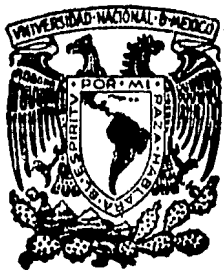


91
L. G. 1985



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**METODO DE PURIFICACION DE UN INTERMEDIARIO
EN LA OBTENCION DE INSULINA HUMANA
BIOSINTETICA**

T E S I S

Que Presenta

CARMEN ELIZABETH RODRIGUEZ NIETO

Para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 5



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

- I. INTRODUCCION
 - II. GENERALIDADES
 - III. ANTECEDENTES
 - IV. OBJETIVO
 - V. MATERIALES
 - VI. PARTE EXPERIMENTAL
 - VII. DISCUSION Y RESULTADOS
- CONCLUSIONES
- BIBIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

La diabetes mellitus es una afección de todas las edades, pero de comienzo más frecuente en la cincuentena, interviniendo en su etiología un fuerte factor hereditario. Es una enfermedad crónica, caracterizada principalmente por una elevación de la glucosa en la sangre. Los desórdenes metabólicos presentes en la diabetes, dependen de una deficiencia absoluta o relativa de insulina.

Por el aumento de la frecuencia de la enfermedad en la población general, se ha considerado que la diabetes mellitus es un problema de salud pública. En el tratamiento de la misma, se cuenta con los siguientes procedimientos terapéuticos:

- a) Educación del enfermo
- b) Dieta
- c) Fármacos hipoglucemiantes

La insulina es la hormona hipoglucemiante del páncreas, descubierta por Banting y Best, (6) y producida por las células beta de los islotes de Langerhans.

En México, toda la insulina utilizada en el tratamiento de la diabetes es importada, y corresponde a la insulina obtenida a partir del páncreas de ganado porcino y bovino principalmente. Actualmente, se ha iniciado la explotación de una nueva fuente de la hormona, que constituye el primer ejemplo de un producto clínicamen

te útil obtenido de la tecnología del ADN recombinante. La insulina humana biosintética representa un ejemplo de la aplicación de la - biotecnología. La ventaja esencial de la nueva insulina, parece ser su fuente potencialmente ilimitada. La disponibilidad de la hormona allana la posible carestía de insulina, que ha sido visualizada en el futuro, debido al número creciente de individuos diabéticos en el mundo.

II. GENERALIDADES

La diabetes mellitus está caracterizada principalmente por una elevación de la glucosa en la sangre. Esta alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, origina en forma concomitante un defecto en la utilización de las proteínas y de las grasas. (1).

La deficiencia absoluta o relativa de insulina puede ser debida a una producción disminuída de la hormona por el páncreas, o bien a la existencia probable de antagonistas de la misma, que disminuyan sus efectos.

Durante la última década, se observó la falta de uniformidad y consistencia en la definición de la diabetes y otras etapas de la intolerancia a la glucosa, se vió que era necesario desarrollar una terminología apropiada, uniforme y funcional en la clasificación de la diabetes, que reflejara los conocimientos contemporáneos que se tenían acerca de la enfermedad. El trabajo se desarrolló en los Estados Unidos (2), y la nueva clasificación ha sido aceptada por la Organización Mundial de la Salud.

La clasificación propuesta incluye tres clases clínicas:

- a) diabetes mellitus
- b) tolerancia débil a la glucosa
- c) diabetes gestacional

La clase diabetes mellitus se ha dividido en tres tipos -

distintos:

Tipo I. Diabetes mellitus insulino-dependiente. Es clásico que este tipo de diabetes se presente en jóvenes y por ello fué antes llamada diabetes juvenil. Sin embargo puede reconocerse por primera vez a cualquier edad, de aquí que el diagnóstico basado en la edad es inapropiado.

Tipo II. Diabetes mellitus no dependiente de la insulina, que ha sido dividida de acuerdo a la presencia o ausencia de obesidad en el paciente. Aunque la mayoría de estos individuos desarrollan la enfermedad después de los cuarenta años, la diabetes tipo II puede presentarse en personas jóvenes que no requieren insulina. En consecuencia, de nuevo no se recomienda la edad como criterio para clasificar a un paciente.

Se considera como una tercera subclase de la diabetes mellitus los tipos de diabetes causados por otras condiciones y síndromes.

Como se mencionó anteriormente, por el aumento de la frecuencia de la enfermedad en la población general, se ha considerado que la diabetes mellitus es un problema de salud pública. La Organización Panamericana de la Salud, (3) reporta que debido a problemas de certificación de las causas de defunción y a la ausencia de datos sobre causas múltiples, las tasas de mortalidad por esta enfermedad describen la situación sólo parcialmente. En el año más reciente sobre el que se dispuso de datos, la diabetes mellitus fué la sexta causa más frecuente de defunción en América del Norte.

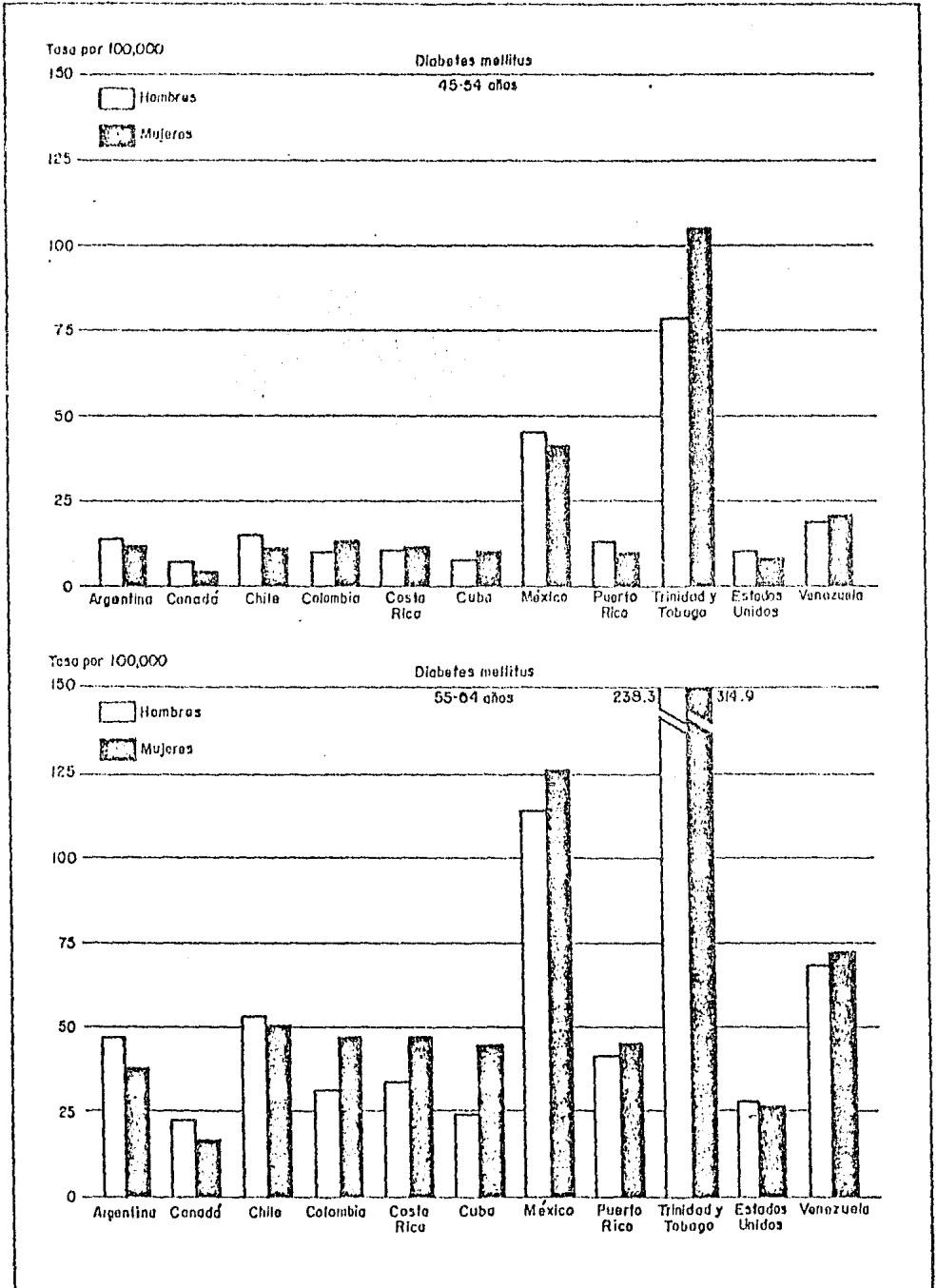
La comparación de la mortalidad debida a esta enfermedad, con la ocasionada por otras causas en 1970 y alrededor de 1979 indica que el porcentaje de defunciones por diabetes mellitus permaneció más o menos constante en la mayoría de los países, en un valor de 1 a 2.5 %

La figura 1 presenta la distribución de defunciones por este padecimiento en personas de edad mediana, en ambos sexos, en once países seleccionados. En el año de 1976, en México se registraron las defunciones por esta enfermedad, citadas en la tabla 1.

EDAD	HOMBRES	MUJERES
Todas las edades	5156	6542
Menores de 5	25	27
5 a 14	21	28
15 a 24	42	63
25 a 34	144	91
35 a 44	335	241
45 a 54	820	764
55 a 64	1195	1392
65 a 74	1454	2099
75 y más	1084	1083
Desconocido	36	34

Tabla 1. Número de defunciones, por diabetes mellitus, en México en 1976. (3)

FIGURA 1. Tasas de mortalidad por 100,000 habitantes debida a diabetes mellitus en los grupos de edad de 45 a 54 y de 55 a 64 años, por sexo, en países seleccionados, alrededor de 1978.



Los síntomas principales de la diabetes son : la poliuria, (orina abundante), polidipsia (sed e ingestión exagerada de líquidos), polifagia (apetito e ingestión alimentaria excesiva), hiperglucemia, glucosuria y adelgazamiento, siendo el síndrome - más temible resultante de los trastornos metabólicos el de acidosis y coma diabético, que puede ser mortal. (4)

La enfermedad fué descrita desde tiempos muy antiguos, pero el padecimiento era completamente misterioso e inexplicable. Siglos después, en 1889 Von Mering (5) demostró que la diabetes mellitus podía inducirse experimentalmente por extirpación del páncreas. En 1900 Schulze y Ssobolew (6) afirmaron que la substancia pancreática responsable de la disminución del nivel sanguíneo de azúcar se formaba en las células de los islotes de Langerhans y por esta razón a la substancia desconocida se le llamó insulina. Hacia 1920 se logró la extracción de la insulina del páncreas(7). El aislamiento de la insulina pura se realizó en 1926 (8) y la determinación de su constitución en 1955 (9).

Los fármacos hipoglucemiantes que se aplican esencialmente en el tratamiento de la enfermedad comprenden:

- I. La insulina
- II. Los hipoglucemiantes sintéticos

La Insulina.

La insulina es la hormona hipoglucemiante del páncreas, - descubierta por Banting y Best (7) y producida por las células beta de los islotes de Langerhans.

La estructura primaria o secuencia de los aminoácidos en el esqueleto covalente de la hormona se muestra en la figura 2. La insulina es una proteína, constituida por dos cadenas polipeptídicas, la cadena A o glicílica (posee el aminoácido glicina en un extremo), y la cadena B o fenilalanínica (posee el aminoácido fenilalanina en un extremo), con 21 y 30 aminoácidos respectivamente.

La estructura posee tres puentes disulfuro, dos intermoleculares entre ambas cadenas, y uno intramolecular en la cadena A. El peso molecular de la insulina bovina es de 5733. La estructura estérica de la molécula de insulina está determinada principalmente por las posiciones de los puentes disulfuro. Debe señalarse que estas uniones son esenciales, ya que la ruptura de dichos enlaces por reducción suprime la actividad de la hormona (10).

Se acepta que la insulina, como todas las proteínas se sintetiza a nivel de los ribosomas de las células beta a partir de los aminoácidos respectivos, siendo un paso previo importante la formación de un precursor insulínico, la proinsulina (Fig. 3), que es un polipéptido en forma espiralada, formado por 84 aminoácidos y que se desdobra por acción de una enzima proteolítica intracelular en insulina y el péptido conector C. (Fig. 4)

La insulina formada en las células beta se almacena en las

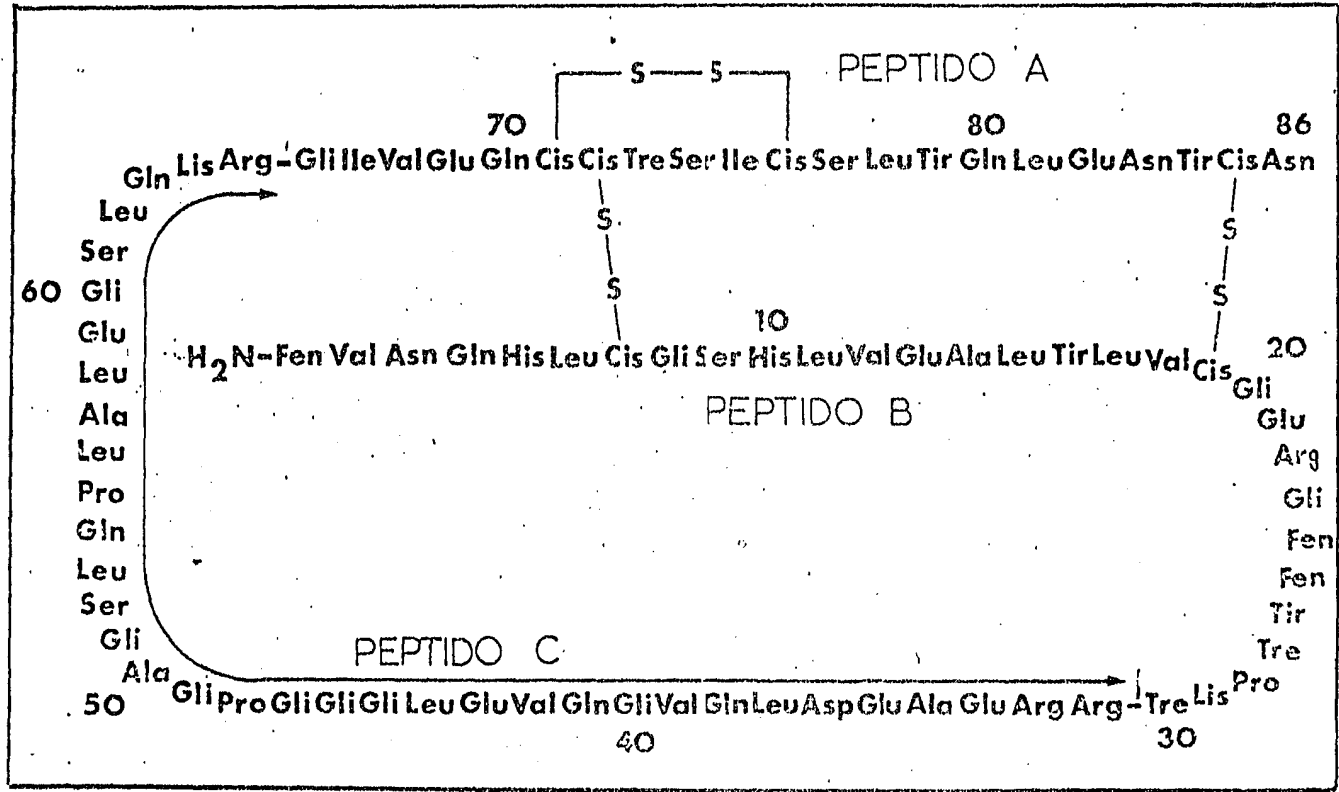


Fig. 3 PROINSULINA

mismas y es liberada a la circulación junto con pequeñas cantidades de proinsulina, que es inactiva, pero puede activarse a nivel de los tejidos por proteolisis.

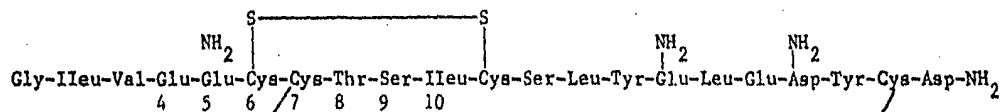
Se han encontrado diferencias en la composición de aminoácidos de las cadenas A de insulina de buey, oveja, y cerdo, (11); las diferencias se presentan en la región A₈₋₁₀. Las diferencias entre las insulinas aumentan con el aumento de la diferencia filogenética entre las especies. (Fig. 5)

En cuanto a los tipos de insulina utilizados en el tratamiento de la diabetes, se puede decir que el procedimiento de extracción más sencillo a partir del páncreas de vacuno o porcino proporciona una solución de insulina amorfa, (31), que puede ser purificada y cristalizada mediante el agregado de sales de zinc, dando el preparado utilizado clínicamente. A partir de esta insulina se ha conseguido una serie de preparados que se diferencian esencialmente por la rapidez y duración de su acción, lo que está en relación con su mayor o menor solubilidad, que a su vez condiciona la absorción por vía parenteral:

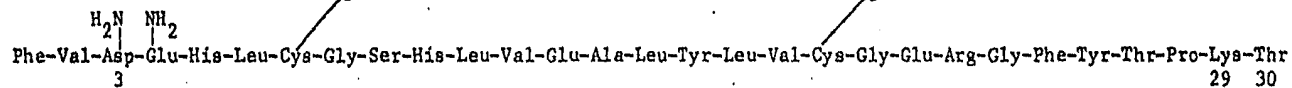
- a) Insulina. Así se denomina a la insulina zinc cristalizada, o insulina corriente, soluble y de acción rápida y corta.
- b) Insulina zinc protamina. Se obtiene por el agregado de pequeñas cantidades de cloruro de zinc a una suspensión de insulina combinada con protamina. Es una suspensión insoluble de acción prolongada.
- c) Insulina NPH (31). Es una insulina zinc protamina modificada. Es una suspensión de acción intermedia entre las dos anteriores.

INSULINA HUMANA

CADENA A



CADENA B



ORIGEN	CADENA A				CADENA B		
	4	8	9	10	3	29	30
Hombre	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asp(NH ₂)	Lys	Thr
Cerdo	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asp(NH ₂)	Lys	Ala
Esperma de ballena	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asp(NH ₂)	Lys	Ala
Bovino	Glu	Ala	Ser	Val	Asp(NH ₂)	Lys	Ala
Ovino	Glu	Ala	Gly	Val	Asp(NH ₂)	Lys	Ala
Caballo	Glu	Thr	Gly	Ileu	Asp(NH ₂)	Lys	Ala
Conejo	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asp(NH ₂)	Lys	Ser
Ferreo	Glu	Thr	Ser	Ileu	Asp(NH ₂)	Lys	Ala
Rata 1	Asp	Thr	Ser	Ileu	Lys	Lys	Ser
Rata 2	Asp	Thr	Ser	Ileu	Lys	Met	Ser

FIG. 5 FORMULAS ESTRUCTURALES DE INSULINAS DE MAMIFEROS (12)

- d) Suspensiones de insulina zinc (insulinas lentas). Son de acción más prolongada que la insulina corriente, pero sin el agregado de ninguna substancia protéica.

En México, se encuentran en el mercado (13), bajo la marca Eli Lilly, preparados de los cuatro tipos de insulina. A continuación se indica la duración del efecto de cada una.

TIPOS DE INSULINA EN EL MERCADO DE MEXICO			
TIPO	ACCION	DURACION DEL EFECTO (H)	EFECTO MAXIMO (H)
Simple	Rápida	5-7	4
NPH	Intermedia	24-28	14
Protamina Zinc	Prolongada	36	19
Lenta	Intermedia	24-28	14

* Por vía subcutánea (4)

La acción fundamental de la insulina es provocar una disminución de la glucemia por los siguientes modos principales de acción:

- a) Facilita el catabolismo, o sea la oxidación de la glucosa en los tejidos, especialmente músculo o tejido adiposo.
- b) Estimula la formación de glucógeno hepático y muscular.
- c) Acelera la transformación de la glucosa en grasa.
- d) Disminuye la formación de glucosa a partir de proteínas en el

hígado.

- e) Inhibe la transformación del glucógeno hepático en glucosa.
- f) Disminuye el desdoblamiento de la grasa en el tejido adiposo.
- g) Estimula la síntesis protéica en el músculo principalmente.

En pacientes pancreatetectomizados (por cáncer), la diabetes producida es controlada por pequeñas dosis de insulina, 30 a 50 U.I. diarias; en la diabetes espontánea, son necesarias muchas veces dosis superiores, lo que se debe a la presencia de un exceso de antagonistas de la insulina. En algunos pacientes diabéticos es necesaria la utilización de grandes dosis de insulina para su control. Se acepta actualmente que la insulino-resistencia se debe esencialmente a la aparición de anticuerpos insulínicos en el plasma sanguíneo. Se describen tres antagonistas en el plasma (4): uno está unido a la fracción sinalbúmina, que inhibe la acción de la insulina en el músculo. Un segundo antagonista se encuentra en la fracción α_1 -globulina y otro se halla en la fracción α_2 -globulina. Los anticuerpos insulínicos aparecen por administración de insulina (generalmente bovina o porcina) y se encuentran en la fracción γ -globulina.

Los resultados que ha dado el uso de la insulina en el tratamiento de la diabetes mellitus han sido magníficos. Cuidadosas estadísticas muestran un aumento del promedio de vida en más de 20 años desde el comienzo del uso de la insulina, y demuestran que antes del empleo de la misma, el 63.8 % de los diabéticos morían en coma, mientras que actualmente no alcanzan el 1 %, (30)

Hipoglucemiantes Sintéticos.

Estos medicamentos también se denominan agentes hipoglucemiantes orales, debido a que son activos por vía oral, a diferencia de la insulina que sólo lo es por las vías parenterales. La utilidad de este grupo es evidente en el tratamiento de la diabetes mellitus, que muchas veces requiere el empleo de inyecciones repetidas de insulina. Se trata de fármacos sintéticos y que corresponden a dos grupos:

- a) Derivados de la sulfonilurea o sulfonilureas
- b) Derivados de la biguanida o biguanidas

La administración de los dos tipos de medicamentos provoca un descenso de la glucemia que depende de la dosis administrada, pero que nunca es muy intenso. Los fármacos son mucho menos potentes que la insulina.

Es importante mencionar que para que las sulfonilureas produzcan sus efectos, es necesaria la presencia de insulina en el organismo, así, son inactivas en los animales y sujetos pancreatectomizados y en la diabetes grave por aloxano, (destrucción de las células beta que producen la insulina). Por otra parte, la acción de la insulina es reforzada por las sulfonilureas. (4)

A pesar del uso tan extendido de los hipoglucemiantes orales, la insulina sigue siendo utilizada como piedra de base en el tratamiento de la diabetes.

Sulfonilureas	Estructura química	Dosis diaria	Duración del efecto (horas)
Tolbutamida (Orinase)		0.3-3 g en dosis divididas	0-12
Tolazamida (Tollinase)		0.1-0.5 g como dosis única o en dosis divididas	10-14
Tolcetamida (Glicetamida)* (Diaboral, Tolhexamida)*		0.25-1 g	---
Gilbarnúrida* (Gilbornúrida)* (Glutril)*		0.01-0.05 g	---
Acetohexamida (Dymelor)		0.25-1.5 g como dosis única o en dosis divididas	12-24
Cloropropamida (Diabinese)		0.1-0.5 g como dosis única	Hasta 60
Carbutamida* (muchos productos)		0.3-3 g	Hasta 60
Gilburida* (Glibencetamida)* (muchos productos)		0.0025-0.02 g	10-24
Glipofida* (Glibefacinamida)* (Glibenese, Minidab, Minoxidab)*		0.0025-0.02 g	3-8

SULFONILUREAS

Una nueva fuente insulínica.

En México, toda la insulina utilizada en el tratamiento de la diabetes mellitus es importada, y corresponde a la insulina obtenida a partir del páncreas de ganado porcino y bovino principalmente. Actualmente, se ha iniciado la explotación de una nueva -- fuente de la hormona, que constituye el primer ejemplo de un producto clínicamente útil obtenido de la tecnología del ADN recombinante.

La insulina humana biosintética, (IHB), representa un ejemplo de la aplicación de la Biotecnología (15). La Ingeniería Genética es una metodología de la biología molecular que se ocupa del aislamiento, multiplicación (amplificación) y modificación de genes para su estudio y aprovechamiento. El gran avance de la microbiología industrial ha empezado a lograr la construcción de microorganismos programados genéticamente para fabricar un producto determinado.

Los primeros pasos empezaron hace más de 100 años, con el aislamiento y desarrollo de bacterias y hongos que intervenían en la formación de productos útiles. Después, con el descubrimiento de las mutaciones y su inducción por rayos X a partir de 1927.

Hacia mediados de los años 40, se produjeron otros avances que permitieron reordenar la información genética por medio de la recombinación de genes de dos o más organismos.

En el año de 1973 se anunció la realización de experimentos con ADN recombinante y clonación molecular. Se diseñaron técnicas de ingeniería genética que permitían transferir genes de un origen a algún otro microorganismo.

En la recombinación de ADN se reordenan los genes, o partes de los genes, y se agrupa en un mismo individuo la información genética de dos o más organismos. Se produce recombinación homóloga cuando cromosomas bacterianos o eucarióticos que poseen secuencias de bases de ADN similares se reúnen por un proceso de apareamiento, e intercambian los segmentos correspondientes mediante la rotura y ensamblaje de ADN.

En tanto que la recombinación homóloga permite un intercambio de segmentos de ADN, otras formas de recombinación añaden nuevo ADN al que ya posee el microorganismo. Uno de estos procedimientos es el de la transferencia de plásmidos. Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de ADN extracromosómico, presentes en las bacterias, capaces de replicación autónoma en la célula y heredables por las células hijas. Algunos plásmidos codifican estructuras que inducen al apareamiento entre bacterias, determinando así su propia transferencia; pero también pueden transferirse de una bacteria a otra mediante un bacteriófago. Asimismo, el ADN plasmídico desnudo, liberado de la célula huésped por rotura puede entrar en una nueva célula, este proceso se llama transformación.

La capacidad de aislar ADN plasmídico de un cultivo e inducir su incorporación en otro, constituye el fundamento de la mayoría de las manipulaciones del ADN recombinante. Uno o varios genes pueden empalmarse en un plásmido, y luego introducirse éste en un nuevo huésped microbiano, funcionando así el plásmido como vector.

Entre las aplicaciones de esta técnica la más conocida es

la producción por un microorganismo de una proteína que éste no sintetiza normalmente, como una enzima o una hormona. (18)

Con el nacimiento de la ingeniería genética, la industria farmacéutica ha adquirido gran potencialidad. Desde una perspectiva comercial y clínica, los antibióticos constituyen la clase más importante de fármacos que se obtiene de los microorganismos; actualmente estos suministran también vitaminas, hormonas humanas, alcaloides, fármacos antitumorales e interferón.

El primer péptido humano obtenido así fué la hormona hipotalámica somatostatina, utilizando como receptor la bacteria Escherichia coli. La somatostatina fabricada por E. coli es idéntica a la hormona natural humana, siendo la producción de 10 000 moléculas de somatostatina por célula.

Asimismo, se han usado técnicas para la síntesis bacteriana de insulina (insulina humana biosintética IHB). La insulina utilizada corrientemente en la terapia de la diabetes mellitus, tradicionalmente se ha extraído del páncreas de ganado bovino y porcino principalmente. Dicha insulina difiere ligeramente en su secuencia de aminoácidos de la insulina humana, y aunque la mayoría de dichas insulinas controlan los principales síntomas del diabético, no impiden efectos secundarios, como deterioramiento renal y de la retina, además algunos diabéticos son alérgicos a las hormonas animales por ser proteínas extrañas. (4,16)

Si la insulina humana fabricada por bacterias fuera capaz

de contrarrestar estas anomalías, dicha insulina ocuparía un lugar preferente en el mercado mundial de la hormona, que se estima en unos 200 millones de dólares (1981). Si se puede elevar el nivel de producción de la proteína hasta el de los demás procesos industriales que utilizan E. coli, se podrían alcanzar 100 g de insulina purificada en 2000 l de caldo fermentativo. Para obtener una cantidad equivalente de hormona animal se necesitarían más de 700 kg de glándulas pancreáticas.

En 1981 se publicaron numerosos estudios que comparan la IHB por Eli Lilly con las otras insulinas presentes en el mercado y que son de origen animal. El desarrollo de la IHB representa, como se ha mencionado, el primer ejemplo de un producto clínicamente útil, obtenido de la tecnología del ADN recombinante. La insulina bacteriana ha sido sometida a estudios in vitro, in vivo y clínicos. (16)

Diversos estudios indican que la IHB es química y físicamente equivalente a la insulina humana pancreática y biológicamente equivalente en varios sistemas bioquímicos y animales, a la insulina humana pancreática y a la preparación estándar de insulina porcina. La potencia biológica (disminución de glucosa plasmática) de la hormona humana se ha comparado con la presentada por la IHB; aunque estudios iniciales de laboratorio indican poca diferencia entre la potencia intrínseca del producto bacteriano y de la insulina porcina purificada, (IPP), ciertos estudios clínicos sugieren la posibilidad de una diferencia in vivo en la potencia (16). Estudios farmacocinéticos realizados en sujetos demues-

tran que la IHB es absorbida de la inyección subcutánea más rápido que las insulinas de origen animal. Asimismo, comparada con las insulinas animales, la biosintética baja el nivel inicial de glucosa sanguínea mucho más rápido. Por otra parte, los efectos laterales inmunológicos en la terapia con insulina son causados principalmente por diferencias de especie entre la hormona humana y la bovina y porcina. El desarrollo de la IHB constituye una ayuda para evitar la alergia a la insulina, la resistencia y la lipodistrofia. (16)

La ventaja esencial de la nueva insulina parece ser su fuente potencialmente ilimitada. La disponibilidad de la hormona allana la posible carestía de insulina, que ha sido visualizada en el futuro, debido al número creciente de individuos diabéticos en el mundo.

La insulina humana producida por Eli Lilly & Co., usando las técnicas de ADN recombinante, ha sido aprobada por la FDA para su uso en humanos (17). Recibe el nombre de humulina. Su uso se aprobó en Inglaterra en septiembre de 1982 y en los Estados Unidos en diciembre del mismo año. Lilly estima que el costo diario promedio de la humulina para un paciente es de 50-55 centavos de dólar, en comparación con 28-35 centavos de la insulina bovina-porcina y de 44-52 centavos de la porcina purificada.

III. ANTECEDENTES

Aquí mismo, en México, un grupo de personas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, han trabajado para obtener la IHB utilizando la tecnología del ADN recombinante, y la importancia del proyecto radica no sólo en la producción de la hormona en el laboratorio, sino también, en la optimización de las condiciones del proceso, que permitan el escalamiento del mismo a nivel industrial.

Las cadenas A y B de insulina humana fueron clonadas en E. coli a partir de genes químicamente sintetizados (18). Así, en el proceso normal de purificación de la cadena A de la hormona, se tiene una cepa (MX614 pBR 213) de la bacteria E. coli que ha sido modificada genéticamente para que sea capaz de producir una proteína híbrida β -galactosidasa-cadena A de insulina. Esta proteína tiene en su extremo carboxilo el péptido A de insulina, separado de la β -galactosidasa bacteriana por un residuo de metionina. En el procedimiento habitual, la proteína híbrida formada debe ser extraída de la célula y tratada con bromuro de cianógeno, que corta las proteínas en los residuos de metionina. Como ninguna de las cadenas de insulina, (en este caso la cadena A), contiene metioninas en su configuración, el tratamiento con bromuro de cianógeno liberará los péptidos intactos al romper el residuo que los une a la β -galactosidasa.

Las cadenas así obtenidas, son posteriormente purificadas

para luego proceder a la reasociación de las mismas y obtener la hormona activa.

Ahora bien, en este trabajo se plantea un posible método de purificación de la proteína híbrida antes de someterla al tratamiento con bromuro de cianógeno. Es decir, en el procedimiento de extracción, se obtiene por solubilización selectiva una fracción enriquecida con la proteína híbrida, que puede utilizarse con dos objetivos: uno de ellos es ir avanzando en el rompimiento con bromuro de cianógeno, sin que la proteína haya sido purificada. El otro consiste en separar la proteína híbrida A del resto de las proteínas celulares, con objeto de obtener un menor número de contaminantes en el tratamiento de ruptura y facilitar así, la purificación de la cadena A.

Actualmente la bioquímica cuenta con numerosos métodos que permiten separar y caracterizar mezclas de sustancias. La elección de la técnica frecuentemente está determinada por las características físicas y químicas de la muestra, su cantidad, y el grado de purificación requerido.

Cromatografía en Gel.

La cromatografía en gel es un método de cromatografía líquida que separa moléculas principalmente de acuerdo a sus diferencias en el tamaño molecular. Ya que los tamaños de moléculas como proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos difieren consi -

derablemente, la cromatografía en gel resulta útil en la separación de mezclas complejas de estas sustancias. El método analítico - recibe también otros nombres: cromatografía de permeación en gel, cromatografía de exclusión, filtración en gel.

En la cromatografía líquida generalmente no es posible asignar la responsabilidad de las separaciones alcanzadas a un solo mecanismo. Así, en la cromatografía en gel, la separación se basa fundamentalmente en el tamaño molecular, pero está influenciada - por otros fenómenos, como intercambio iónico o adsorción.

En este método, las partículas del gel, que poseen una - estructura de matriz porosa, como esponja, de dimensiones controladas, se equilibran en un disolvente apropiado y luego se empa- can en una columna cromatográfica. La muestra, que consiste en - una mezcla de sustancias que difieren en sus dimensiones molecu- lares, se aplica sobre la superficie del lecho, se agrega luego - el eluyente de modo que la muestra va percolándose a través del - lecho. (Fig. 6)

Conforme la elución procede, las moléculas que son dema- siado grandes para entrar en los poros de la matriz del gel, pa- san rápidamente por el lecho en el espacio que rodea las partícu- las del gel y son eluidas en una zona cercana al principio del per- fil de elución. Por otro lado, las moléculas que pueden difundir por los poros de la matriz son retardadas en su migración a tra- vés del lecho. El grado de retención está inversamente correlacio- nado con las dimensiones moleculares: por lo tanto las moléculas

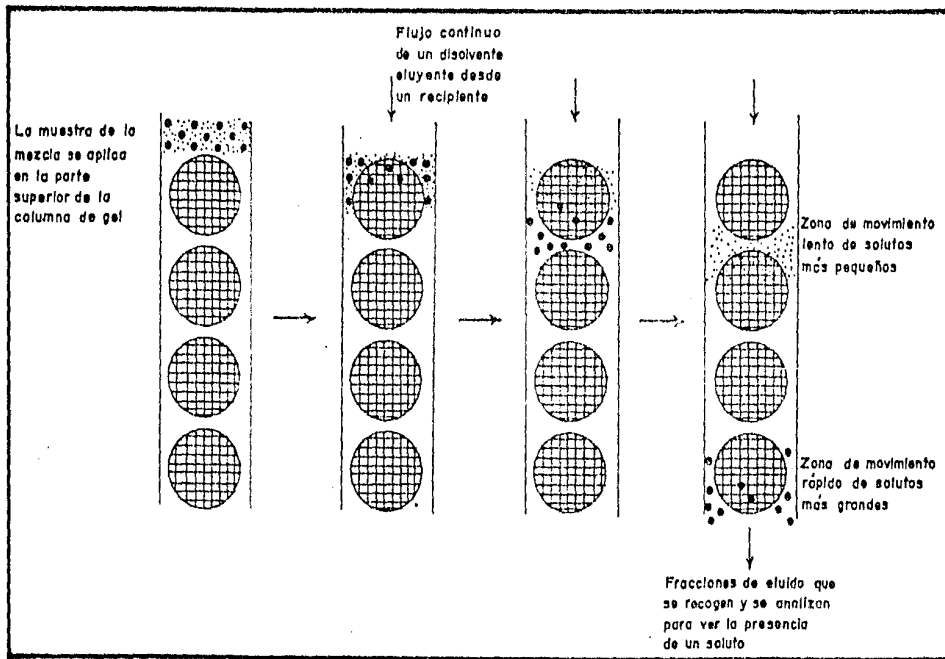


FIG. 6 FILTRACION MOLECULAR

más pequeñas son las más tardadas y por lo mismo, son las últimas en emerger del lecho.

Existen diferentes tipos de fases estacionarias para cromatografía en gel; la eficiencia de la separación proporcionada - por cada una está determinada principalmente por sus características físicas (20). Las más importantes de ellas son el límite de - exclusión, el rango de fraccionamiento, el tamaño de partícula, - la forma de partícula y la retención de agua y otros disolventes.

Las características deseadas en el medio usado en filtración molecular son:

- 1) La falta de reactividad química en la matriz
- 2) Bajo contenido de grupos iónicos
- 3) Poro y tamaño de partícula uniforme
- 4) Amplio rango de tamaño de partícula y de poro
- 5) Alta rigidez mecánica

Se cuenta ahora con diferentes tipos de fases que cubren en mayor o menor grado estas características. Estos son:

- a) Geles de polidextrán
- b) Geles de poliacrilamida
- c) Geles de agarosa y agarosa-acrilamida

En 1968, Davison (21) estudió el comportamiento de varias proteínas en diferentes medios de filtración molecular. Encontró

que muchas proteínas son completamente desnaturalizadas y separadas en las cadenas polipeptídicas que las componen utilizando soluciones de cloruro de guanidinio 6 mol que contenga agentes reductores. (22). Bajo estas condiciones, las cadenas adoptan una configuración parecida a un enrollamiento al azar. Así, las cadenas polipeptídicas de pesos moleculares desde 2000 a 1000 000, - pueden ser eluidas de columnas de agarosa al 6 % y separadas de acuerdo a su peso molecular.

IV. OBJETIVO

En este trabajo se pretende hacer una evaluación técnico-económica del método propuesto para purificar el extracto que contiene la proteína híbrida β -galactosidasa-cadena A de insulina, antes de someterla a la ruptura con bromuro de cianógeno. Los indicadores que se tomarán en cuenta, son el gasto de bromuro de cianógeno por miligramo de proteína tipo, frente al gasto del proceso de purificación.

V. MATERIALES

A. Equipo

- 1.- Aparato de Ultrasonido MSE Soniprep 150
- 2.- Agitador magnético con regulador de temperatura,
Sybron Tipo 1900
- 3.- Centrífuga Beckman Mod. J2-21
- 4.- Spectronic 21 Baush & Lomb
- 5.- Potenciómetro digital Beckman Mod. 3500
- 6.- Colector automático Multirac LKB Bromma 2111
- 7.- Uvicord S LKB Bromma 2138
- 8.- Registrador LKB Bromma 2210
- 9.- Cámara de electroforesis Bio-Rad Mod. 220 y 221
- 10.- Espectrofotómetro DU-8 Beckman

B. Reactivos

- 1.- Cloruro de guanidinio
- 2.- β -mercaptoetanol
- 3.- Bolsa de diálisis (poro 12000-14000)
- 4.- Reactivos para la determinación de proteínas por el
método de Lowry
- 5.- Reactivos electroforesis
- 6.- Sepharose Cl 6B-200
- 7.- β -galactosidasa

8.- Solución amortiguadora de lisis (SAL), de la siguiente composición:

Tris(hidroximetilamino)metano	2.42 g
Cloruro de sodio	11.68 g
Acetato de magnesio	2.145 g
β -mercaptoetanol	0.06 ml
Glicerol	5.0 ml
Agua cbp	100.0 ml

C. Material Biológico

Paquete celular obtenido de la cepa MX614 pBR213

Las técnicas conocidas en ingeniería genética permitieron obtener un gen que codifica para la β -galactosidasa, en cuyo extremo se ha unido la región de ADN que codifica para la cadena A o B de insulina. La traducción de este mensaje generará una proteína híbrida que constará de casi toda la β -galactosidasa y una de las cadenas de insulina fusionada en el extremo carboxilo terminal de la misma por un residuo de metionina.

Se eligió la cepa MX614 porque no produce ninguna proteína de peso molecular igual al de la β -galactosidasa, lo cual es importante dado que la cuantificación de la proteína híbrida se llevará a cabo por densitometría del extracto celular (23). Se utilizó el medio M-9 con glucosa porque en este se observó una biosíntesis de proteína máxima.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

Como fué descrito en el planteamiento del problema, se trata de evaluar el método propuesto de purificación del extracto enriquecido de proteína híbrida A antes de someterla a la ruptura con bromuro de cianógeno.

El trabajo experimental desarrollado consta de varias etapas:

1. Ruptura celular
2. Extracción de la proteína híbrida A
3. Purificación del extracto por filtración en gel

1. Ruptura Celular

De la cepa MX614 pBR213 se obtuvo el paquete celular que fue procesado a fin de obtener un extracto de proteína híbrida, que posteriormente fue purificado. Debido a que la localización de la proteína híbrida es intracelular, es necesaria la ruptura celular para obtenerla en suspensión. Esta ruptura se lleva a cabo por ondas ultrasónicas.

Con lotes anteriores se había comprobado la eficacia de resuspender las células en una solución amortiguadora de lisis, (SAL, cuya composición se indica en la sección de materiales), para someterlas a la ruptura por medio de ultrasonido. La proteína híbrida, a diferencia de algunas otras proteínas celulares, perman

nece insoluble en esta solución y es luego extraída con cloruro de guanidinio 6 mol. Ahora bien, se probó la alternativa de emplear en vez de esta solución de ruptura, una solución de cloruro de guanidinio 1.5 mol, y desintegrar en ella las células, con objeto de ver si el cloruro de guanidinio a esta concentración lograba solubilizar en mayor proporción otras proteínas que se encuentran en la misma suspensión, y obtener así, una fracción de proteína híbrida más libre de otras proteínas. Por esto, el paquete celular original se dividió en dos lotes: A y B, que fueron tratados de diferente forma:

LOTE A. Se pesaron 40 g de células y se suspendieron en 80 ml de solución de cloruro de guanidinio 1.5 mol, hasta obtener una suspensión homogénea.

LOTE B. 5 g de células de la misma cepa se suspendieron en 10 ml de solución amortiguadora de lisis (SAL), hasta obtener una suspensión homogénea.

Los lotes A y B se mantuvieron en agitador magnético en cuarto frío durante cuatro horas. Pasado este tiempo se procedió a romper con ultrasonido el lote A y el B durante 15 minutos a intervalos de un minuto.

La proteína que nos interesa, como ya fué indicado, se encuentra, junto con otras proteínas, en la fracción insoluble y se le separa por centrifugación a 15 000 rpm durante 30 minutos. Al paquete se le hizo un lavado utilizando un volumen igual al del sobrenadante separado y empleando la solución respectiva. Se cen-

trifugó nuevamente a las mismas condiciones. Se separan sobrenadante y paquete.

2. Extracción de la proteína híbrida A

En esta parte del procedimiento, ambos lotes se trataron de la misma forma: se procedió a extraer la proteína híbrida A con una solución de cloruro de guanidinio 6 mol, (conteniendo 1 % de β -mercaptoetanol). Cada uno de los paquetes obtenidos se resuspendió en un volumen determinado de solución, calculado por la relación 40 ml de cloruro de guanidinio por cada 15 g de peso húmedo.

Se dejaron los lotes A y B en agitación magnética para homogeneizar durante 20 horas. Se centrifugaron a 20,000 rpm durante 90 minutos. Se separaron los sobrenadantes con cuidado de no acarrear parte de la fracción insoluble. Esta última se somete a una segunda extracción agregando el mismo volumen de cloruro de guanidinio.

Hasta este punto, se reunieron las muestras indicadas a continuación, que fueron tomadas en la etapa correspondiente. Las muestras tomadas se dializaron contra agua destilada. Se les hizo determinación de proteínas por el método de Lowry (24), y electroforesis en placa de gel de poliacrilamida al 11 % según Laemmli (25). También se presentan a continuación, las fotos de los geles obtenidos.

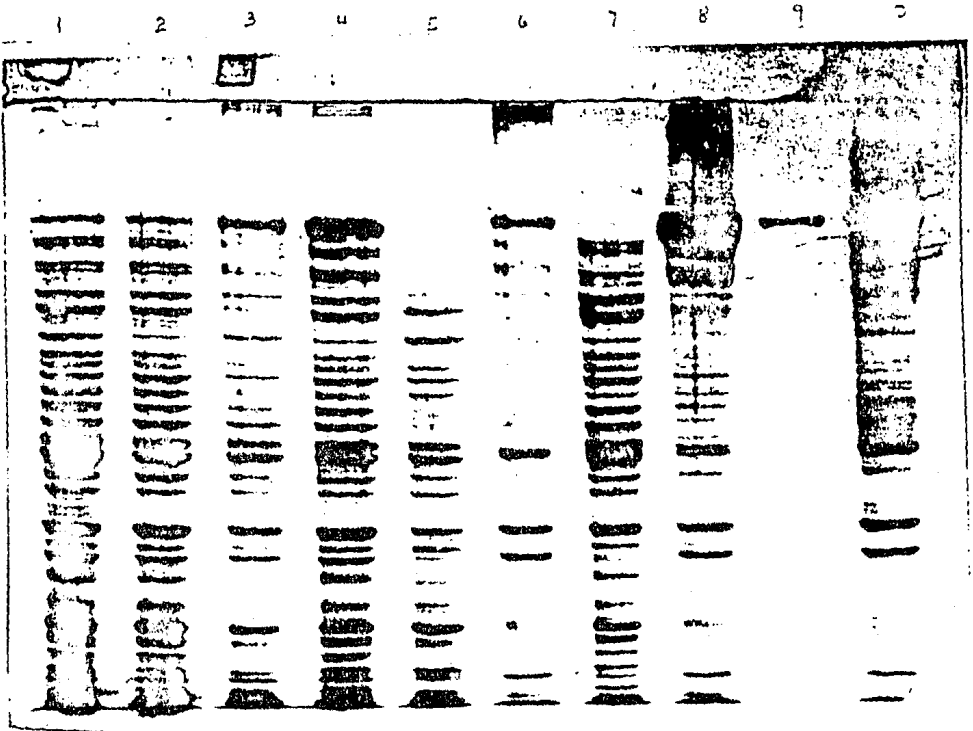
Muestras tomadas:

LOTE A. Desintegración celular en GuHCl 1.5 mol

- a) Suspensión celular antes de la ruptura
- b) Suspensión celular desintegrada
- c) Primer sobrenadante
- d) Primer paquete
- e) Segundo sobrenadante
- f) Segundo paquete
- g) Sobrenadante 1a. extracción
- h) Paquete primera extracción
- i) Sobrenadante segunda extracción
- j) Paquete segunda extracción

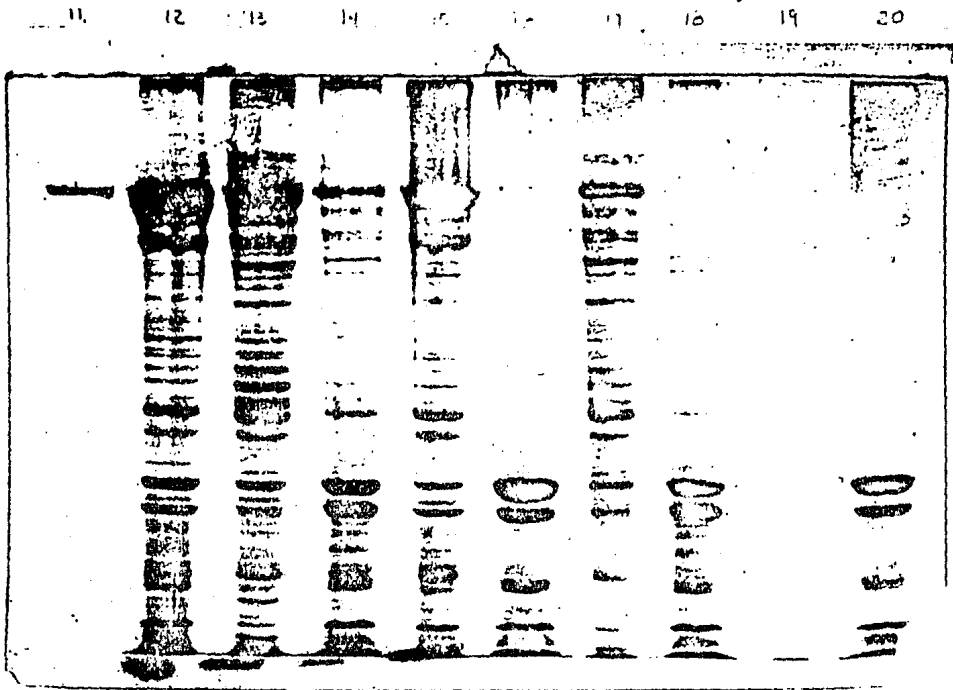
LOTE B. Desintegración celular en SAL

- a) Suspensión celular antes de ruptura
- b) Suspensión celular desintegrada
- c) Primer sobrenadante
- d) Primer paquete
- e) Segundo sobrenadante
- f) Segundo paquete
- g) Sobrenadante primera extracción
- h) Paquete primera extracción
- i) Sobrenadante segunda extracción
- j) Paquete segunda extracción



- 1.- Suspensión celular A
- 2.- Suspensión celular B
- 3.- Sonicado A
- 4.- Sonicado B
- 5.- Primer sobrenadante A
- 6.- Primer pfcipitado A
- 7.- Priemr sobrenadante B
- 8.- Primer precipitado B
- 9.- β - galactosidasa
- 10.- Segundo precipitado A

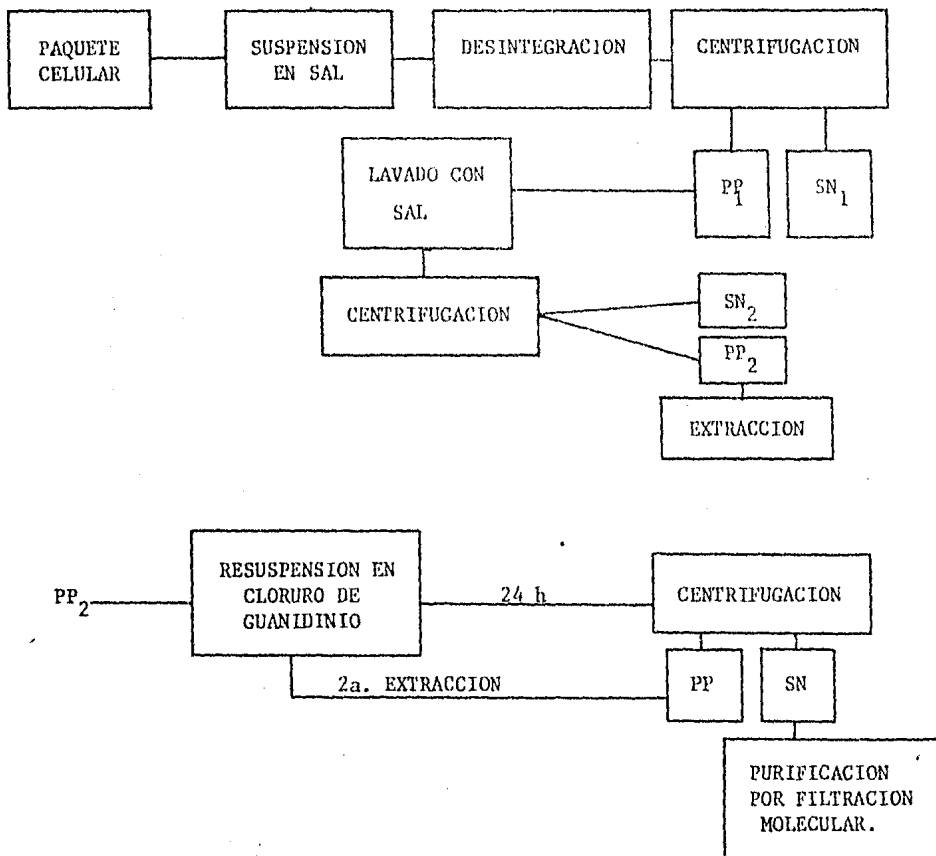
GEL TEÑIDO DE LAS MUESTRAS
TOMADAS



- 11.- β -galactosidasa
- 12.- Segundo precipitado B
- 13.- Sobrenadante 1a. extracción A
- 14.- Precipitado 1a. extracción A
- 15.- Sobrenadante 1a. extracción B
- 16.- Precipitado 1a. extracción B
- 17.- Sobrenadante 2a. extracción A
- 18.- Precipitado 2a. extracción A
- 19.- Precipitado 2a. extracción B

GEL TEÑIDO DE LAS MUESTRAS TOMADAS

ESQUEMA DEL PROCESO TOTAL



3. Purificación del extracto

Como se ha mencionado, el objetivo de este paso consiste en separar la proteína híbrida A del resto de las proteínas celulares presentes en el extracto obtenido, con objeto de obtener un menor número de contaminantes al romper con el tratamiento de bromuro de cianógeno, y así facilitar la purificación de la cadena A.

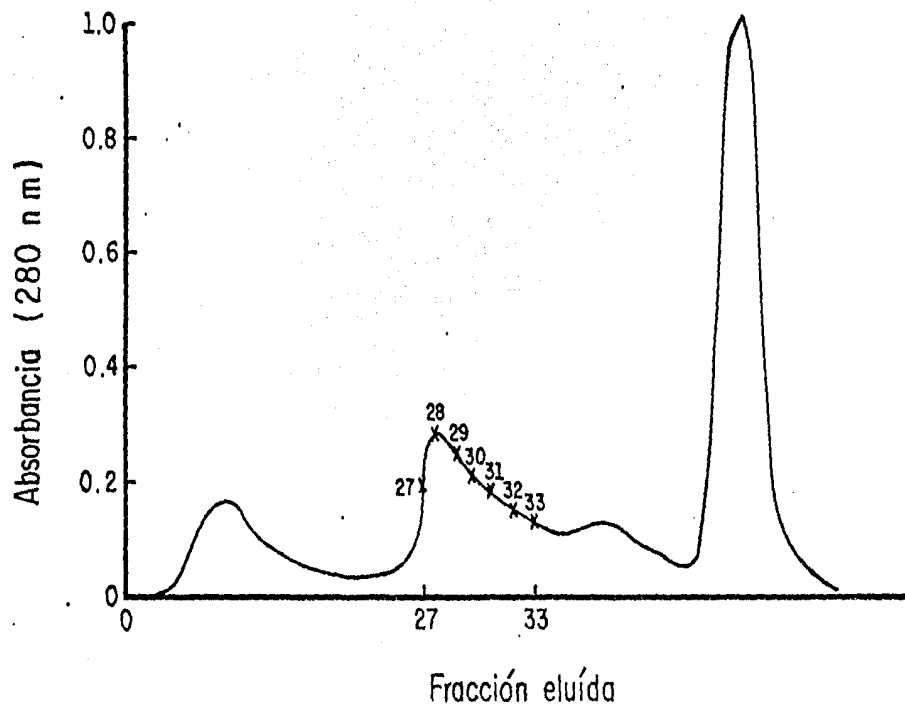
El extracto obtenido con cloruro de guanidinio 6 mol se somete a purificación utilizando el método de cromatografía por permeación en gel. Como hasta este punto se cuenta con dos lotes en el mismo tipo de solución, (Cloruro de guanidinio 6 mol), sólo se procedió a la purificación de uno de ellos, el A, siendo evidente que el otro extracto se comportaría del mismo modo si se trabajara con él.

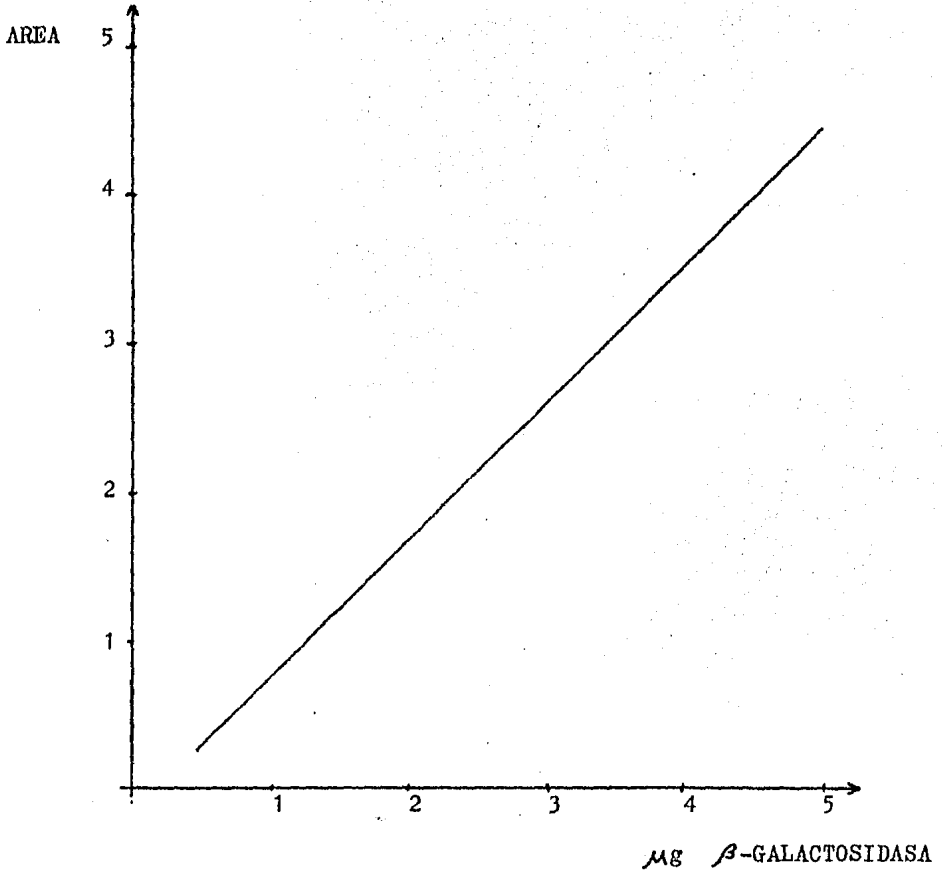
Inicialmente se corrieron numerosas muestras, haciendo variaciones en el empaque, eluyente y flujo utilizados. De todos los empleados, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar las siguientes condiciones:

- a) Empaque: Sepharose Cl 6B-200 (Sigma)
- b) Dimensiones: 1.2 cm X 87 cm
- c) Eluyente: cloruro de guanidinio 6 mol
- d) Flujo: 2 ml/H

La columna utilizada se integró a un aparato colector automático, (el tipo y las partes del mismo se indican en la sección

de materiales). A continuación se muestra el perfil de elución -
obtenido.





CURVA ESTANDAR DE GALACTOSIDASA

Cuantificación de la proteína híbrida.

La cuantificación de la proteína híbrida se llevó a cabo por densitometría en los geles teñidos de poliacrilamida según Fishbein (23), utilizando un aparato espectrofotómetro Beckman DU-8. En general, el método consiste en someter las fracciones de interés a electroforesis según Laemmli (25), y después teñir los geles con azul de Coomasie. El método densitométrico proporciona una gráfica de la intensidad y tamaño de las bandas correspondientes a cada una de las proteínas en el gel. Al obtener el área bajo la curva se obtiene la proporción correspondiente a la proteína híbrida con respecto a las demás.

Así, en primer lugar se corrió una curva estandar de β -galactosidasa, obteniéndose por densitometría las siguientes áreas:

μg β -galactosidasa	Area
0.476	0.310
0.952	0.522
1.428	0.977
1.904	1.792
2.856	2.590
3.332	3.015
3.808	3.619
4.284	3.628
4.760	4.169

Al ajustar la curva por el método de mínimos cuadrados, se obtiene la ecuación:

$$Y = 0.940 X - 0.202 \quad ; \quad \text{donde: } X = \mu\text{g de } \beta\text{-galactosidasa}$$
$$Y = \text{área}$$

Para cuantificar la proteína híbrida obtenida en cada fracción eluida, se realizó la electroforesis en placa de gel de poliacrilamida al 11 % (25). La densitometría del gel teñido proporciona los valores de área de los picos correspondientes a cada proteína. Posteriormente se calcula la concentración correspondiente a cada valor, utilizando la ecuación corregida de la curva estándar previamente corrida.

CARRIL	AREA	μg PROT HIBRIDA	μg TOTALES	% PROT HIBRIDA
Prot. totales	1.521	1.833	7.107	25.79
frac. 27	1.707	2.031	2.121	95.26
frac. 28	2.635	3.018	3.063	98.53
frac. 29	0.586	0.838	1.595	52.54
frac. 30	0.444	0.687	1.443	47.61
frac. 32	0.221	0.450	1.247	36.09
frac. 33	0.363	0.601	4.253	14.13

DENSITOMETRIA DEL PERFIL DE ELUCION

Ahora bien, la densitometría proporciona la concentración de proteína híbrida presente en cada muestra aplicada a la electroforesis. Sin embargo, cada muestra aplicada es sólo una alícuota de la fracción eluida de la columna, por lo que es necesario calcular también la cantidad de proteína híbrida que se tiene en cada fracción completa. El cuadro siguiente muestra el procedimiento seguido para realizar este cálculo.

MUESTRA	μg PROT HIBRIDA	μl APLICADOS ELECTROFOR.	PROT HIB $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	VOL TOT FRACC.	mg TOTALES
Prot Tot.	1.833	2	0.9165	1.5 ml	1.375
27	2.031	22	0.092	3.0	0.276
28	3.018	15	0.201	2.8	0.563
29	0.838	15	0.056	2.8	0.157
30	0.687	15	0.046	2.6	0.119
32	0.450	15	0.030	1.9	0.057
33	0.601	15	0.040	2.2	0.088

CANTIDAD DE PROTEINA HIBRIDA OBTENIDA EN CADA FRACCION
ELUIDA DE LA COLUMNA

De esta manera, ahora se calculará la recuperación de - proteína híbrida que se va alcanzando en las fracciones sucesivas, en base a la cantidad total de proteína híbrida aplicada a la columna, (1.375 mg), dato que también se obtuvo por el análisis densitométrico.

FRACCION	PROT HIBRIDA (mg)	% RECUPERACION
27	0.276	20.07
28	0.563	61.02
29	0.157	72.43
30	0.119	81.09
32	0.057	85.23
33	0.088	91.64

RECUPERACION DE LA PROTEINA HIBRIDA
DESPUES DE PURIFICAR

DISCUSION Y RESULTADOS

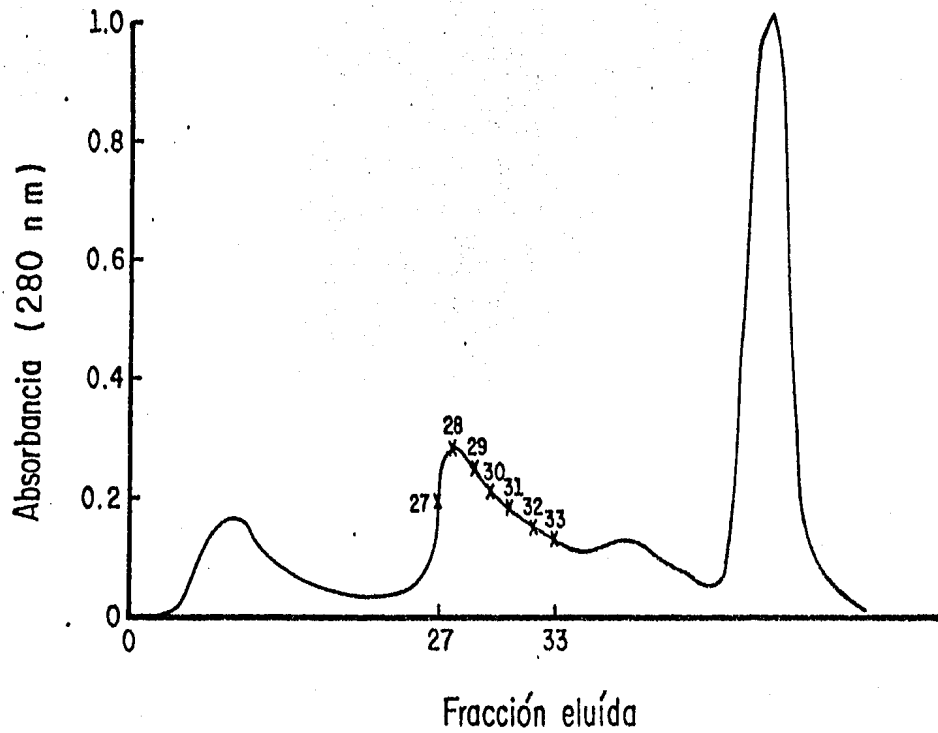
Aunque el objetivo primario de este trabajo lo constituye la evaluación del método de purificación propuesto, a lo largo del proceso experimental se obtuvieron datos que también constituyen objeto de análisis en esta discusión. De modo que la misma se desarrolla abarcando diferentes puntos.

1. En la primera etapa de la parte experimental, (ruptura celular), fué indicado que se probó la eficacia de la utilización de una solución de cloruro de guanidinio 1.5 mol para romper las células con ultrasonido, en vez de la solución amortiguadora de lisis que se había venido utilizando. A continuación se presentan los datos obtenidos de concentración de proteína híbrida en las diferentes etapas de extracción de la misma en ambos lotes.

Como puede observarse, la concentración de proteína híbrida obtenida en el extracto utilizando cloruro de guanidinio 1.5 mol, no presenta ventajas en comparación con la obtenida utilizando la solución amortiguadora de lisis. (lotes A y B respectivamente).

M U E S T R A	% PROTEINA HIBRIDA EN RELACION A PROTEINAS TOTALES	
	LOTE A	LOTE B
Suspensión col.	2.46	3.67
Suspensión desint.	9.28	7.72
1er sobrenadante	0	1.31
1er paquete	8.09	40.23
2do paquete	6.87	32.17
SN 1a. extracc.	29.70	33.30
PP 1a. extracc.	5.46	1.84

2. En la purificación por filtración molecular del extracto de proteína híbrida (sobrenadante de la primera extracción), se obtuvo el perfil de elución mostrado en la siguiente página. El pico B es el que corresponde a la proteína híbrida β -galactosidasa-cadena A, y aunque el perfil parece indicar una resolución incompleta de esta fracción, la electroforesis y cuantificación de las fracciones colectadas muestra un grado de purificación relativamente aceptable, no obstante que no se aprovechen todas las fracciones. Es decir que, aunque en la purificación es recuperado un alto porcentaje de la proteína híbrida aplicada, (91.64 %), sólo las tres primeras fracciones son importantes, pues el resto contiene muchas otras proteínas, y a este nivel se alcanza una recuperación del 72.43 %. Al calcular la concentración relativa de proteí



na híbrida en la mezcla de estas fracciones, vemos que éstas es del 82 %.

La siguiente tabla presenta los resultados de purificación y recuperación de las fracciones analizadas.

FRACCION	% RECUPERACION	% PURIFICACION
27	20.07	95.76
28	61.02	98.53
29	72.43	52.54
30	81.09	47.61
32	85.23	36.09
33	91.64	14.13

PURIFICACION Y RECUPERACION DE LA PROTEINA
HIBRIDA

3. Finalmente, comparemos ahora las dos alternativas: por un lado la purificación de la proteína híbrida de los demás contaminantes protéicos, para así favorecer la obtención de la cadena A tras sulfitólisis oxidativa y rompimiento con bromuro de cianógeno. Y por otro lado, el tratamiento con bromuro de cianógeno sobre la proteína híbrida sin que ésta

haya sido previamente purificada.

A fin de poder hacer la comparación, necesitamos primero algunos datos de la cuantificación del proceso total:

GRAMOS DE CELULAS ORIGINALES	A	40 g
SOBRENADANTE 1a. EXTRACCION	B	110 ml
CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES EN ESE EXTRACTO	C	12.58 mg/ml
CANTIDAD DE PROTEINAS TOTALES	BXC D	1.384 g
% DE PROTEINA HIBRIDA EN RELACION A PROT. TOT. (DENSITOM)	E	29.92 %
CANTIDAD DE PROTEINA HIBRIDA EXTRAIDA	DXE/100	414 mg

De acuerdo con esto, enseguida se procede a considerar primero, la purificación de la proteína híbrida.

3.1 Purificación de la proteína híbrida A.

Un gramo de células dá lugar a 2.75 ml de extracto. Estos 2.75 ml proporcionan 10.35 mg de proteína híbrida, de los cuales, al someterlos a filtración en gel, se recupera un 72.43 %, con una concentración de proteína híbrida del 82 %. De modo que la cantidad total de proteínas después de la pu

rificación sería de 9.14 mg :

$$\frac{110 \text{ ml sobrenadante}}{40 \text{ g células}} = 2.75 \text{ ml/g}$$

$$\frac{12.58 \text{ mg Proteínas}}{1 \text{ ml SN}} \times 2.75 \text{ ml SN} = 34.595 \text{ mg Prot. Tot.}$$

34.595 mg - 100 % (Prot. Totales)

10.35 mg - 29.92 % (Prot. Híbrida)

Así, 10.35 mg de Proteína Híbrida son extraídos a partir de un gramo de células, y sometidos a filtración en gel, de donde se recupera el 72.43 % :

10.35 mg - 100 %

7.5 mg - 72.43 %

Estos 7.5 mg obtenidos después de la filtración en gel, representan el 82 % de las proteínas presentes, de modo que el total de las proteínas es de 9.14 mg :

7.5 mg - 82 %

9.14 mg - 100 %

Considerando que en el tratamiento de ruptura con bromuro de cianógeno se necesita agregar 1.3 g de este reactivo por cada gramo de proteína total, entonces la cantidad de bromuro de cianógeno necesaria para romper la proteína híbrida puri-

ficada a partir de un gramo de células sería de 11.88 mg. Por otro lado, analicemos ahora la segunda alternativa.

3.2 Ruptura con bromuro de cianógeno de la proteína híbrida sin pasar por filtración molecular.

A partir de un gramo de células, (que es nuestra base de comparación), se obtienen 2.75 ml de extracto, los cuales contienen 34.595 mg de proteínas totales. De modo que para romperlas con bromuro de cianógeno se necesitan 44.97 mg del mismo.

De acuerdo con el análisis anterior, tenemos que para cada gramo de células procesado se requiere diferente cantidad de bromuro de cianógeno, dependiendo de la alternativa empleada:

- a) Por un lado se necesitan 44.97 mg del reactivo en el proceso de ruptura directa, el cual proporciona una concentración de proteína híbrida del 29.92 %
- b) Por otro lado, en el tratamiento de purificación se alcanza una concentración de proteína híbrida del 82 % y en el tratamiento posterior con bromuro de cianógeno se requieren solamente 11.88 mg del mismo.

Esta comparación muestra que en la técnica empleada de filtración molecular para la proteína híbrida, se alcanza un ma-

yor enriquecimiento de la misma, lo cual trae como consecuencia una menor cantidad necesaria de bromuro de cianógeno, y por consiguiente, una disminución en el costo del mismo. Además es muy importante considerar otro aspecto: el de seguridad industrial, sobre todo si se toma en cuenta que el escalamiento del proceso automáticamente implica un aumento en la cantidad de bromuro de cianógeno empleado, que es mucho mayor si se realiza la ruptura en la proteína sin purificar, siendo considerablemente más serios los problemas de riesgo de toxicidad en este caso. Los efectos tóxicos del bromuro de cianógeno son similares a los del ácido cianhídrico: altas concentraciones pueden producir paro respiratorio, en menor cantidad se produce dolor de cabeza, vértigo, náuseas y vómito. La exposición crónica por largos períodos puede causar fatiga y debilidad. La exposición a 150 ppm por media hora o una hora puede arriesgar la vida. La muerte puede presentarse en pocos minutos con una exposición a 300 ppm. La dosis letal es de 50-60 mg (32).

Ahora bien, en cuanto al costo del proceso de purificación tenemos que utilizando cloruro de guanidinio BRL y Sepharose Cl 6B 200 Sigma, el proceso efectuado tiene un costo de \$8760.00. Y el mismo proporciona una proteína híbrida bastante enriquecida, cuya posterior ruptura con bromuro de cianógeno se ve facilitada. Del otro modo, la ruptura de la proteína híbrida sin purificar requiere en primer lugar de cantidades mucho mayores de bromuro de cianógeno, además de que la cadena obtenida necesita ser sometida después a otros procesos de purificación.

Actualmente, (al tiempo que se terminó este trabajo experimental), se están estudiando otras alternativas en el proceso de obtención de cada una de las cadenas para la producción de la insulina humana biosintética, para elegir la más adecuada de ellas.

Desde otro punto de vista, es importante recalcar la trascendencia del proyecto. En primer lugar, sabemos que en México - el aumento de incidencia de la diabetes mellitus, provoca una - gran demanda de la hormona. En 1981 se importaron en nuestro país 2,556 kilogramos de insulina, cuyo costo fué de 744,686 dólares. Al año siguiente la cantidad aumentó a 11,967 kilogramos, a un - costo de 1444,753 dólares. Hasta 1981 esta importación procedió de Estados Unidos, Argentina y Brasil. En 1982 Holanda se sumó a la lista.

Estos datos hablan por sí mismos, e indican la importancia de contar con otra fuente de obtención de insulina: la tecnología del ADN recombinante. El avance que se está obteniendo en el campo de la biotecnología es constante y enorme, y parece ser que su potencial es ilimitado: tiene aplicaciones en áreas tales como la salud, los alimentos, la energía y la contaminación.

En los últimos años se han creado cerca de 200 compañías privadas dedicadas a la ingeniería genética en Estados Unidos y Europa Occidental; ahora vemos como en México también surge el - serio interés en el desarrollo y aplicación de la biología molecular.

Por otro lado, la insulina representa apenas el primer producto clínicamente útil obtenido con esta tecnología, de modo que las perspectivas son muy amplias.

CONCLUSIONES

Se estudió la posibilidad de purificación de la proteína híbrida β -galactosidasa-cadena A de insulina, como alternativa en el proceso de obtención de la cadena A de insulina humana biosintética.

La metodología propuesta facilita etapas posteriores del proceso de obtención de la hormona, como son la ruptura con bromuro de cianógeno y la posterior purificación de la cadena A.

Los datos obtenidos servirán como indicativos y como punto de comparación para que con otros trabajos que ya se están llevando a cabo, se establezcan las mejores rutas a seguir en el procedimiento global.

La creciente demanda de insulina en México, hace evidente la importancia de contar con otra fuente de la hormona. He aquí - la trascendencia del proyecto de obtención de la Insulina Humana Biosintética.

BIBLIOGRAFIA

1. Lehninger, A.L., 1979, Bioquímica, Ediciones Omega, Barcelona.
2. National Diabetes Data Group, 1979, Clasificación and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance, Diabetes, 28: 1039-57 , december.
3. Organización Panamericana de la Salud, 1982, Las Condiciones de Salud en las Américas, Washington, D.C.
4. Litter, M., 1979, Farmacología Experimental y Clínica, 5a. edición, El Atenco, Bogotá.
5. Mering, J.V. and Minkowski, O., 1966, Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 26: 371. Citado en Angew. Chem. Int. Ed., 5: 802-22.
6. Ssobolew, Zentralblatt., 1966, Pathol. 11: 202. Citado en Angew. Chem. Int. Ed., 5: 802
7. Banting, F.G., Best, C.H., 1966, J. Lab. Clin. Med., 7: 251. Citado en Angew. Chem. Int. Ed., 5: 802.
8. Abel, J., 1926, Crystalline Insulin, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 12: 132.
9. Ryle, A., Sanger, F., Smith, F. and Kitai, R., 1955, The Disulphide Bonds of Insulin., Biochem. J., 60: 541.
10. Wilson, C.O., Gisvold, O., 1971, Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 6a ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
11. Bhagavan, N.V., 1974, Biochemistry, J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
12. Sanger, F., 1949, Species Differences in Insulins., Nature, 164: 529.

13. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, PLM, 27a. edición mexicana.
14. Meyers, F.H., et al, 1982, Farmacología Clínica, Ed. El Manual Moderno, 5a. ed., México.
15. Scientific American, 1981, No. 62, Nov.
16. Diabetes Care, 1981, 4, No. 2, March, April.
17. Chemical and Engineering, 1982, Nov 8.
18. Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolívar, F., et al, 1979, Expression in Escherichia coli of chemilally synthesized genes for human insulin., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 76, Nº 1, january.
19. Bohinski, R.C., 1978. Bioquímica, Fondo Educativo Interamericano, S.A.
20. Methods in Enzymology, 1971, Vol XXII, Enzyme purification and related techniques., Ed. by William B. Jakoby.
21. Davison, P.F., 1968, Proteins in Denaturing Solvents: Gel - Exclusion Studies, Science 161: 906-7.
22. Tanford., C.H., et al, 1967. Proteins as Random Coils. I. Intrinsic Viscosities and Sedimentation Coefficients in Concentrated Guanidine Hydrochloride., J. of the American Chemical Society., 89: 729.
23. Fishbein, W., 1977, Quantitative Densitometry of 1-50 g Protein in Acrylamide Gel Slabs with Coomassie Blue, Analytical Biochemistry, 46; 388
24. Folin, O. and Ciocalteu, V., 1927, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins., J of Biological Chemistry, 73: 627
25. Laemmli, U., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄., Nature, 227: 680

26. Altszuler, Brange, et al. 1975, Insulin, Hasselbatt and Bruchhausen, New York.
27. Journal of Chromatography Library, vol. 3, 1975, Elsevier, Sci. Pub. Co.
28. Klostermeyer, H., Humbel, R.E., 1966, The Chemistry and - Biochemistry of Insulin, Angew. Chem. Internat. Ed., 5: 807-22
29. Cooper, T.F. 1977, The Tools of Biochemistry, John Wiley & Sons, USA.
30. Villaseñor, J.B., et al., 1976, Temas para el examen profesional del Médico Cirujano, Ed. F. Méndez Oteo., México.
31. Drill's Pharmacology in Medicine, 1971, Mc Graw-Hill Book Co., USA.
32. The Merck Index, 1976, 9a. ed., Merck & Co.
33. Ullman, A., et al., 1968. On the determination of Molecular Weight of Proteins and Protein Subunits in the Presence of 6 mol Guanidine Hydrochloride. Biochemistry. 7: 261