

2ej
138



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION
DE UN PEPTIDO HEPATICO DE RATA”**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

JESUS ZAMORA SALAZAR



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL.

I.- INTRODUCCION.	Página
1.1.- Objetivo.....	1
1.2.- Resumen.....	1
1.3.- Introducción sobre el tema. Antecedentes.....	3
1.4.- Introducción sobre péptidos.....	4
II.- GENERALIDADES.	
2.1.- Liofilización.....	12
2.2.- Cromatografía en capa delgada.....	12
2.3.- Método de tinción con ninhidrina.....	14
2.4.- Determinación de proteínas por el método de Bradford (Azul Brillante de Coomassie G-250)....	15
2.5.- Método de Rydon-Smith (KI-Almidón 1%-1%).....	17
2.6.- Cromatografía de filtración en gel.....	18
2.6.1.- Adsorción.....	20
2.6.2.- Determinación del peso molecular.....	20
2.6.3.- Selección de geles.....	21
2.6.4.- Dimensiones.....	22
2.6.5.- Preparación y composición del eluyente y suspensión de gel.....	22
2.6.6.- Preparación del medio (Sephadex).....	23
2.6.7.- Preparación de la columna (Empacado).....	24
2.6.8.- Revisión de las irregularidades del empacado de la columna.....	29
2.6.9.- Aplicación de la muestra.....	29

	Página
2.6.10.- Conceptos matemáticos elementales,-----	33
2.6.11.- Interpretación de resultados y teoría de filtración en gel.-----	36
2.6.12.- Calibración de la columna de filtración en gel.-----	42
2.7.- Análisis de aminoácidos,-----	43
 III.- MATERIALES Y METODOS.	
3.1.- Método de extracción,-----	49
3.1.1.- Material,-----	49
3.1.2.- Preparación de reactivos,-----	49
3.1.3.- Extracción,-----	50
3.2.- Liofilización,-----	50
3.2.1.- Material,-----	50
3.2.2.- Preparación del equipo y procedimiento,-----	50
3.3.- Cromatografía en capa delgada,-----	52
3.3.1.- Material,-----	52
3.3.2.- Aplicación de la muestra,-----	53
3.3.3.- Desarrollo de la cromatografía,-----	53
3.3.4.- Método de la ninhidrina. Revelado de la cromatografía,-----	53
3.3.4.1.- Procedimiento,-----	56
3.3.5.- Método de Rydon-Smith (KI-Almidón 1%-1%),-----	57
3.3.5.1.- Procedimiento,-----	57
3.3.6.- Curva estándar de proteínas (BSA),-----	59

	Página
3.3.6.1.- Materiales y reactivos.-----	59
3.3.6.2.- Procedimiento.-----	59
3.3.6.3.- Preparación del reactivo de proteínas.-----	59
3.4.- Cromatografía de filtración en gel.-----	61
3.4.1.- Material.-----	61
3.4.2.- Preparación del gel.-----	61
3.4.3.- Empacado de la columna.-----	62
3.4.4.- Revisión de irregularidades del empacado de la columna. Determinación de V_o .-----	63
3.4.5.- Aplicación de la muestra.-----	65
3.4.6.- Curva de calibración.-----	66
3.5.- Análisis de aminoácidos.-----	67
 IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.	
4.1.- Preparación del extracto.-----	68
4.2.- Identificación de la banda.-----	69
4.3.- Determinación del peso molecular por cromato- grafía de filtración en gel.-----	71
4.3.1.- Determinación de V_o . Curva de calibración.-----	71
4.4.- Análisis de aminoácidos.-----	74
 V.- CONCLUSIONES.-----	88
 VI.- BIBLIOGRAFIA.-----	92

I.- INTRODUCCION.

1.1.- OBJETIVO

Implementar una técnica para la extracción y purificación de un péptido hepático de rata con una posible función en el transporte iónico en las mitocondrias, determinar el peso molecular y su análisis de aminoácidos.

1.2.- RESUMEN.

El presente trabajo tiene por objetivo, implementar una técnica para la extracción y purificación de un péptido hepático de rata. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar entre 150-200 g de peso. La obtención del extracto, se hizo en las soluciones amortiguadoras adecuadas, homogenización, precipitación con ETOH:HCl:H₂O (1:1:1), y finalmente la precipitación de proteínas con acetona de grado puro. La extracción se realizó a 0°C. Se concentraron las proteínas precipitadas con acetona, por liofilización. Se resuspendió el liofilizado en una mezcla de n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1). La separación de los péptidos se hizo por cromatografía en capa delgada en el mismo solvente. La identificación de las bandas peptídicas de referencia, así como la banda peptídica problema se realizó mediante: tinción con ninhidrina al 2% en acetona, tinción de Rydon-Smith (28) y la absorción de la banda a la luz ultravioleta, con una manifestación apreciable de fluorescencia por parte de la banda peptídica problema. La purificación y determinación del peso molecular del péptido se realizó

por cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-15. El peso molecular aproximado determinado fue de 1400 daltones. Se recuperaron las fracciones de la cromatografía de filtración en gel, - donde se localiza el péptido problema y se sometió a liofilización para su concentración. Estas muestras se analizaron posteriormente en un analizador de aminoácidos DURRUM D-500. El análisis de - aminoácidos dió los siguientes resultados: Asp (1)*, Treo (1), -- Ser (2), Glu (2), Gli (3), Ala (1), Leu (1). La determinación de Triptofano no se llevó a cabo por limitaciones de carácter técnico y la concentración del péptido por gramo de tejido hepático es aproximadamente de 0.5 microgramos.

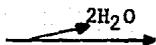
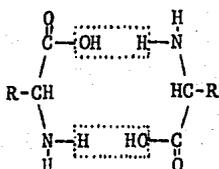
*.- Los valores entre paréntesis indican el número de residuos, tomando como valor base a Alanina.

1.3.- INTRODUCCION SOBRE EL TEMA.

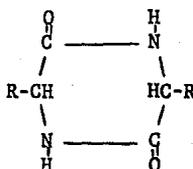
ANTECEDENTES.

El presente trabajo surgió a raíz de la inquietud que se tuvo en uno de los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en donde se buscaba determinar si las dicetopiperazinas compuestos de tipo:

Dos aminoácidos



Una dicetopiperazina



provenían en hígado de rata, de la degradación de proteínas y si tenían una función fisiológica. Esta investigación de los Dres Piña y Chagoya (1) señalaba que las dicetopiperazinas eran afectadas por la dieta y tal vez fueran productos de degradación de péptidos, sin que por ello se pudieran descartar como elementos regulatorios o con alguna función en el organismo. En esta investigación se obtenía en forma constante un componente que no se veía afectado por la dieta y cuya composición no era muy clara, ya que se recuperaba según el método utilizado una concentración muy baja, lo cual impedía la determinación cuantitativa e incluso cualitativa del componente. La investigación a este respecto quedó sin continuación hasta hace tres años en que el problema se retomó para implementar la técnica de purificación y determinación de la -

naturaleza del componente (2) definiéndose como un péptido presente en muy baja concentración en el hígado de rata, por lo que para poder continuar con la determinación de la función específica del péptido en un futuro, era necesario implementar una técnica de aislamiento y purificación del material, trabajo que ha constituido el objetivo de esta tesis.

1.4.- INTRODUCCION SOBRE PEPTIDOS.

La naturaleza y función de los péptidos, el gran número de péptidos que han sido descubiertos y su ocurrencia en diferentes tejidos, da una idea de la diversidad de funciones que caracterizan a estas moléculas.

Se ha observado la ocurrencia de péptidos en varios tejidos, como son tracto gastrointestinal y cerebro. Existen péptidos que son característicos de un solo tipo de tejido y no se han localizado en otro.

En años recientes un gran número de péptidos, se han reportado en el sistema nervioso central (SNC) y en el tracto gastrointestinal, se han descrito por ejemplo: el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), colecistocinina (CCK); en la pituitaria: la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), así como otros péptidos derivados de su precursor, por ejemplo, la pro-opiomelanocortina (POMC), y posiblemente la prolactina, la hormona estimulante de la tirotropina (TSH) y la hormona luteinizante (LH), los cuales han sido descritos en los últimos diez años.

En vertebrados, se ha pensado que estos péptidos tienen un papel como neurotransmisores o neuromoduladores y parecen estar involucrados en la regulación de un buen número de sistemas homeostáticos (3). Enseguida se mencionan algunos ejemplos de péptidos con diferentes actividades biológicas y su presencia en varios tejidos.

El plasma contiene un buen número de péptidos con actividad semejante a insulina (ILA) de pesos moleculares de 7 000 a 90 000 (somatomedinas y proteínas parecidas a insulina) los cuales estimulan el metabolismo celular y pueden funcionar como factores de crecimiento. Se ha encontrado evidencia de la presencia de un péptido de 800 daltones en el plasma humano el cuál estimula marcadamente el metabolismo de condrocitos de pollo (4).

Knecht, R., et.al (5) determinaron la secuencia completa de aminoácidos de un inhibidor de proteinasa, la Eglina C (P.M de -- 8 100 daltones), usando a) dimetilaminoazobencen-sulfonil-cloruro; b) aislamiento usando el método de derivación de precolumna de dimetilaminoazobencen-isotiocianato (DABITC), y c) la degradación automática de Edman (6).

Se han aislado dos péptidos (I y II) inhibidores de la deshidrogenasa láctica de la orina humana por extracción con solventes, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel. El péptido I no contiene ningún aminoácido aromático y no es afectado por la quimotripsina; el péptido II contiene tirosina y es destruido por la quimotripsina (7).

Por otro lado se han purificado otros dos péptidos de hígado humano con actividad similar a aquellos reportados previamente en orina humana (7), los cuales pueden servir como reguladores metabólicos de las isoenzimas de la deshidrogenasa láctica (LDH-M₄ = tipo muscular; LDH-H₄ = tipo cardíaco), por precipitación con ácido tricloroacético (TCA), ultrafiltración, columnas de Sephadex y Bio-Gel P-2, cromatografía de afinidad sobre isoenzimas-LDH inmovilizadas y HPLC. Ninguno de los dos péptidos tienen especificidad-cruzada, cada péptido exhibió actividad inhibitoria solamente sobre una de las dos isoenzimas LDH-M₄ ó LDH-H₄ (8).

Las encefalinas y algunos polipéptidos que contienen encefalinas fueron liberados de glándulas adrenales perfundidas de bovinos; por nicotina y Ba²⁺, agentes que liberan catecolaminas. Todos los polipéptidos que contienen encefalinas se encontraron normalmente en la médula adrenal, siendo liberados por los agentes secretores en aproximadamente la misma proporción (9).

Anastasi, A., et.al (10), obtuvieron extractos metanólicos de la piel de ranas australianas Uperoleia rugosa y Uperoleia marmorata, en los cuales identificaron grandes cantidades de un nuevo péptido (Uperoleína), la que posee una actividad muy similar a la Fisalaemina. Cuya actividad es: estimular la secreción salival, la contracción intestinal y la vasodilatación (11).

En extractos metanólicos de la piel de ranas australianas Litoria (Hyla)-aurea, se ha encontrado que contienen un polipéptido,

la Litorina, el cual posee una actividad muy parecida a la Bombesina (un tetradecapéptido, el cual es un potente estimulante de las secreciones gástricas y pancreáticas en mamíferos) (12). La Litorina ha sido aislada en forma pura y determinado que es un no napéptido (13).

Estudios previos (14) indican que el veneno completo del molusco marino Conus geographus inhibe directamente el músculo esquelético, dejando los nervios periféricos, el músculo cardíaco y el liso inafectados. La miotoxina purificada se obtiene usando -- cromatografía en fosfocelulosa la cual tiene los mismos efectos fisiológicos que el veneno completo. Una caracterización bioquímica de la miotoxina purificada indica que es un péptido de trece aminoácidos que contiene además dos enlaces disulfuro (15).

Recientemente se caracterizaron tres péptidos (Conotoxinas - G-I, G-IA y G-II) altamente tóxicos del veneno del mismo caracol marino Conus geographus. Estos péptidos causan su potente actividad por inhibición de la terminal post-sináptica de la unión neuromuscular de los vertebrados. El tamaño relativamente pequeño de los péptidos (13 a 15 aminoácidos, así como el polimorfismo en su estructura hace que sean potencialmente atractivos para pruebas de eventos de transmisión sináptica (16).

Cuando el plasma humano fue fraccionado por cromatografía de filtración en gel sobre Bio-Gel P-10, se encontró que cantidades sustanciales de putrescina y cantidades traza de espermidina estaban asociadas consistentemente con una especie peptídica de peso

molecular de 4 180 daltones. Se encontró que el péptido purificado es una cadena simple, compuesta de 32 residuos de aminoácidos. La significancia funcional del conjugado putrescina-péptido no es clara (17).

Las neurohormonas vasopresina y oxitocina están incluidas en la lista de péptidos cerebrales, su presencia dentro de las neuronas magnocelulares del hipotálamo es ampliamente conocida. Se ha reconocido recientemente que algunas proyecciones de estas neuronas ocurren en regiones del SNC, otras en la pituitaria posterior. Algunos péptidos (Tabla I): polipéptido intestinal vasoactivo -- (VIP), colecistocinina (CCK), insulina, glucagon y gastrina, ocurren originalmente en elementos secretores del tracto gastrointestinal. Otros péptidos, también llamados péptidos gastrointestinales, tales como la sustancia P, la neurotensina, las encefalinas, y la somatostatina, fueron descritos inicialmente en tejidos neurales previa a su descripción dentro del tracto gastrointestinal. Los datos acumulados indican que sustancias similares a péptidos hormonales conocidos y moléculas de neurotransmisores químicos están presentes en plantas y organismos unicelulares (18).

Hokfelt et.al (19) han demostrado la coexistencia de neuropéptidos y neurotransmisores dentro de la misma neurona.

La bacitracina es un antibiótico polipeptídico complejo producido por Bacillus subtilis y licheniformis, es utilizado como antibacteriano local y en infecciones entéricas (20).

TABLA I.

-LISTA DE PEPTIDOS CEREBRALES DE MAMIFEROS-

"Hormonas-liberadoras-hipotalámicas"

Hormona-liberadora-tirotropina.
Hormona-liberadora-gonadotropina.
Hormona-liberadora-corticotropina.
Hormona-liberadora-hormona de crecimiento.
Somatostatina.

"Hormonas neurohipofisarias"

Vasopresina; Oxitocina; Neurofisisina(s).

"Péptidos de la pituitaria"

Hormona adrenocorticotrópica; Endorfina; Prolactina;
Hormona estimulante de melanocitos; Hormona luteinizante;
Hormona del crecimiento; Tirotropina.

"Péptidos de invertebrados"

FMRF amida (Fenilalanilmetionilargininifenilalanilamida).
Activador de la cabeza de Hydra.

"Péptidos gastrointestinales"

Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP).
Colecistocinina (CCK).
Gastrina.
Sustancia P.
Neurotensina.
Metionin-encefalina.
Leucin-encefalina.
Insulina.
Glucagon.
Bombesina.
Secretina.
Somatostatina.
TRH
Motilina.

Otros.

Bradiquinina.
Carnosina.
Péptido(s) del sueño.
Calcitonina.
CGRP
Neuropéptido Yy.

(Tomado de Krieger, D.T., (1983), Brain Peptides: 222, 975-985)

La Actinomicina D es otro ejemplo de antibiótico de naturaleza peptídica producido por varios Streptomyces sp. Se enlaza al DNA bloqueando el movimiento de la RNA polimerasa, lo que impide la síntesis de RNA (21).

Los agentes antibacterianos que actúan sobre la membrana celular bacteriana pueden dividirse en tres grupos: antisépticos -- aromáticos y catiónicos, antibióticos polipeptídicos cíclicos y -- antibióticos ionóforos. El primer grupo no pertenece a los antibióticos y solamente serán considerados los últimos dos grupos. Los antibióticos polipeptídicos cíclicos pueden ser divididos en dos grupos en base al número de aminoácidos constituyentes del -- anillo peptídico. Los miembros del primer grupo incluyen: la tirocidina, mezcla de antibióticos producidos por Bacillus brevis, -- aislado por Hotchkiss et.al (22), y la gramicidina S (Soviet), -- producida por una especie de Bacillus brevis, aislada por Gause et.al (23), son decapeptidos cíclicos. El segundo grupo, las polimixinas, producidas por Bacillus polymyxa y aislado por Brownlee, J. (24), tienen un anillo polipeptídico de siete miembros unido a una cadena polipeptídica pequeña terminada por un ácido graso ramificado (25).

Aunque el modo de acción preciso de estos antibióticos aún -- no está completamente claro, se sabe que se combinan a la membrana celular y alteran su función permitiendo la salida de componentes citoplásmicos pequeños y desacoplando la fosforilación oxidativa. La gramicidina S y la tirocidina actúan de manera muy ----

semejante y resultan altamente tóxicos para las células de mamíferos, por lo cuál tienen poca aplicación médica (25).

El grupo de los antibióticos ionóforos contiene polipéptidos lineales y cíclicos, estos antibióticos actúan formando poros o canales artificiales en la membrana celular, a través de los cuales escapan los iones intracelulares. Pertenecen a este grupo la Valinomicina, antibiótico ciclo-dodecapéptido producido por Streptomyces fulvissimus, es el ionóforo que ha recibido más atención, tiene una gran afinidad por el ión K^+ , la gramicidina A, producida por Bacillus brevis es un polipéptido lineal que no se considera como ionóforo, sino como formador de canales en la membrana celular bacteriana (25).

II.- GENERALIDADES. SOBRE LA METODOLOGIA EMPLEADA EN EL PRESENTE TRABAJO.

2.1.- LIOFILIZACION.

La concentración de soluciones biológicas es requerida en el curso de la purificación de una molécula. Las soluciones pueden variar, de filtrados de cultivos crudos a soluciones diluídas de enzimas purificadas. Algunos métodos de concentración usan procedimientos íntimamente relacionados a la diálisis. Las soluciones de proteínas son concentradas frecuentemente por precipitación con sulfato de amonio, seguida de disolución de la pastilla ó "pellet" resultante en una cantidad pequeña de amortiguador. De cualquier manera, en frecuentes ocasiones el uso de la precipitación con sales es indeseable o dañino; para estos casos la liofilización es conveniente. Este método implica primero, congelar la solución de proteínas sobre las paredes de un frasco, girando éste sobre su base y sublimando el líquido al vacío. La presencia de sales inorgánicas en concentrados de proteínas es indeseable debido a que por este método no es posible su eliminación. Estos problemas han generado una serie de métodos que concentran las proteínas de una solución, no así las otras moléculas que pueden estar presentes (26).

2.2.- CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

La separación por cromatografía en capa delgada está basada en el tamaño molecular y la solubilidad de aquellas moléculas que van a separarse (26).

La separación de péptidos de digestiones proteolíticas controladas por cromatografía en papel y electroforesis ha encontrado gran aplicación en el estudio de la estructura de proteínas. Con este método es posible comparar mezclas de digestión de diferentes proteínas y detectar diferencias tan pequeñas como el reemplazo de un aminoácido. Tales diferencias son de importancia en la comparación de proteínas homólogas de diferentes especies de plantas y animales y en el estudio de cambios determinados genéticamente en la estructura de proteínas, tal como aquellos resultantes de una mutación simple de un gen (27).

En 1956 una técnica de alto poder de resolución fue descrita por Ingram (28) quien sometió la mezcla de péptidos resultantes de la digestión triptica de hemoglobina desnaturalizada por calor, a electroforesis en papel a pH de 6.5 seguida por cromatografía ascendente en n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1):

El sistema cromatográfico tiende a separar los péptidos polares de los no polares y la electroforesis separa los péptidos polares de acuerdo a la carga (27).

Para una separación satisfactoria de péptidos es importante que la mezcla final esté libre de sales. El sistema de solventes debe ser preparado recientemente y usado durante las siguientes 24 horas (27).

2.3.- METODO DE TINCION CON NINHIDRINA.

Este método está basado en la formación de un color azul por la reacción de ninhidrina y compuestos que contienen grupos amino libres, el método descrito abajo se basa en los métodos desarrollados por Moore y Stein (29), para el análisis de efluentes en separaciones cromatográficas de aminoácidos y péptidos. La ninhidrina, preparada comercialmente por el método de Teeters y Shriner (30), se recrystaliza después de unos meses de uso. La solución es almacenada a 4°C durante toda la noche.

La reacción de color entre alfa-aminoácidos y ninhidrina ha sido estudiada extensivamente. Se ha establecido que se forman compuestos coloridos no solamente con aminoácidos, sino también con péptidos, proteínas y otros tipos de sustancias que poseen grupos amino libres. Es conocido que la reacción es extremadamente sensible para trabajo cualitativo. Además, se obtienen resultados reproducibles para un aminoácido dado, los diferentes aminoácidos no todos, desarrollan la misma cantidad de color por mol. Con prolina e hidroxiprolina, la reacción sigue un curso diferente que con los aminoácidos que contienen un grupo alfa-amino. Estos dos aminoácidos dan productos con un máximo de absorción a 440 nm (29). Para trabajos con material biológico no fraccionado, la falta de especificidad es una desventaja como fue demostrado por Harding y Mac Lean (31).

La ninhidrina, poderoso agente oxidante, causa descarboxilación oxidativa de los alfa-aminoácidos produciendo CO_2 y NH_3 y un aldehído con un átomo de carbono menos que el aminoácido progenitor. La ninhidrina reducida reacciona luego con el amoníaco liberado, formando un complejo azul que tiene un máximo de absorción a 570 nm.

El NH_3 y los péptidos reaccionan más lentamente que los alfa aminoácidos. La prolina y la 4-hidroxi prolina producen un color amarillo en lugar de púrpura, con la ninhidrina (Fig.1)(29,33,34).

2.4.- DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD. (Azul Brillante de Coomassie G-250).

Bradford (35) describió un ensayo espectrofotométrico para proteínas que es cuatro veces más sensible que el ensayo estándar de Lowry (36). Este nuevo ensayo requiere un reactivo simple, el Azul Brillante de Coomassie G-250 (de peso molecular = 695.61, y cuya fórmula condensada es: $\text{C}_{26}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$) (37) y solamente dos minutos para desarrollar el color. De cualquier forma cuando Bradford intentó incrementar la sensibilidad del ensayo disminuyendo el volumen del reactivo colorante notó un decremento no esperado en la extinción del complejo proteína-colorante.

Se encontró que en el intervalo de concentración de proteína de 0.8 a 10 g/ml, la extinción del complejo proteína-colorante no cambió cuando el volumen del reactivo colorante fue variado de 0.5 a 5.0 ml. Esta característica permite que la sensibilidad del

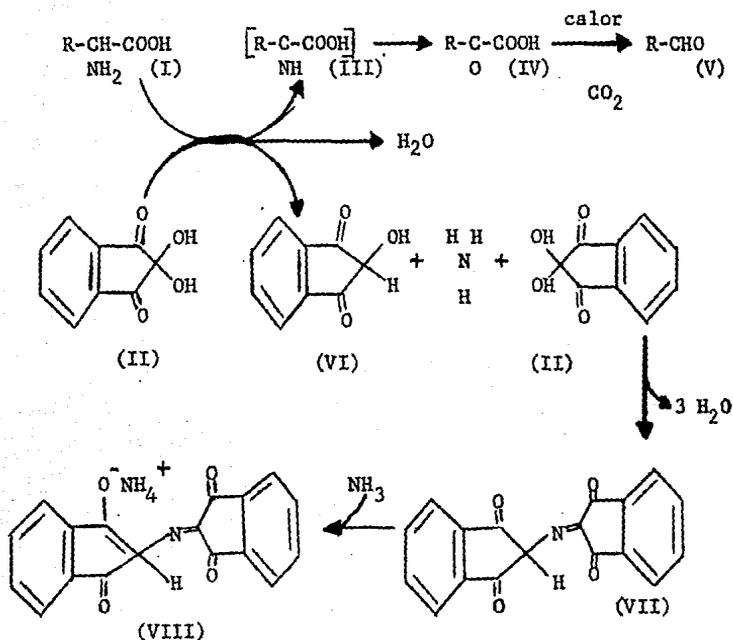


Fig. 1:

La reacción de un aminoácido (I) con la ninhidrina (II). Los productos iniciales formados con agua, una forma parcialmente reducida de ninhidrina (VI) y un alfa-aminoácido (III). (III) reacciona rápidamente con el agua formando amoníaco y un alfa-cetoácido (IV). Si la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente, (IV) puede ser aislado. En presencia de calor, sin embargo, (IV) es descarboxilado formando CO_2 y un aldehído (V) con un átomo de carbono menos que el aminoácido original. La formación del típico color azul púrpura de la reacción de la ninhidrina incluye la condensación de esta, la ninhidrina, parcialmente reducida (VI), del amoníaco y de la ninhidrina (II) con pérdida de tres moles de agua, formándose el compuesto intermedio (VII). Este reacciona entonces con el amoníaco formando el complejo que da la coloración final (VIII). (III) se muestra en corchetes porque en realidad no ha sido aislado como un intermediario.

(Tomado de Breton, S.C., 1958, ref. (32)).

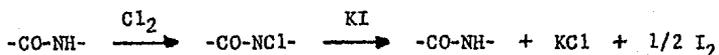
ensayo se incrementa inversamente con el volumen del colorante adicionado (38). El ensayo de proteínas descrito por Bradford (35) - eliminó muchos problemas de interferencias, y es fácilmente utilizado para procesar un gran número de muestras. Está basado en la observación de que el Azul Brillante de Coomassie G-250 existe en dos diferentes formas de color, rojo y azul (39). El complejo proteína-colorante tiene una extinción alta dando así una gran sensibilidad en la medida de la proteína. El enlace del colorante a la proteína es un proceso muy rápido (aprox. 2 minutos) y el complejo proteína-colorante permanece disperso en solución por un tiempo relativamente largo (aprox. 1 hr), haciendo así el procedimiento muy rápido, además de no requerir de un tiempo crítico para el ensayo (35).

2.5.- METODO DE RYDON-SMITH (KI-ALMIDON 1%-1%).

Rydon-Smith (40) desarrollaron un método para la detección de péptidos y compuestos similares sobre cromatogramas en papel.

Además de utilizar la ninhidrina para la separación e identificación de aminoácidos y péptidos, ha sido usada como reactivo - rociador para revelar las posiciones de las manchas. La ninhidrina tiene dos serias limitaciones: no reacciona con aminoácidos o péptidos cíclicos, ya que solamente el grupo amino terminal entra en la reacción, el color desarrollado con una cantidad de material dada decrece con el incremento del peso molecular (29).

Se ha encontrado que péptidos de todo tipo de lotes, incluyendo proteínas, dicetopiperazinas, aminoácidos y péptidos acilados, pueden ser muy fácilmente detectados por cloración y subsecuente rociado con KI-Almidón 1%-1%, el color resultante es debido a la liberación de I₂ por el N-cloro-péptido formado en el estado de cloración, de acuerdo a la siguiente reacción:



Los compuestos son revelados enseguida como manchas azul oscuro sobre un fondo azul débil; las manchas se desvanecen a color café en el curso de unas cuantas horas y completamente en unos cuantos días. El procedimiento cloro-almidón-ioduro puede ser aplicado sucesivamente a papeles los cuales ya han sido rociados con ninhidrina (40).

2.6.- GROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL.

Uno de los métodos más útiles para la separación de proteínas entre sí, basándose en su tamaño, es la cromatografía de filtración en gel (CFG). En la CFG, la mezcla de proteínas disueltas en un amortiguador adecuado, se deja fluir por gravedad, a lo largo de una columna empacada con gránulos, o perlas, de un polímero inerte, que ha sido previamente lavado y equilibrado con el amortiguador. Los materiales mas comunes para el llenado de las columnas son el Sephadex, nombre comercial de un derivado polisacárido, Bio-Gel, un gel de poliacrilamida producido por copolimerización

de acrilamida ($H_2C=CHCONH_2$), con un agente de entrecruzamiento, - la N,N'-metilenbisacrilamida ($H_2C=CHCONHCH_2NHCOCH=CH_2$), (41) y la agarosa, un polisacárido lineal obtenido esencialmente de residuos alternados de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa (42). En las columnas, las proteínas de diferente tamaño molecular van pene--trando en los poros internos de los gránulos en diferentes grados de intensidad y descendiendo a lo largo de la columna a diferen--tes velocidades. La capacidad de resolución de la CFG es tan gran--de, que este sencillo método de determinación del peso molecular aproximado de las proteínas se utiliza ahora de manera muy genera--lizada (34).

El Sephadex es un gel formado por perlas, preparado por en--tre cruzamiento de dextrán con epíclorohidrina. Los tipos G de Sephadex difieren en su grado de entrecruzamiento y por lo tanto en su grado de hinchamiento y fraccionamiento. La Tabla II muestra - las propiedades físicas de los diferentes tipos G de Sephadex.

El Sephadex es insoluble en todos los solventes (si no es de gradado químicamente). Es estable en agua, soluciones alcalinas y débilmente ácidas. En ácidos fuertes, los enlaces glucosídicos en la matriz del gel son hidrolizados. El Sephadex no se funde y pue--de ser esterilizado en estado húmedo a pH neutro o secado por au--toclave durante 30 minutos a $120^{\circ}C$, sin afectar sus propiedades - cromatográficas (26,43,44).

2.6.1.- ADSORCION.

Ciertas especies moleculares se desvían fuertemente del comportamiento general de elución descrito y son eluidas, ya sea, -- temprana o tardíamente que lo predicho de su tamaño molecular (44).

Estos efectos son más prominentes para moléculas pequeñas sobre geles de mayor entrecruzamiento por ejemplo, Sephadex G-10 y G-15. Han sido reconocidos dos tipos principales de interacción - soluto-gel, iónico y aromático. Los compuestos aromáticos heterocíclicos u homocíclicos pueden interaccionar con Sephadex y ser - eluidos tardíamente. Estas interacciones han sido estudiadas extensivamente por Williams, K.W. (45) y son de gran valor en la resolución de compuestos aromáticos pequeños y similares, por ejemplo: las purinas y las pirimidinas, material colorante, las iso-- flavonas y los péptidos. Las fuerzas de interacción pueden ser reguladas por cambios en la fuerza iónica o del pH. La adición de - metanol o etanol, incrementa las fuerzas de interacción (43,44).

2.6.2.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR.

Una columna calibrada de Sephadex provee una forma simple y adecuada para determinar los pesos moleculares aproximados de proteínas (46-48).

Los requerimientos son una columna empacada con el gel apropiado y una serie de proteínas (o péptidos) para su calibración. Una vez determinada una curva de calibración, para la columna, -- esta puede ser aplicada a un gran número de corridas si no se ---

desmonta. El método ha sido usado para la determinación de la distribución del peso molecular de dextranas, polivinilpirrolidonas, preparaciones de gelatinas y otros polímeros hidrosolubles (49,53).

2.6.3.- SELECCION DE GELES.

La separación por CFG puede ser dividida cualitativamente en dos categorías: separación de grupos y fraccionamiento. El tipo de gel, las dimensiones de la "cama" y el volumen de la muestra dependerán de la categoría en la cual descansa la separación.

a).- Separación de grupos.

La separación de grupos implica la separación de la muestra en dos grupos que difieren grandemente en su tamaño molecular, por ejemplo: la desalinización de proteínas ó la eliminación de fenol de preparaciones de ácidos nucleícos. En tales casos la mejor separación será obtenida cuando las moléculas grandes son excluidas de la matriz del gel ($K_{av}=0$), a la vez las moléculas pequeñas son capaces de penetrar la matriz en un grado considerable ($K_{av} \approx 1$).

b).- Fraccionamiento.

El fraccionamiento es usado aquí para designar la separación de sustancias de mezclas complejas donde las diferencias en el tamaño molecular son mucho más pequeñas que en la separación de grupos. Un ejemplo es la purificación de una enzima específica de una mezcla de proteínas. En experimentos de fraccionamiento, las diferencias de K_{av} están en el orden de 0.1-0.2. Cuando se trató de purificar un soluto de peso molecular desconocido, la selección -

del gel apropiado para los experimentos preliminares deberá ser -
hecho sobre bases presuntivas (43).

2.6.4.- DIMENSIONES.

Las dimensiones de la "cama" de gel son importantes, dado que si es demasiado pequeña puede dar como resultado una separación - incompleta, mientras que una demasiado larga puede dar lugar a una dilución excesiva de las fracciones eluidas. Los ajustes en el tamaño de la muestra o las dimensiones de la "cama" pueden ser en--contradas después de un experimento de ensayo. El fraccionamiento de mezclas complejas es realizado sobre "camas" con volúmenes de 25 a 100 veces mayores que el volumen de la muestra con longitud, de diámetro de 20:1 a 100:1.

Los mejores resultados serán obtenidos cuando los picos de - eluyente deseados, sean separados de la línea de base, con el menor volumen de eluyente entre los picos. En esta forma se causa - una mínima dilución de las fracciones eluidas (43).

2.6.5.- PREPARACION Y COMPOSICION DEL ELUYENTE Y SUSPENSION DE GEL.

Dado que los materiales para la CFG casi no son afectados -- por amortiguadores iónicos, la selección de estos iones será usualmente dictada por los requerimientos de estabilidad de los com---puestos deseados de la muestra. Ciertos solventes orgánicos y soluciones altamente concentradas de sales, urea o guanidina, pueden

causar encogimiento o expansión de la matriz del gel, acompañada con un cambio en los límites de exclusión (41,43,53).

Para evitar la formación de burbujas entre la "cama" del gel, las soluciones de eluyente deberán ser desaireadas ya sea por ebullición o aspiración. Las soluciones desaireadas deben ser guardadas en botellas firmemente tapadas. La temperatura de la solución eluyente deberá ser la misma que la de la "cama" del gel (43).

2.6.6.- PREPARACION DEL MEDIO (SEPHADEX).

Las polidextranas y los geles de poliacrilamida son proveídos comercialmente en forma seca, debiendo ser hidratados para su uso. La Tabla II lista algunos valores de "agua recuperada" (water regain) para algunos de los geles. La solución eluyente deberá poseer una fuerza iónica mínima de 0.08. Por debajo de esta fuerza iónica las esferas de gel tienen una característica de intercambio iónico que puede alterar la K_{av} de un soluto. La fuerza iónica de una solución (M), puede ser calculada usando la siguiente ecuación:

$$M = \sum 1/2 (C_i) \times Z_i^2$$

donde C_i es la concentración molar del ión y Z_i es la carga de cada ión. Los geles pueden ser hidratados, ya sea, a temperatura ambiente o en baño de agua hirviendo. La Tabla III indica el tiempo requerido para la hidratación completa de los diferentes geles.

El paso final en la preparación del medio de filtración en gel es la eliminación de burbujas que pueden estar presentes (26,43).

2.6.7.- PREPARACION DE LA COLUMNA (EMPACADO).

Esta es una etapa crítica en cualquier experimento de filtración en gel. Una columna mal empacada dará lugar a un flujo desigual ensanchando la zona y disminuyendo la resolución (26).

El éxito de la CFG requiere de un empacado cuidadoso de la "cama" de gel de la columna. Las características de diseño de una columna adecuada incluye: a) un espacio muerto pequeño (el espacio entre el medio de soporte y la salida de la columna); b) facilidades para la adaptación de tubos capilares para ajustar el flujo del eluyente a través de la columna; c) un soporte de la "cama" del gel que no pueda ser fácilmente obstruido (un tapón de nylon es usado frecuentemente); d) algunos medios para proteger la superficie de la "cama". Las perlas finas de vidrio y las placas blandas de vidrio no deberán ser usadas en columnas como soportes de la "cama" del gel (26,47). Los procedimientos usados para empacar columnas de filtración en gel, difieren un poco para geles de poros largos y pequeños. De cualquier forma, las etapas iniciales son comunes a ambos tipos de gel. Después de eliminar las partículas finas del gel, y desaireado, las soluciones de eluyente son llevadas a la temperatura a la cual será utilizada la columna. El procedimiento usado para empacar la columna depende del "agua recuperada" (W_r) del gel empleado (ver Tabla II) (26,43,44).

Tabla II.- Propiedades físicas de geles de povidextranas.

Tipo de gel	Diámetro de las partículas secas ()	Rango de fraccionamiento. (P.M)	Agua recuperada (water regain) (ml/g de gel seco).
Sephadex G-10	40-120	-700	1.0 ± 0.1
Sephadex G-15	40-120	-1 500	1.5 ± 0.2
Sephadex G-25			
Grueso	100-300	1 000-5 000	2.5 ± 0.2
medio	50-150	"	"
fino	20-80	"	"
superfino	10-40	"	"
Sephadex G-50			
grueso	100-300	1 500-30 000	5.0 ± 0.3
medio	50-150	"	"
fino	20-80	"	"
superfino	10-40	"	"
Sephadex G-75	40-120	3 000-70 000	7.5 ± 0.5
superfino	10-40	"	"
Sephadex G-100	40-120	4 000-150 000	10. ± 1.0
superfino	10-40	"	"
Sephadex G-150	40-120	5 000-400 000	15. ± 1.5
superfino	10-40	"	"
Sephadex G-200	40-120	5 000-800 000	20. ± 2.0
superfino	10-40	"	"

(Tomado de G.Cooper Terrance, (26), pag. 173).

Tabla III.- Tiempo de hidratación de varios medios de gel.

Tipo de gel	Tiempo mínimo de hidratación (horas)	
	A 22°C	A 100°C
Sephadex		
G-10	3	1
G-15	3	1
G-25	3	1
G-50	3	1
G-75	24	3
G-100	72	5
G-150	72	5
G-200	72	5
Bio-Gel		
P-2	4	2
P-4	4	2
P-6	4	2
P-10	4	2
P-30	12	3
P-60	12	3
P-100	24	5
P-150	24	5
P-200	48	5
P-300	48	5

(Tomado de G.Cooper Terrancé, (26), pag. 177).

En el empacado de geles de baja W_r , las "camas" del gel no deberán estar sujetas a cambios de temperatura durante o después de empacadas, debido a que la contracción o expansión de agua puede causar irregularidades de empacado o bien producir burbujas en la "cama" (43).

El procedimiento de empacado puede ser repetido, cuantas veces sea requerido para construir la longitud deseada de la columna. La "cama" se estabiliza permitiendo el paso de eluyente de al menos el volumen total de la "cama" a través de la columna en forma descendente. La siguiente estabilización, es la conversión del flujo en forma ascendente (26,54). La eficiencia de la columna empacada deberá ser revisada con la determinación del volumen muerto.

El empacado de geles de alta W_r , que se caracterizan por poseer estructuras relativamente no rígidas que son fácilmente deformadas bajo presión. Así, durante el empacado de la columna y de su elución, deberá ser hecho con mucho cuidado para evitar la posibilidad de que la "cama" pueda estar excesivamente compactada. Durante el empacado o elución de las columnas de gel de alta W_r , no deben ser excedidas las presiones hidrostáticas dadas en la Tabla IV, que muestra las presiones a las cuales el máximo flujo de elución ocurre (26,43,44).

Tabla IV.- Presiones hidrostáticas máximas, recomendadas
para el flujo a través de "camas" de gel.

<u>Tipo de gel.</u>	<u>Límite (cm de H₂O)</u>
Sephadex G-10 hasta G-50	> 100
Sephadex G-75	50
Sephadex G-100	35
Sephadex G-150	15
Sephadex G-200	10
Bio-Gel P-2 hasta P-60	> 100
Bio-Gel P-100	50
Bio-Gel P-150	35
Bio-Gel P-200	25
Bio-Gel P-300	15
Geles de Agarosa 10%	> 50
Geles de Agarosa 8%	> 50
Geles de Agarosa 6%	50
Geles de Agarosa 4%	40
Geles de Agarosa 2%	20
Geles de Agarosa 1%	10

(Tomado de Reiland, J. (1971) (43), pag. 318).

2.6.8.- REVISION DE LAS IRREGULARIDADES DEL EMPACADO DE LA COLUMNA (2,26,41,46-48,54-56).

La revisión de irregularidades en el empaado de la columna y la determinación del volumen muerto (V_0) son llevados a cabo si multáneamente por cromatografía de una muestra que consiste de una solución de una molécula colorida que es excluida. El volumen de elución (V_e) de una molécula excluida es equivalente al volumen - muerto (V_0). El Azul de Dextrán 2 000 de un peso molecular elevado (2×10^6 daltones), es una fracción de dextrán acoplada covalentemente a un colorante azul, es muy usado para estos propósitos.

La concentración recomendada de Azul de Dextrán 2 000 es de 0.2% cuando es usado con todos los geles de dextrán. La máxima absorción relativa del Azul de Dextrán 2 000 en agua, se presenta a 265 y 630 nm. Las soluciones deben de ser preparadas el día que serán usadas ya que el material se hidroliza lentamente en solución, liberando moléculas coloridas las cuales son adsorbidas al medio de filtración en gel. Si esto ocurre, el material adsorbido puede ser eliminado pasando una solución de sero-albúmina al 5% a través de la "cama".

2.6.9.- APLICACION DE LA MUESTRA.

La aplicación de la muestra es una etapa crítica en la CFG, debido a que una dilución innecesaria y la penetración no uniforme dentro de la "cama" puede dar como resultado una zona ensanchada, afectando así la resolución (43).

Tres propiedades que deben ser consideradas con respecto a la muestra, son: el tamaño, la viscosidad y la fuerza iónica. El tamaño de la muestra depende grandemente de las características de la muestra y el tipo de separación deseada. Para la separación de macromoléculas se aconseja que el tamaño de la muestra sea de 1.0 a 5.0% del volumen total de la "cama" (26).

Whitaker (46), menciona que cuando el Citocromo C fue aplicado a una columna de Sephadex G-75 de 1.2 x 184 cm, como muestras de 20 mg en 1 ml, 2 mg en 1 ml y de 2 mg en 0.1 ml; la relación V_e/V_o fue de 1.98, 1.99 y 1.99 respectivamente. En una columna de Sephadex G-100 de 1.1 x 192 cm, se aplicaron 2 mg y 2 μ g de peroxidasa de rábano como muestras de 1 ml, dando valores de elución idénticos. Por lo tanto, dentro de ciertos límites, V_e/V_o es independiente del tamaño de la muestra y su concentración. Sólo son necesarias cantidades de microgramos de proteínas para la determinación de pesos moleculares por este método (ver Fig. 2).

Una segunda característica importante es la viscosidad. En la práctica la viscosidad de la muestra y del eluyente, nunca debe diferir por más de dos veces. En muchos casos se usa cloruro de sodio a concentraciones de 0.2 a 1.0 M para ajustar a ambos, la muestra y el eluyente, a una fuerza iónica apropiada (ver Fig. 3) (26,41,43,44,36).

Se ha demostrado que muchas sustancias dan volúmenes de elución diferentes de aquellos esperados sobre las bases de tamaño -

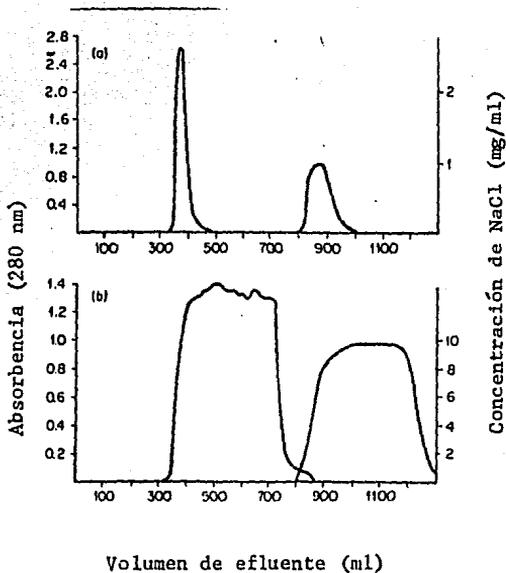


Fig. 2 :

Influencia del tamaño de la muestra sobre la resolución y dilución de fracciones efluentes sobre una cama de Sephadex G-25, de 4 x 85 cm. Muestra (A): 10 ml conteniendo 0.1% de hemoglobina y 0.1% de cloruro de sodio. Muestra (B): 400 ml conteniendo 0.001% de hemoglobina y 1% de cloruro de sodio. El factor de dilución para las fracciones de hemoglobina combinada fue de 10 pulgadas para (A) y de 1.25 para (B).

(Tomado de P. Flodin., et.al., (53), 1980).

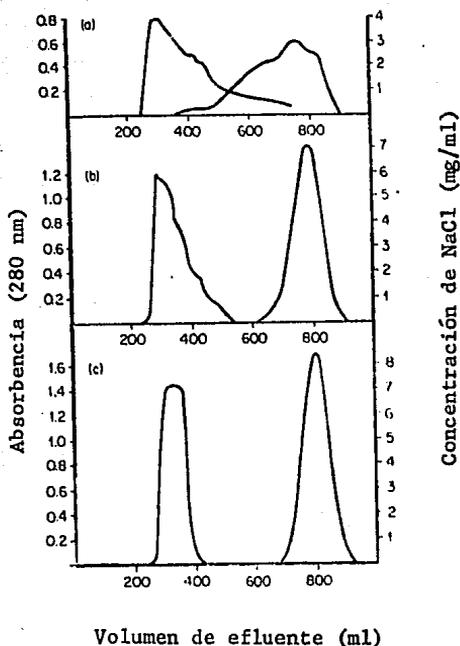


Fig.3.- Influencia de la viscosidad de la muestra sobre el patrón de elución de una mezcla de hemoglobina al 0.1% y cloruro de sodio al 1.0% cromatografiados en una cama de Sephadex G-25 de 4 X 85 cm a un grado de flujo constante de 180 ml/hr. Dextrán 2000 se añadió a la muestra en (A) a una concentración final del 5% ($\eta_{rel} = 11.8$) y a una muestra en (B) a una concentración final del 2.5% ($\eta_{rel} = 4.2$) en orden de incrementar la viscosidad. La muestra en (C) no fué alterada por adición de dextrán.

(Tomado de P.Flodin., et.al., (53), 1980)

molecular debido solamente a la adsorción a la matriz del gel y a la pequeña cantidad de grupos ionizables, sobre el gel. La segunda de estas puede ser eliminada por la selección apropiada del pH y/o la fuerza iónica (57). Gelotte (57) y Porath (58) demostraron que la fenilalanina, la tirosina y el triptofano son adsorbidos a geles de dextrán. Una proteína con un alto contenido de estos tres aminoácidos se comportará anómalamente sobre columnas de Sephadex.

2.6.10.- CONCEPTOS MATEMATICOS ELEMENTALES.

Mientras que un conocimiento extenso de las bases matemáticas de la CFG, no se requiere para la mayoría de las aplicaciones, el conocimiento de los principios fundamentales es útil (43). Muchas discusiones detalladas sobre los aspectos teóricos de la CFG pueden encontrarse en (26, 41, 43-48, 51-56, 58-63).

a).- Definición de términos.

Vt = Volumen total de la "cama", el volumen ocupado por la "cama" de gel. Este es mejor determinado por una calibración previa de la columna, ya sea con agua o alternativamente por geometría.

Ve = Volumen de elución, es el volumen de efluente el cual precede la elución de un soluto específico en la muestra. Este es medido desde el inicio de la aplicación de la muestra al punto medio de la altura de la orilla creciente, del pico del efluente.

V_o = Volumen muerto, el volumen del espacio entre las partículas de gel. Este puede ser determinado midiendo el V_e de un soluto incapaz de penetrar la matriz del gel. En una "cama" de esferas rígidas de diámetro uniforme, el V_o es aproximadamente $0.35 V_t$ (60).

V_i = Volumen interno (oculto), el volumen del líquido contenido entre las partículas del gel. Este puede ser aproximado por:

$$V_i = m.W_r \quad (1)$$

donde m = masa del xerogel usado en la preparación de la "cama" y W_r se refiere al "agua recuperada" del gel utilizado. El V_i puede también ser estimado cromatografiando una muestra de óxido de tritio. El V_e de esta sustancia es igual a $V_o + V_i$; el V_i puede ser entonces determinado sustrayendo el valor obtenido para V_o .

V_p = Volumen del polímero, el volumen ocupado por la matriz de la sustancia.

b).- Caracterización matemática de la "cama" del gel y comportamiento del soluto.

Una cama empacada de cualquier medio de filtración en gel -- puede ser descrito matemáticamente como:

$$V_t = V_o + V_i + V_p \quad (2)$$

De acuerdo a este modelo y en la ausencia de interacciones - soluto-gel, la CFG puede ser considerada como un tipo de cro

matografía de partición líquido-líquido, donde los solutos son -- fraccionados entre los espacios de V_o y V_i . El comportamiento de un soluto entre un gel dado es presentado idealmente por el coeficiente de distribución:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \quad (3)$$

Conforme a esto, aquellos solutos que poseen dimensiones moleculares que impiden su acceso al V_i de la "cama", serán eluidos simultáneamente en un pico simple al V_o con $K_d = 0$, mientras que las moléculas pequeñas, seguirán en un orden secuencial de acuerdo a su tamaño molecular decreciente con $0 < K_d \leq 1$.

Rearreglando la ecuación (3) da:

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i \quad (4)$$

Por la dificultad de determinar correctamente los valores de V_i , la fórmula K_d no es práctica a menudo para la caracterización del comportamiento del soluto; consecuentemente una fórmula revisada, la cual elimina la necesidad para conocer el valor del V_i , es usada frecuentemente. Reemplazando V_i con $V_i + V_p$, la Ec.(3) es transformada a:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_i + V_p} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (5)$$

Para encontrar los valores de K_{av} solo son requeridos aquellos valores obtenidos fácilmente, el V_t , el V_o y el V_e .

2.6.11.- INTERPRETACION DE RESULTADOS Y TEORIA
DE FILTRACION EN GEL.

Squire (56), relacionó el V_e en la CFG sobre Sephadex con el peso molecular de un soluto dado, lo que ha sido derivado sobre las bases de un modelo en el cual los elementos de volumen disponible al solvente en el gel es aproximado por una combinación de conos, cilindros y rendijas. Las ecuaciones están basadas en la suposición de que el volumen del líquido que pasa a través de la columna, desde la aplicación de un soluto macromolecular y la emergencia de éste en su concentración máxima, es equivalente a el volumen entre la "cama" de Sephadex la cual esta disponible para macromoléculas de un tamaño dado. La ecuación es:

$$(V_e/V_0)^{1/3} = \alpha - \beta a$$

donde a = radio Stokes; α y β son constantes (radio Stokes = tamaño molecular medido en Å).

Varias correlaciones matemáticas del V_e con radios Stokes han sido reportados. Las relaciones propuestas por Porath (64), Laurent y Killander (65) y Squire (56) están basadas en teorías las cuales asumen una partición en equilibrio de las moléculas del soluto entre el líquido móvil exterior y las microrregiones de volumen entre las partículas del gel (60). Las ecuaciones propuestas por estos autores son las siguientes:

Porath: $K_d^{1/3} = \alpha - \beta a$

Laurent y Killander: $(-\log K_{av})^{1/2} = \alpha(\beta + a)$

Squire: $(V_e/V_0)^{1/3} = \alpha - \beta a$

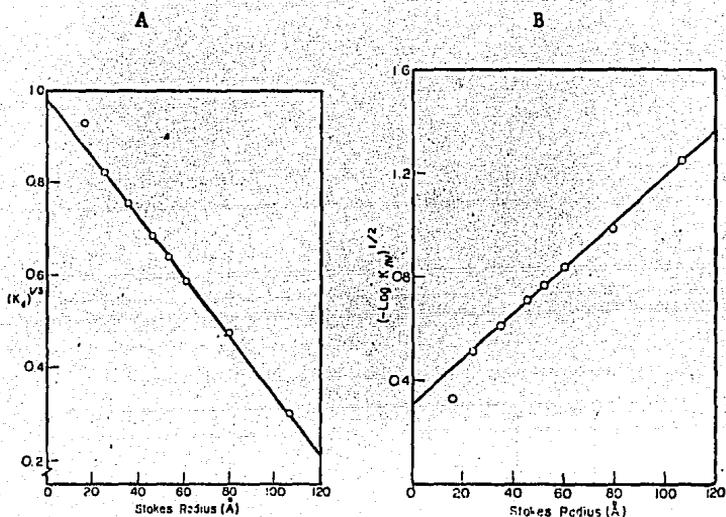
El significado de las constantes α y β difieren para cada ecuación, a = radio Stokes (ver Fig. 4).

Whitaker (46), determinó una correlación lineal entre el logaritmo del peso molecular de una proteína y la relación V_e/V_o de la columna, esto fue encontrado en Sephadex G-100. La relación del volumen de elución al volumen muerto, V_e/V_o , fue independiente de la concentración de proteína, tamaño de la columna y adsorción de intercambio iónico (a fuerza iónica de 0.494), pero se encontró que era dependiente de la temperatura para varias proteínas (ver Fig. 5).

Siegel, L.M., y Monty, K.J., (60), estudiaron el comportamiento de c/u , de una serie de proteínas sometidas a cromatografía en columnas de Sephadex G-200, observando que se podían asociar con los radios Stokes de las proteínas, pero no se correlaciona con su peso molecular.

Andrews, P., (47,54), se refirió a la correlación entre el V_e y el peso molecular investigado por CFG de proteínas de peso molecular en un intervalo de 3 500 daltones (glucagon) a 820 000 daltones (alfa-cristalina), en columnas de Sephadex G-200 a un pH de 7.5. Las curvas de V_e vs $\log. P.M.$, basadas en resultados de columnas de Sephadex G-200, G-100 y G-75, fueron tomadas como representativas del comportamiento típico de proteínas globulares y propuestas como datos estándar para la interpretación uniforme de experimentos de CFG (ver Figuras 6 y 7).

Fig. 4 .



A.- Correlación de K_f con radios Stokes. Los datos de filtración en gel de la Tabla II (60) fueron graficados de acuerdo a la correlación de Porath (64).

B.- Correlación de K_{av} con radios Stokes. Los datos de filtración en gel de la Tabla II (60) fueron graficados de acuerdo a la correlación de Laurent y Killander (65).

(Tomado de Siegel, L.M., y Monty, K.J. (60), 1966).

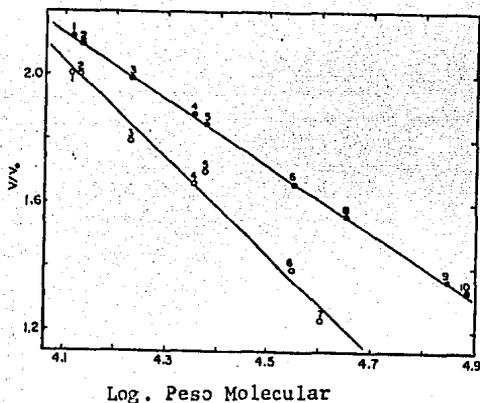


Fig. 5.- Relación entre volumen de elución y peso molecular de proteínas a 25°C o 27°C.

○, columna de 1.2 x 184 cm de Sephadex G-75; ●, columna de 1.1 x 192 cm de Sephadex G-100. Sobre Sephadex G-75, 3.4 mg de mioglobina y 20 mg de otras proteínas fueron usadas. Sobre Sephadex -- G-100, 3.4 mg de mioglobina, 7.5 mg de seroalbúmina y ovoalbúmina, y 5.0 mg de las otras proteínas fueron usadas.

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 1 = Citocromo C | 6 = Pepsina |
| 2 = Ribonucleasa | 7 = Peroxidasa |
| 3 = Mioglobina | 8 = Ovoalbúmina |
| 4 = Alfa-quimotripsina | 9 = Sero-albúmina |
| 5 = Tripsina | 10 = Conalbúmina férrica |

(Tomado de Whitaker, J.R., Anal.Chem.;35 (1963) (46)).

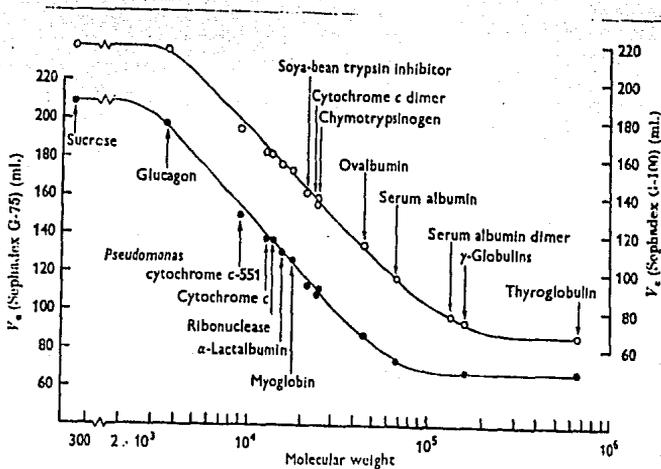


Fig. 6 .- Gráficas de volúmenes de elución, V_e , frente a log.(peso molecular) para proteínas sobre columnas de Sephadex G-75 (●) y G-100 (○) (2.4 cm x 50 cm ; equilibradas con buffer de cloruro de Tris 0.05 M, pH 7.5, conteniendo KCl (0.1 M)).

(Tomado de Andrews, P., Biochem. J. ; 91 (1964) (54)).

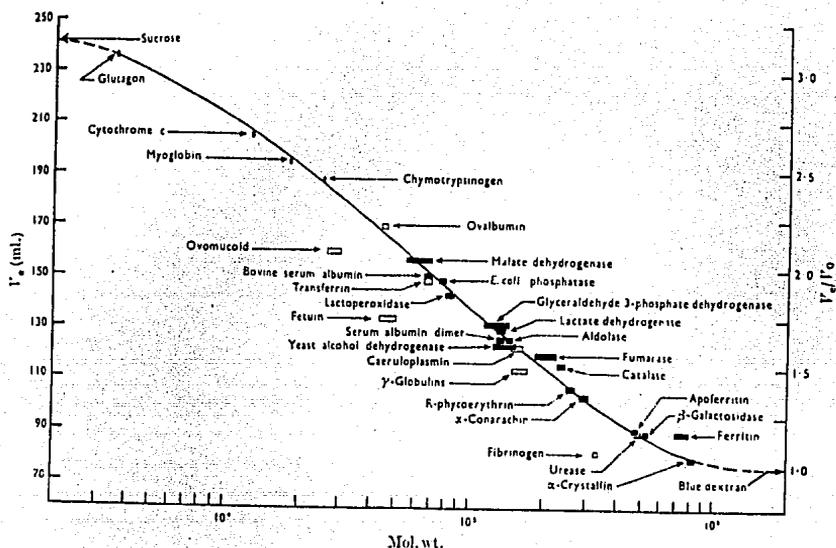


Fig. 7 .- Gráfica de volumen de elución, V_e , frente a \log .(peso molecular) para proteínas sobre una columna de Sephadex G-200 (2.5 cm x 50 cm) a pH 7.5 , (para detalles experimentales ver referencia 37). Las barras abiertas representan glicoproteínas. Las longitudes de las barras indican variaciones en pesos moleculares (Tabla 1 de la referencia 37) y las cerradas indican variaciones de ± 1 ml en V_e .

(Tomado de Andrews, P., Biochem. J. 96, (1965) (47).

2.6.12.- CALIBRACION DE LA COLUMNA DE FILTRACION EN GEL.

Ackers (55), describió un nuevo procedimiento para la calibración de columnas de CFG basado en la suposición de que microregiones de volumen no excluido entre el gel está distribuido -- fortuitamente con respecto a los tamaños de moléculas que pueden acomodarse. Esta proposición conduce a una relación lineal entre el radio molecular y la inversa de la función error complemento del coeficiente de partición de la columna. Una excelente concordancia de la relación es obtenida con datos experimentales sobre un gran intervalo de tamaño molecular, también con una diversidad de especies moleculares y materiales para las "camas" de la columna. El nuevo método es simple y conveniente de usarse y tuvo la ventaja sobre métodos previos en que no está basado en cualquier estructura hipotética para la matriz del gel. La columna es calibrada con dos macromoléculas estándar de tamaño conocido los cuales determinan únicamente dos constantes de calibración. Una vez que estas constantes han sido determinadas para un gel dado, el radio molecular de una especie desconocida puede ser calculado de sus V_e determinados experimentalmente.

Davis, L.C., (62), menciona que para la cromatografía de elución sobre columnas de filtración en gel, una gráfica simple del grado de migración contra radios Stokes proporciona claramente una buena línea recta ajustada como la gráfica más complicada de la inversa de la función error complemento (erfc), del coeficiente de

partición (K) contra radio Stokes. Para una matriz de características conocidas solamente son necesarios dos estándares, uno grande y uno pequeño, la cual proporciona una calibración independiente, y por lo tanto relativamente insensibles al V_0 y al V_i de la columna particular que está siendo calibrada. Con datos reales, el método simple aparece tan confiable como el más complejo. Un método simple el cual combina virtudes del método de Ackers (55) y Andrews (47) fue descrito por Davis (62). La gráfica es hecha de la recíproca del V_e (equivalente al grado de migración) contra radios Stokes para proteínas estándares, y es comparado con el v_0 lumen de elución de proteínas desconocidas (ver Figuras 8 y 9).

2.7.- ANALISIS DE AMINOACIDOS.

El análisis de aminoácidos es una de las primeras etapas en la elucidación de la estructura química de una molécula protéica. El conocimiento de la composición es necesaria como una guía, antes de que el análisis estructural sea iniciado. En particular, la naturaleza del acceso al estudio estructural estará decisivamente influenciado por la presencia o ausencia de ciertos aminoácidos, notablemente cistina, cisteína y triptofano (66).

Acoplado con los resultados de otros procedimientos físicos y químicos, el análisis de aminoácidos proveerá evidencia de la pureza de una preparación de proteína. Una especie molecular simple rendirá valores analíticos, los cuales pueden ser expresados

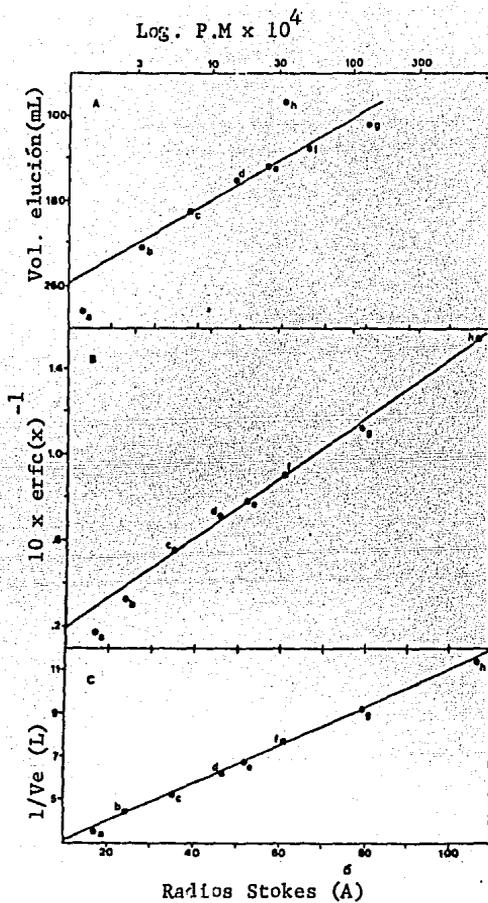


Fig 8.-Gráficas alternativas de datos de filtración en gel sobre Sephadex G-200. Las proteínas son como sigue: a, citocromo C; b, hemoglobina; c, sero-albúmina bovina; d, deshidrogenasa alcohólica de levadura; e, catalasa; f, ureasa; g, ferritina; h, fibrinógeno.

(Tomado de Davis, L.C., 1983.ref.(62)).

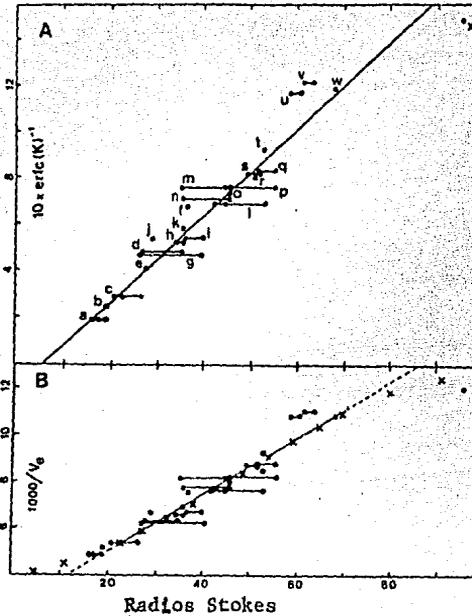


Fig. 9 .

Dependencia del grado de elución y partición de la proteína sobre los radios Stokes. Parte A está graficada de acuerdo al método de Ackers (55). La parte B está graficada de acuerdo al método descrito por Davis (62). Las proteínas son listadas en el orden dado por Andrews (47), de peso molecular pequeño a alto y están indicados por letras: a, citocromo C de corazón de caballo; b, mioglobina de esperma de ballena; c, quimotripsinógeno; d, ovomucoide; e, ovoalbúmina; f, fetuina; g, deshidrogenasa málica de corazón de puerco; h, sero-albúmina bovina; i, transferrina bovina; j, fosfatasa de E.Coli; k, lactoperoxidasa; l, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo; m, alcohol deshidrogenasa de levadura; n, lactato deshidrogenasa de músculo de conejo; o, aldolasa de músculo de conejo; p, ceruloplasmina humana; q, gama-globulina humana; r, fumarasa de corazón de puerco; s, catalasa de hígado de buey; t, ficoeritrina; u, apoferritina; v, ureasa; w, beta-galactosidasa de E.Coli; x, cristali na bovina.

(Tomado de Davis, L.C., (62), 1983)

en términos de números integrales de residuos de aminoácidos por molécula (66).

Con el advenimiento de las técnicas automatizadas de análisis de aminoácidos, la determinación de éstos en muestras provenientes de hidrolizados de proteínas, extractos de tejidos y líquidos fisiológicos, se ha convertido en un ensayo relativamente rutinario en muchas partes del mundo. Los aparatos modernos permiten realizar un análisis con muestras equivalentes a una nanomola y en algunos casos especiales hasta centenas de picomolas. La resolución, sensibilidad y rapidez obtenida con estos aparatos, se fundamenta en tres principios básicos: primero, la utilización de resinas intercambiadoras iónicas sintéticas con alta capacidad, resistentes y homogéneas desde el punto de vista del tamaño de la partícula sólida, las cuales se encuentran debidamente empacadas en columnas de diámetros milimétricos; segundo, la utilización de bombas hidráulicas de alta presión y tercero, la automatización del proceso por medio de computadoras con sistema de memoria, integración y registro, a través de un teletipo (66-69).

Además este equipo automático, fue diseñado para reducir el trabajo manual y la variabilidad sistemática de estos análisis, e incrementar el rendimiento. Las variaciones analíticas han sido reducidas por un factor de 3 sobre el método manual. El trabajo manual involucra, más allá de cargar las columnas, el cambio de amortiguadores y finalmente el cálculo de los resultados de la pre

sentación gráfica. Además su uso en la determinación de aminoácidos, puede ser aplicado directamente a la estimulación de cualquier grupo de sustancias separables por cromatografía en columna (68).

Spackman, et.al., (70) han descrito el funcionamiento de su equipo para la determinación automática de aminoácidos en hidrolizados de proteínas, en cerca de 48 horas con colectores de fracciones y en 24 con equipo de registro automático. El mismo sistema, con modificaciones mínimas, puede ser usado para la determinación de aminoácidos y compuestos relacionados en plasma sanguíneo, orina y tejidos animales (68,69,71).

La determinación cuantitativa de aminoácidos es más rápida y simple por un instrumento que registra automáticamente el valor del color de ninhidrina de los efluentes de la columna de intercambio iónico. El amortiguador influente, desaireado, es bombeado a un flujo constante a través de una columna de resina de poliestireno sulfonado. El efluente es encontrado por una corriente capilar de reactivo de ninhidrina distribuido por una segunda bomba. El color es desarrollado pasando la mezcla de reactivo y efluente a través de una espiral de tubo capilar de Teflón inmerso en un vaso con agua hirviendo. La absorbencia de la solución resultante es medida en forma continua a 570 y 440 nm. Los picos sobre las curvas pueden ser integrados con una precisión del $100 \pm 3\%$ para cargas de 0.1 a 3.0 micromoles de cada aminoácido. Un hidrolizado

de una proteína o péptido puede ser analizado en menos de 24 horas (67).

El equipo de registro automático es diseñado y operado como lo describió Spackman et.al., (67) y Moore y Stein (66).

Chang, J.Y., et.al., (72,73), desarrollaron un nuevo método de análisis de aminoácidos utilizando el cloruro de dimetilamino azo-bencen-sulfonilo (DABS-Cl), que provee algunas ventajas sobre el analizador de aminoácidos comercial de Spackman et.al., (67); las ventajas son:

a).- El método del DABS-Cl es más económico que un analizador convencional. No requiere aparatos de derivación de post-columnas, y el mismo instrumento puede ser usado para el aislamiento de péptidos sin modificación alguna.

b).- El método DABS-Cl es más sensible que los sistemas de derivación de post-columnas. De 20 a 30 nanogramos de hidrolizado de proteína es suficiente para un análisis completo de aminoácidos.

III.- MATERIALES Y METODOS.

3.1.- METODO DE EXTRACCION.

3.1.1.- Material.

- a).- Ratas de la cepa Wistar, machos de un peso de entre 150-200 g. Se utilizaron ratas alimentadas ad libitum a base de purina Chow (Fac. de Medicina) y otras alimentadas con alimento importado (Instituto de - Fisiología Celular).
- b).- Citrato de sodio monohidratado (Sigma).
- c).- Alcohol etílico al 96% (Merck).
- d).- Acido clorhídrico (Merck).
- e).- Acetona q.p (Merck).
- f).- Homogenizador Ultraturrax.
- g).- Potenciómetro (Metrohm 605 pH-Meter).
- h).- Centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS-34 (de Dupont Instruments).

3.1.2.- PREPARACION DE REACTIVOS.

- a).- Amortiguador de Citrato de sodio, 0.05 M, pH 7.4.
Se pesan 14.7055 g y se lleva a un litro; el ajuste del pH se realizó con HCl 2N, en un potenciómetro.

- b).- Et:OH:H₂O (1:1:1).- Se mezclan los solventes.

Nota: Al agregar el HCl al etanol aumenta la temperatura, por lo que se recomienda tener el recipiente de mezcla en un baño de hielo.

3.1.3.- EXTRACCION.

Se procede a sacrificar las ratas por decapitación, dejándolas exsanguinar, el tiempo necesario (aprox. 1 minuto). Después de la disección se extrae el hígado, el cual se va colocando en un vaso de precipitados con 100 ml de amortiguador de citrato de sodio 0.05 M, pH de 7.4, pesándolo previamente, para calcular la cantidad de tejido hepático extraído y llevar 1:1 peso/vol.; el vaso se debe mantener sumergido en un baño de hielo durante el período de extracción (ver Fig. 10).

3.2.- LIOFILIZACION.

3.2.1.- Material.

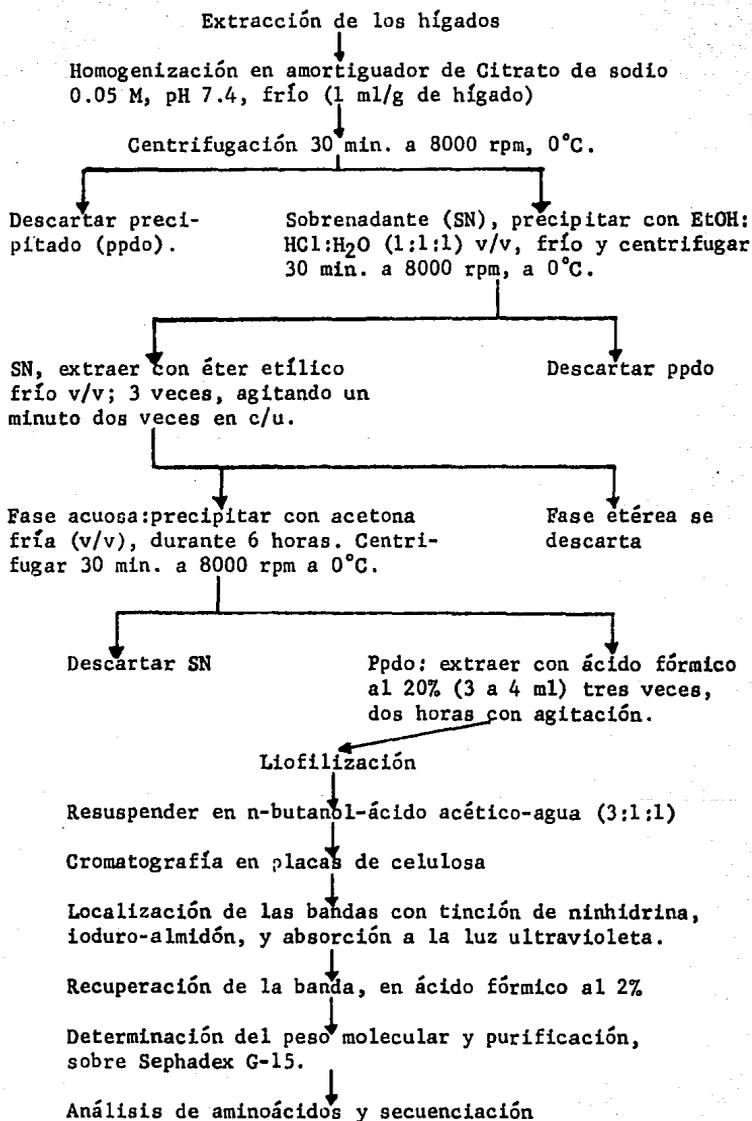
- a).- Liofilizadora (Labconco).
- b).- Hielo seco.
- c).- Frascos tipo vial de diferentes capacidades.
- d).- Acetona industrial.

3.2.2.- PREPARACION DEL EQUIPO Y PROCEDIMIENTO.

a).- Se coloca suficiente hielo seco en las trampas las cuales contienen acetona industrial, teniendo precaución al momento de agregarlo, introducirlo lentamente, para evitar derramar la acetona contenida en c/u de los recipientes que funcionan como trampas; b) en uno de los recipientes que contiene acetona e hielo seco, se congela la muestra; se recomienda para una mejor y más rápida liofilización, congelar la muestra en capa delgada sobre el

Fig. 10

Diagrama de flujo que muestra c/u de los pasos en la extracción y purificación del péptido en estudio.



recipiente contenedor, haciendo girar éste, en el momento de estar congelando la muestra y c) en cuanto la muestra haya sido congelada, se conecta a vacío y se deja el tiempo necesario hasta su total liofilización, en el presente trabajo fue de 6 a 7 horas.

3.3.- CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

3.3.1.- Material.

- a).- Placas de celulosa de 20 x 20 cm y de 0.1 mm de espesor (de Eastman Kodak).
- b).- Cámara de cromatografía (de Scientific Manuf.Ind.).
- c).- Microjeringa de 50 microlitros.
- d).- Secador de pistola o de aire.
- e).- Acetona q.p (Merck).
- f).- Ninhidrina (Merck).
- g).- n-butanol, ácido acético glacial, ioduro de potasio (Baker Analyzed).
- h).- Agua bidestilada.
- i).- Almidón soluble q.p (Merck).
- j).- Aspersor manual con perilla.
- k).- Horno.
- l).- Cámara de cromatografía con atmósfera de cloro.
- m).- Permanganato de potasio y ácido clorhídrico (Baker).
- n).- Ioduro de potasio q.p (Merck).
- ñ).- Solución de KI-Almidón 1%-1%.

3.3.2.- APLICACION DE LA MUESTRA.

La muestra liofilizada se resuspende en n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1) (27), aproximadamente 10 mg del polvo blanco seco en un mililitro.

Se aplican de 300 a 400 microlitros de muestra, sobre c/u de las placas de celulosa, teniendo precaución de que sea lo más uniforme posible, a una distancia aproximada de 1 cm de la parte inferior de la placa. Para un secado más rápido de la muestra se puede utilizar un secador de aire (no acercarlo demasiado para evitar que la capa de celulosa se quiebre) (ver Fig. 11).

3.3.3.- DESARROLLO DE LA CROMATOGRAFIA.

En una cámara de cromatografía, saturada con la mezcla de n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1), (la saturación se logra dejando en reposo durante una media hora) se procede a introducir las placas, preparadas anteriormente, procurando que queden en posición vertical, para obtener un desarrollo uniforme de la cromatografía.

La cromatografía se desarrolló, en un promedio de 3 a 4 horas. Se sacan las placas de la cámara, faltando aproximadamente un cm, del frente del eluyente a la parte superior de la placa. Ya fuera las placas, se dejan secar a temperatura ambiente (Fig. 12).

3.3.4.- METODO DE LA NINHIDRINA. REVELADO DE LA CROMATOGRAFIA.

El paso siguiente al desarrollo de la cromatografía fue el revelado de las bandas que contienen aminoácidos libres y/o grupos

Hoja de papel cubriendo
la placa para evitar
contaminaciones.

Placa de celulosa
de 20 x 20 cm.

Línea de aplicación
de la muestra.

Distancia de aprox. 1 cm
del borde inferior.

Microjeringa de 50 micro-
litros, para la aplicación
de la muestra.

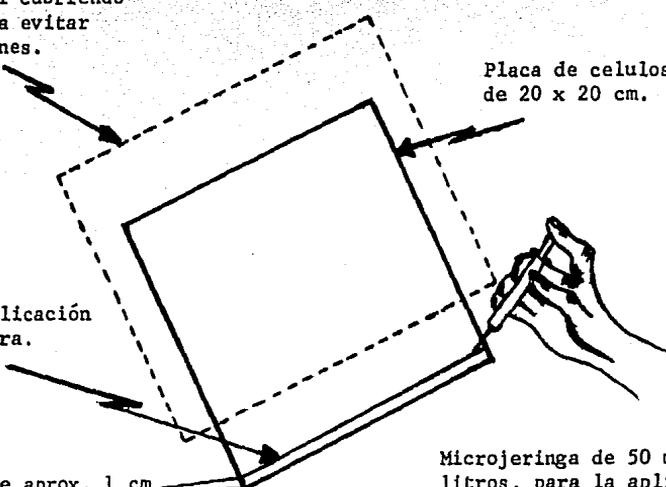


Fig.11 .- Aplicación de la muestra sobre la placa de celulosa de 20 x 20 cm.

La aplicación se hace con una jeringa de 50 microlitros de preferencia, a una distancia de aproximadamente 1 cm del borde inferior de la placa. Se aplica el extracto recuperado en n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1), de 300-400 microlitros para cada placa.

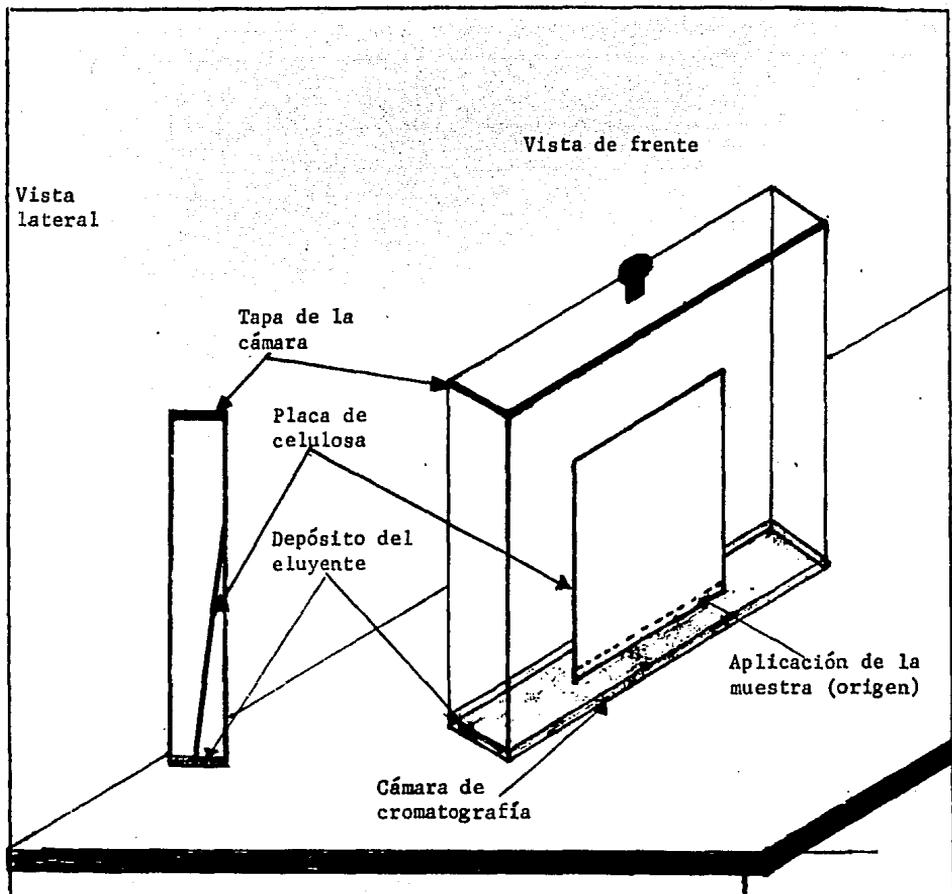


Fig. 12.- Cámara de cromatografía vista de frente y lateral (de Scientific Manufacturing Industries, SMI). Dimensiones de 29 cm x 27 cm x 10 cm. Eluyente utilizado n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1). El tiempo de desarrollo de la cromatografía fue de aproximadamente 4 horas para cada una de las placas.

amino libres, los cuales tienen la capacidad de reaccionar con ni
nhidrina.

Para llevar a cabo la identificación de la banda que corresponde al péptido problema, se tomaron en cuenta las siguientes -- consideraciones:

1).- Se ha establecido que los compuestos coloridos son formados no solamente con aminoácidos, sino también con péptidos, -- proteínas y otras clases de sustancias que poseen grupos amino libres (29). La ninhidrina no reacciona con péptidos cíclicos, con aminoácidos o péptidos acilados, ya que solamente el grupo amino terminal entra dentro de la reacción, el color desarrollado con una cantidad dada de material decrece con el incremento del peso molecular (29,40).

2).- Ha sido encontrado que el color desarrollado por microgramo de aminoácido decrece marcadamente cuando su concentración se reduce (29).

3).- Debido a las desventajas que presenta el método de ninhidrina para la detección de péptidos, se hace necesario utilizar un nuevo método aunado al de ninhidrina para la detección de péptidos; el de Rydon-Smith (40).

3.3.4.1.- PROCEDIMIENTO.

Se sacan las placas de la cámara cromatográfica y se dejan secar a temperatura ambiente el tiempo necesario para la evaporación total del eluyente. Secas las placas, se procede a rociarlas

de manera uniforme, con el reactivo de ninhidrina al 2% en acetona, utilizando un aspersor, evitando concentrar demasiado reactivo en una misma zona de la placa (durante su aplicación), y así - eliminar posibles falsos positivos.

El siguiente paso es colocar las placas rociadas, en el horno durante 5 minutos, a una temperatura entre 55-60°C, para el revelado de las bandas que son positivas a ninhidrina. Se sacan las placas y se procede a marcar las bandas reveladas, se mide el Rf de c/u de ellas.

Para detectar posibles contaminaciones durante el desarrollo del trabajo, desde la aplicación de la muestra hasta el revelado de las bandas, se corrieron blancos, junto con las placas a las que se aplicó la muestra. A los blancos se les aplicó solamente el eluyente utilizado en el desarrollo de la cromatografía (n-butanol-ácido acético-agua, (3:1:1)).

3.3.5.- METODO DE RYDON-SMITH (KI-ALMIDON 1%-1%).

3.3.5.1.- PROCEDIMIENTO.

Después del revelado de las bandas peptídicas con ninhidrina al 2% en acetona, se procede a la tinción con KI-Almidón 1%-1%, - (40), de la siguiente manera:

Se prepara una cámara con atmósfera de cloro haciendo reaccionar en su interior, $KMnO_4$ con HCl conc., por un mínimo de media hora para una saturación completa. Posteriormente se introducen las placas de celulosa con las bandas reveladas con ninhidrina pa-

ra su decoloración. Se dejan en contacto las placas de celulosa, por lo menos media hora para la decoloración de las bandas *.

Para la tinción con la solución de KI-Almidón 1%-1%, el reactivo debe estar recién preparado antes de su uso y a una temperatura de 80°C, para su aplicación sobre las placas de una manera uniforme, mediante un aspersor con perilla, para el revelado de las bandas positivas a la tinción de Rydon-Smith (40). Las bandas son reveladas enseguida claramente como manchas azul-oscuro sobre un fondo azul débil; las manchas se desvanecen completamente en unos cuantos días; por lo tanto deberán ser marcadas o fotografiadas tan pronto como sea posible después de la rociada final.

Como se puede observar, el procedimiento cloro-almidón-ioduro puede ser aplicado sucesivamente a placas de celulosa las cuales han sido rociadas previamente con ninhidrina (40).

*.- Se hizo una modificación del método de Rydon-Smith (40), dejando en contacto la placa de celulosa 1 hora en la atmósfera de cloro, se saca y airea 15 minutos, obteniéndose una mejor resolución (ver Resultados).

3.3.6.- CURVA ESTANDAR DE PROTEINAS (BSA).

3.3.6.1.- MATERIALES Y REACTIVOS.

- a).- Sero-albúmina-bovina (BSA) q.p (de Sigma).
- b).- Pipetas de 1 y 5 ml.
- c).- Azul Brillante de Coomassie G-250 (de Sigma).
- d).- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
- e).- Gradillas.
- f).- Acido fórmico al 2% (V/V).
- g).- Espectrofotómetro Gilford.
- h).- Celdillas de vidrio para 3.0 ml (Sigma).
- i).- Etanol al 95% (Baker).
- j).- Acido fosfórico al 85%.

3.3.6.2.- PROCEDIMIENTO.

La curva estándar de BSA, fue preparada a partir de una solución patrón de BSA de 50 microgramos/ml. La curva sigue la Ley de Beer en un intervalo de absorbencias de 0.0 a 0.50 con una desviación del 1%. En la Tabla V se muestra el procedimiento que se siguió en la preparación de la curva estándar. Las lecturas se llevaron a cabo en celdillas de vidrio para 3.0 ml en un espectrofotómetro Gilford a una longitud de onda de 570 nm.

3.3.6.3.- PREPARACION DEL REACTIVO DE PROTEINAS.

Se pesan 100 mg de Azul Brillante Coomassie G-250, los cuales se disuelven en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución, se le

TABLA V.

Tubo	Sol. patrón de BSA (50 ug/ml). (ml)	Acido fórmico al 2% (V/V) (ml)	Concentración ug/ml	Reactivo colorante (ml)
1	0.05	0.45	5.0	3.0
2	0.10	0.40	10.0	"
3	0.15	0.35	15.0	"
4	0.20	0.30	20.0	"
5	0.25	0.25	25.0	"
6	0.30	0.20	30.0	"
7	0.35	0.15	35.0	"
8	0.40	0.10	40.0	"
9	0.45	0.05	45.0	"
10	0.50	----	50.0	"
Blanco	----	0.50	----	"

Se deja reaccionar la mezcla de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente, y se lee en un período de una hora, en un espectrofotómetro Gilford a una longitud de onda de 595 nm.

agregan 100 ml de ácido fosfórico al 85% (W/V). La solución resultante se diluyó a un volumen final de un litro. Las concentraciones finales en el reactivo son: Azul Brillante de Coomassie G-250 0.01% (W/V), etanol 4.7% (W/V), y ácido fosfórico 8.5%, de acuerdo con Bradford (35).

3.4.- CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL.

3.4.1.- Material.

- a).- Sephadex G-15 (de Sigma).
- b).- Columna para cromatografía en gel (de Pharmacia Fine Chemicals).
- c).- Frasco reservorio de eluyente tipo Mariotte.
- d).- Colector de fracciones ISCO modelo 328.
- e).- Registro ISCO modelo UA-5.
- f).- Acido fórmico grado analítico (de Merck).
- g).- Solución de ácido fórmico al 2% (V/V).
- h).- Citocromo C de grado reactivo (de Sigma).

3.4.2.- PREPARACION DEL GEL.

Se ponen a hidratar aproximadamente 10 g de Sephadex G-15 seco, en 100 ml de ácido fórmico al 2% (eluyente) durante tres horas (Tabla III). Transcurrido este tiempo, se procede a la eliminación de las partículas finas del gel presentes, lavando tres veces con 100 ml de eluyente en c/u de ellas. Después de eliminar las partículas finas del gel, se procede al empacado de la columna.

3.4.3.- EMPACADO DE LA COLUMNA.

Se utilizó una columna de vidrio (tubo) con las siguientes dimensiones: 57.0 x 2.0 cm, equipada con adaptadores de flujo de Pharmacia Fine Chemicals.

Considerada como una etapa crítica en cualquier experimento de CFG, debido a que una columna mal empacada dará lugar a un flujo desigual, provocando una baja de la resolución, por lo que el empacado de la columna se realizó con el máximo de precaución. El procedimiento de empacado de la columna se hizo de la siguiente manera:

a).- La suspensión hidratada fue desaireada. Debido a que la temperatura de empacado debe corresponder a la de operación. En este caso el empacado y operación fue a temperatura ambiente.

b).- La suspensión del gel se diluye con el eluyente para -- permitir un vertido adecuado, y el escape de burbujas a la superficie que pueden haberse quedado atrapadas.

c).- Se fija la columna a un soporte libre de vibraciones, y se nivela verticalmente, para esto se puede utilizar una plomada. Esto se hace con el fin de tener un empacado uniforme.

d).- Se instala el adaptador de flujo inferior.

e).- La columna se llena completamente con eluyente, para observar posibles fugas. Se abre la llave de salida para permitir el flujo del eluyente, hasta la mitad del volumen total de la columna, y se cierra la llave de salida.

f).- El siguiente paso es llenar la columna con la suspensión del gel.

g).- Se permite que las partículas del gel sedimenten entre 5 a 10 minutos. Se abre la llave de salida para permitir el flujo del exceso de eluyente; conforme se va drenando el eluyente, se va agregando al mismo tiempo la suspensión de gel de una manera uniforme y continua, para evitar la formación de "zonas visibles" (interfases, por la discontinuidad en la concentración del gel).

h).- Cuando se forman estas "zonas visibles", es necesario resuspender la "cama" del gel, hasta un asentamiento uniforme del gel. El procedimiento de empacado se repite hasta construir la longitud deseada de la columna.

i).- Se coloca el adaptador de flujo superior.

j).- El reservorio de eluyente es conectado a la columna. Para la estabilización de esta, se permite el paso de 2 a 3 veces el volumen total de la "cama" de eluyente.

La Fig. 13 muestra la columna de Sephadex adaptada a un colector de fracciones y un registro.

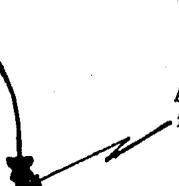
3.4.4.- REVISIÓN DE IRREGULARIDADES DEL EMPACADO DE LA COLUMNA. DETERMINACION DE V_0 .

La revisión de irregularidades del empacado y la determinación de V_0 , se llevaron a cabo simultáneamente, utilizando una solución de una molécula colorida que es excluida. En el presente trabajo se utilizó Citocromo C a una concentración de 10 mg/ml.

Frasco reservorio del eluyente



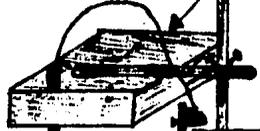
Adaptador de flujo



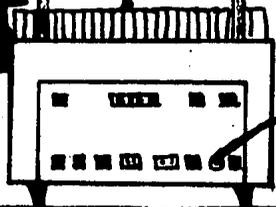
Columna empacada de gel Sephadex G-15



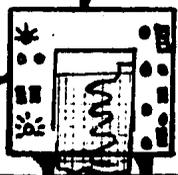
Celda espectrofotométrica de flujo



Colector de fracciones



Registro



Soporte universal

Adaptador de flujo

Fig. - 13

Por lo tanto el V_e de la molécula excluida será igual al V_o de la "cama" del gel.

3.4.5.- APLICACION DE LA MUESTRA.

Después de haber revisado las posibles irregularidades de empacado, el siguiente paso es la aplicación de la muestra, para lo cual se tomaron en cuenta los siguientes factores: concentración, viscosidad, tamaño y fuerza iónica de la muestra (sobre estos -- factores en la resolución de la CFG, se dieron amplios detalles - en el capítulo de generalidades). La aplicación de la muestra se hace de la siguiente manera:

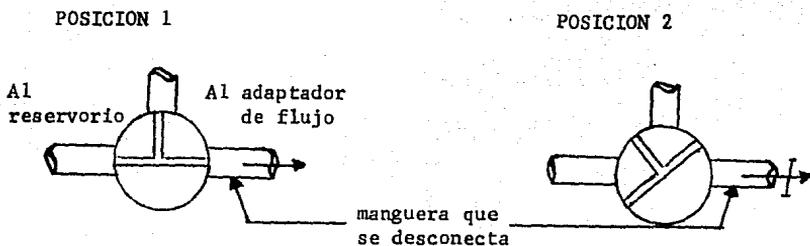
a).- El primer paso es regular el flujo de elución, al cual la muestra va a ser cromatografiada.

b).- El paso siguiente es colocar la llave de tres vías en - la posición 2. Debido a que la posición 1, es encontrada en el momento de estar regulando el grado de flujo (inciso a).

c).- Se procede a desconectar la manguera que une al reservorio de eluyente con el adaptador de flujo superior de la columna, con una llave de tres vías intermedia, colocada en posición 2, que permite detener el flujo de eluyente desde el frasco reservorio.

d).- Bloqueado. el flujo del eluyente, ayudados con una pipe ta tipo Pasteur se aplica la muestra, tratando de evitar la entrada de burbujas de aire. Se deja penetrar la muestra y se va agre-gando eluyente hasta la penetración completa de la muestra. Suce-dido esto, se inicia la colección de fracciones.

e).- Terminada de aplicar la muestra, la llave de tres vías se regresa a la posición 1, para permitir el libre paso del eluyente y llevar a cabo la corrida de la muestra.



3.4.6.- CURVA DE CALIBRACION.

Antes de iniciar la determinación del peso molecular de cualquier molécula, es necesario preparar una curva de calibración -- acorde con el tipo de molécula, a la cual se desea determinar su peso molecular.

Las características de la columna utilizada en la determinación de la curva de calibración se dan enseguida:

- a).- Las dimensiones de la columna fueron las siguientes:
57.0 x 2.0 cm.
- b).- Se utilizó Sephadex G-15, tamaño de la partícula de 40-120 micras (de Sigma).
- c).- Eluyente: ácido fórmico al 2% (V/V).
- d).- Temperatura de elución, ambiental (25°C).

e).- Volumen de muestra 0.2 ml; flujo de elución 1.4 ml/hora.

f).- Lote de péptidos (de Sigma): Bacitracina, Glutation oxidado (G-SS-G), Glutation reducido (G-SH), y la proteína Citocromo C (todos a una concentración de 10 mg/ml).

3.5.- ANALISIS DE AMINOACIDOS.

Después de haber determinado el peso molecular de la proteína en estudio, el paso siguiente es recuperar la proteína de las alícuotas colectadas de la columna durante la CFG. Se liofilizan las alícuotas y se lleva a cabo el análisis de aminoácidos.

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo en un analizador DURRUM D-500, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., en el Laboratorio del Dr. Possani, con la colaboración - de Héctor Valdivia. El análisis de aminoácidos se realizó de acuerdo con el método de Moore, S., Spackman, D.H., y Stein, W.H. (67).

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1.- PREPARACION DEL EXTRACTO.

En las primeras obtenciones del extracto, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar mantenidas en el bioterio de la Facultad de Medicina; sin embargo, estos animales presentaron hígado con mayor cantidad de lípidos lo que dificultaba el proceso de extracción por la gran cantidad de triacilglicéridos hepáticos. Por este motivo, se usaron ratas proporcionadas por el Instituto de Fisiología Celular, animales que no presentaron alto contenido de grasa en hígado.

El homogenado del hígado se hizo con un homogenizador Ultra-Turrax durante 30 segundos, se centrifugó en una Sorvall RC-5B; durante 30 minutos a 8 000 rpm. Al sobrenadante (SN), se le hizo la extracción por partición de lípidos con éter etílico frío (V/V) tres veces, agitando y en frío. La fase acuosa se precipita con acetona fría durante seis horas (V/V) (Fig. 10), también en baño de hielo. El precipitado obtenido con la acetona, se centrifugó durante 30 minutos a 8 000 rpm, para eliminar el SN. Todas las centrifugaciones se hicieron a 0°C.

La pastilla (pellet) obtenida con acetona, se resuspende en ácido fórmico al 20%, tres veces, con agitación y en baño de hielo, a un volumen final de aproximadamente 12.0 ml. La fracción anterior (ácido fórmico al 20%) se liofiliza y después se recupera en una mezcla de n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1), a un volu-

men final de aproximadamente 3.0 ml.

La suspensión en n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1), se aplica a placas de celulosa (con soporte de plástico) de 20 x 20 cm y un espesor de 0.2 mm de la casa Kodak (Fig. 11). Se aplicaron a cada placa de 300-400 microlitros de la suspensión. El criterio de aplicar de 300-400 microlitros, se basa en: cuando se observaba en el punto de aplicación, que la capa de celulosa estaba muy cargada, se dejaba de aplicar más muestra. El desarrollo de la cromatografía de las placas de celulosa, utilizando como eluyente una mezcla de n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1), dura un período de aproximadamente 4 horas (Fig. 12). Después del desarrollo de la cromatografía se procede a la identificación de la banda peptídica de la siguiente manera: se tiñen las placas con ninhidrina al 2% en acetona (el reactivo debe ser preparado al momento de utilizarse), rociando la placa de manera uniforme mediante un aspersor. El revelado de las bandas se realiza en una estufa, a una temperatura de 60°C durante 5 minutos máximo. Los resultados del revelado de las bandas peptídicas se muestran en la Fig. 14. Se determinó el Rf de c/u de las bandas (ver Tabla VI).

4.2.- IDENTIFICACION DE LA BANDA.

Las placas teñidas con ninhidrina al 2% en acetona, se decoloran en una cámara saturada de cloro durante 30 minutos, después se airean 15 minutos y enseguida se tiñen las placas con el reactivo de KI-Almidón 1%-1%, de acuerdo con Rydon-Smith(40). Todas las

tinciones se hicieron a temperatura ambiente. Se observó un mejor revelado de las placas con KI-Almidón 1%-1% cuando el reactivo se utilizó recién preparado y caliente, aplicándose de la misma forma que el reactivo de ninhidrina al 2% en acetona. Los resultados de la tinción anterior se muestran en la Fig. 15. Otro aspecto importante en la tinción de Rydon-Smith (40), es: al aumentar el tiempo de exposición de la placa de celulosa en cloro a una hora y una aireación de 15 minutos, la nitidez de las bandas es mucho mayor (ver Fig. 15).

La elección de la banda problema con un $R_f = 0.64$, se fundamenta en los siguientes criterios: a) la banda peptídica es negativa a la tinción con ninhidrina al 2% en acetona; b) positiva a la tinción con KI-Almidón 1%-1%; y c) el otro aspecto importante para la identificación de la banda peptídica es que absorbe la luz ultravioleta, observándose una fluorescencia apreciable. Con estos criterios: la no tinción con ninhidrina al 2% en acetona, tinción positiva a KI-Almidón 1%-1%, y la absorción a la luz ultravioleta, son suficientes para una identificación precisa de la banda peptídica problema (ver Figuras 14 y 16). Junto a las tinciones de las placas con muestra, se hace la tinción de una placa control (sin muestra) corrida en la cámara de cromatografía para identificar posibles contaminaciones.

Una vez identificada la banda peptídica, se recupera de la placa de celulosa, raspando con una espátula limpia, enseguida se

extrae con 5 ml de ácido fórmico al 20%, se liofiliza posteriormente para su concentración. La muestra liofilizada se resuspende en un volumen de 3 ml de ácido fórmico al 2% y se procede a determinar su peso molecular.

4.3.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL.

Al tomar en consideración que la molécula debe tener un peso molecular bajo y ser un péptido, se hizo la selección del gel para proceder a la determinación del peso molecular.

Se seleccionó Sephadex G-15 de acuerdo a las indicaciones -- del Manual de Pharmacia Fine Chemicals (44): "cuando se tienen dos tipos de gel, es mejor utilizar aquel con el límite de exclusión más bajo, porque las moléculas de interés serán eluidas más temprano, mejorando la recuperación de moléculas activas" el límite de exclusión de este gel es de 1500 daltones (26), si se adecuan las condiciones de flujo, longitud de la columna, etc.

4.3.1.- DETERMINACION DE V_0 . CURVA DE CALIBRACION.

La determinación de V_0 se inició con Azul de Dextrán 2 000 - cuyo peso molecular es de 2×10^6 daltones, sin embargo el colorante se adsorbe en el gel por lo que resultó complicada su utilización. Por lo tanto, se utilizó la proteína Citocromo C con un peso molecular de 12 384 daltones.

La concentración de Citocromo C fue del 1% y cada vez que se determinó V_o , se aplicaron 2.0 mg de Citocromo C, los resultados son mostrados en la Tabla VII.

El flujo de elución de la columna fue de 1.4 ml/hora y se colectaron alícuotas de 1.4 ml con la ayuda de un colector de fracciones (ISCO modelo 328). A las alícuotas se les determinó el contenido de proteína a 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro Gilford. Se utilizaron celdillas de cuarzo para 1.0 ml. La Fig. 17 muestra una curva estándar de proteínas, por el método de Bradford (35). El lote de péptidos utilizados para la curva de calibración en la columna de Sephadex G-15 fue:

<u>Péptidos</u>	<u>P.M (daltones)</u>
Bacitracina-----	1400
Glutación oxidado (G-SS-G)-----	614
Glutación reducido (G-SH)-----	307

La concentración de los péptidos para la curva de calibración fue de 10 mg/ml. Para cada determinación del V_e de c/u de los péptidos se aplicaron 2.0 mg en c/u de las corridas, graficando después el V_e de cada péptido contra la absorbencia de c/u de las fracciones colectadas (ver Fig. 18).

Para la determinación del peso molecular del péptido problema se aplicaron 0.2 ml de la muestra obtenida de las placas de celulosa, recuperada en ácido fórmico al 2%, en c/u de los experimentos. Se colectaron alícuotas a las cuales se les determina la

presencia de proteínas por el método fotométrico de la ninhidrina de acuerdo con el método de Moore y Stein (29), con estos datos se hizo una gráfica de Absorbencia frente al V_e de la muestra --- (ver Fig. 19). En algunas ocasiones también se utilizó el método de Bradford (35) para la determinación de proteína en el efluente de la columna.

Los resultados obtenidos para la determinación de V_e , para c/u de los péptidos y para la muestra problema se dan en la Tabla VII.

La Fig. 20 muestra un espectro de absorción al UV de una --- muestra del péptido problema recuperada de la columna de Sephadex G-15 (Fig. 19), con el objeto de determinar el grado de pureza de la muestra recuperada de la columna. Estas muestras se utilizaron para el análisis de aminoácidos.

Conociendo el V_e y la relación V_e/V_0 de la muestra problema (ver Tablas VII y VIII) se determina el peso molecular aproximado del péptido problema, extrapolarlo en la gráfica de K_{av} vs \log . - P.M. (ver Figuras 21 y 22), obteniéndose un peso molecular aproximado de 1 400 daltones para el péptido en estudio.

4.4.- ANALISIS DE AMINOACIDOS.

El análisis de aminoácidos se realizó en un analizador de -- aminoácidos DURRUM D-500, en el Instituto de Investigaciones Bio-médicas de la U.N.A.M., según el método de Moore, S., et.al (67), obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla IX. La determinación de Triptofano no se realizó por las razones ya expuestas - con anterioridad.

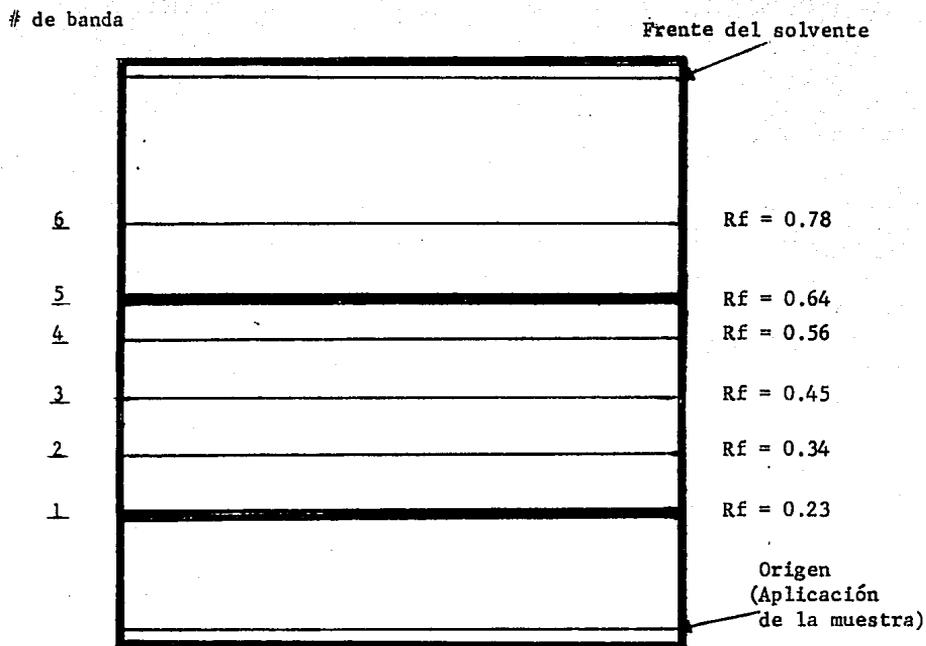


Fig. 14.- Placa de celulosa de 20 x 20 cm de Kodak. El desarrollo de la cromatografía se hizo en una mezcla de n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1). Se muestran las bandas reveladas con Ninhidrina al 2% en acetona y por el método de Rydon-Smith (KI-Almidón 1%-1%) (28), También se muestran los R_f promedio para cada una de las bandas.

El comportamiento de las bandas frente a las tinciones con Ninhidrina al 2% en acetona y Tinción de Rydon-Smith (28), se da en la Tabla VI.

FALLA DE ORIGEN

Fig. 15

TINCIÓN RYDON-SMITH



Fig.- 16

PLACA DE CELULOSA DE 20 x 20 cm. DE EASTMAN-KODAK.
BANDA FLUORESCENTE OBTENIDA AL CORRER UNA MUESTRA DEL EXTRACTO LIOFILIZADO EN BUTANOL-ACIDO ACETICO-AGUA (3:1:1).
TIEMPO DE DESARROLLO DE LA CROMATOGRAFIA: 4 HORAS.

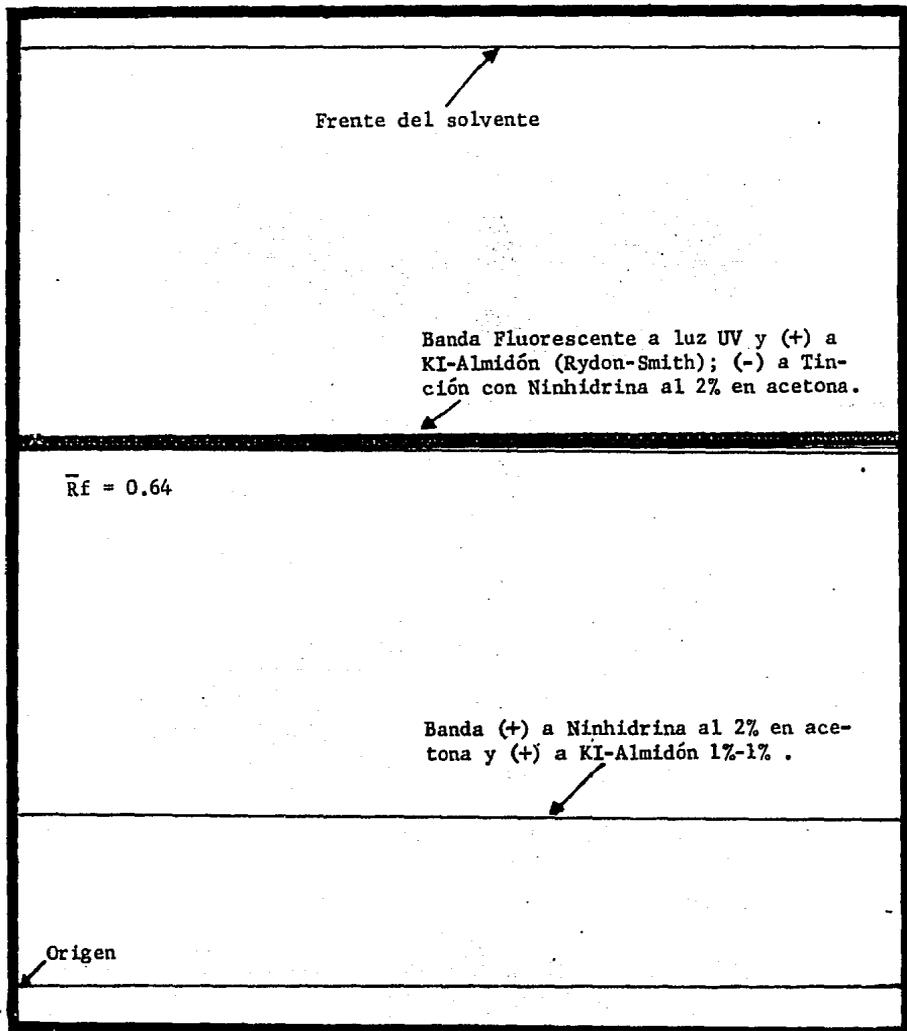
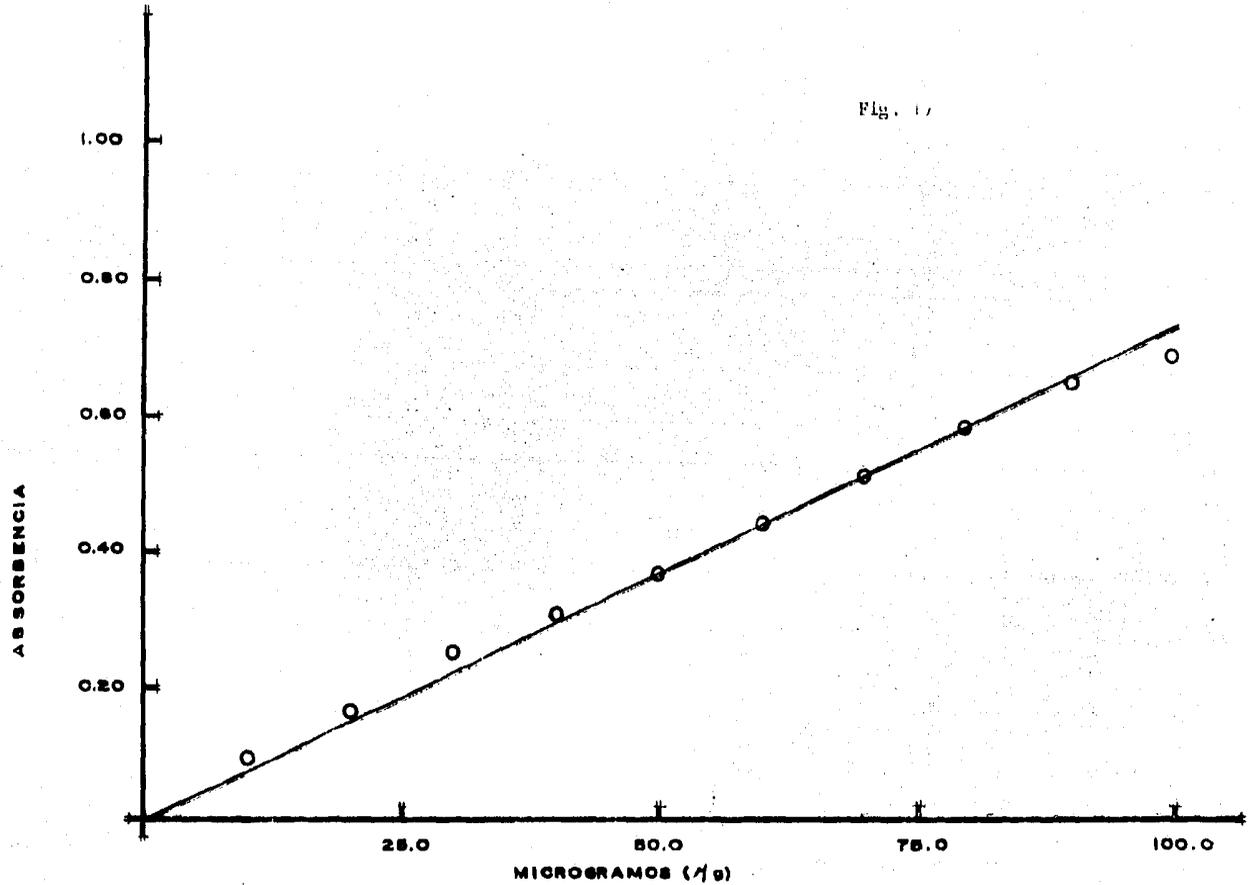


Fig. 17



CURVA ESTANDAR DE BSA (Bovine Serum Albumin)

TINCION METODO DE BRADFORD

SOL. Patrón 1mg/ml

CUBETAS - 3.0 ml

ESPECTROFOTOMETRO GILFORD

LONGITUD DE ONDA (λ) = 595 nm.

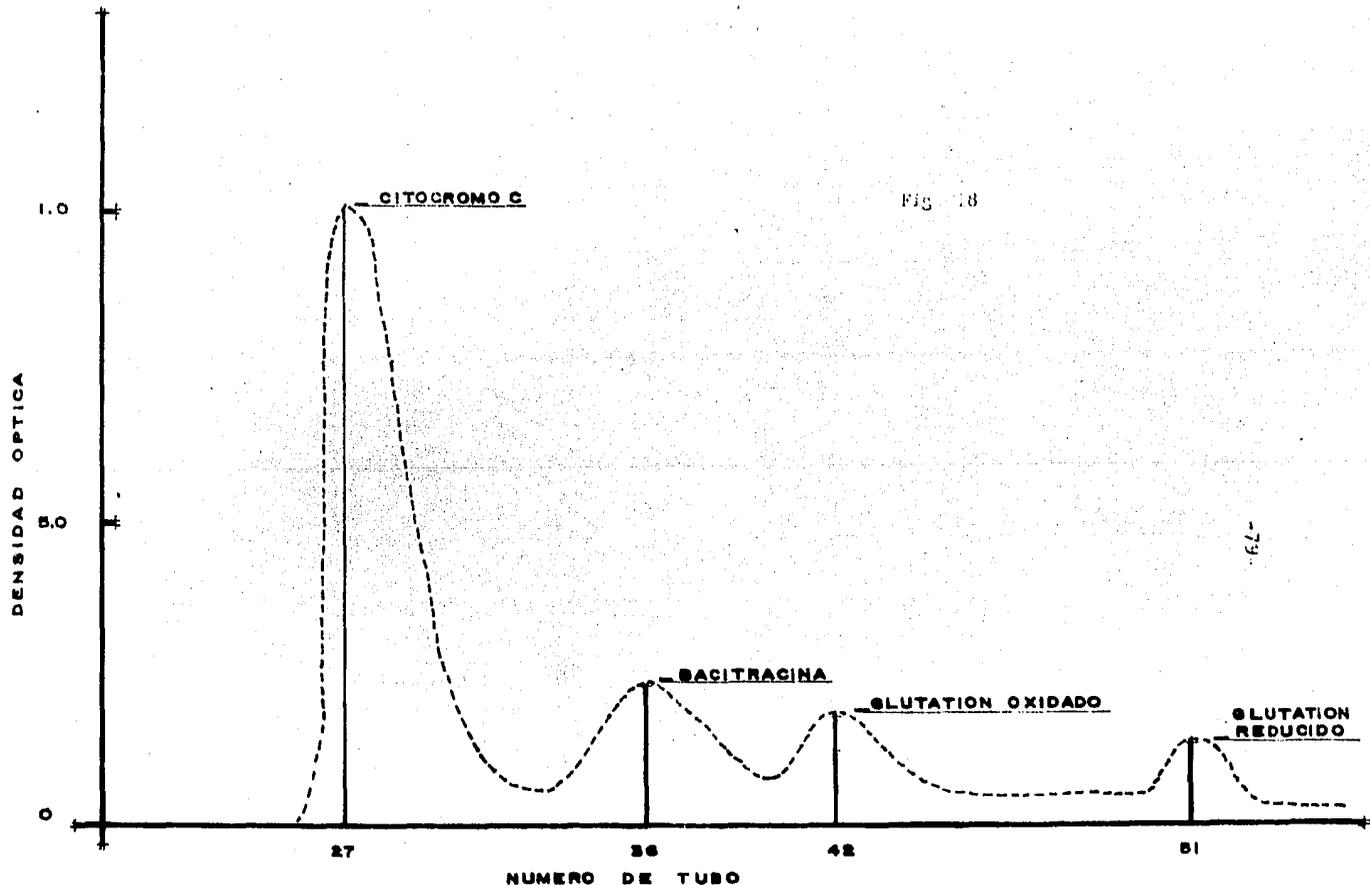


Fig. 18

REGISTRO DE UNA CORRIDA EN SEPHADEX G-15 (de Sigma).

CITOCROMOC (2.0 mg); BACITRACINA (2.0 mg); G-SB-G (2.0 mg); G-SH (2.0 mg).

DIMENSIONES DE LA COLUMNA:

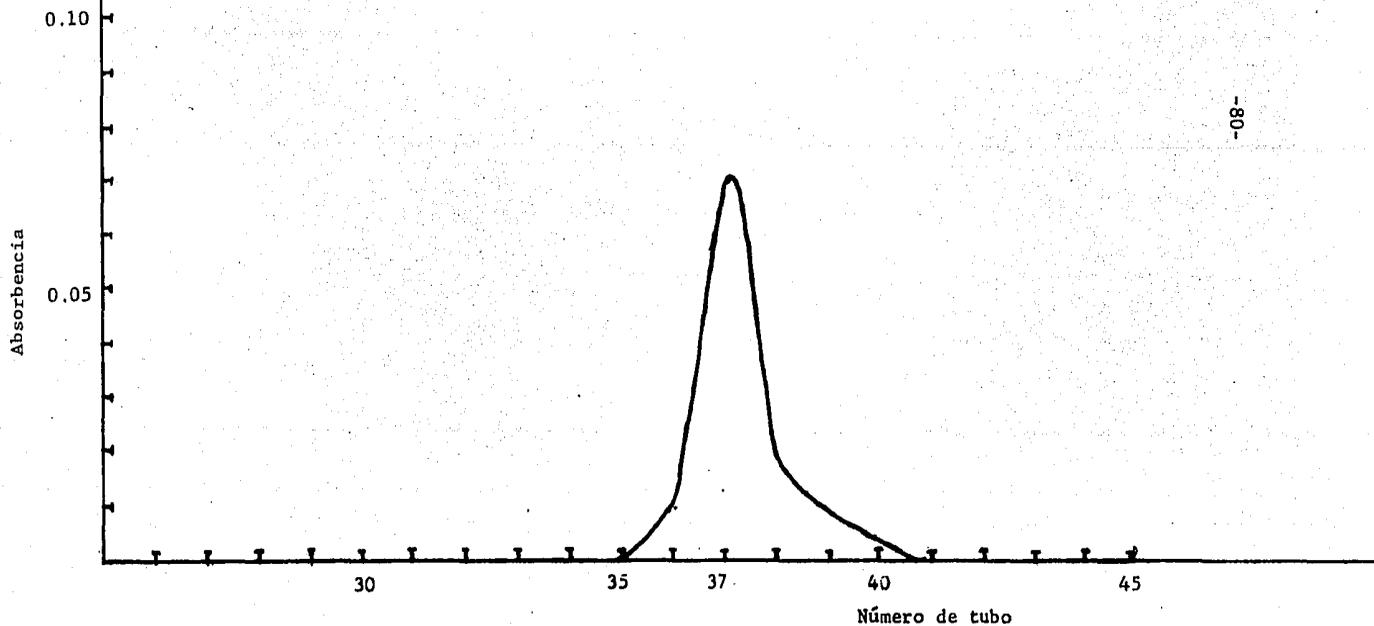
$\varnothing = 2.0 \text{ cm} \times 57.0 \text{ cm}$.

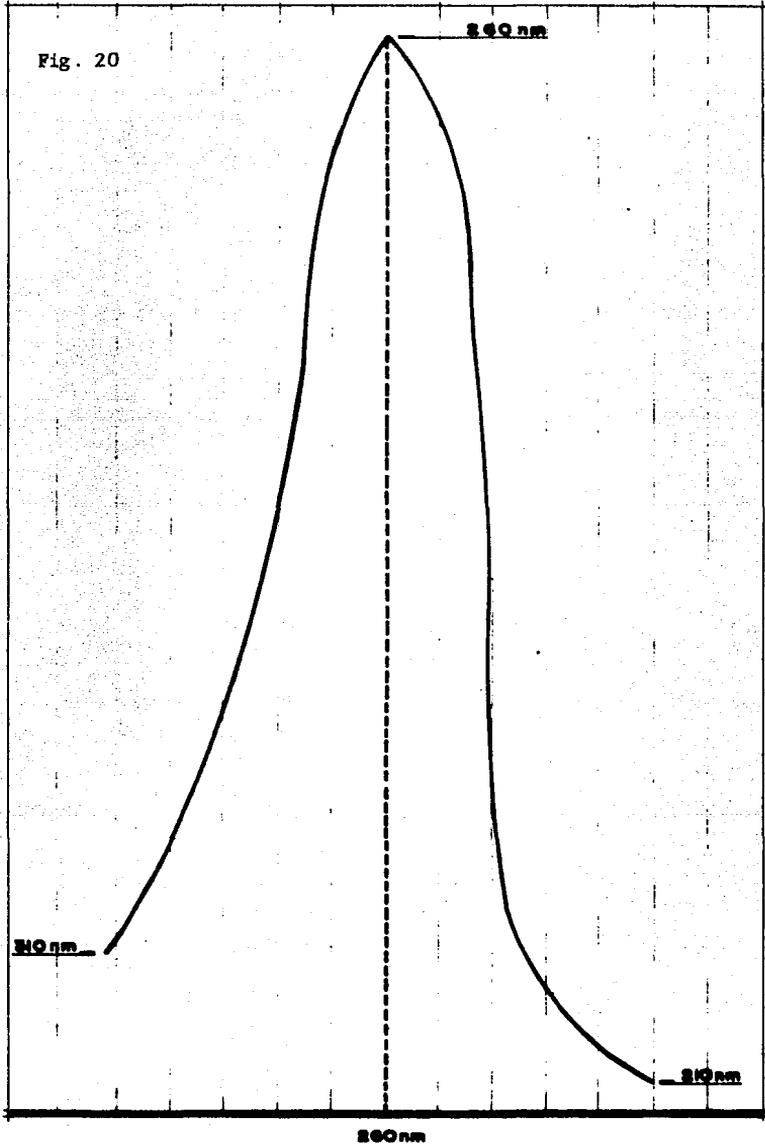
FLUJO = 5 ml/hora.

Fig. 19

Gráfica de Absorbencia vs Número de tubo

Muestra del recuperado de dos placas de celulosa
pasada a través de la columna de Sephadex G-15.
Determinación en los efluentes por el método de Moore y Stein.





(Máxima absorción)

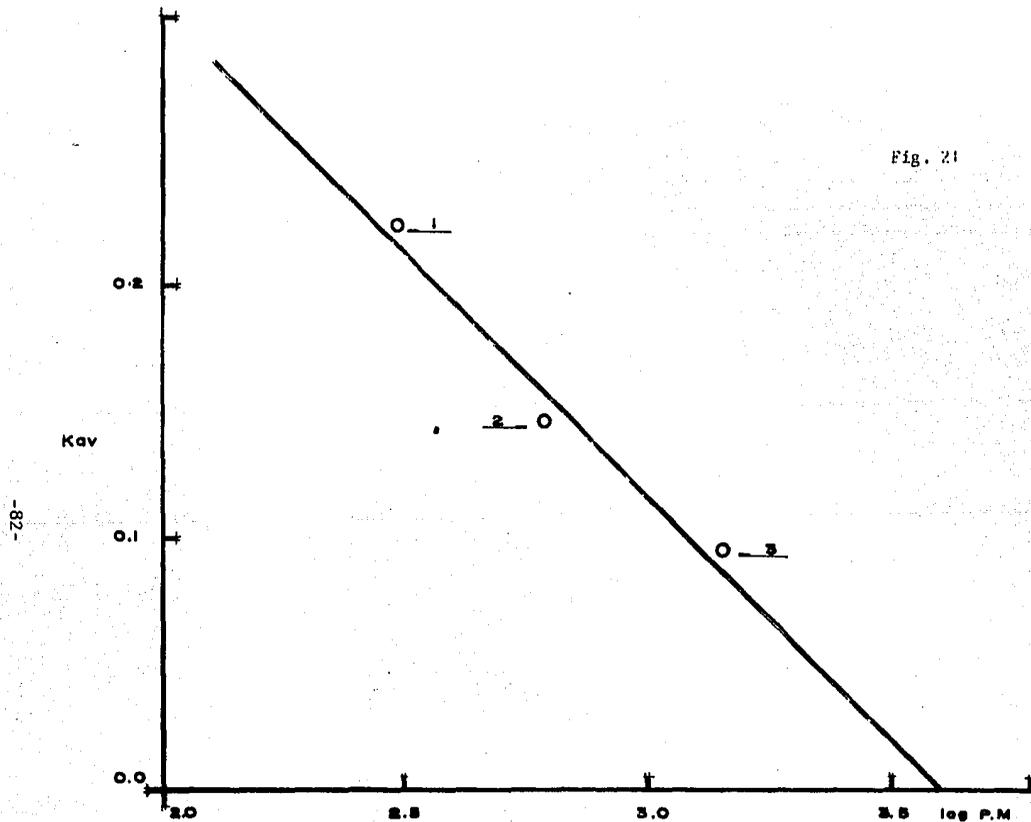
ESPECTRO DE ABSORCION DE UNA MUESTRA DEL RECUPERADO DE PLACAS DE CELULOSA.

APARATO — PYE UNICAM.

VELOCIDAD = 10nm /cm

SENSIBILIDAD = 0-1

Fig. 21



GRAFICA DE K_{av} VS $\log P.M.$

CURVA DE CALIBRACION PARA SEPHADEX G-15 (4 σ)

DIMENSIONES DE LA COLUMNA:

ϕ = 2.0 cm.

L = 57.0 cm.

V_i = 179.0 ml.

1. - Glutathion reducido (G-SH)

2. - Glutathion oxidado (G-S-S-G)

3. - Sacitracina.

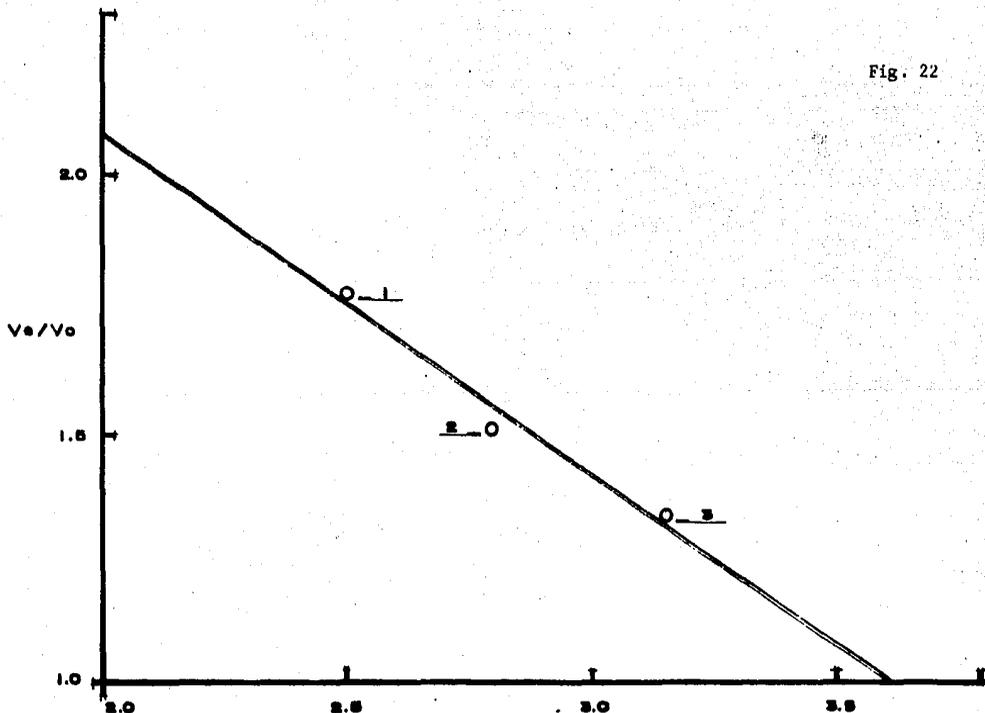


Fig. 22

GRAFICA DE V_e/V_o VS Log P.M
CURVA DE CALIBRACION PARA SEPHADEX G-15 (de Sigma)

DIMENSIONES DE LA COLUMNA:

- | | |
|-------------------|-------------------------|
| $\phi = 2.0$ cm. | 1- Glutathion reducido. |
| $L = 57.0$ cm. | 2- Glutathion oxidado. |
| $V_t = 179.0$ ml. | 3- Sacitracina. |

Tabla VI.

Se dan los Rf promedio de las bandas reveladas sobre las placas de celulosa por los métodos de tinción con ninhidrina al 2% en acetona, tinción de Rydon-Smith (KI-Almidón 1%-1%) y la absorción a la luz ultravioleta.

Número de banda	Rf promedio	Comportamiento frente a las tinciones con ninhidrina al 2% en acetona, tinción de Rydon-Smith (40) y a la luz ultravioleta.
1	0.23	(+) a ninhidrina. (+) a KI-Almidón 1%-1%.
2	0.34	(+) a ninhidrina. (-) a KI-Almidón 1%-1%.
3	0.45	"
4	0.56	"
5	0.64	(-) a ninhidrina. (+) a KI-Almidón 1%-1%. (+) fluorescencia a la luz ultravioleta.
6	0.78	(+) a ninhidrina. (-) a KI-Almidón 1%-1%.

Tabla VII

DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACION

PEPTIDO.	Vo (ml)	Ve (ml)	Ve-Vo (ml)	Ve/Vo	Kav = $\frac{Ve-Vo}{Vt-Vo}$	Peso Molecular	log. P.M
Citocromo C	40.17						
Bacitracina		53.62	13.45	1.3343	0.097	1,400	3.150
Glutación oxidado		60.27	20.10	1.500	0.145	614	2.789
Glutación reducido		70.93	30.76	1.766	0.222	307	2.487
Péptido problema		51.80	11.63	1.289	0.084	≈ 1,400*	
Vt = 179.0 ml		* = Calculado por extrapolación en la curva de calibración.					

Tabla VIII

DATOS DE LA GRAFICA DE K_{av} vs $\log P.M$

V_e/V_o vs $\log P.M$

PEPTIDO	K_{av}	V_e/V_o	Peso Molecular	$\log P.M.$
Bacitracina	0.097	1.334	1,400	3.150
Glutación oxidado	0.145	1.500	614	2.789
Glutación reducido	0.222	1.766	307	2.487

Tabla IX

ANALISIS DE AMINOACIDOS

Nombre	Número de residuos
Asp	1.0 ± 0.163
Treo	1.0 ± 0.226
Ser	2.0 ± 0.208
Glu	2.0 ± 0.188
Gli	3.0 ± 0.544
Ala	1.0 ± 0.000
Leu	1.0 ± 0.116

P.M = 1214.0 daltones.

P.M calculado por cromatografía en Sephadex G-15 ~~1400~~

V.- CONCLUSIONES.

Para analizar si el objetivo central del presente trabajo fue cumplido, habrá que hacer algunas consideraciones: el objetivo central era implementar una técnica más efectiva para la purificación y recuperación adecuada de un péptido hepático de rata, para lo cual se puntualizan enseguida algunas de las consideraciones que influyeron de manera importante, para el desarrollo del trabajo.

a).- Uno de los primeros factores que ayudó en la recuperación del péptido problema, fue el observar que aquellas ratas que eran alimentadas con alimento de origen nacional, presentaron demasiada grasa en su hígado, esta presencia de grasa en el hígado interfería en la resolución adecuada para la separación de las bandas durante la cromatografía en capa delgada sobre placas de celulosa. Así que se optó por cambiar las ratas alimentadas ad libitum con alimento nacional por animales alimentados también ad libitum con alimento importado, observándose una mejor resolución en la separación de las bandas, y la desaparición de la interferencia por el alto contenido de grasa, obteniéndose los animales del Instituto de Fisiología Celular, que no presentaban gran cantidad de grasa.

b).- Considerando el inciso (a), se pudo observar durante el proceso de extracción, por lo menos hasta la precipitación con acetona, una mejoría en la recuperación y ausencia de contaminaciones mayores del extracto.

c).- La separación óptima de las bandas peptídicas en cromatografía en capa delgada se pudo observar que se lograba utilizando una mezcla de n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1) y la utilización de placas de celulosa de 20 x 20 cm con un espesor de 0.2 mm. La separación de las bandas peptídicas no se observó cuando la separación se trató de realizar por electroforesis o en geles de poliacrilamida, técnicas usadas anteriormente a el inicio de este trabajo.

d).- Identificación de la banda peptídica problema mediante las tinciones y fluorescencia. Las tinciones se determinaron con ninhidrina al 2% en acetona y tinción de Rydon-Smith (KI-Almidón 1%-1%) y la absorción a la luz ultravioleta de la banda peptídica problema, manifestada como una fluorescencia (ver Tabla VI). En un momento dado se pudieron descartar las dos tinciones y aceptar como suficiente la fluorescencia de la banda problema frente a la luz ultravioleta para la identificación final, lo que redundó en una mayor eficiencia en la elaboración del trabajo en lo que respecta al factor tiempo.

e).- Como se ha mencionado antes, después del recuperado de la banda de la placa de celulosa, se liofiliza ésta para su concentración. Posteriormente esta muestra se colocó en una columna de Sephadex G-15, para una eventual purificación y determinación del peso molecular del péptido problema. Se observó la separación y pudo determinarse el peso molecular aproximado (1400 daltones),

la desventaja que se pudo observar fue que la muestra era diluída y la recuperación del péptido era pobre.

f).- Como ya se mencionó, a la muestra obtenida en las alícuotas de la cromatografía de filtración en gel (CFG) sobre Sephadex G-15 (ver Fig. 19) se le determinó un espectro de absorción a la luz ultravioleta (Fig. 20), y se observó que el péptido presentaba un máximo de absorción a 260 nm. Esta muestra purificada se le utilizó para el análisis de aminoácidos, una de las limitaciones principales fue la concentración tan pequeña del péptido, para el análisis. La alternativa a este problema fue mezclar dos muestras obtenidas por separado de la columna de CFG, para así poder alcanzar una concentración mínima de 10 ug/ml, necesaria para el análisis de aminoácidos. El análisis de aminoácidos, aparte del problema mencionado, no presentó ninguna otra dificultad en su desarrollo. La secuenciación no se determinó por la concentración final tan baja obtenida, así como tampoco la determinación de Triptofano (Tabla IX).

Al analizar cada una de las consideraciones y observaciones anotadas anteriormente, se ha llegado a la conclusión final: se implementó la técnica para la purificación del péptido, y este resultó reproducible en las condiciones ya expuestas, se determinó su peso molecular y la composición de aminoácidos, la desventaja principal fue: es un método que, aunque reproducible, consume mucho tiempo y la concentración obtenida es muy pequeña. Para evitar

esto se proponen las siguientes perspectivas: después de la separación del péptido por cromatografía en capa delgada, se propone acoplar un sistema HPLC en sustitución del sistema de CFG, tomando en cuenta además todos los factores que intervienen, obtener un diseño final que redundará en una mayor y mejor recuperación del péptido, con la consecuente disminución del tiempo necesario para la purificación final.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1).- E. Piña y Chagoya.- Datos no publicados (1975-1978).
- 2).- A. Hernández y E. Piña.- Datos no publicados.
- 3).- Krieger, D.T.,- Brain Peptides: What, Where, and Why? Science; vol. 222; 975-985 (1983).
- 4).- Pickart, Loren.- Evidence for a Low Molecular-Weight plasma peptide which stimulates chick chondrocyte metabolism. J.Supramol.Structure; vol. 13,385-394 (1980).
- 5).- Knecht, R. et.al.- Sequence Determination of Eglin C Using Combined Microtechniques of Amino Acid Analysis, Peptide Isolation, and Automatic Edman Degradation. Anal.Biochem.; vol. 130; 65-71 (1983).
- 6).- Seemuller, U., et.al.- (1977) Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem.; vol. 358, 1105-1117 (citado en Knecht,R.,1983).
- 7).- Schoenberger, G.A et.al.- Peptide Inhibitors of Lactic Dehydrogenase (LDH). II. Isolation and Characterization of Peptides I and II. Biochemistry; vol. 5; 1375-1379 (1966).

- 8).- Schoenberger, G.A. et.al.- Peptides Isolated from Human Liver with specific inhibitory effects on Reassociation/Reactivation of in vitro dissociated Lactic Dehydrogenase (LDH-M₄ and -H₄) Isozymes. Regulatory Peptides ; vol. 1; 223-244 (1980).
- 9).- Kilpatrick, D.L et.al.- Release of enkephalins and enkephalin-containing polypeptides from perfused beef adrenal glands. Proc.Natl.Acad.Sci.; vol. 77, 7473-7475 (1980).
- 10).- Anastasi, A., et.al.- Structure of Uperolein, a Physalaemin-Like Endecapeptide Occurring in the Skin of Uperoleia rugosa and Uperoleia marmorata. Experientia, vol.31 394-395 (1974).
- 11).- Erspaner, V., et.al.- Experientia, vol. 22; 736 (1966). (citado en Anastasi et.al,1975).
- 12).- Anastasi, A., et.al.- Experientia; vol. 27; 166 (1971) (citado en The Merck Index, Tenth Edition, 1983).
- 13).- Anastasi, A., et.al.- Aminoacid Composition and Sequence of Litorin, a Bombesin-Like Nonapeptide from the Skin of the Australian Leptodactylid Frog Litoria aurea. Experientia; vol. 31; 510-511 (1975).

- 14).- Endean, R., et.al.- (1974), *Toxicon*; vol.12; 131-138.
(citado en Cruz, L.J. et.al., 1978).⁶
- 15).- Cruz, L.J., Gray, W.R., and Olivera, B.M.- Purification and Properties of a Mitoxin from Conus geographus.
Arch.Biochem,Biophys.; vol. 190; 539-548 (1978).
- 16).- Gray, W.R., Luque, A., Olivera, M., Barret, J., Cruz, L.J.- Peptide Toxins from Conus geographus Venom.
J.Biol.Chem.; vol. 256, 4734-4740 (1981).
- 17).- Seale, T.W., et.al.- A polyamine-Conjugated Peptide Isolated from Human Plasma. *Arch.Bioch.Biophys.*; vol. 198; 164-174 (1979).
- 18).- Dale Roith, J.Shiloach, J.Roth.- *Peptides*; vol. 3; 211-1982 (citado en Krieger, D.T., 1983).
- 19).- Hokfelt, T., et.al.- *Nature (London)*; vol. 284; 515 (1980)
(citado en Krieger, D.T., 1983).
- 20).- Johnson et.al.- *Science*; vol. 102; 376 (1945).
(citado en The Merck Index, Tenth Edition, 1983).
- 21).- Bruce, A., et.al.- *Molecular Biology of the Cell*.
Garland Publishing Inc. N.Y (1983).
- 22).- Hotchkiss, et.al.- *J.Biol.Chem.*; vol. 141;155,163 (1941).

- 23).- Gause et.al.- Compt.Rend.Acad.Sci. USSR; vol. 43; 217
(1944). (citado en The Merck Index. Tenth Edition, 1983).
- 24).- Brownlee, Jones.- Biochem.J.; vol. XXV; 43 (1948).
- 25).- Curso general sobre antibióticos. División de Bioquímica
de La Sociedad Química de México. Septiembre (1979).
- 26).- G.Cooper Terrance.- The Tools of Biochemistry.
Ed. John Wiley and Sons (1979) N.Y.
- 27).- Katz, A.M.- Peptide separation by Two-dimensional Chromatography and Electroforesis. J.Biol.Chem.; vol. 234
2897-2900 (1959).
- 28).- Ingram.- Bioch. et Biophys. Acta; vol. 28; 539 (1958).
(citado en Katz, A.M., 1959).
- 29).- Moore, S., and Stein, W.H.- Photometric Ninhidrin Method
for use in the Chromatography of aminoacids.
J.Biol.Chem.; 176, #1 (1948).
- 30).- Teeters, W.O., and Shriner.- J.Am.Chem.Soc., (1933),
3026 (citado en Moore y Stein, 1948).
- 31).-Harding, V.J., and Mc Lean, R.M.- J.Biol.Chem.; vol. 20;
217 (1915); vol. 25; 337 (1916) (citado en Moore y Stein,
1948).

- 32).- Breton, S.C.- Etudes Chimiques et Biologiques sur la Ninhydrine, Réactif des Aminoacids (Imprimerie E.Drovi-llard, Bordeaux, 1958) (citado en The Merck Index. Tenth Edition, 1983).
- 33).- Harper, H.A.- Química Fisiológica de Harper. Ed. El Manual Moderno, México (1984).
- 34).- Lenhinger, A.- Bioquímica. Ed. Omega, 3ª Edición (1980).
- 35).- Bradford, M.M.- A rapid and sensitive method for quanti- zation of microgram quantities of protein-dye binding. Anal.Biochem.; vol. 72, 248-254 (1976).
- 36).- Lowry, O.H., et.al.- J.Biol.Chem.; 193, 265-275 (1951) (citado en Bradford, M.M., 1976).
- 37).- The Merck Index. Tenth Edition (1983)., Merck. Co. Inc. Rahway N.J.
- 38).- Spector, T.- Refinement of the Coomassie Blue Method of Protein Quantitation. Anal.Biochem.; vol. 86, 142 (1978).
- 39).- Reisner, A.H., et.al.- Anal.Biochem.; vol. 64, 509-516 (1975) (citado en Bradford, M.M., 1976).
- 40).- Rydon-Smith.- Method of Rydon-Smith of KI-Starch. Nature; 169, 922 (1952).

- 41).- Hjertén, S., and Mosbach, R.- *Anal.Biochem.*; 3, 109
(1962) (citado en Reiland, J., 1971).
- 42).- Araki, C.- *Bull.Chem.Soc.Jap.*; 29, 543, (1956).
(citado en Reiland, J., 1971).
- 43).- Reiland, J.- *Gel Filtration. Methods in Enzymology.*
vol. 22, 287-321 (1971).
- 44).- *Manual of Pharmacia Fine Chemicals.- Gel Filtration.*
Theory and Practice. Pharmacia Fine Chemicals (1980).
- 45).- Williams, K.W.- *Solute-gel interactions in gel filtra-*
tion. Lab. Practice; vol. 21, 667-670 (1972) (citado en
44).
- 46).- Whitaker, J.R.- *Determination of Molecular weights of*
Proteins by Gel Filtration on Sephadex. Anal.Chem.;vol.
35, 1950-1953 (1963).
- 47).- Andrews, P.- *The gel filtration behaviour of proteins*
related to their molecular weights over a wide range.
Biochem.J.;vol. 96, 595-606 (1965).
- 48).- Determan, H., and Michel, W.- *The correlation between*
molecular weight and elution behaviour in the gel chro-
matography of proteins. J.Chromat.; 25, 303-313 (1966).
(citado en Manual of Pharmacia Fine Chemicals, 1980).

- 49).- Laurent, T.C., and Granath, K.A.- Fractionation of Dextran and Ficoll by Chromatography on Sephadex G-200. *Bioch.Biophys.Acta*; 136, 191-198 (1967).
- 50).- Granath, K.A., and Kuist, B.E.- Molecular weight distribution analysis by gel Chromatography on Sephadex. *J.Chromat.*; 28, 69-81 (1967) (citado en *The Manual of Pharmacia Fine Chemicals*, 1980).
- 51).- Granath, K.A., and Flodin, P.- Fractionation of Dextran by Gel Filtration Method. *Makromolekulare Chem.*; 48, 160-171 (1961) (citado en *The Manual of Pharmacia Fine Chemicals*, 1980).
- 52).- Ackers, G.K.- Molecular sieve studies of interacting protein systems. II.- Enumeration of components and determination of molecular size distributions. *J.Biol.Chem.*; 243, 2056-2064 (1968).
- 53).- Flodin, P.- Dextran gels and their applications in gel filtration. Dissertation 85 pp., AB Pharmacia Uppsala, Sweden, 1962 (citado en *The Manual of Pharmacia Fine Chemicals*, 1980).
- 54).- Andrews, P.- Estimation of the Molecular Weights of Proteins by Sephadex Gel-Filtration. *Biochem.J.*; 91, 222, (1944).

- 55).- Ackers, G.K.- A new calibration procedure for gel filtration Columns. J.Biol.Chem.; 242, 3237-3238 (1967).
- 56).- Squire, P.G.- A relationship between the molecular weights of Macromolecules and their Elution Volumes based on a Model Sephadex Gel Filtration. Arch.Bioch. Biophys.; 107, 471-478 (1964).
- 57).- Gelotte, B.- J.Chromat.; 3, 330 (1960).
(citado en Whitaker, J.R., 1963).
- 58).- Porath, J.- Bioch.Biophys.Acta; 39, 193 (1960).
(citado en Whitaker, J.R., 1963).
- 59).- Giddings, J.C., and Mallik, K.L.- Theory of Gel Filtration (Permeation) Chromatography.
Anal.Chem.; 38, 997-1000 (1966).
- 60).- Siegel, L.M., and Monty, K.J.- Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hidroxylamine reductases. Bioch.Biophys.Acta; 112, 346-362 (1966).

- 61).- Reeves, R.L., et.al.- The separation and purification of ionic azo and azomethine dyes by gel permeation chromatography. J.Chromat.; 47, 217-223 (1970). Citado en The Manual of Pharmacia Fine Chemicals, 1980).
- 62).- Davis, L.C.- A simplified Calibration procedure for Elution Chromatography on gel filtration columns. J.Chromat.Science; 21, 214-217 (1983).
- 63).- Susskind, H., and Beckner, W.- Nature (London); 212 1564 (1966) (citado en Reiland, J., 1971).
- 64).- Porath, J.- Pure Appl.Chem.; 6, 233 (1963). (citado en Siegel, L.M., et.al., 1966).
- 65).- Laurent and Killander.- J.Chromat.; 14, 317 (1964). (citado en Siegel, L.M., et.al., 1966).
- 66).- Moore, S., and Stein, W.H.- Chromatographic Determination of Aminoacids by the use of Automatic Recording Equipment. Methods in Enzymology; VI-117, 819-831 (1963).
- 67).- Spackman, D.H, Stein, W.H., and Moore, S.- Automatic recording apparatus for use in the Chromatography of Aminoacids. Anal.Chem.; 30, 1190-1206 (1958).

- 68).- Simmonds, D.H.- Automatic Equipment for Determination of Aminoacids Separated on Columns of Ion Exchange Resins. Anal.Chem.; 30, 1043-1049 (1958).
- 69).- Moore, S., Spackman, D.H., and Stein, W.H.- Chromatography of Aminoacids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved Systems. Anal.Chem.; 30, 1185-1190 (1958).
- 70).- Spackman, D.H., Stein, W.H., and Moore, S.- Federation Proc.; 15, 358 (1956) (citado en Simmonds, D.H., 1958).
- 71).- Moore, S., and Stein, W.H.- Chromatography of Aminoacids on Sulfonated Polystyrene Resins. J.Biol.Chem.; 192, 663-681 (1951).
- 72).- Chang, J.Y., Knecht, R., and Braun, D.G.- Biochem.J.; 199, 547-556 (1982).
- 73).- Chang, J.Y., Knecht, R., and Braun, D.G.- Biochem.J.; 203, 803-806 (1982).