
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



OBTENCION Y PURIFICACION DE
RELAXINA DE RATA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
MARISELA PELAYO GONZALEZ
GUADALAJARA, JAL., 1989

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de --
Nutrición de la División de Biología de la Reproducción
en la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente
bajo la dirección de la M. en C. Alma Rosa del Angel --
Meza y la asesoría del M. en C. Carlos Beas Zarate.

A mi madre, quien me motivó y me dió su apoyo, amor y confianza para terminar mis estudios profesionales.

A mi esposo, a quien reitero mi amor y doy gracias por su ayuda, confianza, comprensión e interés por mi trabajo.

A mis hermanos por su apoyo y la esperanza que depositaron en mi.

A mi hijo(a) por su resistencia, fuerza y energía que me ha transmitido desde donde se encuentra.

A mis amigos y compañeros.

A Dios: GRACIAS.

Mi agradecimiento a las personas que con su colaboración entusiasta, apoyo, asesoría e interés hicieron posible la realización de este trabajo, en especial a:

La M. en C. Alma Rosa del Angel Meza (Laboratorio de Nutrición de la U.I.B.O.)

Al M. en C. Carlos Beas Zarate (Facultad de Ciencias de la U. de G.).

Al Biól. Jorge Ramiro Domínguez Rodríguez (División de Bioquímica de la U.I.B.O.)

Al M. en C. Fernando Alfaro Bustamante (División de Patología de la U.I.B.O. y Facultad de Medicina de la U. de G.)

Al M.V.Z. Pedro Díaz Esquivel (Bioterio de la U.I.B.O.)

Al Dr. José Sánchez Corona (División de Genética de la U.I.B.O.).

A todos mis compañeros del Laboratorio de Nutrición que vivimos esta experiencia juntos.

INDICE

	pag.
RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIATURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
INTRODUCCION	6
1.- Definición	6
2.- Localización	7
3.- Función	10
4.- Desarrollo	12
5.- Purificación	13
JUSTIFICACION	17
OBJETIVO	19
MATERIAL Y METODOS	20
1.- Extracción de ovarios	20
2.- Filtración en gel	21
3.- Cromatografía de intercambio iónico	22
4.- Bioensayo	23
RESULTADOS	28
1.- Extracción de ovarios	28
2.- Filtración en gel	28
3.- Cromatografía de intercambio iónico	30
4.- Bioensayo	36

RESUMEN

La relaxina es una hormona peptídica que se produce en el cuerpo lúteo, que se localiza principalmente en suero sanguíneo, placenta y ovarios de mamíferos, -- así como en elasmobranquios y algunas aves durante la gestación (1,2). La relaxina es similar a la insulina respecto a la secuencia y número de aminoácidos que las conforman, ambas hormonas constan de dos subunidades unidas por puentes disulfuro y tienen pesos moleculares de aproximadamente 6000 daltones (3-6), a pesar de ello tienen actividades muy diferentes.

La relaxina en la etapa tardía de la gestación suprime la actividad espontánea del miometrio, favorece la dilatación y relajación del cervix, así como de sí-- fisis pùblica y otras uniones pùlvicas (2,4,5).

A pesar de la importancia de esta hormona en los procesos de reproducción solo ha sido purificada en un pequeño número de especies, tales como cerda, rata, tiburón, conejo, humano y equino, utilizando diferentes métodos de obtención, purificación y pruebas biológicas (3,7-14), los cuales resultan ser muy costosos ya que la relaxina existe en muy baja concentración y se requiere un alto número de órganos ricos en esta hormona.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar un -- método para la obtención y purificación de relaxina de rata.

	pag.
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53

RESUMEN

La relaxina es una hormona peptídica que se produce en el cuerpo luteo, que se localiza principalmente en suero sanguíneo, placenta y ovarios de mamíferos, -- así como en elasmobranquios y algunas aves durante la gestación (1,2). La relaxina es similar a la insulina respecto a la secuencia y número de aminoácidos que las conforman, ambas hormonas constan de dos subunidades unidas por puentes disulfuro y tienen pesos moleculares de aproximadamente 6000 daltones (3-6), a pesar de ello tienen actividades muy diferentes.

La relaxina en la etapa tardía de la gestación suprime la actividad espontánea del miometrio, favorece la dilatación y relajación del cervix, así como de sí-- fisis púlica y otras uniones pélvicas (2,4,5).

A pesar de la importancia de esta hormona en los procesos de reproducción solo ha sido purificada en un pequeño número de especies, tales como cerda, rata, tiburón, conejo, humano y equino, utilizando diferentes métodos de obtención, purificación y pruebas biológicas (3,7-11), los cuales resultan ser muy costosos ya que la relaxina existe en muy baja concentración y se requiere un alto número de órganos ricos en esta hormona.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar un -- método para la obtención y purificación de relaxina de rata.

El establecimiento de la metodología se hizo en -- base a métodos previamente descritos, se utilizaron o-- varios de ratas de 20 días de gestación, los cuales se sometieron a homogenización, agitación, centrifugación y diálisis, para posteriormente pasarlos por filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico.

La prueba biológica para comprobar la obtención de relaxina se realizó directamente en útero e intestino de ratas multiparas por medio de registros electrofi--- lógicos de relajación y contracción tanto "in vivo" como "in vitro".

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de relaxina y con ello la estandarización de un método de obtención práctico y reproducible en nuestro medio, que permita llevar a cabo futuros proyectos de investigación.

LISTA DE ABREVIATURAS

R	Relaxina
PM	Peso molecular
D	Daltones
CL	Cuerpo luteo
RIA	Radioinmunoensayo
etf	equivalente a tejido fresco
ODS	Octadecylsilica
CMS	Carboxymetil-celulosa
CII	Cromatografía de intercambio iónico
Col.	Colaboradores

LISTA DE TABLAS

- I. METODOS UTILIZADOS PARA PURIFICAR RELAXINA DE DIFERENTES ESPECIES.
- II. CONCENTRACION DE PROTEINAS DE LOS DIFERENTES DIALIZADOS.
- III. RECUPERACION DE PROTEINAS DURANTE EL PROCESO.

LISTA DE FIGURAS

- 1.- Secuencia de aminoácidos de las cadenas A y B de relaxina e insulina.
- 2.- Indices de medición del registro electrofisiológico.
- 3.- Contenido de nitrógeno proteico en las fracciones - obtenidas de Sephadex G-50.
- 4.- Contenido de nitrógeno proteico de las fracciones - obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico
- 5a.- Registro electrofisiológico de la respuesta biológica en útero de rata "in vivo" al contacto con el extracto de relaxina.
- 5b.- Registro electrofisiológico de la respuesta biológica en útero de rata "in vitro" al contacto con - el extracto de relaxina.
- 6a.- Registro electrofisiológico de la respuesta biológica en intestino de rata "in vivo" al contacto -- con el extracto de relaxina.
- 6b.- Registro electrofisiológico de la respuesta biológica en intestino de rata "in vitro" al contacto - con el extracto de relaxina.
- 7.- Registro electrofisiológico de la respuesta biológica en intestino de rata "in vitro" al contacto -- con insulina.

INTRODUCCION

1.- DEFINICION.

La relaxina (R) es una hormona peptidica que se -- localiza principalmente en suero sanguineo, placenta y ovarios de mamiferos, asi como en elasmobranquios y algunas aves durante la gestación (1,2). Esta hormona --- pierde su actividad durante la incubación con enzimas proteolíticas o agentes reductores. Es termoestable y puede ser sometida a calor y presión en autoclave de 20 a 30 minutos sin perder su potencia en forma significativa. Cuando la R se encuentra en soluciones salinas -- estériles es igualmente estable, pero es conveniente -- refrigerar para prevenir su inactivación (2).

Los primeros estudio de R fueron publicados por -- Hisaw en 1926, quién observó que la llamada "relajación de la sífisis púbica en cobayos es controlada por hormonas. Posteriormente en 1930, Fevoid, Hisaw y Meyer -- demostraron que un extracto acuoso del cuerpo luteo(CL) de cerdas provocaba relajacion de la sífisis púbica en cobayos tratados con estrógenos y ovariectomizados. A -- esta sustancia la denominaron relaxina (3).

Estudios bioquimicos realizados demostraron que la R es similar a la insulina desde el punto de vista estructural (3). Frieden y Hisaw después de utilizar agentes reductores sugirieron la presencia de puentes disulfuro en la molécula de R y su importancia quedó mani---

fiesta con la pérdida de la actividad biológica de la R después de su reducción. Actualmente se sabe que la R consta de dos subunidades unidas por puentes disulfuro, esta característica la hace muy parecida a la insulina (3-6), la cual consta de una cadena A con 21 residuos de aminoácidos y una cadena B de 30 residuos con un peso molecular (PM) de 5800 daltones (D) aproximadamente (fig. 1).

Las cadenas constitutivas de la R de cerda al igual que las de insulina se denominan A y B. La cadena A de la R contiene 22 residuos de aminoácidos (2500 D), mientras que la cadena B contiene 30 residuos (2820 D). La R demostró ser similar a la insulina con respecto a la distribución de sus enlaces disulfuro, es interesante hacer notar que existe la misma distribución relativa de los residuos de cisteína en las dos cadenas, aún cuando no existe homología en otras posiciones (12,13). La identidad en el patrón del cruce de eslabones de R e insulina podría sugerir la duplicación de un gen ancestral que permitió la evolución de dos hormonas con diferentes funciones (4-6).

2.- LOCALIZACION.

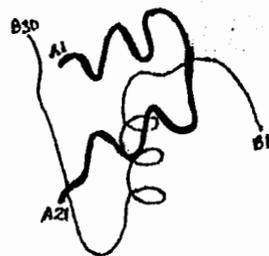
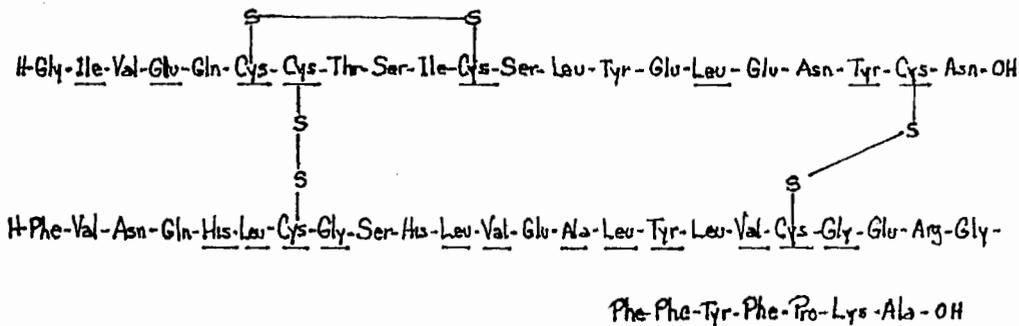
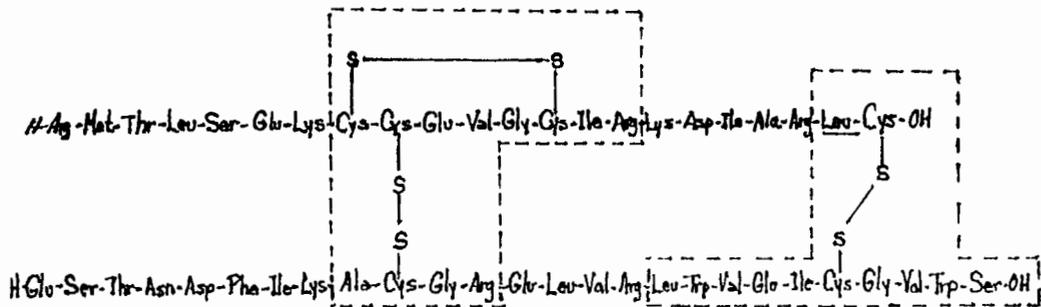
Estudios histológicos y bioensayos indican que -- los CL's de rata y cerda son los que producen grandes cantidades de R durante la gestación, encontrándose tam

FIGURA 1

SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LAS CADENAS A Y B DE RELAXINA E INSULINA.

La estructura primaria de relaxina porcina (arriba) e -
insulina (abajo) con sus residuos de cisteína alineados.
En la estructura de insulina, los residuos subrayados -
son aquellos homologos o sustituidos en relación a las
cadenas respectivas de relaxina.

FIGURA 1



bién que durante la gestación tardía los ovarios de rata contienen altos niveles de R biológicamente activa, mientras que otros tejidos reproductivos no la contienen, entre los que se incluye placenta, útero y glándulas metriales (1,14,15). Los estudios con radioinmunoensayo (RIA) efectuados en rata (16) muestran la presencia de R desde el día 10 de gestación, los niveles se incrementan marcadamente en los siguientes 4 días con rangos entre 50-100 ng/ml del día 14 al 20. En el día 21, es decir, en el pre-parto aparecen niveles de R más elevados (aproximadamente 140 ng/ml de suero), los cuales al parecer están asociados con el fotoperiodo (17). También se detectó R durante el parto y los niveles máximos son de 180 ng/ml de suero.

Los niveles de inmunoadividad de R han sido medidos en ovarios de ratas durante varios estados reproductivos mediante RIA (16). Se encontraron niveles de R extremadamente bajos en los ovarios de ratas inmaduras -- que aun no ciclan (aprox. 2 pg/mg equivalente a tejido fresco (etf)). Durante el ciclo estral de las ratas adultas la concentración de R es baja pero varía con las etapas del mismo. Los niveles máximos se encuentran en la etapa de estro (aprox. 20 pg/mg etf) (18).

3.-FUNCION.

A nivel fisiológico la R es producida en altos ni-

veles por el CL de los ovarios en etapas tardías de la gestación en mamíferos (1,4-6,18-22), y en algunas especies como ya se ha mencionado, en tejidos reproductivos adicionales (1). Los órganos blanco en donde actúa esta hormona son el útero, cervix uterino, vagina, así como uniones púbicas y sacroiliacas (5).

Estudios experimentales han establecido varias funciones de la R en la reproducción de mamíferos. La R actúa en combinación con estrógenos sobre los órganos que intervienen en la reproducción. Sus funciones incluyen dilatación y relajación del cervix, efectos sobre la motilidad del útero, sobre el crecimiento de glándulas mamarias, en la relajación de sínfisis púbica y otras uniones pélvicas (2,4,5) y específicamente, durante el parto de la R es importante para: 1) prevenir una excesiva actividad miometral (21-25), 2) incrementar la respuesta miometral a oxytocina (21,22,26,27), 3) aumentar la dilatación cervical (2,4,5,21-23,25), 4) en combinación con estrógenos asegura un alto índice de supervivencia fetal y acorta la duración de alumbramiento (21,22,28), 5) y en combinación con estrógenos y progesterona induce el desarrollo de glándulas mamarias (21).

En algunas especies como el conejo y la oveja, parece ser que la progesterona es la responsable de inhibir la actividad contráctil uterina en la mayor parte de la gestación. Sin embargo la R también puede ser im-

portante en estas especies, así como en otras durante - el periodo de declinación de la progesterona e incremento de estrógenos en el útero cerca del término de la -- gestación para prevenir una evolución prematura de la actividad del parto. No obstante lo anterior, en cobayo y rata, la progesterona parece no tener efecto sobre la reducción de la actividad miometral. Por otra parte, la administración de R inhibe la actividad miometral en ratas no gestantes "in vivo" e "in vitro", estas y otras evidencias indican que la R puede ser importante para restringir la actividad contráctil uterina en la rata (22,24,25).

4.-DESARROLLO.

Existen diferencias entre la rata y la cerda con respecto a la regulación de la biosíntesis y secreción de la R a través de la gestación. En la rata los niveles de R que se incrementan en los ovarios durante la segunda mitad de la gestación son paralelos a los niveles de R en sangre. En la cerda los niveles de R se incrementan en los ovarios durante las últimas tres cuartas partes de la gestación pero no se elevan más allá de 10 ng/ml en la sangre hasta aproximadamente la etapa prenatal. Los factores responsables de estas diferencias en estas dos especies son aun desconocidos (1). Estudios recientes demuestran que la pituitaria tiene un efecto

supresivo sobre la secreción de R y por lo tanto en su biosíntesis, así como en secreción de progesterona y -- crecimiento de CL en ratas gstantes, Por otra parte durante la segunda mitad de gestación la placenta juega -- un papel importante en promover la síntesis y secreción de R, así como del crecimiento del CL y secreción de -- progesterona (29-30).

5.- PURIFICACION.

La primera R que se aisló con un alto grado de pureza es la del CL de cerdas gestantes, logrando tres -- preparaciones altamente purificadas las cuales fueron -- designadas como CM-B, CM-a y CM-a', de las cuales se ob -- tuvieron resultados sobre su actividad biológica, PM, -- punto isoeléctrico y contenido de aminoácidos (3,6,13), haciendo de esta especie el primer RIA a partir de los niveles de R en plasma durante la gestación y parto en la cerda (31).

La R se ha extraído además de ovarios de cerdas -- gestantes (3,32), de ratas (7,32), tiburones (8,90, va -- cas (33) y humanos (34); de la placenta de la yegua (11, 35), conejo (4,10) y humana (36,37). Sin embargo, solo la R de ovarios de cerda (3), rata (7), tiburón (8), -- placenta de conejo (10) y de equino (11) han sido total -- mente purificadas y caracterizadas. Actualmente solo se han hecho RIA's de rata (16) y de equino (38).

Con respecto a la R de rata, se han obtenido dos - formas altamente purificadas, designadas CM1 y CM2, las cuales según Sherwood (7) son diferentes en cuanto a la movilidad electroforética y a sus puntos isoeléctricos. La composición de aminoácidos de ambas son similares pero no idénticos. Bioensayos con sífisis pública demostraron que no hay diferencias en cuanto a potencia biológica entre ellas.

El rendimiento o producción de la R de rata es similar al de R porcina en relación a mg/g etf de ovario. Utilizando el método de Sherwood y Col. para la obtención y purificación de R porcina, el promedio total de rendimiento de esta para las tres preparaciones fue de 0.24 mg/g etf de ovario, y el promedio total de rendimiento de la R de rata fue de 0.28 mg/g etf de ovario.

Las dos preparaciones de R de rata CM1 y CM2 contienen 58 y 57 residuos de aminoácidos respectivamente. Sus PM's. calculados en base a la composición de sus aminoácidos son 6370 y 6180 D para cada una de ellas (7).

El PM (6000 D aprox.) y el contenido de aminoácidos de la R en las diferentes especies estudiadas es similar pero no idéntico (3,4,7-11). Si comparamos los -- dos tipos de R más estudiados (porcina y rata) encontramos que las únicas diferencias en el contenido de aminoácidos son :

1) La presencia de histidina, prolina y tirosina en la

R de rata y la total ausencia de estos aminoácidos en R porcina.

2) El alto contenido de ácido glutámico más glutamina - en la R de rata.

Los puntos isoeléctricos de CM1 (pH 7.6) y CM2 (pH 9.4) son menores que los de las tres R's porcinas, CMB (pH - 10.55), CMa (pH 10.72) y CMa' (pH 10.77) respectivamente (3,7).

Como se puede observar existe polimorfismo en la R y puede ser atribuido a diferencias genéticas en la secuencia de aminoácidos del Carbono o Nitrógeno terminal (7), o bien este polimorfismo es generado por los procesos de separación convencionales, por proteólisis, por una enzima tipo carboxipeptidasa u otras enzimas (32).

Existen así mismo, diferencias en cuanto a la actividad de la hormona en diferentes especies, y aunque se han postulado diferentes causas a estas diferencias no hay un consenso sobre la verdadera causa (7).

Como método optativo de purificación se encuentra el método de purificación de octadecylsilica (ODS), el cual se basa en un sistema de adsorción por columnas de ODS para reducir drásticamente el grado de heterogeneidad de la R, disminuyendo la proteólisis durante el proceso de separación de la hormona. Este método indica -- que solo existe una forma principal de R y que las otras moléculas variantes son artefactos de los procesos de -

TABLA I. METODOS UTILIZADOS PARA PURIFICAR
RELAXINA DE DIFERENTES ESPECIES

REFERENCIA	ESPECIE	TIPO DE EXTRACCION	CROMATOGRAFIA	BIOENSAYO
SHERWOOD, O. D. AND O'BYRNE, E. M. 1974 (3)	OVARIO DE CERDA	ACETONA ACIDA	SEPHADEX G-50 CMC	LIGAMENTO INTERPUBICO DE RATON
SHERWOOD, O. D. 1979 (7)	OVARIO DE RATA	AMORTIGUADOR	SEPHADEX G-50 CMC	LIGAMENTO INTERPUBICO DE RATON
WALSH, J. R. AND NIALL, H. D. 1980 (32)	OVARIOS DE CERDA Y RATA	_____	ODS SEPHADEX G-50 CMC	_____
YAMAMOTO, S. 1981 (35)	PLACENTA HUMANA	ACETONA ACIDA INHIBIDORES DE PROTEASAS	SEPHADEX G-50 CMC	ADMINISTRACION DE ESTROGENOS UTERO DE RATON "IN VITRO"
REINING, J. W. LAMBERT, N. D. SCHWABE, C. 1981 (8)	OVARIOS DE TIBURON - TIGRE	ACETONA ACIDA	SEPHADEX G-50 SEPHADEX G-25 CMC Y HPLC	LIGAMENTO INTERPUBICO DE RATON Y COBAYO
FIELDS, M. J. ROBERT, R. AND FIELDS, P. A. 1982 (33)	OVARIOS DE VACA Y CERDA	_____	ODS SEPHADEX G-50 CMC	UTERO DE RATON
ELDRIDGE, R. K. AND FIELDS, P. A. 1985 (12)	PLACENTA DE CONEJO	ACETONA ACIDA INHIBIDORES DE PROTEASAS	SEPHADEX G-50 CMC SEPHAROSA CL- 4B	UTERO DE RATON "IN VITRO" CON ESTROGENOS
BULLESBACH, E. GOWAN, L. K. SHWABE, C. 1986 (7)	OVARIOS DE CAZON	METODO DE DOCZI. ACETONA ACIDA	CMC SEPHADEX G-25 SEPHADEX G-50	LIGAMENTO INTERPUBICO DE RATON Y COBAYO
STEWART, D. R. AND PAPKOFF, H. 1986 (11)	PLACENTA DE YEGUA	ACETONA ACIDA INHIBIDORES DE PROTEASAS	CMC SEPHADEX G-50 PRECIPITACION CON TCA CMC	LIGAMENTO INTERPUBICO DE RATON

separación empleados anteriormente (32).

La tabla I muestra en resumen los métodos utilizados para purificar R de diferentes especies.

JUSTIFICACION

No obstante de que la R se encuentra en varios mamíferos, los extractos de esta hormona se han preparado generalmente de ovarios de cerda gestante, los cuales tienen una elevada actividad de R y se encuentran ocasionalmente en otros países en forma comercial ya sea congelados o deshidratados en acetona. En 1955, a partir de un homogenado de ovarios de cerdas gestantes se extrajo "relaxina pura", a esta preparación se le consideró como una "referencia estandar casera" (house reference standard) con la cual se realizaron los primeros estudios químicos y biológicos con el establecimiento de bioensayos para la determinación de algunos de los mecanismos de acción de esta hormona (2).

A pesar del tiempo que ha transcurrido desde el descubrimiento de la R, ésta ha sido purificada solo en un pequeño número de especies como se mencionó anteriormente, debido principalmente a que el costo de obtención de esta hormona es elevado, ya que existe en muy baja concentración en el organismo, por lo que es neces-

sario contar con un alto número de órganos ricos en R - (ovarios) que permitan la obtención de una cantidad significativa de esta hormona. Por otra parte, la falta de un estandar de referencia comercial dificulta el avance en el estudio de esta hormona. Aunado a ésto, a través del proceso de obtención propuesto por Sherwood (3,7) - se corre el riesgo de que la R activa se pierda debido a una proteólisis, ya que en este método se utiliza filtración en gel (Sephadex G-50) y cromatografía de intercambio iónico (CII) sobre carboxymetil-celulosa (CMC). Y el método de Walsh y Niall basado en columnas de ODS que reduce la proteólisis durante la separación de R -- porcina y de rata (32), es mucho más costoso que el anteriormente mencionado.

Dada la importancia de esta hormona en reproduc---ción de mamíferos es necesario contar con un método de obtención práctico y reproducible en nuestro medio, que nos permita llevar a cabo futuros proyectos de investigación sobre biología de la reproducción, con objeto de estudiar la posibilidad de solucionar los problemas perinatales que se presentan entre las poblaciones de mayor riesgo como son las que se encuentran sometidas a - desnutrición.

OBJETIVO

Establecer las condiciones metodológicas con nuestra infraestructura en base a métodos previamente descritos para obtener y purificar relaxina de rata.

MATERIAL Y METODOS

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 70 ratas hembras de la cepa Wistar de 2.5 meses de edad y 18 machos de la misma cepa de 6 meses de edad para el apareamiento, el cual se hizo a razón de 4 hembras por macho. Desde el primer día de apareamiento se inició la toma de citologías vaginales seguidas de una tinción -- por medio de la técnica de Papanicolaou. El primer día de gestación se determinó por la aparición de espermatozoides en la citología vaginal.

1.- EXTRACCION DE OVARIOS.

Para proceder a la extracción de ovarios las hembras se sacrificaron con eter a los 20 días de gestación. Los ovarios se trabajaron de acuerdo al método de Sherwood y Col. para la obtención de R de (7). Inmediatamente después de la extracción se pesaron y colocaron en un amortiguador de pH 7.0 formado por cloruro de sodio 0.14 M y fosfato monobásico de sodio 0.01 M a razón de 100 mg de tejido/ ml de amortiguador. Los ovarios se guardaron congelados en hielo seco hasta completar 2.5 g de tejido de ovario. éstos se homogenizaron completamente en el mismo amortiguador a aproximadamente 4°C. El tejido homogenado se sometió a agitación suave durante 24 horas a 4°C. Después de la agitación el tejido se centrifugó a 40,000 rpm por 1 hora a aprox. 4°C en una

ultracentrífuga BECKMAN L5-40, con un rotor 60 T. El sobrenadante se separó del tejido residual, para trabajar se bajo condiciones de diálisis contra cloruro de sodio 0.025% a 4°C por 48 horas. La concentración de proteína se midió por el método de Lowry (39) antes de proceder a pasarlo por columnas de Sephadex G-50.

2.- FILTRACION EN GEL.

Se montó una columna de 2 x 90 cm para filtración en gel con Sephadex G-50 (fino). La columna se equilibró y corrió con un amortiguador de pH 5.0 y 0.01M formado por acetato de amonio y ácido acético. Se diseñó un depósito en la parte superior de la columna para que se mantuviera con flujo las 24 horas del día. Se reguló un flujo de aproximadamente 8 ml/h para la colecta de fracciones de acuerdo al método descrito por Sherwood (7). Se revizó la homogeneidad del empaque de la columna y el volumen vacío con azul dextrán, el cual se registró a las 48 horas. Posteriormente se colocó en la columna insulina bovina (1.0 ml=80 U) de acción lenta para conocer el tiempo de salida de la misma, ya que su PM es similar al de la R. Después de las 48 horas se inició la colecta cada 30 minutos durante 12 horas con un flujo de 8ml/h a 4°C; al término de este periodo se determinó el contenido de proteínas en las fracciones colectadas con el uso de un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC).

El extracto de R (15.0 mg de proteína) se sometió a filtración en gel en las mismas condiciones que la -- filtración anterior.

3.- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Se montó una columna de 1 x 8 cm para CII con --- Dowex AG 50-W-X8 de 200 a 400 mesh. Para activar la columna se corrió ácido clorhídrico 2N (30 ml), posteriormente se lavó con agua desionizada hasta eliminar el -- cloro, haciéndose pruebas con nitrato de plata para comprobar la total eliminación del mismo. Una vez eliminado éste, la columna se equilibró y corrió con un amortiguador de pH 5.0 y 0.01M formado por acetato de amonio y ácido acético. Se reguló un flujo de aproximadamente 6 ml/h para la colecta de fracciones. Se revizó el volumen vacío con azul dextrán.

Antes de someter a CII las fracciones de sephadex que indicaban la presencia de una proteína de PM similar al de R, se colocó en la columna insulina bovina -- (1 ml=80 U) de acción lenta para conocer el tiempo de salida de la misma, por su similitud con la molécula de R.

Una vez recuperada la insulina, las fracciones de sephadex G-50 que indicaban la supuesta presencia de R se pasaron por CII (157.5 µg de proteína). La columna -- se corrió con el amortiguador antes mencionado (pH 5.0) hasta que las proteínas no adsorvidas se eluyeron. Para

remover las proteínas adsorvidas se provocó un cambio en la carga de la columna con el amortiguador de equilibrio más cloruro de sodio 15mM (10 ml). Después de 1.5 horas se inicio la colecta de fracciones cada 30 minutos durante 6 horas con un flujo de 6 ml/h a 4°C. Las fracciones colectadas se leyeron en un cromatógrafo de líquidos de alta presión a 280 nm para determinar el contenido de nitrógeno proteico en las diversas fracciones.

4.- BIOENSAYO.

Las pruebas biológicas para comprobar la obtención de R por cromatografía y determinar su actividad se llevaron a cabo en intestino y útero de ratas multiparas de la cepa Sprague-Dawley tanto "in vivo" como "in vitro".

En el primer caso, las ratas se separaron en dos grupos, los cuales se anestesiaron con eter para proceder a una laparotomia amplia en 3 planos en decúbito supino. Al primer grupo se le disecó una parte de intestino (ileon), mientras que al segundo grupo se le cortó uno de los cuernos uterinos y se conectaron al transductor del poligrafo GRASS. Se aplicó una fuerza de tensión de 0.4 g para calibrar el aparato y posteriormente se gotearon tanto sobre el útero como sobre el intestino 200 μ l (47.0 μ g de proteína) del extracto obtenido -

de la CII y se registró la respuesta del tejido.

En el segundo caso la rata se anestesió con pento-
barbital (50 mg/kg de peso), posteriormente se extraje-
ron intestino y útero y se mantuvieron a 37°C en una so-
lución de Hartman. Se tomaron aprox. 2.5 cm del tejido,
se fijaron en una cámara de órgano aislado de 20 ml y -
se conectaron al poligrafo, el cual fue calibrado ante-
riormente. Después de observar la actividad contráctil
norlam del tejido se adicionaron a la cámara 200 µl ---
(47.0 µg de proteína) de las fracciones que indicaban -
la presencia de R. Entre fracción y fracción se hizo un
lavado con la solución de Ringer Krebs y se tomó en ---
cuenta el tiempo de recuperación del tejido para proce-
der a una nueva aplicación.

Para asegurar que la actividad biológica demostra-
da durante el bioensayo por los extractos de R prove---
nían de esta hormona y no de otra que tuviera un PM si-
milar, por ejemplo insulina, se hizo una prueba con és-
ta última sobre intestino de rata "in vitro" siguiendo
la técnica del bioensayo anterior.

Para determinar los índices de medición en el re--
gistro electrofisiológico se tomó en consideración:

(a) la altura del pico el cual nos indica la fuerza de
contracción; (b) la distancia entre pico y pico que nos
señala la frecuencia con que se presentan las contrac--
ciones; (c) lo ancho de la base del pico lo que nos da

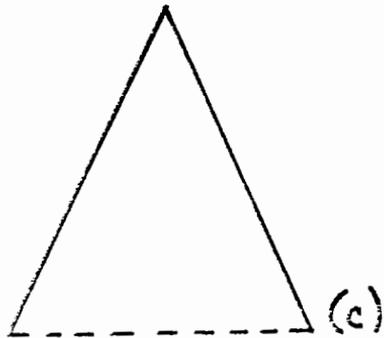
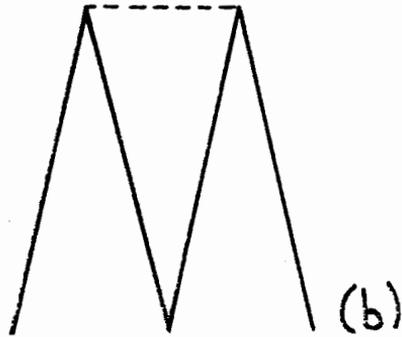
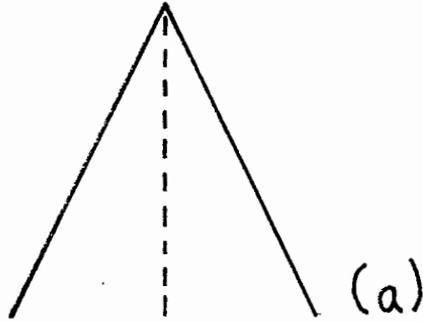
el tono muscular. Considerando como 100% los registros
basales (fig. 2).

FIGURA 2

INDICES DE MEDICION DEL REGISTRO ELECTROFISIOLOGICO.

- (a) Indica la fuerza de contracción
- (b) Frecuencia de contracciones.
- (c) Tono muscular.

FIGURA 2



RESULTADOS

1.- EXTRACCION DE OVARIOS.

El peso promedio del ovario fue de 0.085 ± 0.016 gr. -- Esta diferencia entre ellos se debe principalmente al peso de la rata, ya que en la mayoría de los casos, una rata de mayor peso presentaba ovarios más grandes que una de menor peso, encontrándose también alrededor del ovario una mayor cantidad de grasa, la cual no podía eliminarse totalmente, ya que en ocasiones se presentaba envolviendo al CL o muy cercana a él, lo cual impedía para no llevarse parte del mismo. Por lo tanto para reunir 2.5 g de tejido se necesitó un promedio de 15 ratas. Se recolectaron 4 grupos de ovarios los cuales después del proceso de dializado se sometieron a cuantificación de proteínas por el método ya mencionado. La tabla II presenta la concentración de proteínas de los diferentes dializados. Como se puede observar hay una diferencia en la concentración de los mismos. Esto se atribuye al peso de los ovarios, principalmente a su contenido de grasa, demostrando así de que el hecho de que un ovario tenga un mayor peso no significa que tiene una mayor cantidad de proteína.

2.- FILTRACION EN GEL.

En este trabajo se utilizó la insulina como un control cromatográfico externo, así ésta corrió a través de la columna de Sephadex G-50 en un tiempo aproximada-

DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

TABLA II. CONCENTRACION DE PROTEINAS
DE LOS DIFERENTES DIALIZADOS.

DIALIZADO	DENSIDAD OPTICA 280 nm	PROTEINAS $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$
1	0.395	49.70
2	0.059	11.187
3	0.0765	17.485
4	0.1495	39.646

mente de 57 horas, encontrándose el pico máximo entre los tubos 17-19, con una absorbancia de 0.07-0.08 a una densidad óptica de 280 nm (fig. 3a).

Con cada dializado se hizo una corrida en la columna de Sephadex G-50 ajustando la carga de proteínas a 15.0 mg.

El extracto de R presentó un pico máximo promedio en los tubos 12 y 13 entre las 54 y 55 horas con una absorbancia de 0.060 (fig.3b).

3.- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

La insulina presentó un pico máximo alrededor de las 4 horas entre los tubos 5 y 6 con una absorbancia de 1.4 - 1.6 a una densidad óptica de 280 nm (fig. 4a), mientras que las fracciones colectadas de la columna de Sephadex que presentaron mayor contenido proteico, al ser pasadas por CII presentaron un pico máximo promedio a las 3.5 horas en el tubo 5 con una absorbancia de 1.48 (fig. 4b).

La tabla III presenta el promedio de recuperación de proteínas en las preparaciones de R obtenidas durante el proceso de separación, desde el homogenado del tejido hasta el dializado, se recuperó un promedio de 6.712 ± 2.0 mg de proteína/ g de tejido fresco. En el proceso de filtración en gel se recuperó 1.514 ± 0.013 mg de proteína/g de tejido fresco y en CII 0.028 ± 0.01 mg de proteína/g de tejido fresco. La recuperación to--

FIGURA 3

CONTENIDO DE NITROGENO PROTEICO EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE SEPHADEX G-50.

- 3a. Filtración en gel de insulina bovina (1 ml) de acción lenta. El pico máximo se encuentra entre los tubos 17-19 con un tiempo de 57 horas.
- 3b. Filtración en gel del extracto de relaxina de rata (15.0 mg). Presenta un pico máximo en los tubos 12 y 13 entre las 54 y 55 horas.

FIGURA 3b

EXTRACTO DE RELAXINA
(SEPHADEX G-50)

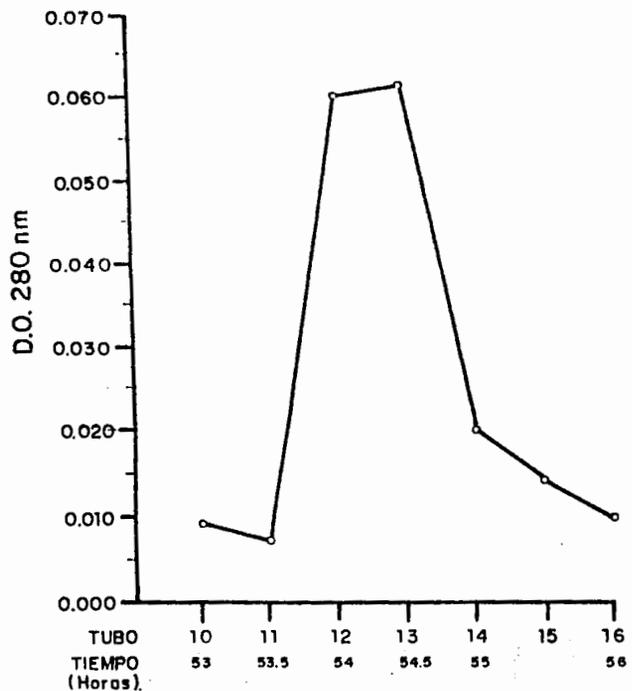


FIGURA 3a

INSULINA (SEPHADEX G-50)

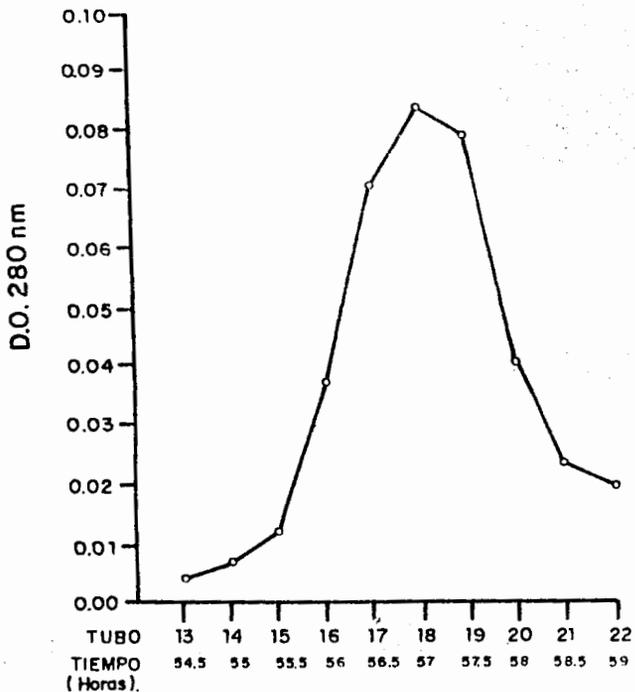


FIGURA 4

CONTENIDO DE NITROGENO PROTEICO EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

4a. Cromatografía de intercambio iónico de insulina bovina (1 ml) de acción lenta. El pico máximo se encuentra en los tubos 5 y 6 alrededor de las 4 horas.

4b. Cromatografía de intercambio iónico de las fracciones obtenidas de Sephadex G-50 (157.5 µg de extracto de relaxina). Presenta un pico máximo a las 3.5 horas en el tubo 5.

FIGURA 4a
INSULINA
(DOWEX)

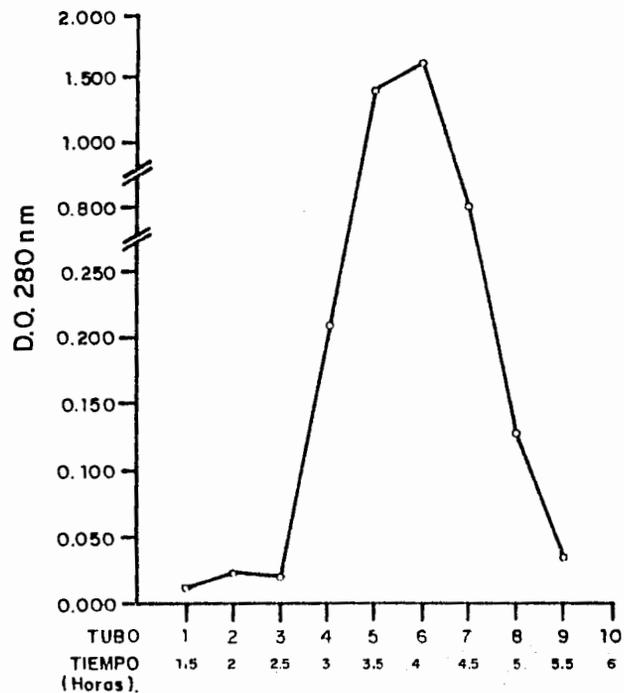


FIGURA 4b
EXTRACTO DE RELAXINA
(DOWEX)

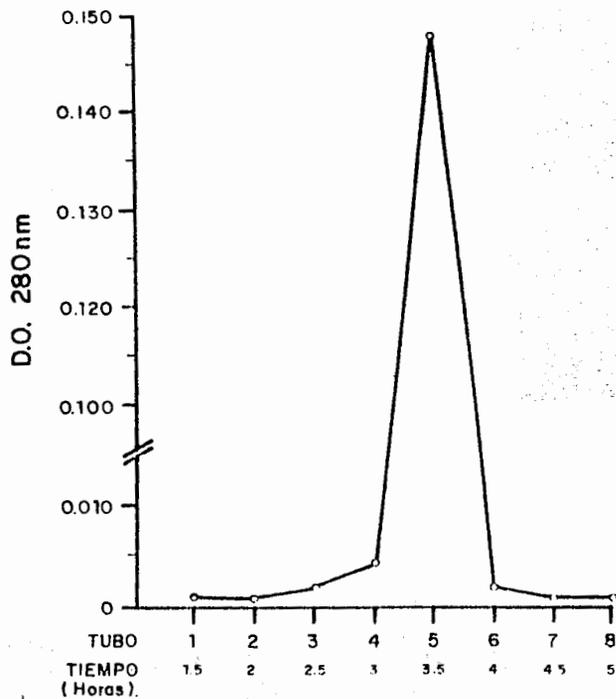


TABLA III. RECUPERACION DE PROTEINAS DURANTE EL PROCESO.

FRACCION	PROTEINA MG/G TEJIDO FRESCO	% DE RECUPERACION
DIALIZADO	6.712 ± 2.0	100
SEPHADEX G-50	1.514 ± 0.03	22.56
DOWEX W-50	0.028 ± 0.01	0.41

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

tal fue de 0.041%.

4.- BIOENSAYO.

Las figuras 5a y 5b muestran la respuesta biológica en útero de rata "in vivo" e "in vitro" al contacto del extracto de R obtenido de la CII.

Fig. 5a: Al adicionar 200 µl de las fracciones equivalentes a 47.0 µg de proteína sobre útero "in vivo" se presentó una disminución del 60% en la fuerza de contracción, 13% en el tono muscular y aumentó 44% la frecuencia de presentación de las contracciones.

Fig. 5b: En el caso de útero "in vitro" se presentó un fenómeno similar. Disminuyó en un 63% la fuerza de contracción, un 21% el tono muscular y 43% la frecuencia de presentación de las contracciones.

Las figuras 6a y 6b muestra la respuesta biológica en intestino tanto "in vivo" como "in vitro" al contacto con 200 µl (47.0 µg de proteína) del extracto de R obtenido de la CII.

Fig. 6a: "in vivo" se presentó una disminución, tanto en el tono muscular como en la fuerza de contracción. La caída del tono muscular fue del 50%, mientras que de la fuerza de contracción fue de un 100% y mostró una evidente disminución en la frecuencia de presentación de las contracciones de un 50%.

Fig. 6b: "In vitro" el fenómeno es muy similar al anterior en cuanto a la disminución de la fuerza de contrac

BIENESTAR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

FIGURA 5a

REGISTRO ELECTROFISIOLOGICO DE LA RESPUESTA BIOLOGICA
EN UTERO DE RATA "IN VIVO" AL CONTACTO DEL EXTRACTO DE
RELAXINA (200 μ l) OBTENIDOS DE LA CII.

INSTITUTO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

FIG. 5a. ACTIVIDAD DE EXTRACTO DE RELAXINA SOBRE UTERO IN VIVO

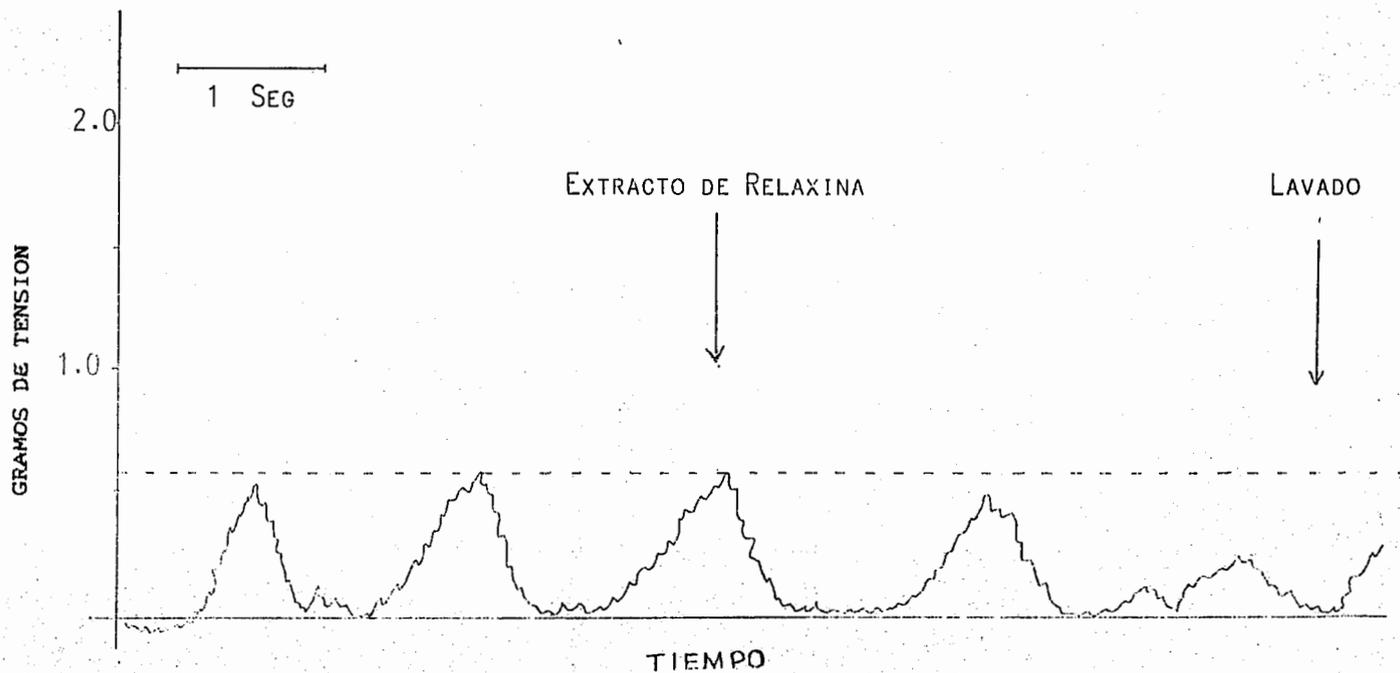


FIGURA 5b

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA -
EN ÚTERO DE RATA "IN VITRO" AL CONTACTO DEL EXTRACTO DE
RELAXINA (200 μ l) OBTENIDOS DE LA CII.

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

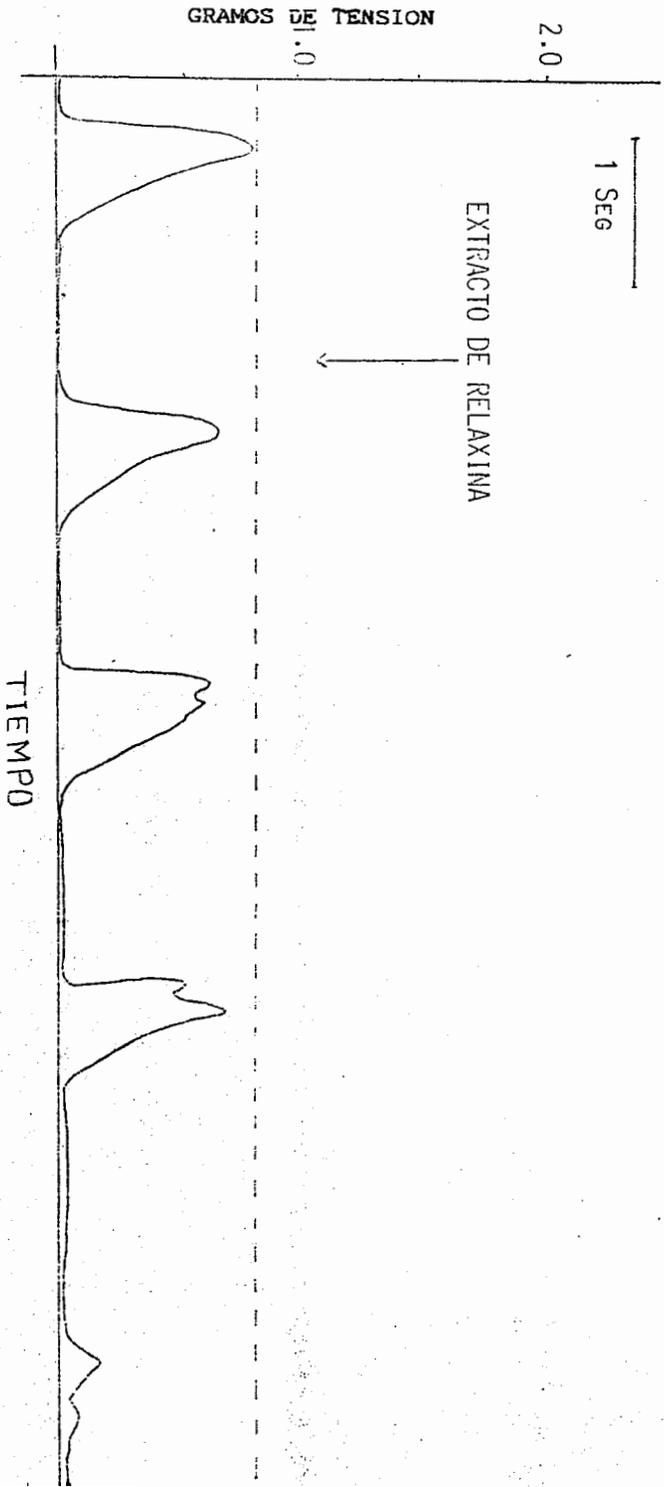


FIG. 5b. ACTIVIDAD DE EXTRACTO DE RELAXINA SOBRE UTERO IN VITRO

... SEPT ANTONIO A I JU ...

FIGURA 6a

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA
EN INTESTINO DE RATA "IN VIVO" AL CONTACTO DEL EXTRACTO
DE RELAXINA (200 μ l) OBTENIDOS DE LA CII.

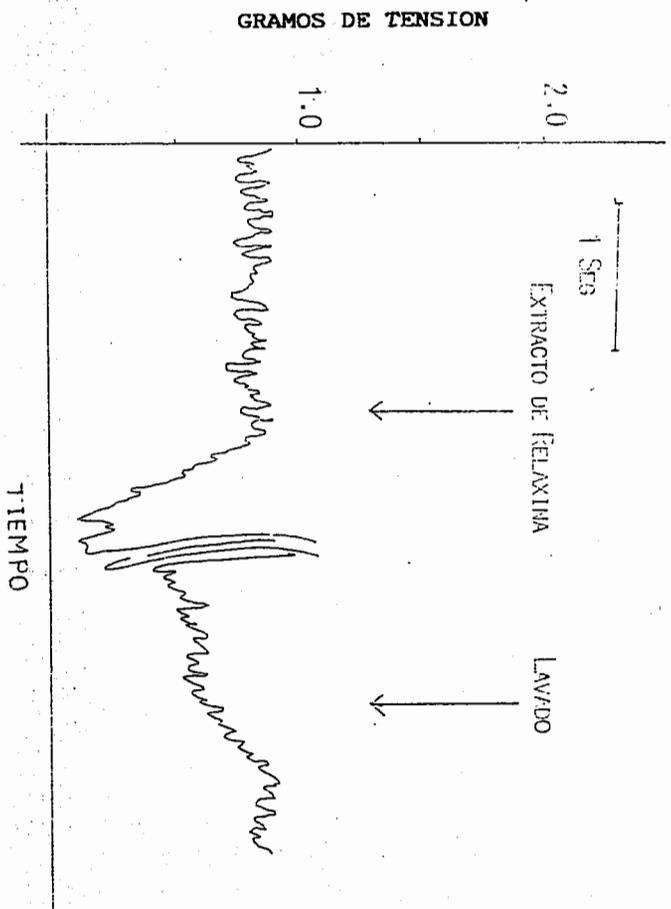


FIG. 6 a. ACTIVIDAD DE EXTRACTO DE RELAXINA SOBRE INTESTINO IN VIVO

FIGURA 6b

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA
EN INTESTINO DE RATA "IN VITRO" AL CONTACTO DEL EXTRAC-
TO DE RELAXINA (200 μ l) OBTENIDOS DE LA CII.

SECRETARÍA DE LA FACULTAD DE...

ción en un 100% y la frecuencia de presentación de las contracciones en un 50%. El tono muscular no presentó - ningún cambio aparente.

La figura 7 muestra la respuesta biológica en intestino "in vitro" al contacto con insulina (200 μ l). Como se puede observar no presenta ningún cambio aparente. Tanto la fuerza de contracción como la frecuencia de - presentación de las contracciones y el tono muscular se mantienen normales.

El fenómeno del registro biológico claramente puede dividirse en dos fases: la primera de aumento de --- fuerza de contracción sin cambio aparente del tono muscular, así como una elevación en la frecuencia, seguida por una segunda fase en la que se abate casi totalmente la actividad contráctil y disminuyen tono y frecuencia, al lavar se recupera la fuerza de contracción.

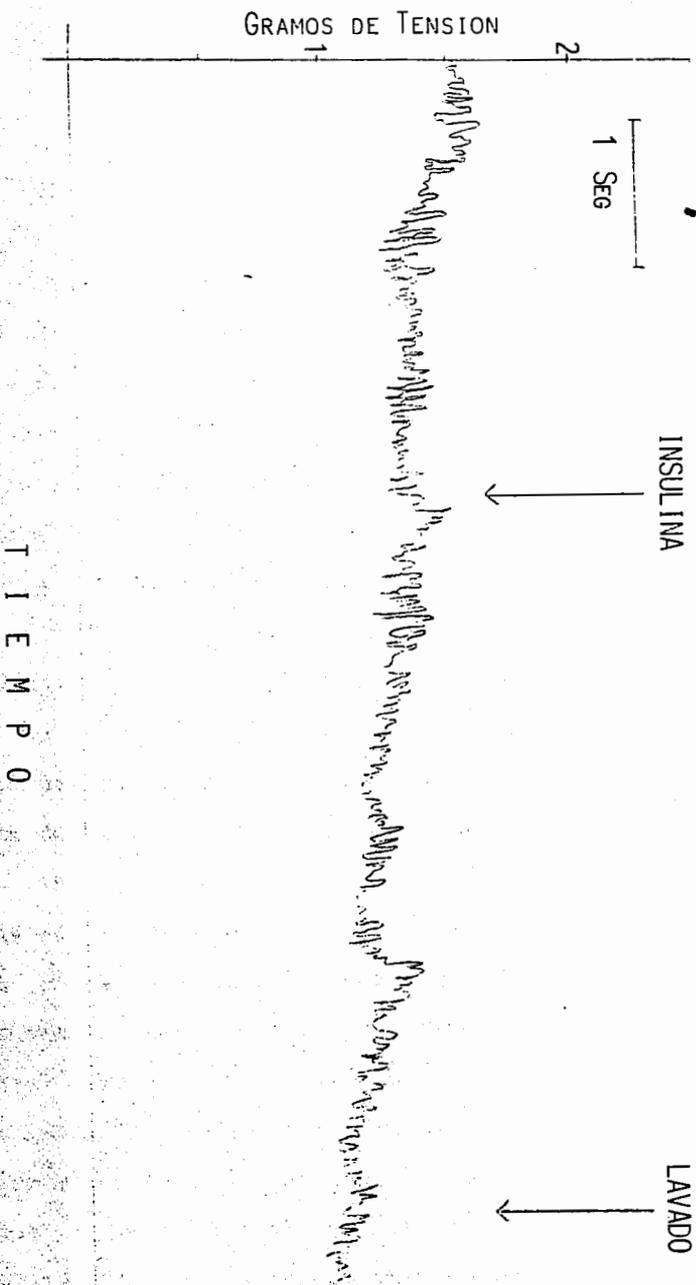
SECRETARÍA DE LA FAMILIA

FIGURA 7

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA -
EN INTESTINO DE RATA "IN VITRO" AL CONTACTO CON INSULI-
NA BOVINA DE ACCIÓN LENTA (200 μ l).

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA -

FIG. 7 ACTIVIDAD DE INSULINA SOBRE INTESTINO IN-VITRO



DISCUSION

La R ha sido purificada de diversas especies (3,4, 7-11,32-37) entre las que se encuentra el cerdo (3,32) y la rata (7,32). En estas últimas Sherwood y Col. han desarrollado métodos de extracción y purificación con el uso de filtración en gel (Sephadex G-50) y CII (CMC) (7), y han determinado que el PM de este péptido oscila entre 5950 a 6015 D aproximadamente.

Shwabe y Col. (5) corroboraron la similitud existente entre las moléculas de insulina y R y las catalogaron como dos hormonas provenientes de un gen ancestral común pero con actividades muy diferentes. A pesar de ello, no existen reportes en los cuales la insulina haya sido utilizada como molécula de referencia para la obtención de R, por esta razón, en nuestro trabajo se empleó la insulina como una molécula control en el desarrollo de la metodología empleada para la extracción y purificación de R de rata, ya que la similitud entre ambas moléculas las llevaría a comportarse de manera similar en el corrimiento a través de las columnas de Sephadex e intercambio iónico empleadas. Estos hechos pudieron ser corroborados con nuestros resultados al observar que la insulina pudo ser detectada en las fracciones 17-19 y 5 y 6 en las columnas de Sephadex e intercambio iónico respectivamente, mientras que la molé-

SECRETARIA DE LA FACULTAD

cula en cuestión fue detectada en las fracciones 12 y 13 y 5 en ambas columnas respectivamente debido probablemente a que la R es ligeramente más pesada que la insulina (6000 y 5800 D respectivamente).

Al observar la figura 3b que muestra la gráfica -- del extracto de R por sephadex G-50 encontramos que la elevación del pico empieza a aparecer después de las -- 53.5 horas cayendo a las 55 horas mostrando una base -- muy amplia debido probablemente a la presencia de otras proteínas de similar PM o a precursores de R como lo -- menciona Sherwood (7).

Al inicio del trabajo experimental, primeramente -- encontramos gran variabilidad en el peso de los ovarios, lo que probablemente ocasionó diferencias en las concentraciones de proteínas de cada uno de los dializados, -- hecho que nos llevó a la utilización de porciones de -- dializado que aportaran una carga proteica igual en cada corrimiento en la columna de Sephadex que fue de aproximadamente 15.0 mg de proteína, a pesar de que ---- Sherwood y Col. han recomendado una carga de 70.0 mg de proteína para la columna de Sephadex. Nuestros resultados muestran que a pesar de esta modificación fue posible obtener de esa columna fracciones con un contenido proteico suficiente para el paso a través de la columna de Dowex W-50 en sustitución a la CMC sugerida por ---- Sherwood (7).

Durante el trabajo experimental la R mostró ser una molécula estable, ya que se sometió a cambios diferentes de temperatura y no fue inactivada.

El porcentaje de rendimiento de acuerdo a la recuperación de proteínas durante el proceso es similar al reportado por Sherwood y Col. (7) quienes reportaron un rendimiento de 0.049%, mientras que nuestros resultados muestran un 0.041%, sin embargo, la carga neta de material que se trabajó en nuestro caso fue de aproximadamente cinco veces menor.

Otros autores no han reportado el porcentaje de recuperación de proteínas en cada etapa del proceso, lo que nosotros consideramos importante para conocer paso a paso el rendimiento o buen funcionamiento de nuestra metodología.

Para la evaluación de la actividad biológica de R se ha utilizado principalmente el ligamento interpúbico de ratón (3,7,9,11) p por sus características fisiológicas, sin embargo Fields y Col. (33) en 1982 utilizaron útero de ratón en sus estudios ya que es sobre este tipo de tejido donde se presenta principalmente la actividad relajante de la hormona. Tomando esto en consideración en este trabajo se utilizaron dos tipos de tejido: útero e intestino de rata, ya que éste último es muy sensible para responder a diversos estímulos.

Los resultados obtenidos nos muestran que la R pre

senta un efecto relajante sobre músculo liso por lo que se podría sugerir este tipo de tejido para las pruebas de actividades de la hormona.

Para asegurar que la fracción obtenida en CII que mostró actividad relajante no correspondía a una molécula como la insulina, se hizo una prueba de actividad biológica de ésta última sobre el tejido ya descrito, sin encontrar con ello ningún efecto relajante, lo que nos permite corroborar una vez más la obtención de R -- por medio de la metodología establecida y que a pesar de que ambas moléculas se comportaron de manera similar en el estudio cromatográfico corresponden a hormonas diferentes de acuerdo a su actividad.

CONCLUSIONES

- 1.- La recuperación de proteínas es similar a la obtenida por otros autores a pesar de haber utilizado Dowex AG50 W-X8 como resina de intercambio iónico.
- 2.- La utilización de tejidos como útero e intestino de rata para el bioensayo demostraron ser muy favorables para la respuesta biológica de relaxina.
- 3.- La metodología establecida en este estudio es práctica y reproducible en nuestro medio para la obtención y purificación de relaxina de rata, facilitando así la elaboración de futuros proyectos de investigación.

REFERENCIAS

- 1.- Sherwood, O.D., Crenekovic, V.E., Gordon, W.L., and Rutherford, J. (1980), Radioimmunoassay of relaxin throughout pregnancy and during parturition in the rat. *Endocrinology* 107: 691-697.
- 2.- Steinetz, B.G., Beach, V.L., and Kroc, R.L. (1962), Bioassay of relaxin, in Dorfman RI (ed) *Methods in Hormone Research*, vol. II. Academic Press, New York, 559-589.
- 3.- Sherwood, O.D., and O'Byrne, E.M. (1974), Purification and characterization of porcine relaxin, *Arch Biochem Biophys* 160:185-196.
- 4.- Fields, P.A., Larkin, L.H., and Pardo, R.J. (1982), Purification of relaxin from the placenta of rabbit. In: Steinetz, B.G., Schwabe, C., and Weiss, G. (eds) *Relaxin: Structure, Function and Evolution*, The New York Academy of Sciences, New York, 75-86.
- 5.- Schwabe, C. and McDonald, J.K. (1977), Relaxin: A disulfide homolog of insulin. *Science* 197:914-915.
- 6.- Kwok, S. and Bryant-Greenwood, G. (1977), Primary structure of porcine relaxin: homology with insulin and related growth factors. *Nature* 267:544-546.
- 7.- Sherwood, O.D. (1979), Purification and characterization of rat relaxin. *Endocrinology* 104:886-892.
- 8.- Reing, J.W., Daniel, L.N., Schwabe, C., Gowan, L.K., O'Byrne, E.M. (1981). Isolation and characterization of

- relaxin from the sand tiger shark (Odontaspis taurus).
Endocrinology 109:537-543.
- 9.- Bullesbach, E.E., Gowan, L.K., Schwabe, C., Steinetz, C
G., O'Byrne, E.M. (1986), isolation, purification and --
the sequence of relaxin from spiny dogfish (Squalus ---
acanthias). Eur. J. Biochem. 161:335-341.
- 10.- Eldridge, R.K., and Fields, P.A. (1985), Rabbit pla-
cental relaxin: purification and immunohistochemical lo-
calization. Endocrinology 117:2512-2519.
- 11.- Stewart, D.R. and Papkoff, H. (1986), Purification -
and characterization of equine relaxin. Endocrinology -
119:1093-1099.
- 12.- Schwabe, C. and Mc Donald, J.K. (1976), Primary ----
structure of A chain of porcine relaxin. Biochem Bio---
phys Res Commun 70:397-405.
- 13.- Schwabe, C. and Mc Donald, J.K. (1977), Primary ----
structure of the B chain of porcine relaxin. Biochem --
Biophys Res Commun 75:503-510.
- 14.- Golos, T.G., Weyhenmeyer, J.A. and Sherwood, O.D. ---
(1984), Immunocytochemical localization of relaxin in -
the ovaries of pregnant rats. Biol. Reprod. 30:257-261.
- 15.- Anderson, M.L. and Long, J.A. (1978), Localization -
of relaxin in the pregnant rat. Bioassay of tissue ex---
tracts and cell fraction studie. Biol. Reprod. 18:110-
117.
- 16.- Sherwood, O.D. and Crnekovic, V.E. (1979), Develop--

ment of homologous radioimmunoassay for rat relaxin. --
Endocrinology 104:893-897.

17.- Sherwood, O.D., Downing, D.J., Golos, T.G., Gorson, W.
L. and Tarbell, M.K. (1983), Influence of light-dark cy-
cle on antepartum serum relaxin and progesterone immuno-
activity levels and on birth in the rat. *Endocrinology*
113:997-1003.

18.- Sherwood, O.D. and Rutherford, J.E. (1981), Relaxin
immunoactivity levels in ovarian extracts obtained from
rats during various reproductive states and from cy----
cling pigs. *Endocrinology* 108:1171-1177.

19.- Mc Lennan, A.H., Green, R.C., Bryant-Greenwood, G.D.,
Greenwood, F.C., and Seamark, R.F. (1980), Ripening of --
human cervix and induction of labour with purified por-
cine relaxin. *The Lancet* 2:220-223.

20.- Schmidt, C.L., Sarosi, P., Steinetz, B.G., O'Byrne, E.M
Tyson, J.E., Horvaath, K., Sas, M., and Weiss, G. (1984), -
Relaxin in human decidua and term placenta. *Europ. J. -*
Obstet. Gynec. Reprod. Biol. 17:171-182.

21.- Downing, S.J. and Sherwood, O.D. (1985), The physio-
logical role of relaxin in the pregnant rat. I. The in-
fluence of relaxin on parturition. *Endocrinology* 116: -
1200-1204.

22.- Downing, S.J. and Sherwood, O.D. (1985), The physio-
logical role of relaxin in the pregnant rat. II. The in-
fluence of relaxin on uterine contractile activity. ---

Endocrinology 116:1206-1214.

23.- Keriles, L.P. and Anderson, L.L. (1979), Effect of relaxin on cervical dilatation, parturition and lactation in the pig. Biol. Reprod. 21:57-68.

24.- Cheach, S.H. and Sherwood, O.D. (1981), Effects of relaxin on in vivo uterine contractions in conscious and unrestrained estrogen-treated and steroid-untreated ovariectomized rats. Endocrinology 109:2076-2083.

25.- Downing, S.J., Bradshaw, J.M.C. and Porter, D.G. (1980), Relaxin improves the coordination of rat myometrial activity in vivo. Biol. Reprod. 23:899-903.

26.- Summerlee, A.J.S., O'Byrne, K.T., Paisley, A.C., Brezee, M.F. and Porter, D.G. (1984), Relaxin affects the central control of oxytocin release. Nature 309:372-374.

27.- Jones, S.A. and Summerlee, A.J.S. (1986), Relaxin acts centrally to inhibit oxytocin release during parturition: an effect that is reversed by naxalone. J. Endocr. 111:99-102.

28.- Jones, S.A. and Summerlee, A.J.S. (1986), Effects of porcine relaxin on the length of gestation and duration of parturition in the rat. J. Endocr. 109:85-88.

29.- Golos, T.G. and Sherwood, O.D. (1984), Evidence that the maternal pituitary suppresses the secretion of relaxin in the pregnant rat. Endocrinology 115:1004-1010.

30.- Golos, T.G. and Sherwood, O.D. (1986), The suppressive effect of the maternal pituitary on relaxin secretion -

during the second half of pregnancy in rats does not --
require the presence of the nonluteal ovarian tissue.

Biol. Reprod. 34:595-601.

31.- Sherwood, O.D., Chang, C.C., Bevier, G.W., and Dziuk,
P.J. (1975), Radioimmunoassay of plasma relaxin levels
throughout pregnancy and parturition in the pig. Endo--
crinology 97:834-837.

32.- Walsh, J.R. and Niall, H.D. (1980), Use of an octa-
decylsilica purification method minimizes proteolysis -
during isolation of porcine and rat relaxins. Endocrinology
107:1258-1260.

33.- Fields, M.J., Roberts, R., and Fields, P.A. (1982), -
Octadecylsilica and carboxymethyl cellulose isolation -
of bovine and porcine relaxin. In: Steinetz, B.G., -
Schwabe, C., and Weiss, G. (eds) Relaxin: structure, fun-
ction and evolution. The New York Academy of Sciences,
New York, 37-46.

34.- Weiss, G. (1976), Relaxin: A product of human cor--
pus luteum of pregnancy. Science 194:948-949.

35.- Stewart, D.R., and Stanbenfelt, G. (1981), Relaxin
activity in the pregnant mare. Biol. Reprod. 25:281-289

36.- Bigazzi, M., Nardi, E., Bruni, P., and Petrucci, F. -
(1980), Relaxin in human decidua. J. Clin. Endocr. and
Metab. 52:939-941.

37.- Yamamoto, S., Kwok, S.C.M., Greenwood, F.C., and ---
Bryant-Greenwood, G.D. (1981), Relaxin purification from

human placental basal plates. J. Clin. Endocr. and --
Metab. 52:601-604.

38.- Stewart, D.R. (1986), Development of a homologous -
equine relaxin radioimmunoassay. Endocrinology 119:1100
-1104.

39.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faar, H., and Randall,
R.J. (1951), Protein measurement with the folin phenol
reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

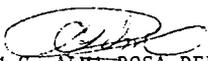
Guadalajara, Jal., Junio 9 de 1989.

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS
Director de la Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara.
P r e s e n t e.

Por medio de la presente comunico a usted que la pasante de Biología MARISELA PELAYO GONZALEZ, número de código 079513237 ha terminado satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado "OBTENCION Y PURIFICACION DE RELAXINA DE RATA", la cuál se desarrolló en el laboratorio de Nutrición de la División de Biología del Desarrollo en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del - I.M.S.S. bajo mi dirección y asesoría del M. en C. Carlos Beas Zárate.

Sin otro particular, reiterándole un cordial saludo quedo de usted

A t e n t a m e n t e.


M. EN C. ALMA ROSA DEL ANGEL MEZA
Laboratorio de Nutrición
División de Biología del Desarrollo
Unidad de Investigación Biomédica
de Occidente, I.M.S.S.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
Número 268/88

SRITA. MARISELA PELAYO GONZALEZ
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "OBTENCION Y PURIFICACION DE RE-
LAXINA DE RATA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptada como Directora de dicha Tesis la M.en C. Alma Rosa
del Angel Meza.

Al contestar este oficio cifrese fecha y número



A T E N T A M E N T E
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Marzo 7 de 1988

El Director

FACULTAD DE CIENCIAS

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

José Manuel Copeland
Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. La M.en C. Alma Rosa del Angel Meza, Directora de -
Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjds