoles en 10 t.o., lo que implica una concentración de 7.705 nmoles por tallo ocular (0.7805 ug).

Esta constituye la primera evidencia bioquímica que demuestra la existencia de GABA en el tallo ocular de los crustáceos, apoyada por criterios electroforéticos, cromatográficos y enzimáticos, así como por sus características fisiológicas.

En forma casi simultánea, el Dr. Ubaldo García, del Depto. de Fisiología del CINVESTAV, reportó experimentos preliminares en donde determinó la presencia de GABA en las diferentes regiones del tallo ocular, por medio de CLAP. También en el mismo trabajo, se describió que en las muestras incubadas en solución de Van Harreveld normal se observaba una liberación basal de GABA de aproximadamente 22.8 pmoles/t.o. Dicha liberación basal no varió al suprimir el Ca^{++} del medio. Al incubar en solución de 40 mM de K^+ , en presencia de Ca^{++} , se observó un incremento en la liberación de GABA, alcanzando un valor de 68.6 pmoles/t.o. Este incremento en la liberación desaparecía al incubar en solución libre de Ca^{++} (125).

Existe una diferencia de un poco más de cien veces en los valores encontrados por el Dr. García y los reportados en este trabajo. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que los valores descritos en el párrafo anterior corresponden a los que se obtienen durante la liberación, mientras que el otro valor se refiere al contenido total de GABA en el tallo ocular. Por otra parte, los valores de liberación de GABA se obtuvieron en Procambarus clarkii, mientras que el contenido total se estableció en Penaeus vannamei, y esa discrepancia tal vez podría explicarse en función de la diferencia de especies. Tal vez debería considerarse que el tamaño y peso de un tallo ocular del camarón es aproximadamente diez veces mayor que el del acocil.

Puesto que el comportamiento electroforético de la fracción P-22 lb era muy semejante al presentado por la Tau, se decidió hacer una cuantificación de este aminoácido en dicha fracción. En efecto se encontró que en P-22 lb se obtenía una gran cantidad de Tau, que presentaba aproximadamente una concentración de 472 nmoles/t.o.

Probablemente esta alta concentración de Tau en el tallo ocular se pueda explicar, en parte, por el hecho de que el extracto original se hizo a partir de tallos oculares completos, que incluían a la retina, y se ha propuesto que la Tau juega un papel de neurotransmisor en las vías nerviosas relacionadas con la retina. De cualquier forma, este dato constituye, hasta donde se tiene conocimiento, el primer reporte de cuantificación de Tau en el tallo ocular de los crustáceos.

Se ha reportado que en algunas especies de invertebrados la Tau puede estar desempeñando también un papel de osmoregulador intracelular, junto con otras sustancias, como un anión orgánico que compense en cierta forma a los cationes inorgánicos existentes en los tejidos y fluidos biológicos. Así, se ha reportado que en el tejido nervioso de Carcinus maenas, la concentración de Tau y de Ala contribuye al 10% de la presión osmótica total del axoplasma (126). Los valores de Tau encontrados en el tallo ocular del camarón corresponden, aproximadamente, a los reportados en nervios periféricos del cangrejo. Si la Tau está, o no, jugando un papel semejante en el tallo ocular, no lo podemos decir en este momento.

En vista de que en las preparaciones anteriores no se había podido encontrar, convincentemente, a una molécula de naturaleza peptídica a la cual se le pudieran atribuir las características de la HND, y puesto que la única fracción que en determinado momento se le podría asemejar fue la fracción P-22 Ia, CLAP_B, por su comportamiento diferencial en comparación con los aminoácidos, se decidió investigar si se estaba llevando a cabo algún tipo de inactivación de la molécula, el cual fuera responsable de que no se le pudiera observar durante el proceso de purificación.

Para ello se decidió utilizar un método ultra-rápido que nos permitiera obtener a esa fracción pura, con unos cuantos pasos. De esta forma se evitarían tiempos prolongados de procesamiento y condiciones agresivas. Se pensó que si se disminuía el tiempo entre el aislamiento y la purificación de esa fracción, y se probaba rápidamente en el bioensayo, las posibilidades de que se pudiera obtener un resultado positivo se incrementarían.

Así, se empezó a trabajar con el lote P-23, correspondiente a aproximadamente 570 t.o. Una vez obtenido el extracto crudo, en medio acuoso, se le sometió a un proceso de separación por quimioadsorción, empleando los cartuchos de Sep-Pak. La estrategia de elución del extracto en los cartuchos estuvo fundamentada en los resultados obtenidos previamente con la CLAP, cuando se utilizó el programa 6.

El primer lavado se hizo con TFA 5 mM en agua, pH 3.0, y cuando se analizó por bioensayo se observó una gran actividad neurodepresora. El equivalente a 2 t.o. de esta fracción P-23,SP-1 fue capaz de deprimir intensamente al tensorreceptor, y en presencia de PTX 1×10^{-3} M se siguió observando dicha depresión.

Por su parte, la fracción P-23,SP-2, cuando se aplicó sobre el tensorreceptor en una cantidad equivalente a 10 t.o. mostró excitación. Este resultado fue sorprendente porque nosotros hubiéramos esperado que en esta fracción eluviera un componente semejante a P-22 Ia, CLAP_B, puesto que el lavado se hizo con TFA 5 mM en metanol al 50%. Sin embargo no sucedió así.

Finalmente, el tercer lavado del Sep-Pak, P-23,SP-3, que se hizo con metanol absoluto y TFA 5 mM, mostró un cierto grado de neurodepresión cuando

se aplicó al tensorreceptor el equivalente a 30 t.o. Cuando se probó la misma dosis de P-23,SP-3 en presencia de PTX 1×10^{-3} M, se observó que la depresión persistía.

Sin embargo, al repetir el experimento, se observó que aunque todavía se lograba obtener una ligera neurodepresión con el equivalente a 30 t.o., dicho efecto se podía bloquear totalmente mediante la adición de picrotoxina.

En un experimento control, realizado en forma paralela, en donde se analizaron los lavados correspondientes del Sep-Pak, al cual no se le había colocado muestra alguna (es decir, se hizo una corrida en blanco), también se observó una disminución en la frecuencia de disparo espontánea del tensorreceptor cuando se le inyectó la fracción obtenida con el lavado de TFA 5 mM en metanol absoluto. Este dato podría estar indicando que la actividad observada con la fracción P-23,SP-3 se debía más bien a un artificio, y que tal vez era una respuesta inespecífica.

Luego, al analizar a cada una de estas fracciones por CLAP, utilizando el programa 6, se observaron los resultados esquematizados en las figuras N° 36 a 38. Resultó obvio que las únicas fracciones con actividad neurodepresora cluyeron al principio de los cromatogramas de P-23,SP-1 y P-23,SP-2, recogidas ambas en el primer bloque. Este comportamiento cromatográfico fue idéntico al que se había observado anteriormente en otras preparaciones.

Cuando se analizaron las fracciones obtenidas cromatográficamente a partir de P-23,SP-3 (figura N° 38), ninguna mostró actividad neurodepresora en el bioensayo, ni siquiera el bloque C, que contenía un pico semejante a P-22,1a, CLAP_g.

Esta serie de experimentos demostró que, aún cuando se acelerara el proceso de purificación, las únicas fracciones que mostraban actividad neurodepresora eran las que no se retenían fuertemente ni en los cartuchos de Sep-Pak ni en la columna de fase reversa, y que eluían al principio del cromatograma.

Estos resultados apoyaron, en buena medida, los datos obtenidos en los lotes anteriores, referentes a que la actividad neurodepresora de los tallos oculares estaba asociada a componentes que no se retienen en sistemas cromatográficos de fase reversa, bajo las condiciones empleadas. Y, por otra parte, restaron fuerza a la hipótesis de que el pico P-22 1a, CLAP_g estaba directamente involucrado con dicha actividad biológica.

En el lote P-24, además de procesar al extracto en forma rápida, como en el lote anterior, se decidió incluir en la estrategia que a la mitad del extracto se le adicionara albúmina sérica bovina al 1%, para intentar disminuir los posibles efectos de adsorción inespecífica en las paredes de los tubos, y también como medio de protección. A la otra mitad no se le agregó albúmina, y funcionó como control para comparar si aquel tratamiento permitía observar una actividad neurodepresora diferente en cuanto a su comportamiento cromato-

gráfico. Por supuesto, previamente se hizo un control que nos indicó que la BSA no ejercía ningún efecto sobre el tensorreceptor.

Cuando se probaron sobre el tensorreceptor las diferentes fracciones obtenidas de la separación en Sep-Pak se obtuvieron los resultados que se mostraron en la pág. 110. Como se indicó ahí, las únicas fracciones que mostraron actividad neurodepresora fueron P-24,A,SP-1 y P-24,B,SP-1, las cuales se habían eluido únicamente con TFA 5 mM en agua, pH 3.0. Dichas fracciones se mostraron francamente neurodepresoras cuando se probaron en dosis de 2, 1 y 0.5 t.o., y el efecto producido no fue bloqueado por picrotoxina 1×10^{-3} M. Sin embargo, al diluir las muestras y aplicar el equivalente a 0.25 t.o. entonces sí se pudo observar el efecto bloqueador de la picrotoxina.

Estos datos mostraron que, como ya se había constatado anteriormente (ver Tabla N° 5), debe existir una relación adecuada entre la picrotoxina y los agonistas del receptor de GABA, para que la droga pueda ejercer su efecto bloqueador.

En cuanto a las otras fracciones salidas del Sep-Pak, no se pudo observar ningún efecto neurodepresor en ellas, ni en las tratadas con BSA, ni en las no tratadas; ni siquiera cuando se probaron dosis tan altas como 60 t.o.

La CLAP de la fracción P-24,A,SP-1, bajo las condiciones del programa 7 (véase la fig. N° 39), confirmó los resultados que se habían obtenido anteriormente, o sea, que toda la actividad neurodepresora que se había observado en el extracto crudo del lote P-24 se ubicaba en la fracción P-24,A,SP-1, CLAP-A, es decir aquella que eluye al principio de la columna de fase reversa. Se debe mencionar que cada uno de los bloques colectados a partir de la CLAP se trataron con BSA al 1%, para aumentar las medidas protectoras. También se vio claramente que cuando se aplicaban dosis suficientemente pequeñas de esta fracción (0.25 t.o), la picrotoxina era capaz de suprimir su efecto neurodepresor.

En esta ocasión el gradiente de metanol se llevó hasta 100% para ver si no había nada con carácter neurodepresor que se retuviera fuertemente en la columna, y que bajo las condiciones del programa 6 no se hubiera visto. El resultado, en este respecto, fue negativo, como ya se mencionó.

C O N C L U S I O N E S

Tratando de resumir todos los datos y evidencias presentados en este trabajo podemos decir lo siguiente:

1) Se confirmó que en los tallos oculares del camarón blanco del Pacífico Penaeus vannamei (Boone) se encuentra una actividad neurodepresora que es capaz de inhibir la frecuencia de disparo de dos tipos diferentes de unidades neuronales. Una de ellas es la neurona f-5, de la tercera raíz del tercer ganglio abdominal, la cual es una motoneurona. La otra constituye la neurona de adaptación lenta, RM-1, del órgano tensorreceptor abdominal, la cual es una neurona sensorial.

2) Se constató que existe un cruzamiento fisiológico entre la actividad neurodepresora extraída de Penaeus vannamei, el cual es un crustáceo decápodo marino, con los receptores neuronales de Procambarus bouvieri y Procambarus clarkii, los cuales son crustáceos decápodos fluviales.

3) La actividad neurodepresora extraída de Penaeus vannamei siempre se asoció con una fracción termoestable (75°, 3 min), dializable, muy soluble en agua y también en metanol.

4) Se encontró que el PM de la actividad neurodepresora es menor de 500, pues fue capaz de atravesar una membrana de ultrafiltración con un rango de corte de 500 de PM.

5) En múltiples ocasiones se pudo observar que la actividad neurodepresora a la que nos referimos presentó una marcada resistencia a la digestión enzimática con proteasas como la pronasa B y la proteinasa K. Este comportamiento se reprodujo en diferentes estados de pureza de la muestra, por lo tanto se postula que una sustancia de naturaleza no peptídica está asociada a la actividad neurodepresora.

6) Se diseñaron diferentes estrategias para tratar de conseguir la purificación de la actividad neurodepresora a partir de tallos oculares liofilizados de P. vannamei. Los esquemas generales fueron:

a) extracción con agua; diálisis; cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 fino y Sephadex G-15; cromatografía líquida de alta presión en columnas de fase reversa, con diferentes sistemas de solventes.

b) extracción con metanol, éter de petróleo, agua y cloroformo; diálisis; cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-15, con diferentes sistemas de elución; quimioadsorción en cartuchos de fase reversa; electroforesis en papel a pH 1.5 y pH 10.0; cromatografía líquida de alta presión, en columnas de fase reversa.

c) extracción con agua; diálisis; ultrafiltración; extracción con metanol; electroforesis en papel a pH 1.8 y pH 10.0; cromatografía líquida de alta presión, en columnas de fase reversa.

d) extracción con agua; diálisis; quimioadsorción en cartuchos de fase reversa; cromatografía líquida de alta presión, en columnas de fase reversa.

Durante todas las etapas de purificación, la actividad neurodepresora fue localizada en las diferentes fracciones por bioensayo, utilizando principalmente al tensorreceptor abdominal, y ocasionalmente a la cadena ganglionar abdominal.

7) Dependiendo de la estrategia de purificación utilizada, se encontró que la actividad neurodepresora se podía desdoblar en varias fracciones (de dos a cuatro) que poseían, cada una, características neurodepressoras sobre el bioensayo.

3) Cuando se aplicaban sobre el tensorreceptor en concentraciones adecuadas, la actividad neurodepresora de cada una de las fracciones aisladas podía ser bloqueada por la aplicación de picrotoxina.

9) En uno de los lotes (P-19) en donde se purificaron a homogeneidad dos fracciones con actividad neurodepresora (B-1 y B-5), por cromatografía líquida de alta presión, se mostró que el tiempo de retención de una de ellas (B-5) era semejante al tiempo de retención de GABA, bajo las mismas condiciones.

El análisis químico mediante técnicas de dansilación no reveló la presencia de algún péptido en estas dos fracciones. Solamente se observó la presencia de una mancha que migraba muy cerca, pero no igual, a la posición que ocuparía DNS-GABA, bajo las condiciones utilizadas.

10) Mediante procedimientos electroforéticos se pudieron aislar, a partir del lote P-22, cuatro fracciones activas: P-22 Ia, P-22 Ib, P-22 Ib y P-22 III. Por comparación con el comportamiento electroforético, bajo las mismas condiciones, de varios patrones se pudo establecer que: a) prolina se comportaba en forma semejante a P-22 Ia y P-22 III; b) taurina se comportaba igual que la fracción P-22 Ib; c) el comportamiento de la fracción P-22 III era semejante al mostrado por GABA, β -alanina, alanina, lisina y dopamina; y d) la homarina se comportó en forma neutra, es decir se mantuvo en el origen tanto a pH 1.8 como a pH 10.0.

11) El análisis químico por dansilación de estas fracciones mostró que: en la fracción P-22 111 se encontró entre otros compuestos, a DNS-GABA, y la fracción P-22 1b mostró claramente, entre otras manchas, a DNS-Tau (datos no mostrados aquí); por su parte la fracción P-22 1a mostró, entre otras, a una mancha A que se asoció, por evidencias indirectas, con DNS-Pro, ocupando una posición muy cercana a DNS-GABA. Esta mancha A demostró características de coloración muy especiales. Por su parte, la mancha B que apareció en este experimento correspondió a homarina.

12) Al separar, mediante CLAP, a la fracción P-22 1a, ésta se desdobló en ocho componentes principales. De ellos, el pico P-22 1a, CLAP₄ mostró actividad neurodepresora en forma consistente, a todas las dosis probadas. Los picos P-22 1a, CLAP₂ y P-22 1a, CLAP₃ mostraron efectos a dosis medianas, y el pico P-22 1a, CLAP₈ sólo mostró efecto neurodepresor en algunas ocasiones, y siempre que lo hizo fue a dosis muy elevadas.

Al dansilar a los componentes de la fracción P-22 1a después de haberlos separado por CLAP, se encontró que el pico P-22 1a, CLAP₂, que había mostrado la mayor actividad neurodepresora, contenía a la mancha A, que se mencionó arriba.

13) Al comparar el comportamiento cromatográfico de diferentes patrones con el de los componentes de la fracción P-22 1a, en CLAP, se encontró que el pico P-22 1a, CLAP₄ aparece en una posición en la que ciuyen GABA y Pro, los cuales apenas son separables en el sistema usado. Además, el pico P-22 1a, CLAP₅ apareció en la posición de la homarina.

14) El comportamiento de la mancha A obtenida por dansilación de la fracción P-22 1a fue muy parecido al que se obtuvo por dansilación del pico B-5 del lote P-19.

15) El análisis de hidrólisis y dansilación de la fracción P-22 1a no mostró la aparición de DNS-aa, por lo que se piensa que dicha fracción no contiene péptido alguno.

16) La fracción P-22 1a mostró una actividad neurodepresora resistente a la picrotoxina, pero al analizar a sus componentes activos, éstos fueron bloqueados por la droga. Esto nos hace pensar que la resistencia que se observó es debida a una acción sinérgica de sus componentes.

17) Siempre que se probó, la actividad neurodepresora eluyó de los cartuchos de Sep-Pak, en forma consistente, en el primer lavado, que contenía un medio totalmente acuoso.

En los diferentes experimentos de CLAP, siempre se pudo asociar actividad neurodepresora a la fracción que eluía primeramente en los cromatogramas, y que constituía el primer bloque que se colectaba.

18) Las fracciones eluidas en el primer bloque, en la CLAP, siempre mostraron sobre el tensorreceptor que dosis pequeñas podían generar efectos muy notorios, como cabría esperar de una interacción fisiológica.

19) La comparación de los extractos de tallos oculares enteros de Penaeus vannamei, con los extractos de glándulas sinusales de Procambarus bouvieri y Procambarus clarkii, mostró que las actividades neurodepressoras de las tres especies estaban asociadas con el primer bloque que eluía de las columnas de fase reversa, en la CLAP.

20) Se confirmó que el tensorreceptor abdominal de los crustáceos es una preparación relativamente inespecífica en cuanto a su respuesta, y se pudo demostrar que compuestos tales como GABA, Tau, Gln, β -Ala, Arg y Asp, podían provocar neurodepresión en este bioensayo.

21) Se demostró la existencia de Tau en los tallos oculares por diferentes métodos, y su cuantificación indicó que existían alrededor de 472 nanomoles/t.o.

22) También se demostró, por primera ocasión, que los tallos oculares contienen GABA, mediante diferentes técnicas, y se determinó, con un ensayo enzimático específico, que su concentración es de alrededor de 7.705 nanomoles/t.o.

23) La mayoría de los datos aquí presentados sugieren que, al menos en parte, el GABA (o alguno de sus análogos funcionales) parece estar directamente involucrado en la acción de lo que aquí se ha denominado la actividad neurodepresora de los tallos oculares de Penaeus vannamei.

24) A lo largo de este trabajo no se encontraron evidencias sólidas que apoyaran la hipótesis de que existe un péptido en los tallos oculares que posea actividad neurodepresora sobre las preparaciones biológicas utilizadas.

Entonces ¿a quién se pueden atribuir las características que se habían asignado inicialmente a la llamada Hormona Neurodepresora?

25) Si se comparan algunas de las características presentadas durante el aislamiento del Factor I (ver INTRODUCCION, pág. 7), con las características de la actividad neurodepresora de los tallos oculares del camarón, que se han descrito en este trabajo, se pueden encontrar varias semejanzas. Ambas demostraron ser termoestables, tener un PM molecular pequeño, ser dializables y sumamente solubles en agua y en metanol. Además, ambas son capaces de inhibir la frecuencia de disparo del tensorreceptor de los crustáceos, y cuando se aplican en dosis adecuadas, sus efectos pueden ser bloqueados por la adición de picrotoxina.

Además, el Factor I se localizó en las fibras nerviosas inhibitoras, tanto del sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico de los crustáceos, y de acuerdo a múltiples evidencias de carácter fisiológico, este factor mimetiza los efectos del transmisor inhibitor neuronal.

También se describió ya que el GABA es un componente muy importante del Factor I. De igual manera se demostró aquí que el GABA parece ser un

componente muy importante de la actividad neurodepresora que se obtiene de los tallos oculares.

En un estudio enfocado a tratar de elucidar cual era el componente activo del Factor I, se demostró que por cromatografía en papel, usando como fase móvil a la mezcla n-butanol:ác. acético:agua (4:1:5,v/v/v), la fracción B del Factor I mostró un $R_f = 0.4-0.5$. Se pudo demostrar que, en el mismo sistema, tanto GABA como GGBA poseían el mismo R_f (véase la Tabla A). De la misma forma, durante estudios realizados para caracterizar a la HND, se utilizó en algunas ocasiones el mismo sistema cromatográfico, en papel y en capa delgada, y se observó que la sustancia que se identificó como HND tuvo un $R_f = 0.45$ (95,106).

Cuando se han inyectado extractos de tallos oculares con actividad de HND en acociles íntegros, se observan cambios en su conducta locomotora, la cual disminuye o se detiene, y el animal adquiere una conducta muy tranquila, que le hace parecer que estuviera paralizado. De igual forma se ha reportado que la inyección de Factor I, así como de GABA, en el acocil entero, provocaba que el animal cayera en una parálisis flácida (16).

Una gran cantidad de estudios han generado evidencias muy sólidas de que el GABA es un neurotransmisor inhibitor en múltiples organismos.

Ahora empezamos a vislumbrar que no es muy prudente el pensar, sobre todo en lo referente al sistema nervioso, que los mensajeros químicos involucrados en los procesos neurales cumplen una sola función, como se creía en el pasado. Más bien, lo opuesto parece ser la regla. Así, existen ejemplos en donde se aprecia que dependiendo del lugar en donde actúen, las estructuras con las que interaccionen, la forma en que se liberen, etc., una molécula, que debiera ser vista como un informador químico, puede desempeñar el papel de un neurotransmisor, de un neuromodulador o de una neurohormona. Los ejemplos son variados: noradrenalina, serotonina, dopamina, sustancia P, encefalinas, TRH, etc.

Existen evidencias que postulan un papel neuroendócrino para el GABA, en el sistema hipotálamo-hipofisiario de los mamíferos. En éste la liberación de GABA de algunas terminales hipotalámicas puede influir sobre la liberación de prolactina en la hipófisis (127). Evidentemente, en esta situación el GABA no está cumpliendo una función de neurotransmisor inhibitor clásico.

El hecho de que se haya encontrado GABA en diferentes regiones del tallo ocular, y que se hayan distinguido dos tipos diferentes de liberación, una basal o tónica, y una fásica (125) tal vez permita especular que la liberación tónica de GABA esté ejerciendo un control sobre la excitabilidad neuronal.

Resulta claro, de todo lo expuesto aquí, que las evidencias obtenidas no nos permiten afirmar hoy, en forma concluyente, que el GABA (o alguno de sus análogos funcionales) pueda estar desempeñando un papel neurohumoral en los crustáceos, cumpliendo un papel de modulador de la excitabilidad neuronal. Sin embargo, pensamos que existen algunos datos que sugieren que dicha posibilidad debería estudiarse más a fondo, de manera que se obtengan más resul-

tados que permitan descartar, o bien confirmar, esta hipótesis.

En este sentido, debería probarse si el GABA (o alguno de sus análogos) es capaz, o no, de reproducir, total o parcialmente, los efectos que se han descrito para la Hormona Neurodepresora.

A N E X O 1

Los programas utilizados durante los diversos experimentos de cromatografía líquida de alta-presión se introdujeron al microprocesador de la siguiente manera:

flujo = ml/min

duración = minutos

% B = porcentaje del solvente B en el gradiente

S/E = almacena/ejecuta

PROGRAMA 1:

tiempo	función	valor	duración	S/E
0	flujo	1		S/E
0	señal C-R1A	1	0.1	S/E
0	% B	0	20	S/E
20	señal C-R1A	2	0.1	S/E
20	flujo	0		S/E

Solvente A: metanol:agua (70:30, v/v)

Velocidad del papel: 1 cm/min

Registrado a 254 nm; sensibilidad 0.2 AUFS

La inyección se hizo en el minuto 1

La muestra fue una mezcla de acetofenona, nitrobenzeno, benceno y tolueno.

Este programa se utilizó para la determinación de platos teóricos de la columna Ultrasphere-ODS, 5 µm.

PROGRAMA 2:

tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	0.5		S/E
0	señal C-R1A	1	0.1	S/E
0	% B	0	10	S/E
10	% B	100	30	S/E
40	% B	100	10	S/E
50	% B	0	15	S/E
65	señal C-R1A	2	0.1	S/E
65	flujo	0		S/E

Solvente A: ácido trifluoroacético (TFA) 5 mM en metanol al 10%, pH 3.0

Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto

Velocidad del papel: 1 cm/min

Registrado a 206 nm; sensibilidad 0.1 AUFS

La inyección se hizo en el minuto 10

PROGRAMA 3:

tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	0.5		S/E
0	vel. papel	1		S/E
0	% B	0	20(30)	S/E
20(30)	flujo	0		S/E
20(30)	vel. papel	0		S/E

Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0

Registrado a 206 nm; sensibilidad 2.0 AUFS

La inyección se hizo al minuto 2

En estos caso el registro se obtuvo en un graficador Kipp & Zonen, modelo BD41.

PROGRAMA 4:

tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	1		S/E
0	vel. papel	0.5		S/E
0	% B	0	30	S/E
30	flujo	0		S/E
30	vel. papel	0		S/E

Solvente A: formiato de trietilamina (TEAF) 10 mM, pH 3.5

Registrado a 206 nm; sensibilidad 0.2 AUFS

La inyección se realizó en el minuto 2

El registro se obtuvo en un graficador Kipp & Zonen, mod. BD41

PROGRAMA 5:

tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	1		S/E
0	señal C-R1A	1	0.1	S/E
0	% B	0	20(30)	S/E
20(30)	señal C-R1A	2	0.1	S/E
20(30)	flujo	0		S/E

Solvente A: TEAF 10 mM, pH 3.5

Velocidad del papel: 0.5 cm/min

Registrado a 206 nm; sensibilidad 0.1 AUFS

La inyección de la muestra se hizo en el minuto 2

PROGRAMA 6:

tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	0.5		S/E
0	señal C-R1A	1	0.1	S/E
0	% B	0	15	S/E
15	% B	15	20	S/E
35	% B	50	15	S/E
50	% B	0	5	S/E
55	señal C-R1A	2	0.1	S/E
55	flujo	0		S/E

Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0

Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto

Velocidad del papel: 0.2 cm/min

Registrado a 206 nm; sensibilidad 0.05, 0.1, 0.2 AUFS

Se inyectó al minuto 2

PROGRAMA 7:

tiempo	función	valor	duración	
0	flujo	0.5		S/E
0	señal C-R1A	1	0.1	S/E
0	% B	0	15	S/E
15	% B	15	20	S/E
35	% B	50	15	S/E
50	% B	100	20	S/E
70	% B	0	10	S/E
80	señal C-R1A	2	0.1	S/E
80	flujo	0		S/E

Solvente A: TFA 5 mM en agua, pH 3.0

Solvente B: TFA 5 mM en metanol absoluto

Velocidad del papel: 0.2 cm/min

Registrado a 206 nm; sensibilidad 0.2, 0.5 AUFS

La muestra se inyectó en el minuto 2

B I B L I O G R A F I A

- 1) Florey, E. Neurotransmitters and modulators in the animal kingdom. Fed. Proc. 26: 1164-1178 (1967).
- 2) Roberts, E., Baxter, C.F., Van Harreveld, A., Wiersma, C.A.G., Adey, W.R. and Killam, K.F. (Eds.) 1960, "Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid", Pergamon Press, Oxford.
- 3) Florey, E. (Ed.) 1961, "Nervous Inhibition", Pergamon Press, New York.
- 4) Von Euler, C., Skoglund, S. and Söderberg, U. (Eds.) 1968, "Structure and function of inhibitory neuronal mechanisms", Pergamon Press, Oxford.
- 5) Tapia, R. The role of γ -aminobutyric acid metabolism in the regulation of cerebral excitability. In: (Myers, R.D. and Drucker-Colin, R.R., Eds.) 1974, "Neurohumoral coding of brain function", Plenum Publishing Co., New York, pp. 3-26.
- 6) Tapia, R. La comunicación interneuronal en el sistema nervioso central. En: (Mora, J., Estrada-O., S. y Martuscelli, J., Eds.) 1974, "Los perfiles de la Bioquímica en México", UNAM, México, pp. 303-320.
- 7) Bradley, K., Easton, D.M. and Eccles, J.C. An investigation of primary or direct inhibition. J. Physiol. 122: 474-488 (1953).
- 8) Eccles, J.C., Fatt, P. and Koketsu, K. Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. J. Physiol. 126: 524-562 (1954).
- 9) Brock, G., Coombs, J.S. and Eccles, J.C. The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode. J. Physiol. 117: 431-460 (1953).
- 10) Florey, E. An inhibitory and an excitatory factor of mammalian central nervous system, and their action on a single sensory neuron. Arch. int. Physiol. 62: 33-53 (1954).
- 11) Alexandrowicz, J.S. Muscle receptor organs in the abdomen of Homarus vulgaris and Palinurus vulgaris. Quart. J. micr. Sci. 92: 163-199 (1951).

- 12) Wiersma, C.A.G., Furshpan, E. and Florey, E. Physiological and pharmacological observations on muscle receptor organs of the crayfish Cambarus clarkii (Girard). *J. Exptl. Biol.* 30: 136-150 (1953).
- 13) Florey, E. and McLennan, H. The release of an inhibitory substance from mammalian brain, and its effect on peripheral synaptic transmission. *J. Physiol.* 129: 384-392 (1955).
- 14) Florey, E. and McLennan, H. Effects of an inhibitory factor (Factor I) from brain on central synaptic transmission. *J. Physiol.* 130: 446-455 (1955).
- 15) Elliott, K.A.C. and Florey, E. Factor I - Inhibitory factor from brain. Assay. Conditions in brain. Stimulating and antagonizing substances. *J. Neurochem.* 1: 181-191 (1956).
- 16) Bazemore, A.W., Elliott, K.A.C. and Florey, E. Factor I and γ -aminobutyric acid. *Nature* 178: 1052-1053 (1956).
- 17) Bazemore, A.W., Elliott, K.A.C. and Florey, E. Isolation of Factor I. *J. Neurochem.* 1: 334-339 (1957).
- 18) Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R. and Seale, B. Free γ -aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* 187: 35-39 (1950).
- 19) Roberts, E. and Frankel, S. γ -aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 187: 55-63 (1950).
- 20) Udenfriend, S. Identification of γ -aminobutyric acid in brain by the isotope derivative method. *J. Biol. Chem.* 187: 65-69 (1950).
- 21) Wingo, W.J. and Awapara, J. Decarboxylation of L-glutamic acid by brain. *J. Biol. Chem.* 187: 267-271 (1950).
- 22) Roberts, E. and Frankel, S. Glutamic acid decarboxylase in brain. *J. Biol. Chem.* 188: 789-795 (1951).
- 23) Roberts, E. and Frankel, S. Further studies of glutamic acid decarboxylase in brain. *J. Biol. Chem.* 190: 505-512 (1951).
- 24) Roberts, E., Harman, P.J. and Frankel, S. γ -aminobutyric acid content and glutamic decarboxylase activity in developing mouse brain. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 78: 799-803 (1951).
- 25) Tallan, H.H., Moore, S. and Stein, W.H. Studies on the free amino acids and related compounds in the tissues of the cat. *J. Biol. Chem.* 211: 927-939 (1954).
- 26) Florey, E. Chemical transmission and adaptation. *J. Gen. Physiol.* 40: 533-545 (1957).

- 27) Edwards, C. and Kuffler, S.W. Fed. Proc. 16: 34 (1957).
- 28) Florey, E. Further evidence for the transmitter function of Factor I. Naturwissenschaften 44: 424-425 (1957).
- 29) Florey, E. Chemical transmission and adaptation in the crayfish heart-ganglion. Anat. Rec. 132: 435-445 (1958).
- 30) Brockman, J.A. and Burson, S.L. Multiple nature of inhibitory factor (Factor I) from brain. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 94: 450-452 (1957).
- 31) McLennan, H. A comparison of some physiological properties of Factor I and γ -aminobutyric acid. Naturwissenschaften 44: 116-117 (1957).
- 32) McLennan, H. A comparison of some physiological properties of an inhibitory factor from brain (Factor I) and of γ -aminobutyric acid and related compounds. J. Physiol. 139: 79-86 (1957).
- 33) Van der Kloot, W.G., Robbins, J. and Cooke, I.M. Blocking by picrotoxin of peripheral inhibition in crayfish. Science 127: 521-522 (1958).
- 34) Kuffler, S.W. and Edwards, Ch. Mechanism of gamma-aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. J. Neurophysiol. 21: 589-610 (1958).
- 35) Purpura, D.P., Girado, M. and Grundfest, H. Central synaptic effects of ω -guanidino acids and amino acid derivatives. Science 127: 1179-1181 (1958).
- 36) Irreverre, F., Evans, R.L., Hayden, A.R. and Silber, R. Occurrence of γ -guanidinobutyric acid. Nature 180: 704-705 (1957).
- 37) Pisano, J.J., Mitoma, Ch. and Udenfriend, S. Biosynthesis of γ -guanidinobutyric acid from γ -aminobutyric acid and arginine. Nature 180: 1125-1126 (1957).
- 38) Thoai, N.v., Roche, J. et Robin, Y. Métabolisme des dérivés guanidylés. I. Dégradation de l'arginine chez les invertébrés marins. Biochim. Biophys. Acta 11: 403-411 (1953).
- 39) Florey, E. and Florey, E. Studies on the distribution of Factor I in mammalian brain. J. Physiol. 144: 220-228 (1958).
- 40) McLennan, H. Absence of γ -aminobutyric acid from brain extracts containing Factor I. Nature 181: 1807 (1958).
- 41) Van der Kloot, W.G. and Robbins, J. The effects of γ -aminobutyric acid and picrotoxin on the junctional potential and the contraction of crayfish muscle. Experientia 15: 35-36 (1959).

- 42) Florey, E. and McLennan, H. The effects of Factor I and of gamma-aminobutyric acid on smooth muscle preparations. *J. Physiol.* 145: 66-76 (1959).
- 43) Elliott, K.A.C. and van Gelder, N.M. The state of Factor I in rat brain: the effects of metabolic conditions and drugs. *J. Physiol.* 153: 423-432 (1960).
- 44) Cravioto, R.O., Massieu, G. and Izquierdo, J.J. Free amino acids in rat brain during insulin shock. *Proc. Soc. exp. Biol.* 78: 856-863 (1951).
- 45) Killam, K.F. and Bain, J.H. Convulsant hydrazides. I. In vitro and in vivo inhibition of vitamin B₆ enzymes by convulsant hydrazides. *J. Pharmacol.* 119: 255-262 (1957).
- 46) Varon, S., Weinstein, H. and Roberts, E. Exogenous and endogenous γ -aminobutyric acid of mouse brain particulates in a binding system in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 13: 269-279 (1964).
- 47) McLennan, H. The identification of one active component from brain extracts containing Factor I. *J. Physiol.* 146: 358-368 (1959).
- 48) Kuriaki, K., Yakushiji, T., Noro, T., Shimizu, T. and Saji, Sh. Gamma-aminobutyrylcholine. *Nature* 181: 1336-1337 (1958).
- 49) Kobayashi, G. Metabolism of L-arginine. *J. Japan. biochem. Soc.* 19: 92-93 (1947).
- 50) McLennan, H. *J. Physiol.* 150: 31-39 (1960).
- 51) Florey, E. Comparative physiology: transmitter substances. *Ann. Rev. Physiol.* 23: 501-528 (1961).
- 52) Curtis, D.R., Phillis, J.W. and Watkins, J.C. Actions of amino acids on the isolated hemisected spinal cord of the toad. *Brit. J. Pharmacol.* 16: 262-283 (1961).
- 53) Curtis, D.R. and Watkins, J.C. The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* 6: 117-141 (1960).
- 54) Robbins, J. The effects of amino acids on the crustacean neuromuscular system. *Anat. Rec.* 132: 492-493 (1958).
- 55) Robbins, J. The excitation and inhibition of crustacean muscle by amino acids. *J. Physiol.* 148: 39-50 (1959).
- 56) Edwards, C. and Kuffler, S.W. The blocking effect of γ -aminobutyric acid (GABA) and the action of related compounds on single nerve cells. *J. Neurochem.* 4: 19-30 (1959).

- 57) McGeer, E.G., McGeer, P.L. and McLennan, H. The inhibitory action of 3-hydroxytyramine, gamma-aminobutyric acid (GABA) and some other compounds towards the crayfish stretch receptor neuron. *J. Neurochem.* 8: 36-49. (1961).
- 58) McLennan, H. and Hagen, B.A. On the response of the stretch receptor neurones of crayfish to 3-hydroxytyramine and other compounds. *Comp. Biochem. Physiol.* 8: 219-222 (1963).
- 59) Honour, A.J. and McLennan, H. The effects of γ -aminobutyric acid and other compounds on structures of the mammalian nervous system which are inhibited by Factor I. *J. Physiol.* 150: 306-315 (1960).
- 60) Florey, E. A new test preparation for bio-assay of Factor I and gamma-aminobutyric acid. *J. Physiol.* 156: 1-7 (1961).
- 61) Florey, E. and Biederman, M.A. Studies on the distribution of Factor I and acetylcholine in crustacean peripheral nerve. *J. Gen. Physiol.* 43: 509-522 (1960).
- 62) Boistel, J. and Fatt, P. Membrane permeability change during inhibitory transmitter action in crustacean muscle. *J. Physiol.* 144: 176-191 (1958).
- 63) Grundfest, H. and Reuben, J.P. Neuromuscular synaptic activity in lobster. In: (Florey, E., Ed.) 1961, "Nervous Inhibition"; Pergamon Press, New York, pp. 92-104.
- 64) Grundfest, H., Reuben, J.P. and Rickles, W.H. The electrophysiology and pharmacology of lobster neuromuscular synapses. *J. Gen. Physiol.* 42: 1301-1323 (1959).
- 65) Dudel, J. and Kuffler, S.W. Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *J. Physiol.* 155: 543-562 (1961).
- 66) Hagiwara, S., Kusano, K. and Saito, S. Membrane changes in crayfish stretch receptor neuron during synaptic inhibition and under action of gamma-aminobutyric acid. *J. Neurophysiol.* 23: 505-515 (1960).
- 67) Furshpan, E.J. and Potter, D.D. Slow postsynaptic potentials recorded from the giant motor fibre of the crayfish. *J. Physiol.* 145: 326-335 (1959).
- 68) Dudel, J., Gryder, R., Kaji, A., Kuffler, S.W. and Potter, D.D. Gamma-aminobutyric acid and other blocking compounds in crustacea. I. Central Nervous System. *J. Neurophysiol.* 26: 721-728 (1963).
- 69) Kravitz, E.A., Kuffler, S.W., Potter, D.D. and van Gelder, N.M. Gamma-aminobutyric acid and other blocking compounds in crustacea. II. Peripheral Nervous System. *J. Neurophysiol.* 26: 729-738 (1963).

- 70) Kravitz, E.A., Kuffler, S.W. and Potter, D.D. Gamma-aminobutyric acid and other blocking compounds in crustacea. III. Their relative concentrations in separated motor and inhibitory axons. *J. Neurophysiol.* 26: 739-751 (1963).
- 71) Kravitz, E.A. and Potter, D.D. A further study of the distribution of γ -aminobutyric acid between excitatory and inhibitory neurones of the lobster. *J. Neurochem.* 12: 323-328 (1965).
- 72) Otsuka, M., Kravitz, E.A. and Potter, D.D. The γ -aminobutyric acid (GABA) content of cell bodies of excitatory and inhibitory neurones of the lobster. *Federation Proc.* 24: 399 (1965).
- 73) Otsuka, M., Iversen, L.L., Hall, Z.W. and Kravitz, E.A. Release of gamma-aminobutyric acid from inhibitory nerves of lobster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 1110-1115 (1966).
- 74) Kalmus, H. Das Aktogram des Flusskrebsees und seine beeinflussung durch Organ Extrakte. *Z. vergl. Physiol.* 25: 798-802 (1938).
- 75) Schallek, W. Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. *J. exp. Zool.* 91: 155-156 (1942).
- 76) Roberts, T.W. Evidences that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish *Cambarus virilis* (Hagen). *Anat. Rec. (Suppl.)* 81: 46-47 (1941).
- 77) Edwards, G.A. The influence of eyestalk removal on the metabolism of the fiddler crab. *Physiologia comp. Oecol.* 2: 34-50 (1950).
- 78) 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).
- 79) Naylor, E. and Williams, B.G. Effect of eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in *Carcinus*. *J. exp. Biol.* 49: 107-116 (1968).
- 80) Hanström, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 21: 584 (1935).
- 81) Kleinholz, L.H. *Amer. Zool.* 16: 151 (1976).
- 82) Aréchiga, H. and Wiersma, C.A.G. Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71-85 (1969).
- 83) Aréchiga, H., Fuentes, B. and Barrera, B. In: (Sálanki, J., Ed.) 1973, "Neurobiology of Invertebrates", Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, pp. 403.
- 84) Aréchiga, H., Huberman, A. and Naylor, E. Hormonal modulation of circadian neural activity in *Carcinus maenas* (L.). *Proc. R. Soc. Lond. B* 187: 299-313 (1974).

- 85) Aréchiga, H., Huberman, A. and Martínez-Palomo, A. Release of a neurodepressing hormone from the crustacean sinus gland. *Brain Res.* 128: 93-106 (1977).
- 86) Aréchiga, H., Cabrera-Peralta, C. and Huberman, A. Functional characterization of the neurodepressing hormone in the crayfish. *J. Neurobiol.* 10: 409-422 (1979).
- 87) Aréchiga, H. and Huberman, A. Peptide modulation of neuronal activity in crustaceans. In: (Barker, J.L. and Smith, T.G., Eds.) 1980, "The role of peptides in neuronal function", Marcel Decker, New York, pp. 317-349.
- 88) Jaros, P.P. Tracing of neurosecretory neurons in crayfish optic ganglia by cobalt iontophoresis. *Cell Tiss. Res.* 194: 297-302 (1978).
- 89) Aréchiga, H. and Cerbón, J. The influence of temperature and deuterium oxide on the spontaneous activity of crayfish motoneurons. *Comp. Biochem. Physiol.* 69A: 631-636 (1981).
- 90) Thomas, R.C. Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol. Rev.* 52: 563-594 (1972).
- 91) Cerbón, J. y Aréchiga, H. Modulación neurohormonal de la actividad de una ATPasa dependiente de Na y K en el sistema nervioso del acocil. *Res. XXVI Congr. Nal. Soc. Mex. Ciencias Fisiol.*, Colima, p. 90 (1983).
- 92) Aréchiga, H. y Anaya, V. Ritmo circádico en la secreción de la hormona neurodepresora del acocil Procambarus bouvieri. *Res. XIX Congr. Nal. Soc. Mex. Ciencias Fisiol.*, Durango, pp. 46 (1976).
- 93) Aréchiga, H., Atkinson, R.J.A. and Williams, J.A. Neurohumoral basis of circadian rhythmicity in Nephrops norvegicus (L.). *Mar. Behav. Physiol.* 7: 185-197 (1980).
- 94) Aréchiga, H. and Naylor, E. In: (De Coursey, P.J., Ed.) 1976, "Biological rhythms in the marine environment", University of South Carolina Press, pp.1.
- 95) 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).
- 96) Huberman, A., Arámburo, C. and Aréchiga, H. Isolation, purification, and partial characterization of a neurodepressing hormone from the eyestalks of Penaeus vannamei (Boone). In: (Gross, E. and Meienhofer, J., Eds.) 1979, "Peptides: Structure and Biological Functions", Proc. 6th. Am. Pept. Symp., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 853-855.

- 97) Huberman, A., Aréchiga, H., Arámburo, C. and González, I. Physiological and electrophoretic identity of neurodepressing hormone in decapod crustaceans (datos no publicados).
- 98) Aréchiga, H., Williams, J. A., Pullin, R. S. V. and Naylor, E. Cross sensitivity to neurodepressing hormone and its effects on locomotor rhythmicity in two different groups of crustaceans. *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**: 350-357 (1979).
- 99) Huberman, A., Aréchiga, H. and Arámburo, C. Search for the neurodepressing hormone in a stomatopod, Squilla mantis. *Experientia* **37**: 51-52 (1981).
- 100) Huberman, A., Aréchiga, H. and Arámburo, C. Distribution of the neurodepressing hormone in invertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **46**: Abst.166 (1982).
- 101) A. Huberman, H. Aréchiga y C. Arámburo. Efectos de la hormona neurodepresora sobre el ritmo circadiano de algunos crustáceos e insectos. XVIII Congr. Nal. Entomología, Tapachula, (1983).
- 102) Cimet Ralsky, A. Aislamiento y purificación de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del acocil Procambarus bouvieri (Ortmann). Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM (1977).
- 103) De la Rosa Vélez, J. Caracterización de una hormona neurodepresora de la glándula sinusal del acocil Procambarus bouvieri (Ortmann). Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM (1977).
- 104) Huberman, A., Aréchiga, H., Cimet, A., De la Rosa, J. and Arámburo, C. Isolation and purification of a neurodepressing hormone from the eyestalk of Procambarus bouvieri (Ortmann). *Eur. J. Biochem.* **99**: 203-208 (1979).
- 105) Aréchiga, H. and Huberman, A. Hormonal modulation of circadian behavior in crustaceans. *Front. Hormone Res.* **6**: 16-34 (1980).
- 106) Arámburo de la Hoz, C. Purificación de la hormona neurodepresora de Pennaeus vannamei (Boone) por cromatografía líquida de alta presión. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM (1981).
- 107) Dawson, Elliott, Jones. Data for biochemical research. 2nd. Ed., 1969, Oxford University Press, London, pp. 526-527.
- 108) *Ibid.*, pp. 528.
- 109) 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).

- 110) Schmid, O.J. Zur technik des nachweises von peptiden auf papier mit hilfe von chlor und o-tolidin. *J. Chromat.* 3: 499-500 (1960).
- 111) Van Harreveld, A. A physiological solution for freshwater crustaceans. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. N.Y.* 34: 428-432 (1936).
- 112) Aréchiga, H. and Bailey, H. An accurate and simple method to analyse neuronal activity over long periods of time. *Behav. Physiol.* 2: 307-310 (1974).
- 113) 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).
- 114) Schwartz, D.P. Glass wool as a potential source of artifacts in chromatography. *J. Chromatogr.* 152: 514-516 (1978).
- 115) *Worthington Enzyme Manual* (Decker, L.A., Ed.) 1977, Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, pp.
- Laskowski, M. In: (Colowick and Kaplan, Eds.) 1955, *Methods in Enzymology*, Vol. 11, Academic Press, New York, pp. 34.
- 117) Gray, W.R. and Hartley, B.S. A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides. *Biochem. J.* 89: 59 (1963).
- 118) Osborne, N. 1974. *Microchemical analysis of nervous tissue*, 1st. Ed., Pergamon Press, Oxford, pp. 58-121.
- 119) Scott, E.M. and Jakoby, W.B. Soluble γ -aminobutyric-glutamic transaminase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* 234: 932-936 (1959).
- 120) Jakoby, W.B. and Scott, E.M. Aldehyde oxidation. III. Succinic semialdehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 234: 937-940 (1959).
- 121) Jakoby, W.B. In: (Colowick and Kaplan, Eds.) 1962, *Methods in Enzymology*, Vol. V., Academic Press, New York, pp. 765.
- 122) Lowry, O.H., Roberts, N.R. and Kapphaum, J.I. The fluorometric measurement of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 224: 1047-1064 (1957).
- 123) Gaitonde, M.K. and Short, R.A. Quantitative determination of taurine by an o-phthalaldehyde-urea reaction. *Analyst* 96: 274-280 (1971).
- 124) Takeuchi, A. and Takeuchi, N. A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromuscular junction of the crayfish. *J. Physiol.* 205: 377-391 (1969).

- 125) García, U., Santos, G., Rodríguez-Sosa, L. y Aréchiga, H. Liberación de GABA en el tallo ocular del acócil Procambarus clarkii. Res. XXVI Congr. Nal. Soc. Mex. Ciencias Fisiol., Colima, pp. 139 (1983).
- 126) Lewis, P.R. The free amino acids of invertebrate nerve. Biochem. J. 52: 330-338 (1952).
- 127) Tapia, R. GABAergic mechanisms and their relationship to some hormones in the central nervous system. Front. Hormone Res. 6: 86-103 (1980).
- 128) Fernlund, P. and Josefsson, L.H. Chromactivating hormones of Pandalus borealis. Isolation and purification. Biochim. Biophys. Acta 158: 262-273 (1968).
- 129) Fernlund, P. and Josefsson, L.H. Crustacean color-change hormone: Amino acid sequence and chemical synthesis. Science 177: 173-175 (1972).
- 130) Fernlund, P. Synthesis of the red pigment concentrating hormone of the shrimp, Pandalus borealis. Biochem. Biophys. Acta 371: 312-322 (1974).
- 131) Fingerman, M. and Conell, P.M. The role of cations in the actions of the hormones controlling the red chromatophores of the prawn, Palaemonetes vulgaris. Gen. Comp. Endocrinol. 10: 392-398 (1968).
- 132) Freeman, A.R., Connell, P.M. and Fingerman, M. An electrophysiological study of the red chromatophore of the prawn Palaemonetes: Observations on the action of red pigment concentrating hormone. Comp. Biochem. Physiol. 26: 1015-1029 (1968).
- 133) Jost, J., Cain, H. and Marsden, J.R. A micro thin-layer chromatographic analysis of the amines and free-amino acids in the central nervous system of the polychaete, Nereis virens (Sars). Comp. Biochem. Physiol. 68C: 43-47 (1981).