

Tesis de Posgrado

Proteínas séricas y hemoglobinas de los peces *Cynoscion striatus* y *Raya microps*

Ford, María C.

1960

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ford, María C.. (1960). Proteínas séricas y hemoglobinas de los peces *Cynoscion striatus* y *Raya microps*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1071_Ford.pdf

Cita tipo Chicago:

Ford, María C.. "Proteínas séricas y hemoglobinas de los peces *Cynoscion striatus* y *Raya microps*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1960. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1071_Ford.pdf

El trabajo que se resume consiste en un estudio de las proteínas séricas de dos peces del Atlántico Sur (se encuentran también en otras aguas), que fué realizado con los siguientes fines:

- 1) Reunir datos sobre las proteínas séricas del *Cynoscion striatus* y *Raja microps* sobre las que no existía ninguna información.
- 2) Idear técnicas apropiadas y adaptar técnicas conocidas para trabajar con muestras individuales de suero de peces (may poca cantidad y rápida descomposición).
- 3) Averiguar si hay especificidad en las proteínas séricas de los peces estudiados, y, si la hay, cual es el centro de variación entre las de uno y otro pez.

RESULTADOS

Concentración: Cy. st. (pesadilla): 4.47 ± 0.47 gr en 100 ml
Raja ni. (Raya): 6.41 ± 0.44 gr en 100 ml.

Se efectuaron 173 determinaciones para el *Cy. st.* y 135 para la *Raja ni.*

Fracionamiento: a) Por electroforesis sobre papel en buffer de veronal-veronal sódico de pH 8.6 y fuerza iónica 0.05. Se obtuvieron 6 fracciones desplazadas hacia el frente que se designaron I, II, III, IV, V y VI en orden creciente de movilidad. Se efectuaron 60 fraccionamientos para el *Cy. st.* y 40 para *Raja ni.* con los siguientes resultados:

<u>Fracción</u>	<u>Cy. st.</u>	<u>Raja ni.</u>
I	7.0 ± 0.9	7.9 ± 0.7
II	10.2 ± 1.2	10.5 ± 1.3
III	11.3 ± 1.3	11.9 ± 1.1
IV	14.0 ± 0.8	13.9 ± 0.7
V	18.8 ± 1.8	18.0 ± 1.1
VI	38.5 ± 3.1	37.6 ± 2.4

Res. de Tiss.: 107

071

FOYDA

Se determinó la concentración de cada fracción en gr %.

b) Por diferencias de solubilidad (Método de Howe).

En sulfato de sodio 22.2 gr % se separan 2 fracciones: soluble (FS) e insoluble (FI). Los datos proporcionados por el decaje y la electroforesis de la FS (previa diálisis y concentración al vacío) indican que la FS está formada por las fracciones I y VI y la FI por las restantes. Se efectuaron 19 determinaciones.

Análisis de cada fracción:

Cynoptera striata

Fracción I: Mezcla de proteínas simples que se separa en dos fracciones por electroforesis en buffers de pH entre 2 y 7.

Punto isoeléctrico: (de la mezcla) 7.4 (40 determinaciones).

Composición de hidrolizados ácidos y alcalinos (19 cromatogramas):

cisteína, cistina, histidina, arginina, ácido aspártico, glicocola y metionina. En el caso de esta peculiar fracción I, no podemos encontrar analogía con ninguna de las fracciones del suero humano.

Por su punto isoeléctrico, solubilidad y composición en aminoácidos, aventuramos la hipótesis de que se trata de una histona muy simple. Por los cualitativamente escasos aminoácidos que la componen se asemeja a una protamina, pero no es tan básica y además las proteínas conocidas no contienen sulfuro, en cambio la fracción I tiene cisteína, cistina y metionina.

Por los cualitativamente escasos aminoácidos que la componen se asemeja a una protamina, pero no es tan básica y además las proteínas conocidas no contienen sulfuro, en cambio la fracción I tiene cisteína, cistina y metionina.

Fracción II: Lipoproteínas e mezcla de proteínas simples y lipoproteínas.

Punto isoeléctrico: entre 5.8 y 5.9 (15 determinaciones). Globulinas. Composición de hidrolizados (24 cromatogramas):

histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, serina, alfa alanina, prolina, glicocola, leucina, triptófano y 3 aminoácidos no identificados (C, D y E).

Debemos señalar que la calificación "no identificados" no tiene otro sentido en este trabajo, que el de aminoácidos cuyos RF no coinciden con los utilizados como testigos.

Fracción

Fracción III: Lipoproteínas o mezcla de proteínas simples y lipoproteínas. Punto isoelectrónico 5.6 (12 ensayos). Globulinas. Composición de hidrolizados: arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, histidina, treonina, alfa alanina, prolina, metionina, triptófano y 4 no identificados, A, B, C y F. (19 cromatogramas).

Fracción IV: Lipoproteínas. Punto isoelectrónico 5.3 (14 ensayos). Globulinas. Composición de hidrolizados: ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, lisina, alfa alanina, triptófano, cisteína, arginina, metionina, A, B, C, E y F (16 cromatogramas).

Fracción V: Mezcla de proteínas simples y lipoproteínas. Punto isoelectrónico 5.0 (20 ensayos). Globulinas. Composición de hidrolizados: histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, glicocola, prolina, leucina, triptófano, G, D y E (18 cromatogramas).

Fracción VI: Glicoproteínas o mezcla de proteínas simples y glicoproteínas. Punto isoelectrónico 4.4 (18 ensayos). Albuminas. Composición de hidrolizados: ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, arginina, treonina, prolina, metionina, leucina, A, B, C, D y E (20 cromatogramas).

Fracción VII

Fracción I: Composición de hidrolizados (G de H): igual a la fracción I del Cy. st. (8 cromatogramas).

Fracción II: G de H: Aparece isoleucina; por lo demás igual a la fracción II del Cy. st.

Fracción III: G de H: Aparecen valina y 3 además de las de la fracción III del Cy. st. excepto E. G es un aminoácido no identificado que aparece solamente en la Fracción VII. (4 cromatogramas).

Fracción IV: C de H: Aparece 6 además de las de la F IV del Cy. st. (4 cromatogramas).

Fracción V: G de H: Aparecen isoleucina y fenilalanina además de

PROTEÍNAS

los de la F V del Cy. st. (4 cromatogramas).

Fracción VI: C de las Aparceas valina y fenilalanina además de los de la F. VI del Cy. st.

Algunas proteínas en otros usos:

Se efectuó fraccionamiento electroforético del suero de algunos ejemplares de: *Megal brasilensis*, *Percephis brasilensis*, *Erephya brasilensis*, *Micropogon* sp., *Galena omnia*, *Paralichthys bonariensis* y *Paralichthys brasilensis*. Se obtuvo consistentemente, desplazamiento hacia el ánodo. La fracción de mayor movilidad es siempre la más abundante.

Paralichthys brasilensis

Concentración: El promedio de 5 determinaciones da 2.16 ± 0.14 gr de proteínas séricas en 100 ml de suero.

Fraccionamiento electroforético: En buffer de veronal-veronal ácido de pH 8.6 se obtuvieron 5 fracciones desplazadas hacia el ánodo.

<u>Fracción</u>	<u>Proteínas</u>	<u>Concentración</u> <u>SA. ST. %</u>
I	8.1 ± 1.2	0.17
II	10.5 ± 0.8	0.23
III	12.2 ± 1.3	0.27
IV	18.7 ± 1.2	0.41
V	50.4 ± 2.6	1.00

MÉTODOS

Reactivos: a) Marenzi, Meglia y Villalonga (hidrólisis). b) Wang (micro Kjeldhal). c) Phillips y Van Slyke modificado (densitométrico).

Fraccionamiento: a) Electroforesis sobre papel. Se utilizaron técnicas distintas según se quisiera ver el número de fracciones y hacer cuantificación o densitométrica; aislar cada fracción para utilizarla en otras determinaciones; averiguar qué fracciones

CONCLUSIÓN

contenían lío e g-uaco; rotasinas.

b) Método de Howe (diferencias de solubilidad). Se desaven las fracciones soluble e insoluble. La soluble se dializaba contra agua destilada y en pequeños volúmenes se concentraba en desecador al vacío, para efectuar luego electroforesis. Análisis de cada fracción: Los puntos isoelectricos se determinaron por electroforesis (en buffers de veronal ácido fóico electrolítico de distintos pH) de cada fracción aislada previamente por electroforesis. De cada fracción se prepararon hidrolizados ácidos y alcalinos (Método modificado y método del hidróxido de bario modificado). De cada hidrolizado se efectuaron cromatogramas sobre papel (ascendente, descendente y circular) para investigar aminoácidos.

CONCLUSIONES

Antes de exponer las conclusiones se quiere señalar que cuando se habla de acuerdo e desacuerdo con otros autores no se refiriéndose a los datos particulares de Gy. et. y Haya et., sino a las generalizaciones hechas por quienes han estudiado otros peces.

De los resultados expuestos se deduce, para estos peces, lo siguiente:

1º) La cantidad de proteínas séricas (en un estrecho rango), el número de fracciones separadas por electroforesis, sus concentraciones, movilidads, signos, puntos isoelectricos y composición cualitativa en aminoácidos, son respectivamente iguales en ejemplares de una misma familia.

2º) En ejemplares de distintas familias, la concentración de proteínas séricas es distinta sin que llegue a ser un dato característico. La probabilidad es pequeña pero pueden encontrarse Gy. et. con concentración de L. et. y viceversa. En el caso de las fracciones proteicas se encuentran una

diferencia característica solo en el número de aminoácidos correspondientes a las fracciones II, III, IV, V y VI de uno y otro pes.

3º) No se encuentra variación significativa en el valor de A/G. Si, al igual que Field y col. (1) y Frieden y col. (2), hubiéramos considerado como globulinas a todas las fracciones excepto la de mayor movilidad (por analogía con las del suero humano), habríamos obtenido para ambos pesos el mismo valor: 0.62 (sin considerar la fracción I obtuvimos 0.70 y 0.69 para Gy. st. y R. ml. respectivamente).

Al comparar estas conclusiones con las de algunos trabajos que se mencionan en la Introducción del trabajo que aquí se resume, se ve que hay coincidencia en el punto primero con Dutoch y Ho Shan (3), pero en el segundo punto se difiere con los mismos autores en que no todas las dadas iguales son características.

Hay desacuerdo con los autores Frieden y col. (2) pues encontramos una variación consistente entre las fracciones proteicas respectivas II, III, IV, V y VI en ambas familias.

REFERENCIAS (de este resumen)

- (1) Field, Elvehjem y Juday; *J. Biol. Chem.* 142, 261 (1943)
- (2) Frieden, Horner, Fish y Gussen Lewis; *Science*, N° 1273 (1957)
- (3) Dutoch y Ho Shan; *J. Biol. Chem.* 122, 219 (1940)

FCEN-BA.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Proteínas séricas de los peces *Gynoscion striatus* y
*Raya microps***

María G. Ford

TESIS: 1071

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Química

Año 1960



AGRADECIMIENTOS

La autora deja constancia de su gratitud al Dr. Andrés O.M. Steppani por haber sugerido el tema del presente trabajo y por haber seguido el desarrollo del mismo.

Asimismo agradece al Dr. Aziz-Ur Rahman sus valiosas sugerencias, y a los Dres. Édouard Rapoport, Jorge Torres y Alberto L.M. Loleng por haber facilitado la utilización de laboratorios, equipos y drogas en la Universidad Nacional del Sur.

Agradece también a la Cooperativa Pesquera de Ingeniero White por haber facilitado la provisión de muestras.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION

OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

PARTE I: EXPERIMENTAL

- 1) Métodos utilizados para medir la concentración de proteínas séricas.
- 2) Fraccionamiento de las proteínas séricas por electroforesis sobre papel y aislamiento de cada fracción.
Fraccionamiento salino por el método de Howe y electroforesis sobre papel de la fracción soluble.
- 3) Hidrólisis de las fracciones proteicas y cromatografía sobre papel de los hidrolizados.
- 4) Determinación del Punto Isoeléctrico de cada fracción.

PARTE II: RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1. ONOSCIUM STRIATUM

- 1.1) Concentración de proteínas séricas.
- 1.2) Fracciones proteicas obtenidas por electroforesis sobre papel y por fraccionamiento salino.
- 1.3) Análisis de cada fracción: Gluco y lipoproteínas.
Punto Isoeléctrico. Composición cualitativa en aminoácidos. Clasificación de las fracciones.
- 1.4) Relación A/G.
- 1.5) Lípidos en algunos sueros de aspecto patológico.

2. BAYA NICOTTE

- 2.1) Concentración de proteínas séricas.
- 2.2) Fracciones obtenidas por electroforesis sobre papel.
- 2.3) Análisis de cada fracción.
- 2.4) Relación A/G.

3. COMPARACION ENTRE GYNOBGIUM SPECIATUS Y RAYA NEGRO

4. CONCLUSIONES

5. ALGUNOS RESULTADOS EN OTROS PECES Y COMPARACION CON LOS DE GYNOBGIUM Y RAYA

5.1) Paralichthys brasiliensis (lenguado): Concentración de proteínas séricas. Fraccionamiento por electroforesis.

5.2) Otros peces.

5.3) Comparación de los resultados de 5.1 y 5.2 con los de Gynobgium y Raya.

REFERENCIAS

APENDICE (contiene las tablas).

INTRODUCCION

El cuadro de los análisis efectuados en sangre de peces presenta un aspecto peculiar: faltan datos indispensables y elementales, con un número suficiente de determinaciones (por ejemplo: concentración proteica en suero), mientras que por otra parte se encuentran algunos exámenes tan finos como la determinación de grupos sanguíneos en atunes, por Cushing (1).

Dentro de la bibliografía, relativamente escasa en comparación con la existente sobre composición del suero en otros animales, se encuentra que la mayor parte de los trabajos han sido realizados en "pools" de suero y no en muestras individuales.

Otro aspecto que llama la atención es el escaso número de ensayos efectuados comparado con la apreciable cantidad de conclusiones y generalizaciones.

En cuanto a las proteínas séricas, se nota la falta de un estudio sistemático, aunque existen trabajos de suma interés.

Deutch y Mo Shan (2) han efectuado el estudio electroforético (Tiselius) de las proteínas séricas de

(1): Cushing; Science, N° 1267 (junio 1957)

(2): Deutch y Mo Shan; J.Biol.Chem., 152, 219 (1948)

varias familias de peces y han llegado a la conclusión de que el número de fracciones, la movilidad y la cantidad de proteínas séricas, son datos característicos de las especies. En "pools" de suero de cada especie han encontrado entre 6 y 12 fracciones. En el caso de la Carpa sp. encuentran distinto número de fracciones que el obtenido anteriormente por Deutsch y Goodlee (3). Field y colaboradores (4), utilizando la misma técnica que los autores antes citados, ya habían obtenido 6 fracciones en pools de suero de Carpa sp.

Frieden y colaboradores (5), en un estudio sobre los cambios en las proteínas séricas durante la metamorfosis anfibia, llegaron a las siguientes conclusiones: no hay un cuadro de variación consistente entre las proteínas séricas de animales de distintas especies, pero, cuando aumenta la complejidad del animal, aumentan:

- a) la concentración proteica
- b) la relación A/S
- c) la concentración de la fracción o fracciones con escasa movilidad.

(3): Deutsch y Goodlee; J. Biol. Chem., 161, 21 (1945)

(4): Field, Elvehjem y Juday; J. Biol. Chem., 148, 261
(1943)

(5): Frieden, Herner, Fish y Casson Lewis; Science,
N° 3273 (setiembre 1957)

J.W. Airan (6) ha analizado hidrolizados de "peels" de cuero de algunos peces de Bombay, por cromatografía sobre papel, encontrando buen número de los aminoácidos esenciales.

En el presente trabajo se describe un estudio sobre las proteínas séricas de dos peces del Atlántico Sur (se encuentran también en otras aguas), que fue realizado con los fines siguientes:

- 1) Reunir datos sobre las proteínas séricas de los peces *Cynoscion striatus* y *Raja microps* sobre las que no existía ninguna información.
- 2) Idear técnicas apropiadas y adaptar técnicas conocidas para trabajar con muestras individuales de sangre de peces (muy poca cantidad y rápida descomposición).
- 3) Averiguar si hay especificidad en las proteínas séricas de los peces estudiados y, si la hay, cual es el cuadro de variación entre las de uno y otro pez.

En la Parte II.4, páginas 41 y 42, se encuentran las conclusiones con respecto a este punto.

Las Partes I y IX (1,2,3) se refieren a los dos primeros objetivos.

(6): Airan; C.A. 2165 f (1954); el artículo, que no se ha podido consultar, se encuentra en *J.Univ.Bombay*, 21, Pt 5, Sect A 5-8 (1953)

OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Los análisis se efectuaron en muestras individuales de sangre extraída de peces vivos e inmediatamente después de morir. En un principio se extraía la sangre por punción cardíaca, utilizando aguja y jeringa; este método se desechó porque frecuentemente se obstruía la aguja con trocitos de tejido. Se adoptó como método de extracción el siguiente: se efectúa un corte en el pescado que deja libre el corazón; se corta el vaso superior más grueso y oprimiendo suavemente la víscera se recibe la sangre en una cuchara de vidrio, honda, preparada para este fin. En esta forma se asegura una muestra abundante (4-5ml) y limpia. El volumen de sangre que es posible extraer de un pez cuyo peso esté entre 2 y 3 Kgr, está entre 4 y 5 ml; el volumen de suero que puede separarse en esos casos es de 1,5 a 2 ml.

En los peces estudiados la sangre se mantiene sin coagular entre 4 y 8 horas a temperatura ambiente (temperaturas que han variado entre 3°C y 32°C). Durante ese período hay muy escasa o ninguna separación de plasma. Los intentos de separar el plasma por centrifugación conducen a hemólisis, aún a 900 r.p.m. durante pocos minutos. La hemólisis es total o casi total.

Después de coagular la sangre, puede separarse el suero por centrifugación sin que se produzca hemólisis si se observan las siguientes precauciones: no pasar de las 2000 r.p.m. e interrumpir cada 4 o 5 minutos para observar y no proseguir la centrifugación una vez que ha separado el suero límpido. Habitualmente la centrifugación durante 10 minutos es suficiente para separar el suero. Si el coágulo está retraído la separación puede efectuarse en menos de 5 minutos, pero no es aconsejable esperar la

retracción del coágulo pues este proceso lleva 2 o 3 horas más y la sangre se descompone con rapidez.

Existe un compromiso entre la velocidad de descomposición de la sangre y la regla de centrifugar el menor tiempo posible a la más baja velocidad.

En la mayoría de los peces estudiados el suero se conserva solo 24 horas en heladera. Los sueros de *Cynosium striatus* y *Raya microps* se conservan hasta 2 y 3 días en heladera; es posible que esto se deba a que la extracción de la sangre es menos traumática y por lo tanto la muestra se obtiene libre de pequeños trozos de tejido; además puede obtenerse un volumen mayor de sangre. Estas razones han decidido la utilización de ejemplares de estas especies para la mayoría de los análisis.

Como criterio para juzgar el estado de conservación de la muestra se adoptó el de repetición de los diagramas electroforéticos; mientras fueran consistentemente iguales a los obtenidos con el mismo suero fresco, se proseguía utilizando la muestra para análisis.

PART I

EXPERIMENTAL

I) METODOS UTILIZADOS PARA MEDIR LA CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS.

WORG (7): Es un micro Kjeldahl. El amoniaco formado se trata con reactivo de Nessler y se dosa fotocolorimétricamente. Se utilizan testigos de sulfato de amonio.

Este método se utilizó para las primeras determinaciones pero se desechó por la inseguridad con respecto al factor de reducción de nitrógeno a proteínas. Posteriormente se comprobó que daba resultados similares a los obtenidos con el método del biuret y el densimétrico.

MARENZI, MOGLIA y VILLALONCA (7): Este método utiliza la reacción del biuret. Se emplearon como testigos, diluciones de suero humano de concentración proteica conocida o soluciones de albúmina.

Se usó como método de compensación para adaptar el método densimétrico al suero de peces.

PHILLIPS y VAN SLYKE (8): Es un método densimétrico. Se mide la densidad del suero por comparación con soluciones de sulfato de cobre cuyas densidades son conocidas.

Se aplica la fórmula:

$$\text{gr de P.T. en 100 ml suero} = k (D - D')$$

P.T.: proteínas séricas totales

k: constante de proporcionalidad

D: densidad del suero

D': densidad del suero desproteinizado

(7): "Química Analítica Cuantitativa", Marzani, Cardini, Banfi y Villalonga. Ed. El Ateneo, 1948.

(8): "Clinical Diagnosis by Laboratory Methods", Kelmer

Para hallar los valores de k y D' que habrían de utilizarse en la fórmula se hizo lo siguiente:

Para D' : Se desproteinizó el suero agregando una gota de ácido tricloroacético 20% por ml de suero, agitando y calentando suavemente. El precipitado se separó por centrifugación y se determinó la densidad del sobrenadante.

Debido a la variación de volúmen no se considera más que aproximados a los valores obtenidos de D' , pero lo suficiente como para emplearlos en la fórmula.

Se adoptó para D' el promedio de 5 determinaciones que dieron resultados muy similares: $D' = 1.0057$ a 22°C

Para k' : Se calculó despejando el valor de la fórmula aplicada a sueros de concentración proteica conocida (determinada por el método del biuret). Se adoptó como valor 160. La técnica de Phillips y Van Slyke fue la más utilizada. La rapidez del método compensa el trabajo de su adaptación a la medida en suero de peces. Una serie de 10 determinaciones efectuadas por el método del biuret y por el densimétrico, dió resultados similares.

2) METODOS DE FRACCIONAMIENTO DE PROTEINAS SERICAS

ELECTROFORESIS SOBRE PAPEL (9),(10)

Dentro del método general de fraccionamiento de proteínas séricas por electroforesis sobre papel, debemos, en realidad, diferenciar tres técnicas de acuerdo al uso ulterior de las fracciones. Describiremos primero lo que tienen de común y señalaremos luego las diferencias.

Aparatos: Se utilizaron dos modelos: uno de 120-140 volts y papel horizontal que realiza la separación en 16 a 18 horas; otro de 350-400 volts y papel en ángulo que la efectúa en 4 a 5 horas. El primero posee un receptáculo donde se coloca agua para mantener el ambiente saturado de humedad y evitar la concentración del buffer. En el segundo se colocaban algodones embebidos en agua tibia para este efecto.

Buffers: Se ensayaron numerosos buffers de distinta composición y pH y se eligió el de veronal-veronal sódico de pH 8.6 y fuerza iónica 0.05. También es satisfactorio el buffer de fosfatos del mismo pH pero se descompone rápidamente.

Se ensayaron los siguientes buffers: veronal sódico-ácido clorhídrico a varios pH; ácido succínico-bórax a pH 4, 4.6, 5 y 5.6; fosfato monopotásico-bórax a pH 6, 6.6, 7, 7.6, 8, 8.6 y 9.

Papel: Schleicher-Schull para electroforesis.

Técnicas: I) Cuando el objeto del fraccionamiento era conocer el número de fracciones, movilidad, dirección del desplazamiento, porcentaje y cantidad de cada una, se utilizó la técnica standard, revelando con solución alcohólica de azul de bromofenol.

(9): "Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", Block, Durrum, Zweig. 1957.

(10): "Electrophoresis", Ed. Milan Bier. Academic Press. 1959.

nal 1%. Para hallar el porcentaje de cada fracción se efectuó alución e densitometría y planimetría de la curva obtenida. Para hallar la concentración de cada fracción se refirieron los porcentajes a la cantidad de proteínas totales obtenidas por desaje.

II) Cuando se utilizó el método para averiguar la distribución de glucos y lipoproteínas en las fracciones se procedía así: la muestra se aplicaba en forma de estría fina y larga; una vez terminada la separación se cortaba longitudinalmente el papel en tres tiras, una se revelaba con azul de bromofenol, otra con sudán III 0.1gr en 100 ml de etanol 60% y la restante con anilina (0.93 gr) y ácido ftálico (1.66 gr) en etanol (200 ml). Con el primer revelador aparecen todas las proteínas, con el segundo sólo las lipoproteínas y con el tercero las glucoproteínas. El método es semejante al de las triadas de Wanderly.

III) Se utilizó también la electroforesis como método de separación para utilizar luego las fracciones aisladamente. En ese caso se la muestra se aplicaba en forma de estría larga y gruesa (utilizando 1 ml de suero). Terminado el fraccionamiento se cortaba el papel longitudinalmente en dos partes: una tira angosta (aproximadamente 2 cm) se revelaba con azul de bromofenol. Esta tira teñida se utilizaba para ubicar las fracciones en la tira ancha sin teñir que se cortaba transversalmente para separar así las fracciones. Cada tira conteniendo una fracción proteica se colocaba en un tubo identificado y podía usarse para la determinación del punto isoelectrico e era hidrolizada para averiguar la composición en aminoácidos por cromatografía sobre papel.

FRACCIONAMIENTO SALINO: METODO DE HOWE (11)

Se empleó este método para separar las proteínas solubles e insolubles en sulfato de sodio 22.2 gr%.

Se emplearon volúmenes adecuados de suero y solución para que la concentración de sal en la mezcla fuera 21.5%. Las proteínas de la fracción soluble se dosaban por el método de Maresni, Meglia y Villalanga (1.1). La concentración de la fracción insoluble se determinaba por diferencia entre la de proteínas totales (dosadas por el mismo método) y la de proteínas solubles.

ELECTROFORESIS DE LA FRACCION SOLUBLE

Preparación de la solución proteica: La parte soluble separada por el método de Howe se colocaba en tubos de cellofán para diálisis (en cada tubo 10 ml de solución aproximadamente) y se dializaban cada uno contra 800 ml aprox. de agua destilada, durante 12-14 horas en heladera. Se efectuaba 1 cambio del agua destilada (el agua de cambio a la misma temperatura). Luego se secaba al vacío en la siguiente forma: se colocaba 1 ml de la solución dializada en cada uno de 8 cuadrados de cellofán e nylon (de 6 cm. de lado aproximadamente). Los cuadrados se colocaban en desecador con cloruro de calcio y el desecador se conectaba a una trampa de agua o generalmente a una bomba de vacío protegida por dos trampas con cloruro de calcio. El secado se realizaba en una hora aprox., a temperatura ambiente. Sobre cada residuo seco se volvía a agregar 1 ml de solución para duplicar la concentración y se procedía a un nuevo secado. Resulta conveniente el uso de cellofán e nylon pues el pequeño volumen de líquido puede extenderse,

(11): "Dynamic Aspects of Biochemistry", Edición;
Cambridge University Press, 2a. ed. 1957.

aumentando así la superficie, sin que se forme gota como en los vidrios de reloj lo que aumenta el tiempo de secado en un 50%.

Sobre el residuo seco de un cuadrado se agrega con una varilla, una o dos gotas de buffer (el mismo que se usará en la electroforesis), se homogeneiza bien con la varilla, se levantan los bordes del cuadrado para que se forme gota y con una pipeta para recuentos globulares se aspira cuidadosamente la solución y se deposita sobre el papel del aparato de electroforesis.

Los trozos de celofán con residuos secos sin diluir (pues no todos se utilizaban inmediatamente para electroforesis) se envasaban en tubos de vidrio tapados y se guardaban en heladera.

Electroforesis: Se efectuaba en buffer de veronal-veronal sódico de pH 8.6. En la misma tira de papel se corrían simultáneamente 3 electroferetogramas: 2 de solución de fracción soluble preparada como se explicó, y 1 de suero, para comparar la ubicación de las fracciones, ya que no basta la sola determinación de la movilidad para caracterizar una fracción, debido al error que tiene esta medida en la electroforesis sobre papel.

El fraccionamiento electroferético de las proteínas solubles dió dos fracciones en los 10 ensayos efectuados, coincidentes con las posiciones de las fracciones I y VI aunque ligeramente más desplazadas. El gráfico correspondiente figura en la Parte II.

3) HIDROLISIS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS Y ORNATOLOGIA
SOBRE PAPEL DE LOS HIDROLIZADOS. (12),(13),(14),(15)

La separación de las fracciones proteicas se efectúa según la tercera técnica descrita en II.2.

Hidrólisis: Cada examen de aminoácidos se efectuó en hidrólisis ácida y alcalina. La hidrólisis alcalina se utilizó solamente para investigar triptófano, y a veces, serina, pues los aminoácidos restantes se investigan mejor en hidrolizados ácidos.

Como técnica general para cualquier tipo de hidrólisis se empleó lo siguiente: el papel con la fracción que se quiere hidrolizar se coloca en un tubo de ensayo pyrex, se agrega el ácido o álcali según el caso y se cierra el tubo con soplete a unos 6 cm de la base. Se mantiene el tubo en estufa 24 horas (a 100°C para la hidrólisis ácida y a 120°C para la alcalina).

Una vez frío, se corta el tubo y se le coloca un tapón perforado por el que pasa un tubo de vidrio que se conecta a una trampa o bomba de vacío. Mientras dura la evaporación se mantiene el tubo en baño María. Una vez evaporado todo el líquido se cambia el tapón por uno que tenga dos tubos; uno para la trampa, otro para entrada de aire. Manteniendo el tubo en baño María se hace pasar aire durante 1½-2 horas. Se da por terminado el pasaje de aire cuando no reacciona un papel de tornasol húmedo colocado en la boca del tubo (se desconecta la trampa).

El residuo seco y acreado se disuelve en agua.

Para la hidrólisis ácida se adaptó a micrométodo la técnica de Lahn (13). El método modificado se ensayó con albúmina

humana separada por electroforesis de suero, antes de aplicarla al suero de peces.

Para la hidrólisis alcalina se probaron dos métodos (también adaptados a micrométodos); uno con hidróxido de sodio y otro con hidróxido de bario. Se desechó el primero pues al neutralizar queda una concentración tal de sal que perjudica y aún impide la separación cromatográfica. El método del hidróxido de bario no tiene ese inconveniente pues la neutralización con ácido sulfúrico y ulterior centrifugación para separar el precipitado producen el "desalting" del hidrolizado. (9)

Cálculo de las cantidades para hidrolizar y para diluir el hidrolizado

Tomando como cantidad de proteínas séricas en gr^g, 4.5 para el *Gyrodactylus striatus* y 6.5 para la Raya microps (estos valores son los promedios de los más frecuentes), se calcula la cantidad que hay en 1 ml de suero (cantidad que se usa para hidrólisis de suero) y en cada fracción separada por electroforesis de 1 ml de suero.

En el método de Zehn se agrega 0.5 ml de GHN concentrado por cada 50 mgr de proteínas, aproximadamente. Para la hidrólisis alcalina se agregan 0.5 ml de hidróxido de bario 10% por cada 50 mgr de proteínas.

La cantidad de agua destilada con que se diluye el residuo que se debe ser tal que quede una solución al 2%. Una gota (0.01 ml) de solución contiene entre 10 y 20 gamas de cada aminoácido.

La fracción I se diluyó al 1% pues contiene solamente 7 aminoácidos (aproximadamente la mitad de las otras fracciones) y por consiguiente con doble concentración aparecerían las mg

chas del cromatograma demasiado grandes o muy tupidas, y no podría establecerse una comparación semicuantitativa.

CRONATOGRAFIA DE LOS HIDROGLICIDOS

Se realizaron cromatogramas ascendentes, descendentes y circulares.

Aparato: Para "cromatografía ascendente" se utilizó un cajón de madera (ver esquema) perfectamente enlucido y pintado para evitar aberturas y mantener el ambiente saturado con el sistema agua-solvente. Encima de la tapa de vidrio (que ajusta sobre un burlete de goma) se colocó una tapa de cartón para aislar mejor el aparato. Tiene las siguientes ventajas: constancia de temperatura, capacidad (pueden efectuarse simultáneamente 50 cromatogramas), altura (permite muy buenas separaciones de mezclas complejas de aminoácidos), observación del progreso del cromatograma y lectura de temperatura sin necesidad de abrir el aparato, manejo muy sencillo de los papeles al papel merles y sacarico. Las desventajas son: la necesidad de enlucir y pintar el cajón periódicamente (cada 2 meses aproximadamente) y por supuesto la que va aparejada a la ventaja de la mayor longitud del papel, el tiempo (a 12°C 2½ días para que el solvente recorra 45 cm).

El aparato para "cromatografía descendente" resultó útil para separar regular número de sustancias ya que la longitud aprovechable es sólo 20 cm. Es difícil colocar y quitar las tiras y además hay variación de temperatura. Pueden realizarse simultáneamente 4 cromatogramas.

Los aparatos utilizados para "cromatografía circular" son desecadores con tapa bombé, excepto el más pequeño que está constituido por dos cristalizadores grandes cerrados transversalmente para suprimir el piso. Pueden efectuarse en cada aparato 4 cromatogramas simultáneamente. La cromatografía circular resultó muy ventajosa por la rapidez. Con los desecadores más grandes pudieron separarse muy bien los aminoácidos de las fracciones más complejas en 4 a 5 horas. El más pequeño se usó solamente para testigos y los de tamaño intermedio para los hidrólisis de fracción I (7 aminoácidos).

Terminada la separación se colocaban los papeles en bastidores de madera para el secado y revelado.

Fenol: Whatman 1 saturado con agua-solvente.

Solventes: Se utilizaron dos sistemas:

Fenol-agua hidestilada

El fenol pre-análisis (Merck o Analar) se agita con agua hidestilada en ampolla de decantación y se deja en la ampolla unos 3 días para asegurar el equilibrio entre las fases.

Sistema de Partridge

Butanol normal 40%, ácido acético 10%, y agua hidestilada 50%. Se empleó butanol destilado, agua hidestilada y ácido acético analítico o purificado por enfriamiento a 5°C (para separar el agua) y destilación.

Se adoptó preferentemente este sistema como solvente pues con la cistina y cisteína, el desarrollo del cromatograma es más rápido y no hay que manejar sustancias tan efusivas como el fenol.

Revelador: ninhidrina 0.2% en butanol normal destilado. Para los cromatogramas de hidrolizados alcalinos se empleó la solución mencionada diluida al medio con ácido acético 10%.

Técnica: Se empleó la técnica standard efectuando simultáneamente cromatogramas de soluciones de aminoácidos como testigos. Los Rf de los aminoácidos puros utilizados en las soluciones de comparación, se determinaron previamente e simultáneamente en soluciones conteniendo un solo aminoácido cada una. Los aminoácidos que aparecen como "no identificados" son los que no tienen Rf comparable a ninguno de los testigos utilizados; esto no significa que sean desconocidos sino que no se dispuso de toda la serie de aminoácidos para testigos. En la misma tira o hoja se efectuaban cromatogramas de hidrolizados ácidos, alcalinos y de solución de triptófano en butanol e isopropanol.

Una de las soluciones testigo utilizadas fue la siguiente:

Aminoácido	Rf en Partridge a 14°C
cisteína	0.029
cistina	0.035
lisina	0.110
serina	0.203
alanina	0.302
metionina	0.304
leucina	0.300

Las manchas obtenidas con los hidrolizados se compararon con las de testigos de concentración conocida. La comparación se realizó por planimetría de las manchas. Como este método, de como cuantitativo en algunos textos, tiene muchas causas de error, nos hemos limitado a dar una idea de la cantidad de los aminoácidos presentes (abundante, regular, escasa, etc.).

Lista de aminoácidos usados como testigos:

Cisteína, cistina, histidina, arginina, lisina, serina, ácido aspártico, treonina, alfa alanina, glicocola, ácido glutámico, prolina, beta alanina, metionina, tirocina, isoleucina, leucina, valina, triptófano, fenilalanina.

A continuación, como ejemplo, se transcribe uno de los ensayos efectuados:

Ensayo N° 41: Fracción V de suero de Raza microps

Hidrolizado ácido N° 17

Hidrolizado alcalino N° 17 (para investigar triptófano)

Cromatografía ascendente (en caja) en sistema Partridge.

Desplazamiento del solvente: 47 cm

Tiempo: 36 horas

Temperatura: 12°C

Testigos:

Solución 1: cisteína-cistina-lisina-serina-treonina-alfa alanina-prolina-metionina-isoleucina-leucina

Solución 2: histidina-arginina-ác. aspártico-glicocola-ác. glutámico-beta alanina-tirocina-valina-fenilalanina.

Solución 3: triptófano en alcohol isopropílico.

Resultados:

Hidrolizado alcalino: aparece una mancha roja cuyo Rf es 0.538 coincidente con el del triptófano.

Estimación de la cantidad regular ↔

Hidrolizado ácido:

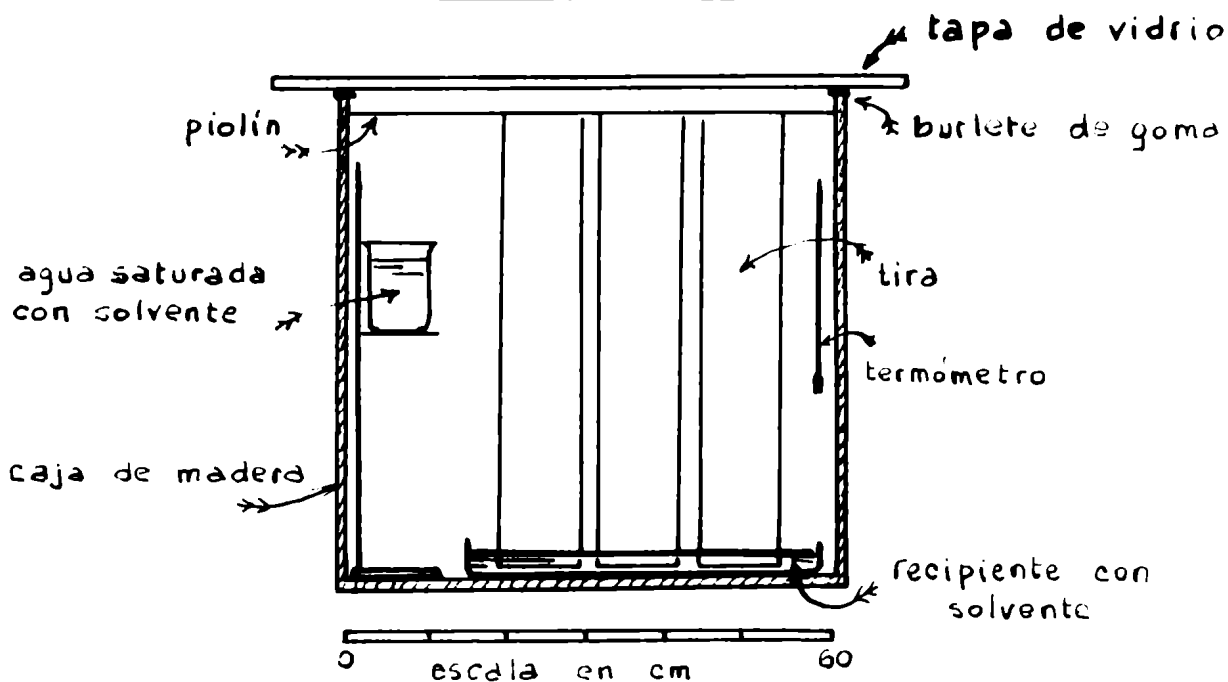
<u>Rf</u>	<u>aminoácido</u>	<u>cantidad</u>
0.100	histidina	++
0.129	arginina	++
0.168	? C	++
0.201	serina	++
0.228	? D	++
0.245	ác. aspártico	+++
0.260	treonina	++
0.313	? E	++
0.326	glicocola	++
0.338	ác. glutámico	+++
0.343	prolina	++
0.478	isoleucina	++
0.498	leucina	++
0.671	fenilalanina	++

Según estos resultados las proteínas de la Fracción V están formadas por 15 aminoácidos: 12 identificados por coincidencia de los Rf con los de las soluciones testigos (que por supuesto han sido determinadas previamente una por una), y 3 no identificados; de los últimos solo podemos decir que son: cisteína-cistina-lisina-alfaalanina-metionina-beta alanina-tirosina-valina.

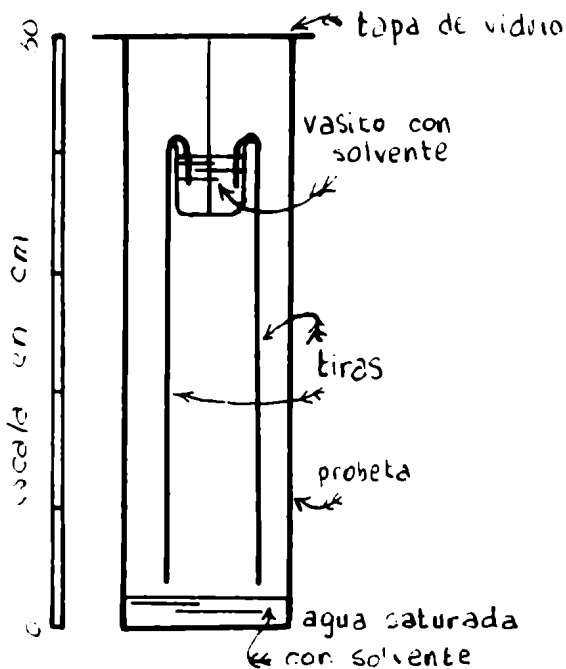
-
- (12): "Fundamentals of Chromatography", James Cassidy K. Ed. A. Weisberger, 1957.
- (13): "Chromatography", Gruner F., 1954.
- (14): "Chromatografía en Carta", Savoia Franco. Ed. Hoeppli, 1953.
- (15): "Papierschromatographie und Dünnschichtchromatographie", Ed. E. March, A.G. Darmstadt, 1959.

DISPOSITIVOS PARA CROMATOGRAFÍA SOBRE PAPEL

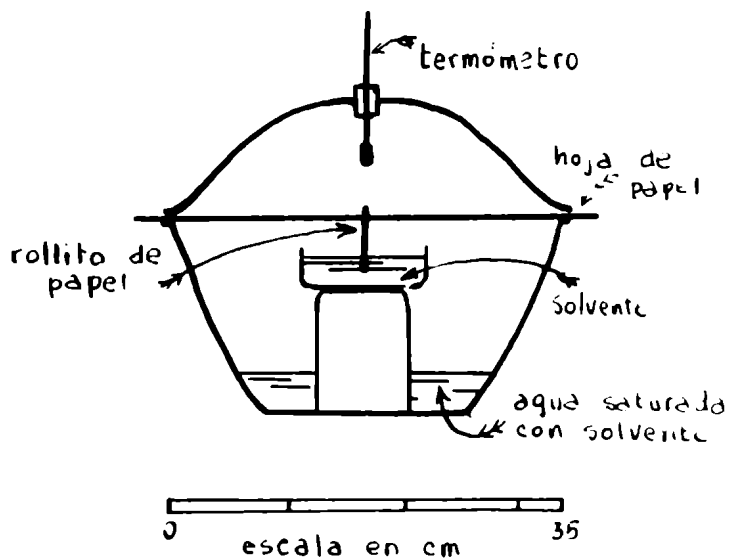
ASCENDENTE



DESCENDENTE



CIRCULAR



4) DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO DE CADA FRACCION

Se emplea la tercera técnica descrita en II.2 para aislar las fracciones proteicas. Mientras se efectúa la tinción de la tira angosta se mantiene el resto del papel en ambiente saturado de humedad. A cada tubo conteniendo una fracción proteica se agrega 0.5 ml de agua destilada y se deja una media hora para que se produzca la elución. Puede repetirse el agregado de 0.5 ml de agua destilada.

Para determinar el Punto Isoeléctrico se efectuaron electroforesis de cada dilución en buffers de versnal ácido-ácido electrolítico de distintos pH.

Se tomó como Punto Isoeléctrico el pH al cual la fracción no migra o migra muy poco (0.2-0.3 cm) en forma equitativa hacia el ánodo o el cátodo indistintamente.

PARTE II

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

PARTI II

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1. OXEOSCIUM STRIATUS (pescadilla)

1.1) CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS

4,47 \pm 0,47 gr en 100 ml de suero

Para resultados individuales de 173 observaciones ver Tabla 1.

1.2) FRACCIONAMIENTO DE PROTEINAS SERICAS

Electroforesis sobre papel: En buffer de veronal-veronal ácido de pH 8.6 y fuerza iónica 0.05 se obtuvieron 6 fracciones desplazadas hacia el ánodo: I, II, III, IV, V y VI, en orden creciente de movilidad.

Se efectuaron 173 fraccionamientos. En 60 casos se efectuó aluación o densitometría del electroforetograma y planimetría de las curvas obtenidas. Ver Tablas 2 y 3. Los resultados generales se resumen en el Cuadro 1.

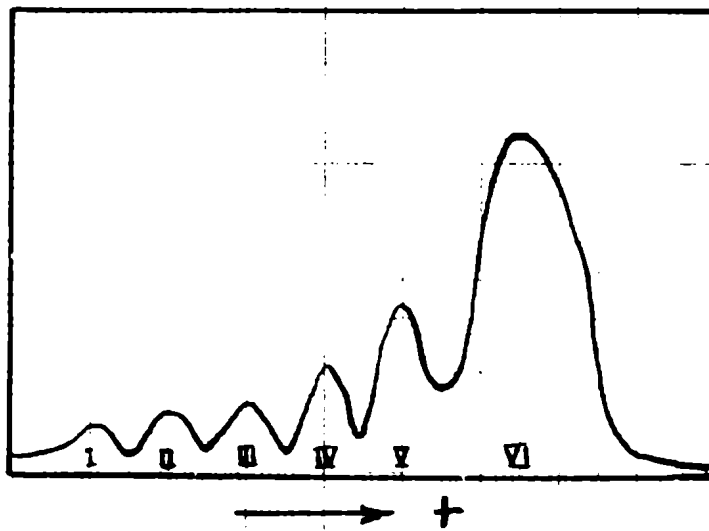
CUADRO 1

PORCENTAJE Y CONCENTRACION DE CADA FRACCION

<u>Fracción</u>	<u>Porcentaje</u>	<u>gr en 100 ml suero</u>
I	7.0 \pm 0.9%	0.11 \pm 0.02
II	10.2 \pm 1.2%	0.48 \pm 0.06
III	11.5 \pm 1.1%	0.95 \pm 0.09
IV	14.0 \pm 0.8%	0.66 \pm 0.07
V	18.8 \pm 1.8%	0.87 \pm 0.11
VI	38.5 \pm 3.1%	1.80 \pm 0.08

CYNOSCIUM STRIATUS

FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS SERICAS POR ELECTROFORESIS



ENSAYO N° 56

TIEMPO 4h 50 min

INTENSIDAD 4 - 4.4 mA

DESPLAZAMIENTO MÁX. 9cm

SE EFECTUÓ DENSITOMETRÍA

Método de Hays: Las diferencias de solubilidad en sulfato de sodio 22.2 gr%, separé las proteínas séricas en dos grupos: fracción soluble (FS) y fracción insoluble (FI).

La concentración de FI se halló por diferencia entre la de proteínas séricas totales (PT) y la de FS. Los resultados de 10 determinaciones figuran en el Cuadro 2.

Por electroforesis de la fracción soluble (previa diálisis y concentración al vacío) se encontró que está constituida por las fracciones I y VI, por consiguiente la parte insoluble contiene las fracciones II, III, IV y V.

Analizaré estos resultados en 1.3 a la luz de otros análisis complementarios.

CUADRO 2

CONCENTRACION DE LAS FRACCIONES

<u>ENSAYO N°</u>	<u>gr% P.T.</u>	<u>gr% F.S.</u>	<u>gr% F.I.</u>
1	4.68	2.00	2.68
2	4.15	2.00	2.15
3	5.00	2.50	2.50
4	4.26	1.90	2.36
5	4.32	2.20	2.12
6	4.60	2.10	2.50
7	4.28	1.90	2.38
8	4.40	2.00	2.40
9	4.84	2.40	2.44
10	4.50	2.10	2.40

P.T.: Proteínas totales

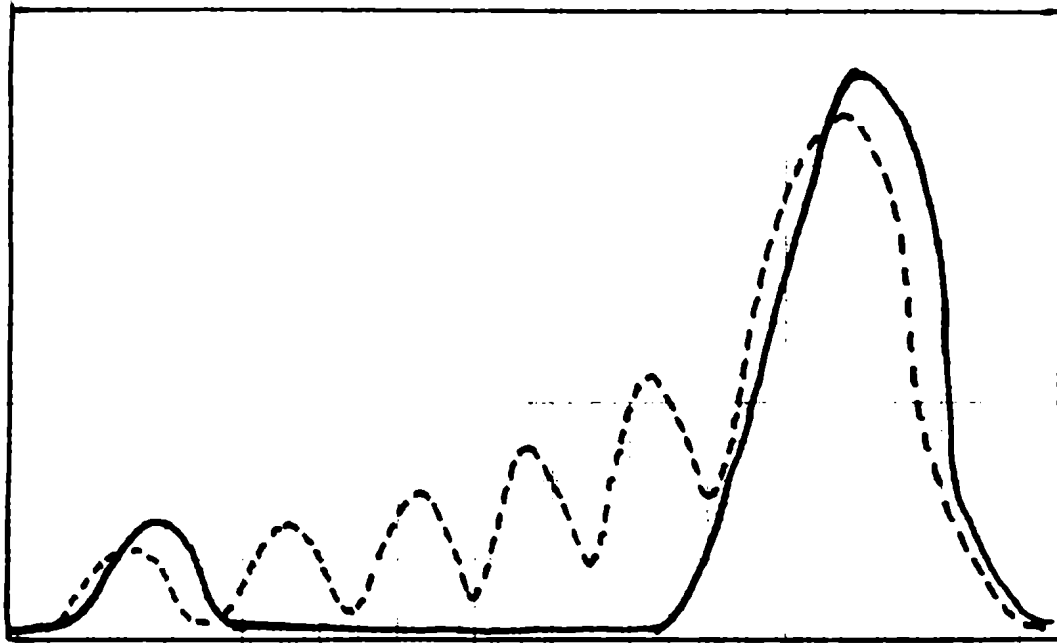
F.S.: Fracción soluble

F.I.: Fracción insoluble

La concentración promedio de fracción soluble es 2.13 gr^s y la de insoluble 2.56. La suma de las concentraciones promedio de Fracción I y Fracción VI es 2.13 y la suma de las concentraciones promedio de II, III, IV y V es 2.41 (ver Cuadro 1 en pág. 20) lo que confirma el diagrama electroforético de la fracción soluble.

CYNOSCIUM STRIATUS

ELECTROFORESIS DE LA FRACCIÓN SOLUBLE EN SO_4Na_2 22,2 gr%



SCALA

1cm

ENSAYO N° 6

TIEMPO: 4h 30m

INTENSIDAD: 4.4 mA

DESPLAZAMIENTO MÁXIMO: 9.2 cm

SE EFECTUÓ DENSITOMETRÍA

— ELECTROFORESIS DE LA FRACCIÓN SOLUBLE

---- ELECTROFORESIS DEL SUERO, EFECTUADA EN LA MISMA TIRA, SIMULTÁNEAMENTE

1.3) ANALISIS DE CADA FRACCION

FRACCION I:

Es la de menor movilidad en la migración electroforética. Es la que se encuentra en menor cantidad en el suero: aproximadamente 7,0%. Su concentración media es $0,13 \pm 0,02$ gr en 100 ml de suero. Es soluble en sulfato de sodio 22.2%. Es la única fracción con características puramente proteicas, es decir, no se trata de lipoproteínas ni glicoproteínas. Es el único caso, en este trabajo, en que se ha podido comprobar que no se trata de una sola proteína: por electroforesis de la fracción I aislada, en buffers de pH entre 2 y 7, se han obtenido dos sub-fracciones, a y b. El valor de 7.4 que damos al Punto Isoeléctrico de la mezcla de a y b, cuyos P.I. individuales deben ser, por supuesto, muy próximos. En el Cuadro 3 se resumen los resultados del comportamiento de la Fracción I en la electroforesis a distintos pH.

La cromatografía de hidrolizados de Fracción I indica que está compuesta solamente por 7 aminoácidos: cisteína, cistina, histidina y arginina, (estos 4 en abundante cantidad), ácido aspártico, glicocola y metionina, en cantidad regular. Estos son los resultados de 6 cromatogramas ascendentes en fenol-agua y de 8 ascendentes y 5 circulares en el sistema de Partridge.

CUADRO 1

ELECTROFORESIS DE LA FRACCIÓN I A DISTINTOS pH

<u>pH</u>	<u>—</u>	<u>Reservado en cm.</u>	<u>N° de ensayos</u>	<u>Observaciones</u>
2	-	a: 6.2 b: 8-8.2	2	
3	-	a: 5-5.2 b: 6.8-7	4	
4	-	a: 4-4.1 b: 5.5	2	
5	-	a: 4 b: 5.5-5.7	2	
6	-	a: 2.7-2.8 b: 3.9-4	2	
7	-	a: 0.6-1 b: 1-1.6	2	En dos casos se obtu- vo 1 sola mancha.
7.4	+	0-0.3	2	1 sola fracción
8	+	0.6-0.9	4	1 sola fracción
9	+	0.8-0.9	4	1 sola fracción
9.6	+	0.9-1.1	4	1 sola fracción

La flecha indica desplazamiento hacia el signo que figura en la columna.

En el caso de esta peculiar Fracción I no podemos encontrar analogías con ninguna de las fracciones proteicas del suero humano. Por su Punto isoelectrico, solubilidad y composición en aminoácidos, aventuramos la hipótesis de que se trata de una histona muy simple. Por los cualitativamente escasos aminoácidos que la componen se asemejaría a una proteína, pero no es tan básica y además las proteínas conocidas no contienen azufre a diferencia de la Fracción I que tiene cistina, cisteína y metionina.

FRACCIÓN II:

Se encuentra en el suero en la preparación de 10.2 ± 1.2 . Su concentración es 0.48 ± 0.06 gr \pm 0.06 en 100 ml. Es insoluble en sulfato de sodio 22.2% por lo que se puede incluir en el grupo de las globulinas. Se trata de lipoproteínas e de una mezcla de proteínas simples y lipoproteínas. El Punto Isoeléctrico es 5.8 a 5.9 (otra característica semejante a la de las globulinas del suero humano).

La Fracción II está compuesta por 14 aminoácidos: histidina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico en cantidades abundantes; lisina, serina, alfa alanina y prolina en cantidades regulares; muy escasa cantidad de glicocola, leucina y triptófano, y 3 aminoácidos no identificados (G, D y E) cuyos Rf en el sistema Partridge a 14°C (acetato) son:

G: 0.169

D: 0.228

E: 0.117

Debemos señalar que la calificación "no identificados" no tiene otro sentido en este trabajo más que el de aminoácidos cuyos Rf no coinciden con los aminoácidos usados como testigos.

Los resultados expuestos son los de 5 cromatogramas ascendentes y 5 descendentes gliceral-agua y 9 ascendentes y 5 circulares en sistema Partridge.

El valor del Punto Isoeléctrico resulta de 15 ensayos realizados a pH 4, 5, 5.8 y 6.

FRACCION III:

Porcentaje: $11,5 \pm 1,3$

Concentración: $0,55 \text{ gr} \pm 0,09$ en 100 ml de suero.

En insolubilidad en sulfato de sodio 2N.3% y su Punto Isoeléctrico 5.6, permiten clasificarla como globulina. Es también lipoproteína o mezcla de proteínas simples y lipoproteínas. Está compuesta por 14 aminoácidos: arginina, ácido aspártico y ácido glutámico y lisina en cantidad abundante; histidina, treonina, alfa alanina, prolina, metionina y triptófano en cantidad regular, y 4 aminoácidos no identificados, A, B, C, y F cuyos Rf a 14°C en el sistema de Partridge son:

A: 0.075

B: 0.090

C: 0.160

F: 0.500

En esta fracción así como en la II, IV, V y VI se encuentran algunos de los aminoácidos no identificados que hemos llamado A, B, C, D, E y F. Lo único que podemos asegurar con respecto a estas sustancias es que no son ninguno de los 20 aminoácidos

utilizados como testigos, a saber: cisteína, cistina, histidina, arginina, lisina, serina, ácido aspártico, treonina, alfa alanina, glicocola, ácido glutámico, prolina, beta alanina, metionina, tirocina, isoleucina, leucina, valina, triptófano y fenilalanina.

Para averiguar la composición en aminoácidos en el caso de la Fracción III se efectuaron 5 cromatogramas descendentes en fenol-agua y 9 ascendentes y 5 circulares en el sistema de Partridge.

Para averiguar el Punto Isoeléctrico se efectuaron 12 electroforogramas a pH 4, 5, 5.6, y 6.

FRACCIÓN IV:

Porcentaje: $14,0 \pm 0,8$

Concentración: $0,66 \text{ gr} \pm 0,07$ en 100 ml de suero.

Es insoluble en sulfato de sodio 22.2% y tiene un Punto Isoeléctrico de 5.3, lo que permite ubicarla entre las globulinas. Es la fracción que da la reacción más intensa propia de lipoproteínas.

Está compuesta por 14 aminoácidos: predominantemente ácido aspártico, ácido glutámico y treonina; en cantidad regular lisina, alfa alanina y triptófano; en muy escasa cantidad, cisteína, arginina y metionina; 5 aminoácidos no identificados A, B, C, E y F cuyos Rf en Partridge a 14°C son:

A: 0.075

B: 0.090

C: 0.109

E: 0.317

F: 0.520

Se efectuaron 4 cromatogramas ascendentes en fenol-agua y 9 ascendentes y 5 circulares en sistema Partridge. Para determinar el Punto Isoeléctrico se realizaron 14 ensayos a pH 3.4, 5, 5.3, 5.6 y 6.

FRACCIÓN V:

Es la fracción más abundante de las que forman el insoluble en el fraccionamiento salino con sulfato de sodio 22.2%.

Constituye el 18,8% \pm 1,8 de las proteínas séricas. Su concentración es 0,87 gr \pm 0,11 en 100 ml de suero.

Es probablemente una mezcla de proteínas simples y lipoproteínas pues la reacción característica de estas últimas es débil. Su Punto Isoeléctrico es 5.8; por esto y por la insolubilidad en sulfato de sodio 22.2% la incluimos en el grupo de las globulinas.

La cromatografía del hidrolizado revela 13 aminoácidos: en abundante cantidad, histidina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico; en cantidad regular, serina, treonina, glicocola, prolina, leucina y triptófano, y 3 aminoácidos no identificados C, D y E.

Se efectuaron 4 cromatogramas ascendentes en fenol-agua y 9 ascendentes y 5 circulares en Partridge.

Para determinar el Punto Isoeléctrico se efectuaron 20 ensayos a pH 2, 3, 4, 5 y 6.

FRACCIÓN VI:

Es la que se encuentra en mayor cantidad en el suero.

Porcentaje: 38,5 \pm 3,1

Concentración: 1,80 gr \pm 0,08 en 100 ml de suero.

Es soluble en sulfato de sodio 22.2% y tiene un Punto Isoeléctrico de 4.4, por lo que presenta características semejantes a las albúminas. La analogía con la albúmina del suero humano se mantiene pues es la fracción más móvil y la más abundante. Es una glicoproteína o mezcla de proteínas simples y glicoproteínas.

Está compuesta por 13 aminoácidos: ácido glutámico y ácido aspártico en gran cantidad; en cantidad regular, histidina, arginina, treonina, prolina, metionina y leucina; y 5 aminoácidos no identificados, A, B, C, D y E.

Se efectuaron 6 cromatogramas ascendentes en ímol-agua y 9 ascendentes y 5 circulares en Partridge.

Para determinar el Punto Isoeléctrico se realizaron 18 ensayos a pH 2, 3, 4, 4.4, 4.6 y 5.

COMPARACION ENTRE FRACCIONES:

Ver Cuadros 1, 2, 4 y 5.

CUADRO 4

<u>Fracción</u>	<u>P.I.</u>	<u>Fracionamiento en sulfato de sodio 2%</u>	<u>Clasificación</u>
I	7.4	soluble	Proteínas simples Histonas
II	5.8	insoluble	Lipoproteínas Globulinas
III	5.6	insoluble	Lipoproteínas Globulinas
IV	5.3	insoluble	Lipoproteínas Globulinas
V	5.0	insoluble	Lipoproteínas Globulinas
VI	4.4	soluble	Glicoproteínas Albuminas

P.I.: Punto isoelectrico.

Clasificación: Las fracciones que no están constituidas por proteínas simples pueden ser una mezcla de proteínas simples y conjugadas. Lo más que podemos afirmar es que las fracciones II, III, IV y V "contienen" lipoproteínas y la VI "contiene" glicoproteínas.

CUADRO 2

AMINOACIDOS OBTENIDOS POR HIDROLISIS DE CADA FRACCION

<u>AMINOACIDO</u>	<u>Frac. I</u>	<u>Frac. II</u>	<u>Frac. III</u>	<u>Frac. IV</u>	<u>Frac. V</u>	<u>Frac. VI</u>
Cisteina	+++			+		
Cistina	+++					
Histidina	+++	+++	++		+++	++
Arginina	+++	+++	+++	+	+++	++
Lisina		++	+++	++		
Serina		++			++	
Ac. Aspártico	+	+++	+++	+++	+++	+++
Treonina			++	+++	++	++
Alfa Alanina		++	++	++		
Glicocola	+	+			++	
Ac. Glutámico		+++	+++	+++	+++	+++
Prolina		++	++		++	++
Beta Alanina						
Metionina	+		++	+		++
Pirrocina						
Isoleucina						
Leucina		+			++	++
Valina						
Triptófano		+	++	++	++	
Fenilalanina						
A(Rf 0.075)			+	++		+
B(Rf 0.090)			+	+		+
C(Rf 0.169)		++	+	+	+	+
D(Rf 0.228)		++			+	+
E(Rf 0.317)		++		+	+	+
F(Rf 0.520)			+	++		

+++: abundante cantidad

++: regular cantidad

+: escasa cantidad

Los Rf de A, B, C, D, E y F que figuran en el cuadro están medidas en sistema Partridge a 14°C.

1.4) RELACION ENTRE ALTERNANCIAS Y SINGULARES

De los resultados que figuran en el Cuadro 4, concluimos que

$$\frac{\Delta}{\sigma} = \frac{VI}{II + III + IV + V} =$$

$$\frac{\Delta}{\sigma} = 0.70$$

1.5) LÍPIDOS EN ALGUNOS SUEROS DE ASPECTO PATOLÓGICO

Entre unas 200 muestras de sangre de *Cynoscion striatus* y 150 de todos los peces estudiados, se encontró en 5 sueros de *Cynoscion striatus* una opalescencia tan marcada que hizo pensar que las sangres contenían gran cantidad de lípidos. En 3 muestras en esas condiciones (concentradas con intervalos de meses) se efectuó una valoración gruesa por el método nefelométrico de HLOER que dió como resultados entre 0.9 y 1.0 gr % de lípidos en suero. El mismo método aplicado a un pool de sueros normales de peces de la misma especie dió como resultado 0.1 gr % de lípidos, aproximadamente.

2. RAYA MICROPS

2.1) CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS

6.41 ± 0.44

Ver en Tabla 4 los resultados de 135 determinaciones.

2.2) FRACCIONAMIENTO DE PROTEINAS SERICAS POR ELECTROFORESIS SOBRE PAPEL

Por electroforesis del suero en buffer de veronal-veronal ácido de pH 8.6 y fuerza iónica 0.05, se obtuvieron 6 fracciones, I, II, III, IV, V y VI, en orden creciente de movilidad, desplazadas hacia el cátodo.

Se efectuaron 135 fraccionamientos. En 40 electroferetogramas se efectuó elución e densitometría y planimetría de las curvas obtenidas, con los siguientes resultados resumidos en el Cuadro 6. Ver Tablas 5 y 6.

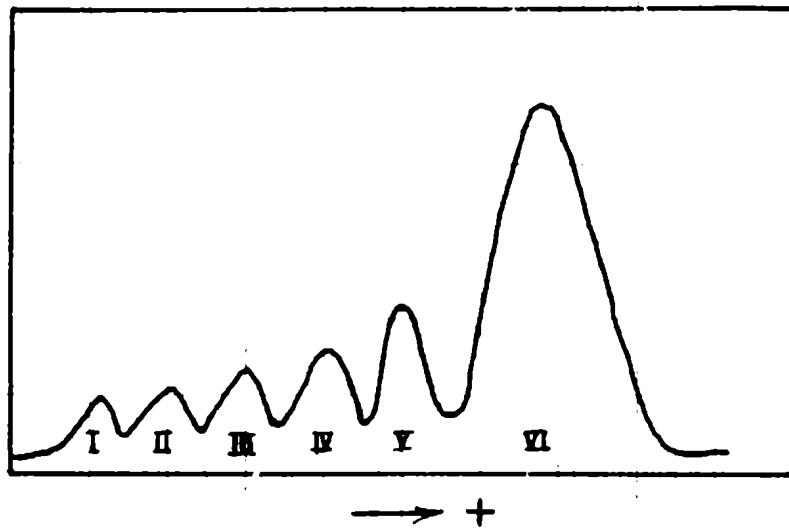
CUADRO 6

PORCENTAJE Y CONCENTRACION DE CADA FRACCION

<u>Fracción</u>	<u>Porcentaje</u>	<u>mg. en 100 ml. suero</u>
I	7.9 ± 0.7	0.49 ± 0.03
II	10.5 ± 1.3	0.66 ± 0.20
III	11.9 ± 1.1	0.75 ± 0.05
IV	13.9 ± 0.7	0.87 ± 0.03
V	18.0 ± 1.1	1.13 ± 0.20
VI	37.6 ± 2.4	2.35 ± 0.10

RAYA MICROPS

FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS SÉRICAS POR ELECTROFORESIS



ENSAYO Nº 38

TIEMPO 4 h 30 min

INTENSIDAD 4 mA

DESPLAZAMIENTO MAX 9.2 cm

SE EFECTUÓ DENSITOMETRÍA

2.3) ANALISIS DE CADA FRACCION

FRACCION I: Es la menos abundante. Constituye el 7.9% de las proteínas séricas (0.49 gr \pm 0.03). Está constituida por 7 aminoácidos: en abundante cantidad se encuentran cisteína, cistina, histidina y arginina; en cantidad regular, ácido aspártico, glicocola y metionina. Es decir, la composición del hidrolizado es igual al de la Fracción I del *Cynoscium Striatum*. Se efectuaron 4 cromatogramas ascendentes y 4 circulares en sistema de Partridge.

FRACCION II: 10.5% \pm 1.3 de las proteínas séricas.

Su concentración media es 0.66 gr \pm 0.20 en 100 ml de suero. Los cromatogramas de hidrolizados de esta fracción revelan 15 aminoácidos: en abundante cantidad, histidina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico; en cantidad regular, lisina, serina, alfa alanina, glicocola, prolina, isoleucina, leucina, y 3 aminoácidos no identificados, E, G y D; en cantidad muy escasa aparece triptófano.

G, D y E son los mismos que aparecen en la fracción II del *Cynoscium striatum*. Aparece isoleucina que no hay en la fracción II del *Cynoscium* pero el resto de la composición es igual. Se efectuaron 4 cromatogramas ascendentes en sistema de Partridge.

FRACCION III: Constituye el 11.9% \pm 0.7 de las proteínas. Se encuentra en la concentración de 0.75 gr % en el suero.

Hay 15 aminoácidos presentes en los hidrolizados: en cantidad abundante se encuentran histidina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico; muy escasa lisina y regular cantidad de treonina, alfa alanina, prolina, metionina, triptófano y 5 amino-

ácidos no identificados, A, B, C, F y G. G es un aminoácido no identificado que no aparece en ninguna de las fracciones de Gynossium. Aparece valina y no aparece E (presente en F. III de Cy. str.) Se efectuaron 4 cromatogramas ascendentes en Partridge.

FRACCION IV: Es el 13,9% \pm 0,7 de las proteínas séricas.

Cuatro cromatogramas ascendentes en sistema Partridge de hidrolizados de esta fracción, revelan 15 aminoácidos: en cantidad abundante se encuentran lisina, ácido aspártico, treonina y ácido glutámico; cisteína en muy escasa cantidad, y regular cantidad de arginina, alfa alanina, metionina, valina, triptófano y 5 aminoácidos no identificados, A, B, C, F y G. El Rf de G en Partridge a 14°C es 0.550.

Con excepción de G, el resto es igual al de la fracción IV del Gynossium.

FRACCION V: Constituye el 10% \pm 1.1 de las proteínas séricas.

Cuatro cromatogramas ascendentes en Partridge revelan 15 aminoácidos: en cantidad abundante ácido aspártico y ácido glutámico; en cantidad regular histidina, arginina, serina, treonina, glicocola, prolina, isoleucina, leucina, triptófano, fenil alanina y 3 aminoácidos no identificados, G, D y E. Isoleucina y fenil alanina son los dos aminoácidos "extra" que aparecen en esta fracción con respecto a la Fracción V del Gynossium.

FRACCION VI: Es la más abundante; $37,6\% \pm 2,4$ de las proteínas séricas, y la de mayor movilidad.

La cromatografía de los hidrolizados (4 cromatogramas ascendentes en Partridge) revela 15 aminoácidos: abundante cantidad de ácido aspártico y ácido glutámico y regular cantidad de histidina, arginina, treonina, prolina, metionina, leucina, valina, fenil alanina y 5 no identificados, A, B, C, D y E.

Valina y fenil alanina son los dos aminoácidos en exceso con respecto a la Fracción VI del *Cynosium*.

Comparación entre las fracciones:

Ver Cuadros 6 y 7.

2.4) RELACION ENTRE ALBUMINAS Y GLOBULINAS

Debido a la similitud entre fracciones correspondientes de Gy. str. y Raya ni. calculamos A/B en la misma forma:

$$\frac{A}{B} = \frac{VI}{II + III + IV + V} = 0,20$$

CUADRO I

AMINOACIDOS OBTENIDOS POR HIDROLISIS DE CADA FRACCION

<u>Aminoácido</u>	<u>Frac. I</u>	<u>Frac. II</u>	<u>Frac. III</u>	<u>Frac. IV</u>	<u>Frac. V</u>	<u>Frac. VI</u>
Cisteína	+++			+		
Cistina	+++			-		
Histidina	+++	+++	+++		++	++
Arginina	+++	+++	+++	++	++	++
Lisina	---	++	+	+++	---	---
Serina		++	-	---	++	
Ac. Aspártico	++	+++	+++	+++	+++	+++
Treonina	---	---	++	+++	++	++
Alfa Alanina		++	++	++	---	---
Glicocola	++	++	---	---	++	
Ac. Glutámico		+++	+++	+++	+++	+++
Prolina		++	++	---	++	++
Beta Alanina		---	---		---	---
Metionina	++		++	++		++
Tirosina			---	---		---
Isoleucina		++			++	
Leucina		++			++	++
Valina		---		++	---	++
Triptófano		+	++	++	++	---
Fenilalanina			---	-	++	++
A(Rf 0.075)			+	+	---	+
B(Rf 0.089)			++	+		+
C(Rf 0.168)		++	+	+	++	+
D(Rf 0.227)		++	-	-	++	++
E(Rf 0.313)		++			++	+
F(Rf 0.518)		---	++	+	---	-
G(Rf 0.550)			+	++		

+++ : abundante cantidad

++ : regular cantidad

+ : escasa cantidad

Rf de A, B, C, D, E, F, G que figuran en el cuadro medidos a 12°C en sistema Partridge.

3. COMPARACION ENTRE GYNOSCIUM STRIATUM Y RAYA MICROPS

En II.1 y en II.2 hemos expuesto los resultados obtenidos en los análisis del suero de *Gynoscium striatum* y *Raya microps*. Corresponde ahora comparar estos resultados, cuando es posible puesto que el *Gynoscium* fue estudiado más completamente que la *Raya*.

La *Raya* tiene una concentración de proteínas séricas mayor que el *Gynoscium*.

Suero de ambas especies sometidos a la electroforesis sobre papel separan sus proteínas en 6 fracciones desplazadas hacia el ánodo. Las fracciones respectivas tienen semejante movilidad y se encuentran en la misma proporción. En rasón de este último, A/G es aproximadamente el mismo.

La cromatografía de los hidrolizados revela una mayor complejidad en las fracciones proteicas de la *Raya microps*, con excepción de la Fracción I; las demás fracciones tienen mayor número de aminoácidos componentes y aparecen algunos (valina, G, isoleucina y fenilalanina) que están ausentes en el *Gynoscium*. Es de hacer notar que en ninguna de las especies aparece tiroxina.

Ver Cuadro 3.

CUADRO 8

COMPARACION ENTRE CYNOSCIVUS STRIATUS Y RAYA NIGRETA

	<u>Cynoscivus</u> <u>striatus</u>	<u>Raya</u> <u>nigreta</u>
Proteínas séricas gr %	4.47 ± 0.47	6.41 ± 0.44
% Fracción I	7.0 ± 0.9	7.9 ± 0.7
% Fracción II	10.2 ± 1.2	10.5 ± 1.3
% Fracción III	11.5 ± 1.3	11.9 ± 1.1
% Fracción IV	14.0 ± 0.8	13.9 ± 0.7
% Fracción V	18.3 ± 1.8	18.0 ± 1.1
% Fracción VI	38.5 ± 3.1	37.6 ± 2.4
A/G	0.70	0.69
Aminoácidos de F I	7	7 (los mismos Cy.st.)
" " F II	14	15 (aparece isoleucina, lo demás igual)
" " F III	14	15 (aparece G; lo demás igual)
" " F IV	14	15 (no tiene H. Aparecen G y valina)
" " F V	13	15 (aparecen isoleucina y fenilalanina)
" " F VI	13	15 (aparecen valina y fenilalanina)

4. CONCLUSIONES

Antes de exponer las conclusiones se quiere señalar que cuando se habla de acuerdo o desacuerdo con otros autores no es refiriéndose a los datos particulares del Gy. str. y R. ni. sino a las generalizaciones hechas por quienes han estudiado otros peces.

De los resultados expuestos podemos sacar las siguientes conclusiones para estos peces:

1°) La cantidad de proteínas séricas (en un estrecho rango), el número de fracciones proteicas separadas por electroforesis, sus concentraciones, movilidades, signos, puntos isoelectricos y composición cualitativa en aminoácidos, son respectivamente iguales para ejemplares de una misma familia.

2°) En ejemplares de distintas familias, la concentración de proteínas séricas es distinta sin que llegue a ser un dato característico. La probabilidad es pequeña pero pueden encontrarse Gy. str. con concentración de R. ni y viceversa.

En el caso de las fracciones proteicas se encuentra una diferencia característica solo en el número de aminoácidos correspondientes a las fracciones II, III, IV, V y VI de uno y otro pez.

3°) No se encuentra variación significativa en el valor de A/G en ambos pescos. Si, al igual que los autores Field y col. (4) y Frieden y col.(5) hubiéramos considerado como globulinas a todas las fracciones excepto la de mayor movilidad, habríamos obtenido para ambos pescos el mismo valor: 0.62.

Al comparar estas conclusiones con algunos trabajos mencionados en la INTRODUCCION, se ve que hay coincidencia en el punto primero con Deutsch y Mo Shan (2), pero en el punto segundo se difiere con los mismos autores en que no todas los datos iguales son característicos.

También hay desacuerdo con los autores Frieden y col. (5) pues se encuentra una variación consistente entre las fracciones proteicas II, III, IV, V, y VI correspondientes.

5. ALGUNOS RESULTADOS EN OTROS PECES Y COMPARACION CON GYNOSSIUM STRIATUS Y RAYA MICROPS

Hay pocos análisis fueron efectuados en muestras de otras especies, pero pueden resultar interesantes a la luz de los obtenidos con el *Gynossium striatus* y la Raya *microps*.

5.1) Para *Lichthys brasiliensis* (languido)

Concentración de proteínas séricas: El promedio de 3 determinaciones da $2.16 \text{ gr} \pm 0.14$ en 100 ml de suero.

Ver Tabla 7.

Fracionamiento por electroforesis: La electroforesis del suero en buffer de veronal-veronal ácido de pH 8.6 dió 5 fracciones desplazadas hacia el ánodo. Se hicieron 8 fraccionamientos, en 5 de los cuales se efectuó elución y planimetría de las curvas para averiguar el porcentaje y cantidad de cada fracción (Ver Tablas 8 y 9). Los resultados se resumen en el siguiente cuadro.

CUADRO 8

<u>Fración</u>	<u>Porcentaje</u>	<u>Concentración en suero</u>
I	8.1 ± 1.2	0.17
II	10.5 ± 0.8	0.23
III	12.2 ± 1.3	0.27
IV	18.7 ± 1.2	0.41
V	30.4 ± 2.6	1.08

5.2) OTROS PECES

La electroforesis sobre papel en buffer de veronal-veronal sódico de pH 8.6 de los siguientes sueros:

- 2 de *Mugil brasiliensis* (lisa)
- 2 de *Percophis brasiliensis* (palo)
- 1 de *Brophycis brasiliensis* (brétola)
- 3 de *Micropogon sp.* (cervina)
- 3 de *Galaxias Canis* (gatuze)
- 6 de *Paralichthys bonariensis* (pajarrey)

dió desplazamiento de las proteínas hacia el ánodo, con la sola excepción de una hembra de *Galaxias canis* con 6 crías que en 3 fraccionamientos del mismo suero dió desplazamiento hacia el cátodo. No puede decirse con seguridad el número de fracciones que dan las proteínas séricas de estos peces pues hay muy pocos datos y estos análisis fueron efectuados al comienzo de este trabajo con la finalidad de elegir las especies más convenientes, pero, en todos, la fracción más móvil es la que se encuentra en mayor cantidad.

5.3) COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE 5.1 Y 5.2 CON LOS DE CYNOSSCIUM STRIATUS Y RAYA NEGRO

Hemos visto que con una sola excepción, la electroforesis en el mismo buffer produce desplazamiento de las proteínas hacia el ánodo. En todos los casos la fracción de mayor movilidad es la más abundante.

El *Paralichthys brasiliensis* tiene una cantidad de proteínas séricas mucho menor que la Raya y el *Cynoscion*.

El fraccionamiento electroforético produce 5 fracciones contra 6 en las otras especies y hay que hacer notar que la diferencia de porcentajes se encuentra solamente en las fracciones IV y V; las fracciones I, II y III se encuentran en porcentajes semejantes a las correspondientes en el *Gynocidium* y la *Rayet*.

REFERENCIAS

- (1) Cushing; Science, N° 3267 (junio 1957)
- (2) Deutsch y Ma Shan; J.Biol.Chem. 159, 219 (1949)
- (3) Deutsch y Goodlee; J.Biol.Chem. 161, 21 (1945)
- (4) Field, Elvehjem y Juday; J.Biol.Chem. 148, 261 (1943)
- (5) Frieden, Herner, Fish y Gannon Lewis;
Science, N° 3273 (septiembre 1957)
- (6) Airan; C.A., 2165 F (1954)
- (7) "Bioquímica Analítica Cuantitativa", Marzani,
Gardini, Villalonga y Bonfi. Ed. El Ateneo, 1948
- (8) "Clinical Diagnosis by Laboratory Methods" Kolmer
- (9) "Paper Chromatography and Paper Electrophoresis"
Block, Durrum y Zweig. 1957
- (10) "Electrophoresis" Ed. Milan Mar. Academic Press Inc.
1959
- (11) "Dynamic Aspects of Biochemistry", Baldwin
Cambridge University Press, 3a. ed. 1957
- (12) "Fundamentals of Chromatography", Gomez Cassidy H.
Ed. A. Weisberger. 1957
- (13) "Chromatography", Cramer F. 1954
- (14) "Cromatografia su Carta", Savoia Franco. Ed. U. Hoepli
1953.
- (15) "Papierchromatographie und Sulfenchromatographie"
Ed. H. Merck, A.G., Darmstadt. 1959

A P P E N D I X .

TABLE 1

CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS DE CYNOSCIUM SERIATES

<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Gras. de prots.</u> <u>en 100ml suero</u>	<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Gras. de prots.</u> <u>en 100ml suero</u>
1	5,27	36	4,98
2	4,85	37	5,06
3	4,00	38	5,00
4	6,25	39	3,90
5	5,00	40	4,62
6	5,22	41	4,95
7	5,00	42	4,83
8	4,36	43	4,25
9	3,96	44	4,60
10	4,60	45	4,72
11	5,65	46	5,80
12	4,68	47	4,70
13	6,20	48	4,72
14	4,32	49	5,40
15	4,00	50	5,40
16	4,80	51	4,65
17	4,82	52	5,00
18	4,00	53	4,00
19	4,40	54	5,20
20	4,30	55	3,50
21	4,56	56	5,00
22	4,90	57	4,00
23	5,40	58	5,70
24	5,00	59	5,30
25	4,80	60	4,70
26	4,40	61	5,20
27	4,32	62	4,61
28	4,50	63	3,92
29	5,20	64	4,50
30	4,35	65	4,58
31	5,00	66	3,66
32	4,48	67	4,65
33	4,80	68	4,26
34	4,30	69	4,39
35	4,32	70	5,08

///

///

<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Gra. de prots.</u> <u>en 100 ml. suero</u>	<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Gra. de prots.</u> <u>en 100 ml. suero</u>
71	4,25	106	4,52
72	4,60	107	3,90
73	5,06	108	5,20
74	4,32	109	4,36
75	5,00	110	4,16
76	4,72	111	4,25
77	4,33	112	4,18
78	5,12	113	4,26
79	3,88	114	4,75
80	3,97	115	4,72
81	4,33	116	3,97
82	4,66	117	4,51
83	4,55	118	3,69
84	3,95	119	4,00
85	4,00	120	4,21
86	4,23	121	4,06
87	4,44	122	4,24
88	4,33	123	4,05
89	4,36	124	4,21
90	4,21	125	3,67
91	3,89	126	5,05
92	5,20	127	3,90
93	4,76	128	4,76
94	4,55	129	4,06
95	4,55	130	4,23
96	4,00	131	5,06
97	4,00	132	4,20
98	4,27	133	4,28
99	4,26	134	3,87
100	4,14	135	3,90
101	5,11	136	5,06
102	4,00	137	4,00
103	4,32	138	4,26
104	4,41	139	4,45
105	4,40	140	4,66

///

<u>///</u> <u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Gra. de prote.</u> <u>en 100 ml suero</u>	<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Gra. de prote.</u> <u>en 100 ml suero</u>
141	4,20	158	4,23
142	4,50	159	3,99
143	3,66	160	4,60
144	3,75	161	3,97
145	4,80	162	4,10
146	4,07	163	4,24
147	3,88	164	3,66
148	4,75	165	4,05
149	4,30	166	4,25
150	4,21	167	4,30
151	4,20	168	4,20
152	4,22	169	4,25
153	4,51	170	4,50
154	4,08	171	4,12
155	4,03	172	3,92
156	4,26	173	4,40
157	4,15		

TABLA 2

PORCENTAJE DE CADA FRACCION PROTEICA EN SUERO DE CL. ST.

Ensayo	% Fracc.	% Fracc.	% Fracc.	% Fracc.	% Fracc.	% Fracc.
Nº	I	II	III	IV	V	VI
1	7,3	12,0	13,8	14,6	13,8	18,5
2	7,4	12,8	15,6	15,0	13,9	33,4
3	7,0	12,0	13,9	15,0	14,1	39,0
4	7,2	11,6	13,0	13,5	18,1	36,7
5	7,1	11,6	13,0	13,9	18,4	36,0
6	5,6	10,6	11,2	16,6	13,0	43,0
7	7,3	12,0	13,3	13,3	18,2	35,9
8	7,6	11,0	13,4	13,7	18,8	35,5
9	7,4	11,8	12,6	13,8	17,7	36,7
10	6,0	10,4	11,9	13,7	19,7	38,3
11	7,8	11,3	12,7	14,2	19,1	34,9
12	4,1	8,1	11,1	13,2	21,0	42,5
13	7,0	10,2	12,3	13,9	19,7	36,9
14	5,7	8,6	11,9	12,8	20,5	40,5
15	7,3	11,5	13,4	14,1	16,1	37,6
16	6,3	10,7	12,5	14,3	20,0	36,2
17	7,8	11,3	12,7	14,2	19,2	34,8
18	7,1	10,7	12,8	15,0	19,6	34,8
19	6,0	10,5	11,2	13,7	19,3	39,3
20	6,9	12,0	14,6	15,0	14,6	36,9
21	7,4	11,0	12,9	13,9	18,4	36,4
22	6,0	9,6	11,0	14,0	19,1	40,3
23	7,7	11,1	11,8	15,3	19,8	34,3
24	6,2	9,2	10,2	12,8	19,5	42,1
25	7,0	10,4	11,6	13,5	20,0	37,5
26	6,3	9,3	10,5	13,4	19,3	41,2
27	6,2	9,8	11,5	14,6	19,4	38,5
28	7,6	11,3	12,7	14,7	19,5	34,2
29	6,2	9,0	10,4	15,0	18,4	41,0
30	6,6	8,4	10,2	12,7	20,1	42,0
31	7,4	10,0	10,9	13,9	19,1	38,7
32	7,9	10,4	11,5	14,3	20,0	35,9
33	6,9	9,0	10,7	14,5	19,7	39,2
34	7,8	10,4	11,3	13,5	19,1	37,9
35	7,9	10,4	11,5	14,0	20,0	36,2

///

///

<u>Essayo</u> <u>Nº</u>	<u>% Fracc.</u> <u>I</u>	<u>% Fracc.</u> <u>II</u>	<u>% Fracc.</u> <u>III</u>	<u>% Fracc.</u> <u>IV</u>	<u>% Fracc.</u> <u>V</u>	<u>% Fracc.</u> <u>VI</u>
36	6,9	11,0	12,0	13,8	22,4	33,9
37	5,1	8,1	9,6	14,6	20,3	42,3
38	6,4	8,7	9,6	13,3	18,4	41,6
39	5,6	8,4	10,3	13,5	19,6	42,6
40	7,5	10,4	12,7	13,4	19,4	36,6
41	8,0	10,9	11,6	14,2	19,3	36,0
42	5,7	9,0	10,4	13,2	20,3	41,4
43	6,2	8,4	9,8	13,4	20,6	41,6
44	7,8	9,9	11,0	13,1	19,7	39,8
45	7,9	10,3	11,8	13,9	21,0	35,1
46	6,4	8,6	9,7	12,8	20,4	42,1
47	7,5	10,8	11,9	15,9	20,0	33,9
48	7,5	9,4	11,0	15,3	19,6	37,2
49	8,1	10,6	11,7	14,7	19,4	35,5
50	8,6	11,0	11,8	13,8	19,2	35,6
51	7,7	9,4	10,6	13,8	19,1	39,4
52	6,1	8,5	9,5	13,2	20,1	42,6
53	5,8	8,9	10,4	13,1	19,9	41,9
54	8,3	9,9	11,0	14,0	18,9	37,9
55	5,6	7,3	8,3	12,8	17,2	48,8
56	8,5	10,1	10,9	15,3	20,2	35,0
57	6,3	8,5	10,3	13,4	21,0	40,5
58	8,4	10,5	11,7	13,8	18,3	37,3
59	8,2	10,0	10,0	12,2	19,1	35,5
60	8,2	10,4	11,9	14,9	18,0	36,6

TABLE 3

CONCENTRACION DE CADA FRACCION EN 100 ml. DE SUERO

<u>Ensayo</u>	<u>Fracción</u>	<u>Fracción</u>	<u>Fracción</u>	<u>Fracción</u>	<u>Fracción</u>	<u>Fracción</u>
<u>N°</u>	<u>I. gr. %</u>	<u>II. gr. %</u>	<u>III. gr. %</u>	<u>IV. gr. %</u>	<u>V. gr. %</u>	<u>VI. gr. %</u>
1	0,38	0,62	0,72	0,73	0,72	2,05
2	0,36	0,63	0,77	0,74	0,69	1,76
3	0,35	0,60	0,69	0,71	0,70	1,95
4	0,34	0,56	0,63	0,65	0,84	1,78
5	0,30	0,50	0,57	0,61	0,80	1,57
6	0,25	0,45	0,48	0,70	0,55	1,62
7	0,29	0,48	0,53	0,53	0,69	1,46
8	0,35	0,50	0,62	0,63	0,81	1,69
9	0,34	0,54	0,58	0,63	0,82	1,68
10	0,29	0,49	0,55	0,65	0,94	1,83
11	0,44	0,64	0,71	0,80	1,07	2,00
12	0,24	0,47	0,64	0,78	1,21	2,46
13	0,33	0,48	0,57	0,65	0,92	1,73
14	0,27	0,40	0,56	0,60	0,97	1,90
15	0,45	0,71	0,83	0,88	1,00	2,13
16	0,30	0,50	0,59	0,68	0,94	1,71
17	0,34	0,49	0,55	0,62	0,83	1,52
18	0,38	0,58	0,69	0,80	1,05	1,90
19	0,24	0,42	0,45	0,55	0,77	1,57
20	0,37	0,65	0,79	0,81	0,79	1,90
21	0,35	0,53	0,62	0,67	0,88	1,75
22	0,28	0,45	0,51	0,65	0,88	1,88
23	0,37	0,53	0,58	0,74	0,95	1,66
24	0,31	0,46	0,51	0,64	0,97	2,11
25	0,28	0,41	0,46	0,54	0,80	1,51
26	0,27	0,37	0,42	0,54	0,77	1,63
27	0,27	0,38	0,51	0,64	0,86	1,74
28	0,39	0,59	0,66	0,76	1,01	1,78
29	0,27	0,39	0,45	0,65	0,79	1,75
30	0,26	0,35	0,38	0,49	0,67	1,35
31	0,36	0,47	0,52	0,65	0,91	1,64
32	0,33	0,45	0,53	0,72	0,99	1,98
33	0,38	0,51	0,55	0,66	0,93	1,87
34	0,31	0,42	0,46	0,56	0,80	1,43
35	0,37	0,59	0,65	0,74	1,21	1,84

///

///

<u>Ensayo</u> <u>Nº</u>	<u>Fración</u> <u>I gr. g</u>	<u>Fración</u> <u>II gr. g</u>	<u>Fración</u> <u>III gr. g</u>	<u>Fración</u> <u>IV gr. g</u>	<u>Fración</u> <u>V gr. g</u>	<u>Fración</u> <u>VI gr. g</u>
36	0,29	0,46	0,55	0,83	1,11	2,42
37	0,32	0,43	0,48	0,67	0,92	2,18
38	0,30	0,44	0,55	0,71	1,04	2,26
39	0,36	0,50	0,61	0,64	0,93	1,76
40	0,38	0,51	0,55	0,67	0,91	1,68
41	0,25	0,40	0,46	0,58	0,88	1,83
42	0,32	0,44	0,51	0,70	1,07	2,16
43	0,27	0,42	0,47	0,57	0,85	1,73
44	0,36	0,47	0,54	0,64	0,97	1,62
45	0,29	0,39	0,44	0,58	0,94	1,86
46	0,29	0,42	0,46	0,64	0,78	1,33
47	0,39	0,49	0,57	0,79	1,02	1,94
48	0,39	0,48	0,53	0,66	0,87	1,57
49	0,37	0,48	0,51	0,60	0,84	1,55
50	0,35	0,43	0,49	0,63	0,88	1,80
51	0,30	0,42	0,53	0,61	1,01	2,13
52	0,21	0,33	0,38	0,48	0,73	1,53
53	0,37	0,44	0,49	0,63	0,85	1,70
54	0,26	0,34	0,39	0,60	0,80	2,26
55	0,41	0,48	0,52	0,73	0,98	1,68
56	0,27	0,36	0,44	0,57	0,90	1,62
57	0,36	0,45	0,50	0,60	0,79	1,60
58	0,36	0,44	0,44	0,54	0,84	1,78
59	0,29	0,36	0,44	0,55	0,88	1,80
60	0,42	0,53	0,60	0,76	0,92	1,85

TABLE 4

CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS DE RAYA NIGROPS

<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Grm. de prots.</u> <u>en 100 ml. suero</u>	<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Grm. de prots.</u> <u>en 100 ml. suero</u>
1	5,89	36	5,80
2	6,30	37	6,00
3	5,90	38	6,90
4	6,40	39	6,90
5	5,70	40	6,42
6	6,56	41	6,00
7	5,90	42	6,60
8	5,80	43	6,20
9	7,20	44	7,20
10	6,45	45	5,86
11	6,30	46	6,06
12	6,25	47	6,20
13	6,20	48	6,30
14	6,32	49	5,90
15	5,96	50	6,00
16	6,26	51	5,07
17	7,00	52	6,11
18	6,80	53	6,08
19	7,20	54	5,60
20	5,86	55	6,50
21	6,75	56	6,25
22	5,95	57	6,75
23	6,40	58	6,80
24	6,30	59	6,12
25	6,45	60	7,10
26	6,65	61	6,20
27	5,88	62	6,46
28	6,70	63	6,32
29	6,00	64	6,54
30	6,25	65	5,90
31	5,72	66	6,06
32	6,14	67	6,80
33	6,35	68	5,92
34	6,16	69	6,16
35	6,36	70	6,45

///

///

<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Grs. de prots.</u> <u>en 100 ml suero</u>	<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>Grs. de prots.</u> <u>en 100 ml suero</u>
71	6,37	103	5,87
72	5,80	104	6,77
73	6,52	105	6,03
74	6,42	106	5,92
75	6,10	107	6,66
76	6,63	108	6,63
77	6,12	109	5,43
78	5,63	110	7,25
79	7,02	111	7,14
80	6,48	112	6,57
81	6,13	113	6,13
82	6,41	114	6,46
83	6,09	115	6,10
84	7,36	116	7,70
85	6,55	117	5,75
86	5,92	118	5,68
87	6,69	119	7,18
88	7,07	120	7,12
89	7,15	121	6,80
90	6,80	122	7,00
91	6,36	123	6,57
92	6,50	124	6,75
93	6,95	125	6,94
94	6,91	126	6,46
95	6,00	127	6,37
96	6,37	128	6,04
97	6,47	129	6,70
98	5,90	130	5,96
99	7,00	131	7,10
100	6,98	132	6,76
101	6,85	133	6,87
102	6,84	134	6,93
		135	7,37

TABLA 3

PORCENTAJE DE CADA FRACCION PROTEICA EN SUERO DE RAYA NIGROPS

<u>Ensayo</u> <u>Nº</u>	<u>% Fracc.</u> <u>I</u>	<u>% Fracc.</u> <u>II</u>	<u>% Fracc.</u> <u>III</u>	<u>% Fracc.</u> <u>IV</u>	<u>% Fracc.</u> <u>V</u>	<u>% Fracc.</u> <u>VI</u>
1	7,8	12,1	13,2	14,4	16,9	35,6
2	8,3	11,9	13,3	14,4	16,6	35,4
3	7,1	12,7	13,8	14,9	16,2	35,3
4	7,5	12,4	13,2	14,7	16,6	35,6
5	7,9	11,9	13,7	14,0	17,1	35,4
6	7,0	12,1	12,8	13,9	17,0	37,2
7	6,9	12,0	13,1	14,5	17,4	36,1
8	7,8	12,1	13,2	14,4	16,9	35,6
9	8,2	11,9	13,0	14,3	16,9	35,7
10	6,8	12,2	13,2	14,4	16,5	36,9
11	8,1	11,8	12,7	14,3	16,9	36,2
12	7,5	12,1	13,6	15,1	16,4	35,3
13	7,4	12,0	13,5	14,5	16,8	35,8
14	8,7	10,2	11,8	14,1	17,7	37,5
15	8,8	10,7	11,6	13,9	19,9	35,1
16	8,9	10,4	11,7	14,1	17,7	37,2
17	8,3	10,1	11,0	13,6	18,4	38,6
18	8,8	10,1	11,6	13,9	18,5	37,1
19	7,8	9,1	10,8	12,0	19,2	41,1
20	8,3	10,6	12,0	14,4	19,2	35,5
21	8,4	10,6	11,7	13,4	16,7	39,2
22	8,7	10,6	12,1	13,6	18,2	36,8
23	6,7	8,2	9,7	12,6	18,5	44,3
24	5,9	7,4	9,6	13,3	20,4	43,4
25	8,7	10,3	11,1	13,0	18,2	38,7
26	8,3	10,3	12,0	14,1	18,7	36,6
27	7,8	9,9	11,5	13,5	18,8	38,5
28	7,6	8,7	10,5	12,8	19,8	40,6
29	8,1	10,0	11,3	13,5	18,5	38,6
30	8,0	9,8	11,6	14,3	18,8	37,5
31	8,8	10,4	12,2	14,4	19,1	35,1
32	8,8	10,5	12,2	14,3	18,4	35,8
33	6,3	8,1	10,0	12,6	19,4	43,6
34	8,4	10,5	11,8	12,7	17,5	39,1
35	7,6	9,3	10,6	13,1	18,6	40,8
36	8,4	9,3	10,7	13,9	18,6	39,1
37	9,0	10,2	11,4	13,0	17,9	38,5
38	8,5	9,4	11,3	15,1	18,8	36,9
39	8,6	9,9	11,7	14,2	20,4	35,2
40	8,3	10,0	11,3	13,9	18,2	38,3

ZARLA 6

CONCENTRACION DE CADA FRACCION EN 100 ml. DE SUELO

Ensayo N°	Fracción I gr %	Fracción II gr %	Fracción III gr %	Fracción IV gr %	Fracción V gr %	Fracción VI gr %
1	0,45	0,70	0,77	0,84	0,98	2,06
2	0,52	0,75	0,84	0,91	1,04	2,22
3	0,41	0,76	0,83	0,90	0,97	2,13
4	0,44	0,73	0,78	0,87	0,98	2,10
5	0,51	0,78	0,89	0,91	1,11	2,30
6	0,45	0,79	0,83	0,90	1,11	2,42
7	0,39	0,69	0,75	0,83	1,04	2,00
8	0,50	0,78	0,86	0,94	1,16	2,32
9	0,49	0,72	0,78	0,86	1,01	2,14
10	0,40	0,72	0,78	0,85	0,97	2,18
11	0,53	0,78	0,84	0,94	1,11	2,40
12	0,45	0,70	0,79	0,87	0,95	2,04
13	0,46	0,74	0,84	0,90	1,04	2,22
14	0,56	0,61	0,76	0,91	1,14	2,47
15	0,43	0,63	0,68	0,81	1,26	2,05
16	0,56	0,65	0,74	0,89	1,11	2,35
17	0,50	0,61	0,67	0,82	1,12	2,34
18	0,55	0,63	0,73	0,87	1,15	2,32
19	0,48	0,56	0,67	0,74	1,19	2,56
20	0,52	0,67	0,76	0,91	1,24	2,20
21	0,52	0,66	0,73	0,83	1,03	2,43
22	0,55	0,67	0,77	0,86	1,14	2,33
23	0,39	0,48	0,57	0,74	1,09	2,63
24	0,35	0,44	0,57	0,79	1,21	2,60
25	0,52	0,62	0,67	0,78	1,09	2,32
26	0,47	0,58	0,68	0,80	1,07	2,07
27	0,55	0,69	0,80	0,95	1,31	2,70
28	0,48	0,55	0,66	0,81	1,25	2,56
29	0,55	0,68	0,77	0,92	1,26	2,62
30	0,49	0,60	0,71	0,87	1,14	2,27
31	0,63	0,75	0,88	1,03	1,37	2,64
32	0,49	0,59	0,68	0,80	1,03	2,01
33	0,37	0,47	0,59	0,74	1,14	2,55
34	0,55	0,68	0,77	0,83	1,13	2,59
35	0,51	0,63	0,72	0,89	1,25	2,75
36	0,52	0,58	0,67	0,87	1,16	2,45
37	0,53	0,61	0,68	0,77	1,06	2,30
38	0,57	0,63	0,76	1,02	1,27	2,50
39	0,55	0,63	0,75	0,91	1,30	2,26
40	0,56	0,68	0,77	0,95	1,24	2,60

TABLA 7

CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS DE PARALITICOS BRASILENSES

<u>Ensayo N°</u>	<u>Grs. de prots. en 100 ml. suero</u>
1	2,06
2	2,30
3	1,98
4	2,14
5	2,32

TABLE 8

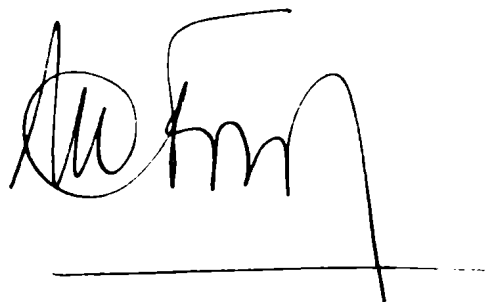
PERCENTAJE DE CADA FRACCION PROTEICA EN SUELO DE PARALITISIS
BRASILIANIS

<u>Ensayo</u> <u>N°</u>	<u>% Fracc.</u> <u>I</u>	<u>% Fracc.</u> <u>II</u>	<u>% Fracc.</u> <u>III</u>	<u>% Fracc.</u> <u>IV</u>	<u>% Fracc.</u> <u>V</u>
1	8,0	10,0	10,0	18,0	54,0
2	6,4	10,9	12,7	20,0	50,0
3	7,7	9,6	12,5	18,2	52,0
4	9,8	11,5	12,3	17,3	49,1
5	8,7	10,6	13,5	20,1	47,1

TAHLA 9

CONCENTRACION DE CADA FRACCION EN 100 ml. DE SUEÑO

<u>Ensayo</u>	<u>Fracc.</u>	<u>Fracc.</u>	<u>Fracc.</u>	<u>Fracc.</u>	<u>Fracc.</u>
<u>Nº</u>	<u>I. cm. 1</u>	<u>II. cm. 1</u>	<u>III. cm. 1</u>	<u>IV. cm. 1</u>	<u>V. cm. 1</u>
1	0,17	0,21	0,21	0,29	1,08
2	0,15	0,25	0,29	0,46	1,15
3	0,15	0,19	0,25	0,36	1,03
4	0,21	0,25	0,27	0,37	1,04
5	0,20	0,25	0,31	0,47	1,09



A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized initial 'A' followed by a series of loops and a long horizontal stroke at the bottom.