
ANÁLISIS Y SEPARACIÓN CROMATOGRAFICA EN PAPEL FILTRO DE LOS COMPONENTES DEL HUMOR ACUOSO Y DEL PLASMA DESPROTEINIZADOS DE CONEJO, QUE DAN REACCIÓN COLORADA CON LA NINHIDRINA

RENE O. CRAVIOTO
B., GUILLERMO
MASSIEU H., JOSE
JOAQUIN IZQUIERDO

Departamento de Fisiología.
Facultad de Medicina de la Universidad
Nacional Autónoma.

Desde los trabajos de Duke-Elder (7) y de Krause y Yudkin (14) se sabe que el humor acuoso contiene aminoácidos libres, en concentración aproximadamente igual a la del plasma sanguíneo. Sin embargo, debido a la dificultad de obtener material suficiente para su análisis por los métodos químicos ordinarios, es explicable que los autores hayan obtenido únicamente cifras relativas a su cantidad total pero no acerca de cuáles son los ácidos que contribuyen a integrarla. A pesar de no haber tenido tales datos, Duke-Elder (7, 8, 9) consideró al humor acuoso un dializado del plasma sanguíneo, y por lo mismo, sería de esperarse que éste contuviese los mismos aminoácidos que aquél. Sin embargo, contradice dicha suposición: que el humor acuoso no contiene glutatión que existe en el plasma (11); la gran diferencia de concentración del ácido ascórbico en uno y otro líquido, y la presencia de ácido hialurónico en el humor acuoso, pero no en el plasma, lo que Robertson (17) interpreta en favor de la formación del humor acuoso por un proceso de secreción. Existen, además, los experimentos de Kinsey y Grant (13) que indican que el paso de los electrólitos del plasma al humor acuoso, no se hace de acuerdo con la hipótesis de filtración de Duke-Elder.

Estas consideraciones fueron las que nos condujeron a investigar cuáles podrían ser los aminoácidos y los péptidos libres, por una parte en el plasma, y por otra en el humor acuoso, seguros de que los resultados serán de gran importancia para el problema del origen del humor acuoso en condiciones normales, así como para otros muchos problemas de orden patológico.

Para el logro de nuestros propósitos, hemos usado las novísimas técnicas de separación cromatográfica en papel, de Consden y colaboradores (4) con modificaciones de diversos autores, las cuales, en contraste con su gran sencillez, permiten separar e identificar con gran delicadeza a multitud de sustancias, entre ellas las que aquí nos interesan.

PARTE EXPERIMENTAL

El método cromatográfico fue aplicado al estudio de extractos etanólicos de humor acuoso y de plasmas de conejo y humano, preparados en las formas *a* y *b* que se indican a continuación, y además al estudio de hidrolizados del extracto de humor acuoso *c*.

a) Después de sacrificar rápidamente a 5 conejos normales, por golpe en la nuca, evitando así el empleo de anestésicos cuyos posibles inconvenientes son obvios, se obtuvo el humor acuoso de sus 10 ojos (2 a 3 ml) y se le privó de pórpidos y lípidos siguiendo indistintamente uno de estos dos métodos: 1, el de Awapara (1) [tratamiento sucesivo con etanol al 80% y cloroformo, para obtener lo que llamaremos en este trabajo *extractos I*], y 2, el de Verdier y Agren (18) [adición de etanol hasta un 80% y tratamiento del extracto resultante evaporado, con éter etílico, para obtener lo que llamaremos *extractos II*].

b) Siguiendo el mismo método de Verdier y Agren se obtuvieron extractos de plasmas recién separados, de conejo (*extractos III*) y de plasma humano (*extractos IV*).

c) Los extractos I fueron sometidos a hidrólisis ácida en autoclave, a 15 libras de presión, con las dos variantes siguientes: 1, con H₂SO₄ 6N durante 4 horas, eliminando posteriormente el ácido por precipitación con Ba(OH)₂, y 2,

con HCl 6 N, durante 7 horas en una ocasión, y 20 horas en otro, eliminando en ambos casos el HCl por evaporación a vacío y redisolviendo el residuo en agua.

Con las muestras de los *extractos* I (correspondientes a 0.3-0.5 ml del líquido original) se obtuvieron:

a) 8 papirogramas* con el sistema bi-dimensional descendente de Dent (5), usando para la primera dimensión fenol al 80%, que es la concentración empleada por Bull et al. (3) y "colidina" para la segunda dimensión. El fenol utilizado en estos experimentos y en los siguientes fue purificado por destilación a baja presión, en presencia de polvo de zinc, como recomiendan Williams y Kirby (19). Llamamos "colidina" a una mezcla saturada con agua, de volúmenes iguales de colidina (en nuestro caso colidinas mezcladas, Eastman-Kodak) y de 2-4 lutidina. El papel utilizado en todos los casos fue Whatman N° 1.

* Utilizamos aquí la denominación papirogramas propuesta por Dent (6) para el cromatograma bi-dimensional corrido y revelado en papel filtro.

b) 6 papirogramas por el sistema bi-dimensional de Joslyn y Stepka (12), usando el mismo solvente que para las anteriores, para la primera dimensión y para la segunda dimensión la mezcla butanol-ácido acético, que utilizan dichos autores. Se dejaron correr los papirogramas en fenol y "colidina", de 20 a 22 horas, y los hechos con butanol-ácido acético, de 16 a 18. Aunque en ningún caso procuramos trabajar a temperatura constante, por lo general lo hicimos a 18° C.

La presencia de los materiales absorbidos sobre diferentes porciones del papel, previamente desecado, fue puesta de manifiesto pulverizándolo con solución de ninhidrina al 0.25% en butanol saturado con agua, tal como lo recomiendan Williams y Kirby (19) y calentando después durante 5 minutos, en estufa seca a 80° C., en la forma empleada por Consden et al. (4).

Con los hidrolizados de los extractos etanólicos de humor acuoso, correspondientes a 0.3–0.5 ml del líquido original, se hicieron 4 papirogramas, en los dos sistemas bi-dimensionales señalados.

Con los *extractos* II, III y IV, se obtuvieron 6 papirogramas del primero, 6 del segundo y 2 del tercero, en el sistema fenol-butanol ácido acético.

Con objeto de asegurarnos previamente de los resultados que pudiera dar el método cromatográfico en nuestras manos, se corrieron papirogramas de mezclas preparadas con los siguientes aminoácidos: ácidos aspártico y glutámico, glicina, alanina, cistina, prolina, hidroxiprolina, tirosina, serina, norleucina y los diez llamados "indispensables", cada uno de ellos a concentraciones de 10 a 20 μ g. Asimismo, cuando la posición de aminoácido pareció dudosa, se corrieron en iguales condiciones papirogramas individuales de sus soluciones puras, así como de los diversos extractos, adicionados de los aminoácidos cuya posición deseábamos comprobar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se comprobó (véase la fig. 1) que las posiciones que ocupan los diversos aminoácidos en el papirograma coinciden, en lo general, con las señaladas por Dent (6) en el sistema fenol-"colidina", salvo la lisina, que en nuestras manos resultó con un R_f^* menor que el encontrado por dicho autor. Ciertamente, en vez de la s-colidina empleada por la mayor parte de los autores, hemos utilizado una mezcla de colidinas, pero esto no parece ser de importancia, ya que el mismo Dent ha obtenido resultados que califica de satisfactorios con mezclas similares. Es posible que haya influido el haber usado fenol al 80% en lugar del mismo reactivo saturado con agua, empleado por dicho autor. En el sistema fenol-butanol ácido acético (véase fig. 2), también encontramos, de modo general, que las posiciones de ciertos aminoácidos correspondían con las consignadas por Joslyn y Stepka (12) y Lesh et al. (15).

* Se recuerda que R_f es la relación entre la distancia m recorrida en el papel, por la substancia que da la mancha y la distancia s , recorrida por el solvente ($R_f = m/s$) (4).

En los papirogramas obtenidos con *extractos* I, es decir de humor acuoso, en sistema fenol-"colidina" pudimos identificar los siguientes aminoácidos (véase fig. 3): leucina e isoleucina (por lo general mezcladas en una mancha), valina y metionina (también mezcladas en una mancha), alanina, tirosina y ácido glutámico. Vimos, además, una mancha por debajo de la alanina y otras dos, no identificadas, que hemos denominado A y B, con valores para sus *Rf* en fenol, de 0.73 y 0.68 respectivamente, y en "colidina", de 0.07 y 0.04. En el sistema fenol-butanol ácido acético se identificaron además (véase fig. 4): glicina, treonina, prolina y serina, y nuevamente las manchas A y B con valores para sus *Rf* de 0.18 y 0.14 respectivamente, en butanol-ácido acético. Estas manchas tienen en ambos sistemas color púrpura, pero pasado algún tiempo, la B cambia a color naranja.

Cuando se emplea "colidina" para la segunda dimensión, las manchas de glicina, treonina, prolina y serina, resultan pálidas o no se manifiestan (compárense las figuras 3 y 4) lo cual parece atribuible a que en estas condiciones reaccionan poco con la ninhidrina.

En los papirogramas de *extractos* II o sea los privados de lípidos por el éter etílico, las manchas A y B no aparecieron o lo hicieron muy débilmente (véase fig. 5 y compárense con la 4), lo cual nos parece atribuible a que los componentes que dan lugar a la producción de las manchas, son parcialmente disueltos por el reactivo empleado.

En los papirogramas de hidrolizados de humor acuoso, en HCl 6N, la mancha situada por debajo de la alanina, así como las manchas A y B (véase fig. 6) desaparecen en fenol-"colidina", pero en cambio aparecen las correspondientes a serina, glicina, treonina y otras no identificadas que marcamos con los números I, II y III. En los papirogramas en sistema fenol-butanol ácido acético, también desaparecen esas manchas, pero en cambio se intensifican las correspondientes a serina, glicina y treonina y aparecen las que hemos marcado con I, II y III (compárense las figuras 7 y 8). Cuando la hidrólisis de los *extractos* I fue llevada a cabo con H₂SO₄ 6N (4 horas a 150 °C), desapareció la mancha por debajo de la alanina, y persistieron las A y B.

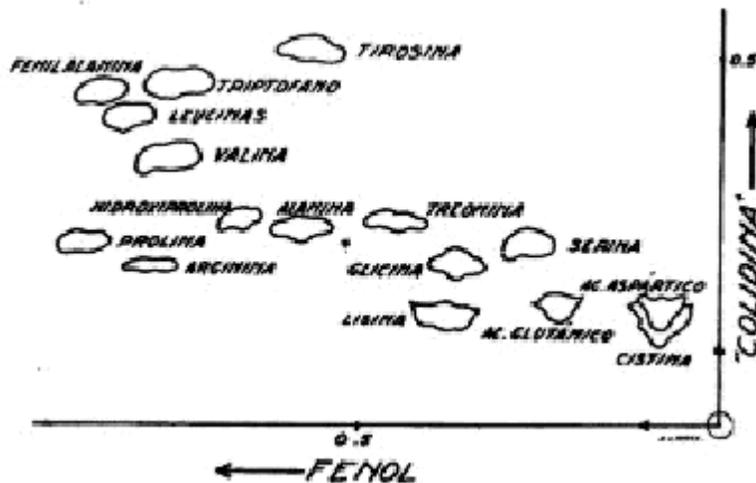


Fig. 1. Papirograma de una "mezcla tipo" de aminoácidos.

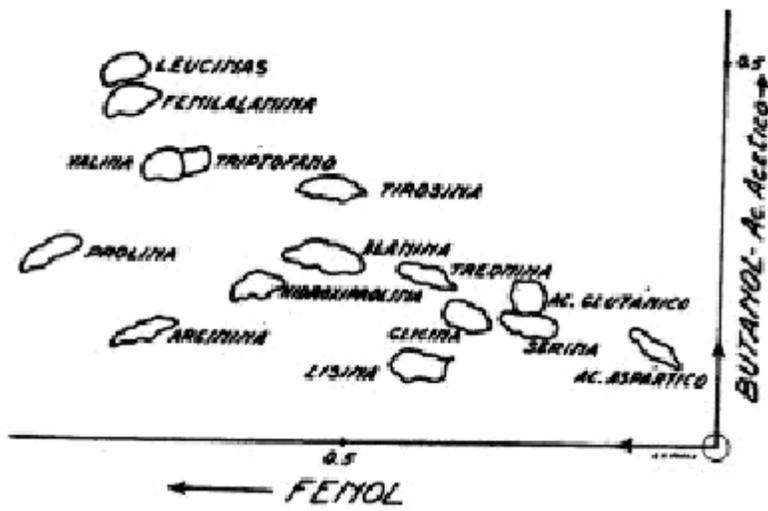


Fig. 2. Papirograma de una "mezcla tipo" de aminoácidos.

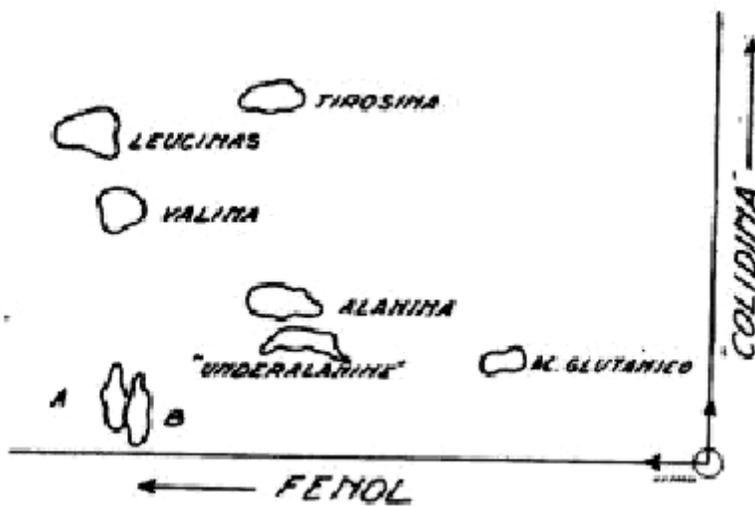


Fig. 3. Papirograma de humor acuoso desproteinizado según el método de Awapara.

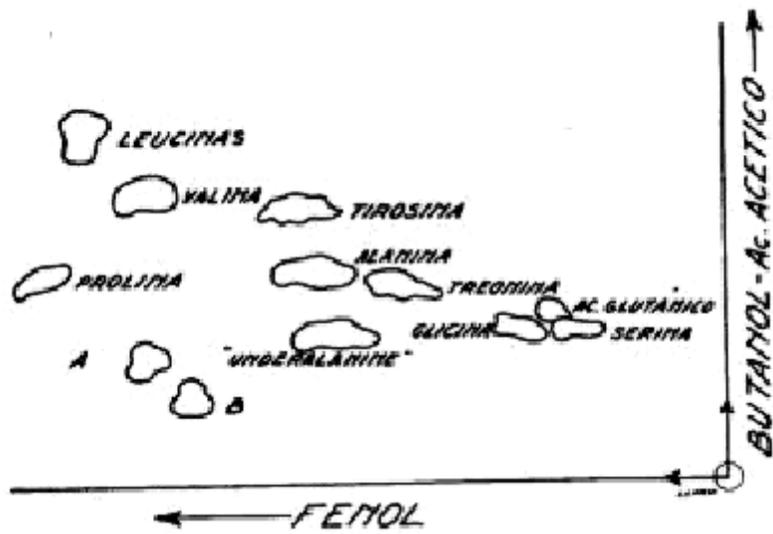


Fig. 4. Papirograma de humor acuoso desproteinizado según el método de Awapara.

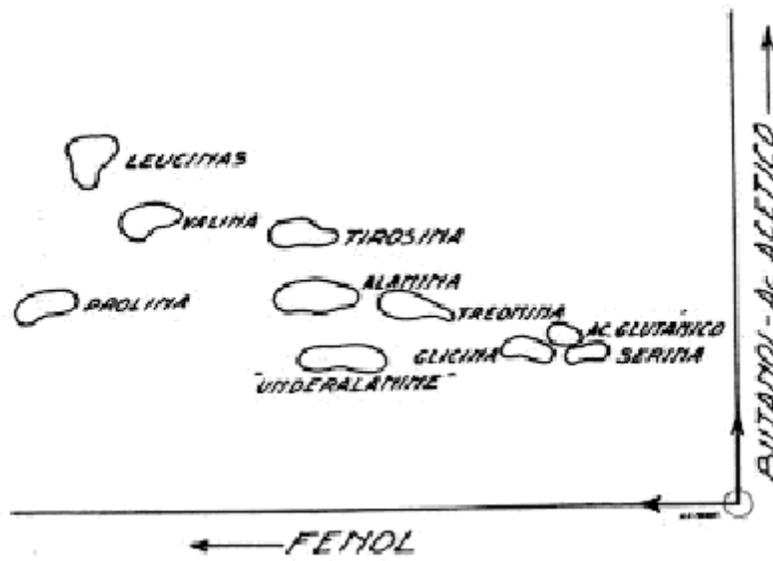


Fig. 5. Papirograma de humor acuoso desproteinizado por el método de Verdier y Agren.

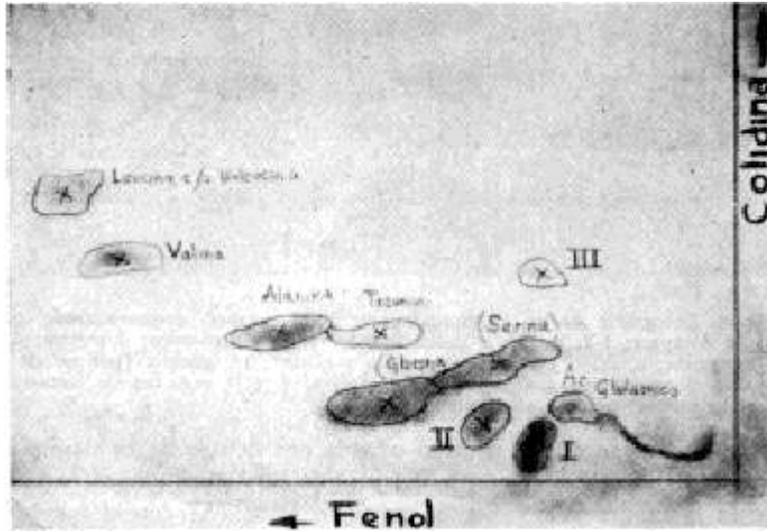


Fig. 6. Fotografía de un papirograma de humor acuoso desproteinizado por el método de Awapara y sometido a hidrólisis con HCl, 6N.

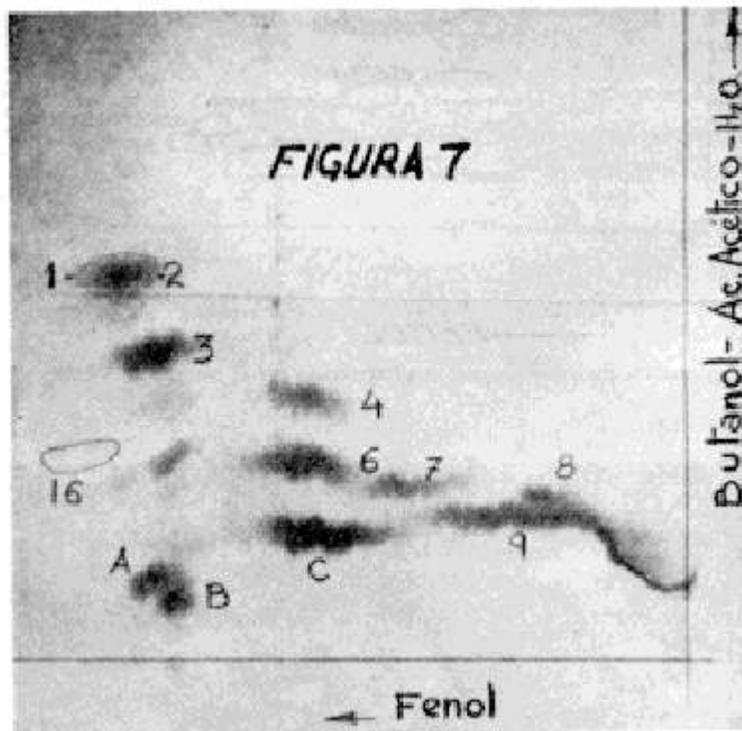


Fig. 7. Fotografía de un papirograma de humor acuoso desproteinizado por el método de Awapara: 1-2, leucina e isoleucina; 3, valina y metionina; 4, tirosina; 6, alanina; 7, treonina; 8, ácido glutámico; 9, serina y glicina; 16, prolina (por ser de color amarillo en el original no aparece en la fotografía), A y B, manchas no identificadas, y C posiblemente el péptido glicil-glicil-serina.

Es de inferirse que la mancha situada por debajo de la alanina probablemente es identificable con la del péptido seril-glicil-glicina, cuya presencia en la sangre y la orina ha señalado Dent (5) con el nombre de "underlanine". En cuanto a las manchas A y B dejando por el momento a un lado otras posibilidades, nos limitamos a sugerir que corresponden a componentes que en el medio con HCl 6N, se hidrolizan dando los derivados no identificados que originan las manchas I, II y III.

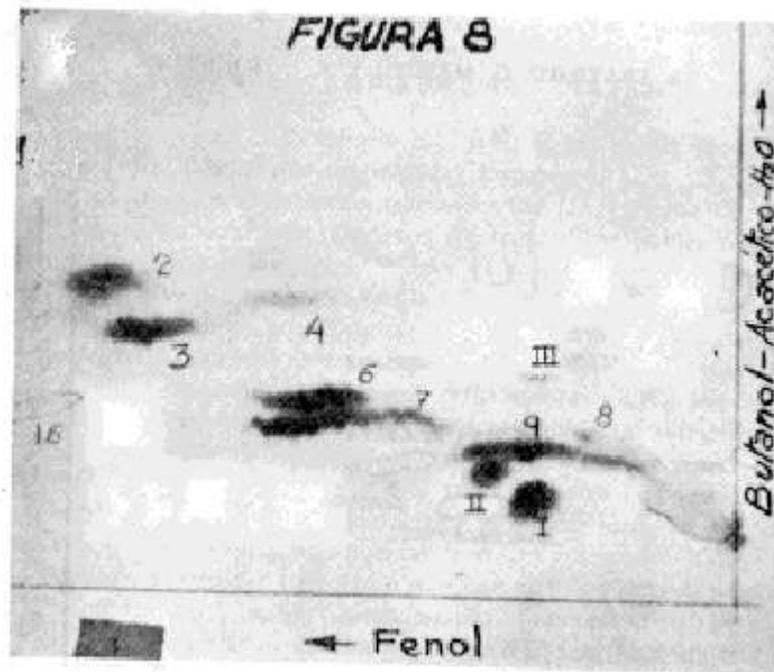


Fig. 8. Fotografía de un papirograma de humor acuoso desproteínizado por la técnica de Awapara y sometido a hidrólisis con HCl 6N. Los números de las manchas tienen la misma equivalencia que en la figura 7. Obsérvense las manchas I, II y III, no identificadas.

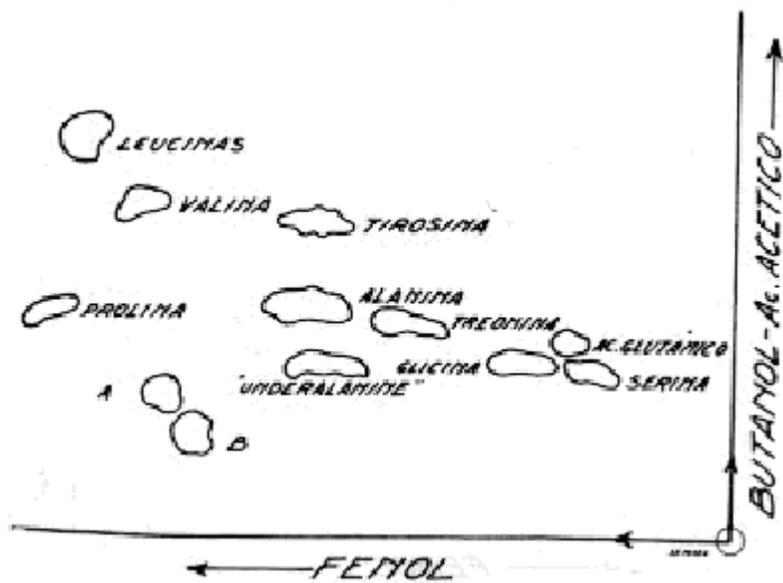


Fig. 9. Papirograma de plasma de conejo desproteinizado por el método de Awapara.

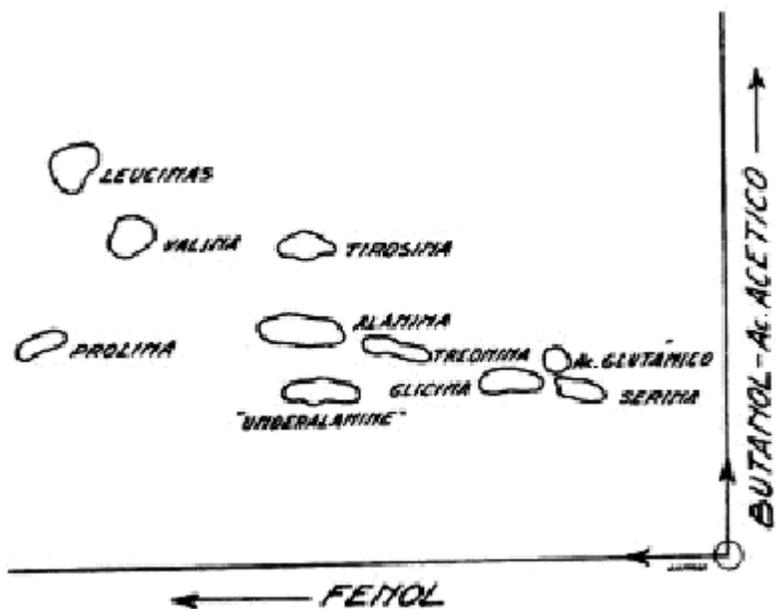


Fig. 10. Papirograma de plasma de conejo desproteinizado por el método de Verdier y Agren.

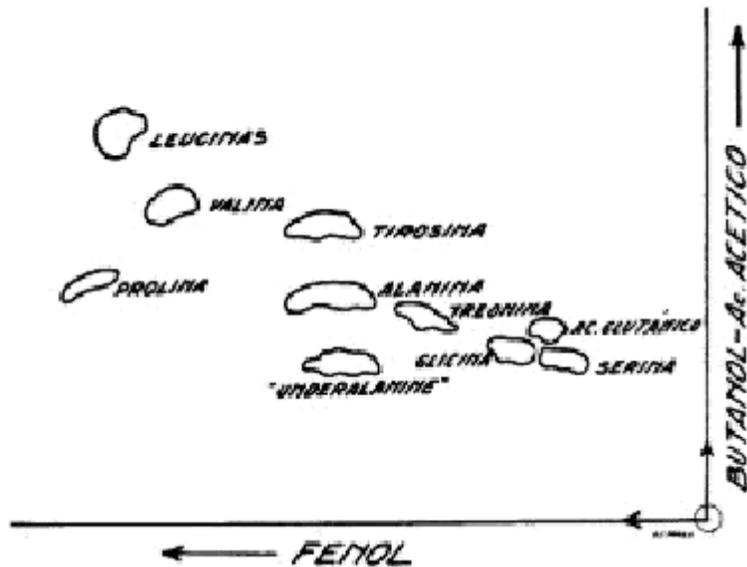


Fig. 11. Papirograma de plasma humano desproteinizado por el método de Verdier y Agren.

Los papirogramas obtenidos con *extractos* III (plasma de conejo) y IV (plasma humano) no ofrecieron diferencias apreciables con los de humor acuoso (véanse las figures 9, 10 y 11 y compárense con las 4 y 5). Por lo tanto, cabe pensar que ambos líquidos contienen los mismos aminoácidos y péptidos libres, por lo menos desde un punto de vista cualitativo.

No logramos identificar en estos plasmas lisina, ácido aspártico, arginina y ácido alfa-amino butírico, que otros autores (2,18) han señalado empleando técnicas semejantes. Parécenos atribuible tal diferencia tanto a que se han servido de extractos privados de sales, como a que los han ensayado a concentraciones dos o tres veces mayores que las empleadas por nosotros, pues no debe olvidarse que la sensibilidad del método requiere concentraciones mínimas que varían de un aminoácido a otro. Tampoco logramos identificar triptofano, que por métodos microbiológicos ha sido demostrado tanto en el plasma humano como en el del perro (10, 16); pero la diferencia es igualmente atribuible a la baja concentración en que se encuentra.

RESUMEN

1. Para estudiar la composición en aminoácidos, péptidos libres y de otras sustancias que reaccionan con la ninhidrina, del humor acuoso y plasma de conejo y humano, se hizo la separación cromatográfica de tales componentes en papel filtro.

2. En los papirogramas de humor acuoso desproteinizado, corridos en el sistema bi-dimensional fenol-*colidina*, se identificaron: manchas correspondientes a los aminoácidos leucina (e isoleucina), valina (y metionina) tirosina y alanina; una mancha debajo de la alanina (posiblemente el péptido "underalanine", formado por glicina y serina) y dos manchas no identificadas, denominadas provisionalmente A y B, con valores para sus *R_f*, en fenol al 80% de 0.73 y 0.68 respectivamente, y en "*colidina*" de 0.07 y 0.04. En el sistema fenol butanol-ácido acético, se identificaron además prolina, treonina, serina y glicina, y las manchas A y B resultaron con valores para sus *R_f* en butanol-ácido acético, de 0.18 y 0.14 respectivamente.

3. Con humor acuoso privado de lípidos por medio del éter etílico, las manchas A y B no aparecieron en los papirogramas o lo hicieron débilmente.

4. En los papirogramas de hidrolizados de humor acuoso desproteinizado, desapareció la mancha por debajo de la alanina, y también las A y B. pero se reforzaron las correspondientes a la treonina, la serina y la glicina, y

aparecieron tres manchas no identificadas, que se denominaron provisionalmente I, II y III.

5. Por los métodos empleados en este trabajo, no se encontró diferencia entre los papirogramas de humor acuoso y de los plasmas de conejo y humano, desproteinizados, lo cual sugiere que ambos tienen la misma composición en aminoácidos y péptidos libres, por lo menos desde el punto de vista cualitativo.

REFERENCIAS

1. AWAPARA, J. Arch. Biochem., vol. 19, p. 172, 1948.
2. AGREN, G. y T. NILSON. Acta Chem. Scand., vol. 3, pp. 525, 1949.
3. BULL, H. B., J. W. HAHN y V. H. BAPTIST. J. Am. Chem. Soc., vol. 71, p. 550, 1949.
4. CONSDEN, R., A. GORDON, A. J. P. MARTIN, Biochem. J., vol. 38, p. 224, 1944.
5. DENT, C. E. Biochem. J., vol. 41, p. 240, 1947.
6. — Biochem. J., vol. 43, p. 169, 1948.
7. DUKE-ELDER, W. S. Biochem. J., vol. 21, p. 66, 1927.
8. — J. C. QUILLIAM y H. DAVSON. Brit. J. Ophthalmol., vol. 24, p. 421, 1940.
9. — J. Am. Med. Assoc., vol. 137, p. 1285, 1948.
10. HARRIS, M. M. y R. S. HARRIS. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., vol. 64, p. 471, 1947.
11. HERRMANN, H. y S. G. MOSES. J. Biol. Chem., vol. 158, p. 33, 1945.
12. JOSLYN, M. A. y W. STEPKA. Food Research. vol. 14, p. 459, 1949.
13. KINSEY, V. E. y W. M. GRANT. J. Gen. Physiol., vol. 26, p. 131, 1942.
14. KRAUSE, A. C. y A. M. YUDKIN. J. Biol. Chem., vol. 88, p. 471, 1930.
15. LESH, J. B., J. D. FISHER, I. M. BUNDING, J. J. KOCSIS. L. J. WALASZEK. W. F. WHITE y E. E. HAYS. Science, vol. 112, p. 43, 1950.
16. LOTSPEICH, W. D. J. Biol. Chem., vol. 179, p. 175, 1949.
17. ROBERTSON, J. D. Trans. Ophthalmol. Soc., United Kingdom, vol. 52, p. 611, 1939.
18. VERDIER, C. H. DE, y C. AGREN. Acta. Chem. Scand., vol. 2, p. 783, 1948.
19. WILLIAMS, R. J. y H. KIRBY. Science, vol. 107, p. 481, 1948.

Estando en prensa este trabajo, se publicó un escrito de Awapara y colaboradores (J Biol. Chem. Vol. 187, p. 35, 1950) en el que demuestran la presencia del ácido gamma- amino-butírico en extractos alcohólicos de cerebro, por cromatografía en papel, consignando un Rf en fenol de 0.74 muy próximo al encontrado por nosotros para la mancha A (0.73). Queriendo asegurarnos si dicha mancha es o no producida por el ácido gamma-amino-butírico, el cual según Dent (Biochem. J. Vol. 43, p. 169, 1948) se encuentra en la sangre, hicimos experiencias, adicionándolo a muestras de sangre desproteinizada y localizamos su posición separándolo por el sistema fenol-butanol-ácido acético, con lo que comprobamos que la posición de tal aminoácido no corresponde a la mancha A, puesto que su Rf es de 0.79 en fenol y 0.29 en butanol-ácido acético.

Deseamos hacer patente nuestro agradecimiento al Dr. Roger Adams, del Departamento de Química de la Universidad de Illinois, por habernos proporcionado el ácido gamma-amino-butírico utilizado en esta investigación.