

287
6



Universidad Nacional Autónoma
de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
CUAUTITLAN

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA
HORMONA DE CRECIMIENTO
HUMANA PARA USO CLINICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JOSE DE JESUS PEREZ SAAVEDRA

Q. F. B. RAMON CENDEJAS RAMIREZ

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

CONTENIDO.

GENERALIDADES.

INTRODUCCION.

Método de Raben (1959) 25.

Método de Stockell(1966) 32.

Método de Trygstad (1971) 36.

Método de Parlow (1975) 24.

PARTE EXPERIMENTAL.

Objetivo.

Motivación.

Material.

Equipo.

Reactivos.

Método.

I.-Obtención de los polvos de pituitaria secados en acetona.

II.-Extracción de la fracción glucoproteica.

III.-Extracción de la hormona de crecimiento.

IV.-Purificación de la hormona.

V.-Resultados.

DISCUSION.

CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

GENERALIDADES.

Hormona de Crecimiento (Somatotropina).

La hormona de crecimiento ha sido aislada de las glándulas pituitarias de distintas especies (principalmente de bovino) con suficiente pureza y cantidad para su estudio. El conocimiento de la estructura fue determinado por Li y colaboradores, estableciéndola como primaria (16).

La hormona de crecimiento de todos los mamíferos consiste en un sólo polipéptido con un peso molecular aproximado de 21,500 g/mol. La hormona de crecimiento humana contiene 190 aminoácidos con dos puentes disulfuro.

La hormona de crecimiento de otros primates se a semeja mucho a la hormona de crecimiento humana en diversas propiedades físicas, pero las diferencias inmunológicas se incrementan marcadamente de acuerdo al grado de se paración filogenética. Es válido decir que estas diferencias inmunológicas indican diferencias en la secuencia de aminoácidos (35).

Sólo la hormona de crecimiento de humano y de otros primates es activa en el hombre y no la de bovino y porcino a pesar de que existe un elevado grado de similitud en el orden de sucesión de los aminoácidos entre la - de éstos y la del hombre.

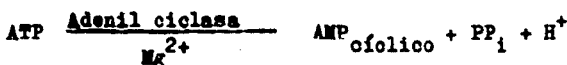
La hormona de crecimiento puede llevar a cabo al gunas acciones de la hormona lactogénica (prolactina) y de lactógeno placentario humano. Aunque todas estas hormonas son entidades separadas, hay considerable similitud en sus estructuras y en consecuencia propiedades inmunológicas - similares.

MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS.

Un avance importantísimo para conocer el mecanismo de acción de las hormonas (incluyendo desde luego la hormona de crecimiento) fue realizado por Earl Sutherland como consecuencia de estudios comenzados en 1950. El trabajo de Sutherland dió lugar al concepto de que el AMP cíclico es un mensajero secundario en la acción de diversas hormonas.

Los aspectos esenciales de este concepto son:

- a).-Las células contienen receptores para las hormonas en la membrana plasmática.
- b).-La combinación de una hormona con sus receptores específicos en la membrana plasmática da lugar al estímulo de adenil ciclase que también está ligada a membrana plasmática.
- c).-El aumento de actividad de la adenil ciclase incrementa la cantidad de AMP cíclico en el interior de la célula ya que es bien sabido que el AMP cíclico se forma a partir de ATP por la acción de adenil ciclase:



- d).-El AMP cíclico actúa entonces dentro de la célula para alterar la velocidad de uno o diversos procesos celulares (por ejemplo glucogenólisis, lipólisis, cetogénesis etc.) ya que activa un denominador común a estos efectos, la proteína quinasa.

Un importante aspecto del modelo del mensajero secundario es que la hormona no necesita penetrar a la

célula, su impacto se realiza sobre la membrana celular. Los efectos biológicos de la hormona van mediados dentro de la célula por AMP cíclico en vez de por la propia hormona (30).

ACCION BIOLOGICA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO.

Se han realizado grandes esfuerzos de investigación para estudiar la acción biológica de la hormona de crecimiento. En general se ha determinado que tiene varios efectos en diferentes tejidos "verbi gratia" tejido muscular, tejido adiposo, hígado etc. En general incrementa el crecimiento total y puede llegar a causar gigantismo. Su efecto estimulante sobre la síntesis de ARNs sugiere que parte de su actividad interviene en la síntesis de proteínas o enzimas. La hormona de crecimiento también actúa a nivel de membrana para facilitar el transporte, principalmente de aminoácidos.

La hormona tiene influencia en diversas esferas del metabolismo, a continuación se presenta un muy breve resumen sobre las áreas de mayor acción de la hormona de crecimiento.

I.-Síntesis de Proteínas.

La hormona de crecimiento estimula la síntesis de proteínas en el animal intacto, los aminoácidos y la urea sanguínea disminuyen(10). En tejido muscular, la hormona de crecimiento puede estimular la síntesis proteica incrementando el transporte de aminoácidos hacia la célula, acción que se puede demostrar "in vitro" en el diafragma de la rata (10). Este efecto no es inhibido por la puromicina. Por lo tanto la facilitación del transporte de aminoácidos por la hormona no es mediado por la acción directa sobre la síntesis proteica(10). Diversos autores han

hecho intentos por explicar la estimulación de la síntesis proteica por la hormona de crecimiento en términos de metabolismo de ácido nucleico(35). En el animal intacto la administración de hormona de crecimiento aumenta la síntesis de ADN y ARN (35). La hormona también provoca un aumento en la síntesis de colágena, puesto que esta proteína es rica en hidroxiprolina, la medición de la hidroxiprolina urinaria se puede usar para valorar la actividad de la hormona de crecimiento en el animal intacto(10).

2.-Metabolismo de lípidos.

En vivo la administración de hormona de crecimiento es seguida, después de 60 minutos, de un incremento de ácidos grasos libres circulantes y de un aumento de la oxidación de estos ácidos en el hígado(35).

3.-Metabolismo de Glúcidos.

En todo tipo de músculo la hormona de crecimiento antagoniza los efectos de la insulina. La disminución de la glucólisis, así como la inhibición del transporte de glucosa puede ocurrir en distintas etapas. La movilización de los ácidos grasos de los depósitos de triglicéridos también puede contribuir a la inhibición de la glucólisis en músculo en general. La hiperglucemia después de la administración de la hormona de crecimiento es el resultado combinado de la utilización periférica disminuida de la glucosa y del incremento de producción hepática a través de la gluconeogénesis (10).

4.-Metabolismo iónico o mineral.

La hormona de crecimiento aumenta la absorción intestinal(mediada por calcitonina) de iones calcio así -

como su excreción. Ya que la hormona estimula el crecimiento de los huesos largos en la epífisis, resulta un aumento de la retención de iones calcio además de sodio, potasio, magnesio, cloruros y fosfatos.

5.-Propiedades de Prolactina.

La hormona de crecimiento tiene propiedades de prolactina, como por ejemplo: estimulación de glándulas mamarias y estimulación de lactogénesis.

Control de Secreción.

Recientes evidencias sugieren que sustancias específicas dentro del hipotálamo pueden estimular (factor liberatorio de hormona de crecimiento, PLHC) e inhibir (factor inhibitorio de hormona de crecimiento FIHC) la secreción de hormona de crecimiento (16). Este doble sistema de regulación hipotalámica esta bajo la influencia de centros cerebrales superiores. Se sabe que la dopamina, serotonina y norhepinefrina que estan presentes dentro del hipotálamo actuan como neurotransmisores y controlan los efectos de diversos estimulantes de hormona de crecimiento (por ejemplo, catecolaminas, vasopresina, factor liberatorio de hormona tiroidea, endorfinas, encefalinas, arginina, prostaglandinas, AMPc, GMPc, insulina etc.)

La L-dopa, 5 hidroxitriptofan, agentes alfa-adrenérgicos y bloqueadores beta-adrenérgicos pueden estimular o facilitar la liberación de hormona de crecimiento y los bloqueadores alfa-adrenérgicos y agentes beta-adrenérgicos inhibir la secreción de la hormona (20).

INTRODUCCION.

La naturaleza y el tipo de acción de la hormona de crecimiento humana de la pituitaria anterior ha sido revisada por numerosos autores. En 1920 la importancia metabólica de la glándula pituitaria se puso de manifiesto por los experimentos del profesor Houssay y la doctora Potich en batracios.

El aislamiento de la hormona de crecimiento bovina de elevada pureza por Li, Evans y Simpson (19) y los subsecuentes métodos de separación (37), (18) y (25) estimularon el desarrollo de diversos trabajos sobre los efectos de esta hormona en animales y en el hombre.

En el Simposium Internacional realizado en 1955 (28) se determinó la existencia de un alto grado de especificidad entre la hormona de crecimiento de las diversas especies animales. Las preparaciones de glándulas pituitaria de pez no son activas en la rata, la hormona de crecimiento bovina y de pez son activas en peces intactos e hipofisectomizados, la hormona de crecimiento bovina es activa también en gatos, perros, conejos y ratas la hormona de crecimiento de los no primates no es activa en el hombre. Esto indica que de peces a anfibios a mamíferos y a primates existen cambios estructurales en la hormona de crecimiento que la hacen efectiva de especies superiores a especies inferiores pero no a la inversa.

Para tratar de explicar esto se ha propuesto entre otras hipótesis, la existencia de un "centro activo" en la hormona que viene siendo progresivamente más com-

plejo de peces a primates.

La demostración de que la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento de mono son altamente efectivas en el hombre(1) y (25) y en el mono (14) provocaron un elevado interés en las hormonas de la pituitaria humana.

Diversos trabajos para aislar hormonas de la pituitaria se efectuaron en glándulas de animales (borrego, buey, puerco etc). Cada uno de estos métodos tendió a especializarse para obtener una hormona simple o quizá dos pocos trabajos se efectuaron para alcanzar un sistema general para la separación de todos los principios activos de la pituitaria anterior(8),(2) y (7). Generalmente hablando no fueron del todo satisfactorios. Trabajos más optimistas fueron los realizados en 1955 por Wilhelmi.

En años más recientes y conjugando los conocimientos producidos por los diversos trabajos, Raben implementó un método de obtención de la hormona de crecimiento humana que fue y aún es considerado como el método clásico (25). Stockell en su trabajo (32) aisla no únicamente la hormona de crecimiento humana sino también hormona luteinizante, hormona folículo estimulante y hormona estimulante de tiroides. Parlow (24) propone su método y obtiene la hormona con muy buena pureza. Otros autores siguen diversos caminos fundamentalmente interezados en obtener más pureza y mayor potencia, entre ellos se puede mencionar el trabajo realizado por Olav Trygstad (36).

Estos últimos cuatro autores determinaron los métodos que se pueden considerar como los más importantes

y por lo consiguiente los más usuales. A continuación se presenta un resumen de cada método.

Abreviaciones usadas en el desarrollo del trabajo:

HCH =Hormona de Crecimiento Humana.

D.O. =Densidad Optica.

mcg =Microgramos.

ng =Nanogramos.

cpm =cuentas por minuto.

nm =nanómetros.

RIA =radioinmunoanálisis.

I.U. =unidad internacional, la actividad de 1 mg de hormona de crecimiento bovina USP.

METODO DE RABEN (1959) 25

El autor propone este método enunciando dos ventajas principales sobre los otros trabajos.

- a).-El producto se encuentra libre de otras hormonas.
- b).-El procedimiento de extracción es lo suficientemente violento como para destruir bacterias y virus que puedan contener las hipófisis.

En resumen el método de extracción consiste en:

- a).-Solubilización de la hormona de crecimiento con ácido acético glacial a elevada temperatura (70°C).
- b).-Precipitación y eliminación de contaminantes alterando la fuerza iónica (con cloruro de sodio) y por propiedades de solventes (acetona).
- c).-Precipitación de la hormona aún conteniendo contaminantes por propiedades de solventes (eter etílico).
- d).-Solubilización de la hormona (con ácido acético) y - purificación con una resina de intercambio iónico.
- e).-Nueva purificación de la hormona por cambio en el pH (con hidróxido de potasio y ácido acético).
- f).-Recuperación de la hormona de crecimiento por propiedades de solventes (alcohol etílico).

METODO DE STOCKELL (1966) 32.

La ventaja esencial de este método consiste en obtener tres hormonas (hormona folículo estimulante, hormona luteinizante y hormona estimulante de tiroideas) además de la hormona de crecimiento.

El principio del método consiste en el mismo propuesto por Raben con la importante modificación que a continuación se señala.

Antes de proceder a la extracción de la hormona de crecimiento se extrae la fracción glucoproteica que contiene las tres hormonas arriba mencionadas. Esto se logra como sigue:

- a).-Se solubilizan las glucoproteínas en acetato de amonio en medio alcoholico.
- b).-El sobrenadante se separa por centrifugación y el precipitado se almacena para la posterior extracción de la hormona de crecimiento, por el método de Raben como ya se mencionó anteriormente.

MÉTODOS DE TRYSTAD (1971) 36.

La idea de Trystad al seguir esta metodología es cubrir los siguientes objetivos:

- a).-Preparar la hormona de crecimiento a partir de pequeños lotes de glándulas.
- b).-Que la hormona sea fácilmente soluble y bien tolerada por el paciente.
- c).-No exista pérdida de actividad por la formación de anticuerpos.

El resumen del método es el siguiente:

- a).-Solubilización de la hormona de crecimiento en agua destilada y amortiguador de fosfatos sucesivamente.
- b).-Precipitación de la hormona de crecimiento por cambio en el pH (con ácido clorhídrico) y propiedades de solventes (acetona).
- c).-Nueva solubilización de la hormona de crecimiento en amortiguador de fosfatos.
- d).-Precipitación de la hormona de crecimiento por cambio en la fuerza iónica (con sulfato de amonio).
- e).-Purificación de la hormona de crecimiento pasandola a través de una columna de sephadex G-100.

MÉTODO DE PARLOW (1975) 24.

El desarrollo de este método, nos dice el autor, nos da las siguientes ventajas con relación a las otras metodologías:

- a).-Incremento en el producto y la pureza química.
- b).-Se pueden tratar grandes lotes en poco tiempo (hasta 20,000 hipófisis en dos semanas).

La hormona de crecimiento humana es aislada por el método de Raben en detalle exacto, excepto por una modificación muy importante:

En el paso final la precipitación a $\text{pH}=6.5$ con etanol fue evitada, en su lugar se efectuó una diálisis del ácido acético en contra de bicarbonato de amonio y el dializado se liofiliza. La hormona obtenida es purificada por el paso a través de una columna de sephadex G-100.

Los cuatro métodos enunciados anteriormente ocasionalmente complementados con las experiencias de otros autores, dan la pauta a seguir en la formulación de un nuevo método con la finalidad última de obtener un producto más puro, con menos inversión de tiempo y dinero.

Los puntos claves del método son:

-De Trygstad.

- a).-Solubilización de la hormona por aumento en el pH.
- b).-Precipitación de contaminantes por disminución en el pH

-De Stockell.

- c).-Solubilización de las glucoproteínas en acetato de amonio y medio alcohólico.
- d).-Separación de las glucoproteínas de la hormona de crecimiento por centrifugación.

-De Raben.

- e).-Recuperación de la hormona de crecimiento por propiedades de solventes.

-De Parlow.

- f).-Purificación de la hormona por su paso a través de una columna de sephadex G-100.

Los detalles se dan a continuación en la Parte Experimental.

PARTE EXPERIMENTAL.**EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA PARA USO CLINICO.**

Objetivo.-Aislar la hormona de crecimiento humana, con buena pureza a bajo costo para aplicación clínica.

Motivación.- Una fuerte motivación es que existen personas que padecen deficiencia de hormona de crecimiento, a quienes se les llama enanos hipofisarios, se pueden tratar - proporcionándoles la hormona de crecimiento, pero su tratamiento resulta muy caro, ya que en la actualidad el precio de la hormona es muy alto (en nuestro país, el costo del tratamiento fluctuaba, a la fecha entre un millón y un millón doscientos mil pesos) produciéndose aquí la hormona, el costo del tratamiento se reduce enormemente, hasta quedar en aproximadamente sesenta mil pesos.

Material.-El esencial de un laboratorio de análisis clínicos.

Material biológico.-Hipófisis humanas.

Equipo.-Refrigerador.

Centrífuga Beckman Modelo J-21

Milivoltímetro Beckman Expandomatic.

Electrodos Beckman para el milivoltímetro.

Homogeneizador Omni Mixer.

Agitador Mag-Mix y barra magnética.
 Espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ II.
 Liofilizadora Usifadid. Précédés Rieutord.
 Columna Cromatográfica Pharmacia Fine Chemicals.
 Colector de Fracciones LKB Produkter AB.
 Contador de Gammas AMES Gammacord II.

Reactivos. - (Todos los reactivos usados son Q.P.)

Hidróxido de Sódio (NaOH) 0.1 N
 Acido Clorhídrico (HCL) 4.0 N
 Acetato de Amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 10 % y pH=5.1
 Acetona (CH_3)₂CO
 Etanol 96°
 Equipo para determinar HCH (Dainabot)
 Reactivos para método de Lowry modificado que incluyen:

Solución A

2 gr de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 100 gr de carbonato de sodio (Na_2CO_3), se disuelven en 500 ml de hidróxido de sodio 1.0 N y se añora a un litro.

Solución B

2 gr de tartrato de sodio y potasio y 1 gr de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) son disueltos en 90 ml de H_2O destilada y 10 ml de hidróxido de sodio 0.1 normal.

Solución C.

Reactivo de folin (1 vol es diluido con 15 volumes de agua destilada) se prepara cada vez que se

va a usar, con esta dilución, el reactivo debe quedar entre 0.15 N y 0.18 N.

Proteína para curva patrón Lab-frol Base albúmina de bovino (DADE Division American Hospital. Supply Corp. Miami Fla 33152.)

Método.—Los resultados corresponden a un lote de 25 glándulas (por ser la cantidad colectada al inició del trabajo sin ningún otro motivo) cedidas por el Departamento de Anatomía Patológica del Centro Hospitalario 20 de Noviembre. ISSSTE.

Todo el método se lleva a cabo entre 4°C y -35°C para tratar de incrementar el producto.

El proceso se divide en 5 fases:

I.—Obtención de los polvos de pituitaria secados en acetona

II.—Extracción de la fracción glucoproteica.

III.—Extracción de la hormona de crecimiento.

IV.—Purificación de la hormona de crecimiento.

V.—Resultados.

I.-Obtención de los polvos de pituitaria secados en acetona.

& Todas las centrifugaciones son a 1425 X g y a 4°C a menos que se indique lo contrario.

& En todos los casos la agitación es magnética y a 4°C.

a).-Las glándulas almacenadas en acetona a 4°C se transfieren a acetona limpia.

b).-Son molidas en acetona a 4°C (4 ml/glándula) por un periodo de 30 minutos, usando el homogeneizador.

c).-El homogeneizado se vierte, con sumo cuidado, en un buchner al que previamente se le colocó un papel filtro Wathman # 42 de peso conocido.

d).-Se realiza el filtrado por succión lavando con acetona a 4°C (2 ml/glándula) una sola vez.

e).-Se mantiene la succión por el tiempo necesario para que el homogeneizado este completamente seco.

f).-Se obtiene el peso de los polvos secados en acetona utilizando una balanza analítica.

II.-Extracción de la fracción glucoproteica.

a).-A los polvos secos se les añade 10 ml/gr de una mezcla a 4°C de acetato de amonio al 10 % y pH=5.1 (ajustar si es necesario) y etanol 96 % (6:4 respectivamente).

b).-El producto se mezcla toda la noche.

c).-Se centrifuga la mezcla y el sobrenadante se almacena a 4°C (este sobrenadante contiene la hormona estimulante de foliculo, hormona estimulante de tiroides y la hormona luteinizante.)

d).-El residuo se reextrae como se mencionó en los pasos (a)

(b) y (c) uniéndose el sobrenadante con el que se tenía previamente.

e).-El residuo de pituitaria de las dos extracciones es lavado con acetona a 4°C (2 ml/glándula) una sola vez, y filtrado por succión por el tiempo necesario para que este completamente seco.

III.-Extracción de la Hormona de crecimiento.

a).-Se obtiene el peso de los polvos.

b).-Se agrega NaOH 0.1 N 20 ml/gr y se agita por una hora.

c).-Se ajusta el pH de la mezcla a 10 con HCL 4 N.

d).-Se agita la mezcla por toda la noche.

e).-A la mezcla ya agitada se le ajusta nuevamente el pH, a hora a 8.4 con HCL 4 normal.

f).-Se agita por media hora.

g).-La mezcla se centrifuga y el sobrenadante se guarda a 4°C .

h).-El residuo se reextrae como en (b),(c),(d),(f) y (g) el residuo se deshecha y el sobrenadante se une con el sobrenadante previo.

i).-Los sobrenadantes combinados se ajustan a pH de 4.8 con HCL 4 N y se agitan por media hora.

j).-El precipitado que se forma es separado por centrifugación y el sobrenadante se reserva.

k).-El precipitado obtenido en el paso previo se trata con la mitad del volumen de NaOH 0.1 N usado en (b) y se ajusta el pH a 8.4 con HCL 4 N. (este paso es esencialmente para asegurarse de la completa extracción de HCH).

l).-Se agita por media hora y se centrifuga, el sobrenadante--

te se une con el sobrenadante previo, el residuo se deshecha.

m).-El volúmen de la solución resultante se mide.

n).-Se añade suficiente etanol al 96 % enfriado a -30°C lentamente y con agitación a dar una concentración final de 25 % v/v.

o).-Se agita por media hora y se procede a centrifugar, el sobrenadante se elimina.

p).-El precipitado se disuelve en el mínimo volúmen de bicarbonato de amonio 0.1 N, clarificando la solución resultante por centrifugación a 3325 X g durante 30 minutos.

q).-El precipitado se elimina, en solución queda la HCH grado clínico, la cual se guarda en congelación.

IV.-Purificación de la HCH grado clínico por filtración en una columna de sephadex G-100.

a).-Se preparan 2 litros de bicarbonato de amonio 0.1 N y se ajusta el pH a 8 (reactivo A)

b).-Se pesa 6.5 gr de sephadex G-100 y se procede a hidratarlo con 150 ml del reactivo A dejandose 48 hs a 37°C .

c).-En refrigeración se monta la columna quedando como se muestra en el esquema II.

d).-Se lava la columna con 200 ml del reactivo A.

e).-De la muestra disuelta en 6 ml de reactivo A se toma una alícuota de 0.5 ml y al resto se le agregan 0.2 ml de HCH marcada con I^{125} (Dainabot, con 7559 cuentas por minuto y radioactividad menor de 1 microcurie/10.5ml) para usarlas como control y determinar el volúmen de salida de -

la HCH purificada. De esta solución se toman 0.025 ml para controlar las cpm, al final del ensayo, el resto se coloca en el lecho de la columna.

f).-El colector de fracciones se regula de tal forma que cada fracción sea de 6 ml, con un flujo de salida de 0.3 ml/min.

g).-Se colectan 30 fracciones.

V.-Resultados.-

La muestra de HCH tomada antes de su paso a través de la columna de sephadex G-100 (denominada M_1) lo mismo - que muestras tomadas de las fracciones 5, 6 y 7; 11, 12, y 13; 18, 19, y 20 (denominadas M_2 , M_3 y M_4 respectivamente) fueron enviadas al laboratorio de histocompatibilidad del mismo Centro Hospitalario 20 de Noviembre ISSSTE, para que se les efectuara electroforésis en acetato de celulosa, dando los resultados que a continuación se señalan.

La M_1 (ver esquema I) presenta 4 bandas claras (a, b, c y d) la (c) es una gran mancha que probablemente sea la combinación de varias bandas. La M_2 presenta un patrón electroforético similar a la M_1 : Las M_3 y M_4 presentan un comportamiento similar entre sí, la mancha grande (c) presentada en M_1 y M_2 se mantiene pero más reducida y se observa la completa desaparición de la banda (b).

Las fracciones colectadas de la cromatografía en sephadex, fueron analizadas en el contador de gammas, los resultados se dan en la tabla 1.

En la gráfica I se muestra la actividad contra el número de fracciones, se obtuvieron tres picos de actividad que incluyen para el primero las fracciones 5, 6 y 7 con un máximo para la fracción 6 (714 cpm), para el segundo se tienen las fracciones 10, 11, 12 y 13 con un máximo en la fracción 11 (2118 cpm), para el tercero las fracciones 18, 19 y 20 con un máximo en la fracción 19 (1291 cpm).

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos al analizar las fracciones mediante el espectrofotómetro a 280 nm.

En la gráfica II se muestra la D.O. contra el número de fracción, se obtuvieron también tres picos que incluyen para el primero las fracciones 6,7 y 8 con un máximo para la fracción 7 (D.O. de 3.5), para el segundo las fracciones 11,12,13 y 14 con un máximo para la fracción 12 (D.O. de 1.25) y el tercero que incluye las fracciones 18,19 y 20 con un máximo para la fracción 19 (D.O. de 15.8)

Posteriormente a las fracciones se les determinó la concentración de proteína por el método de lowry modificado (11), leyendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm, los resultados se dan en la tabla III, estos resultados se grafican en concentraciones (mcg/ml) contra el número de fracción. En esta gráfica se obtienen tres picos de concentración que incluyen para el primero las fracciones 6,7,8 y 9 con un máximo para la fracción 7 (900 mcg/ml), para el segundo se tienen las fracciones 16 y 17 con un máximo para la fracción 17 (250 mcg/ml) y un último la fracción 19 (250 mcg/ml).

Se tomaron muestras de las fracciones 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 20 y 21 a las cuales se les hizo una dilución 1:1000 con agua destilada y se determinó HCH por radioinmunoanálisis(5), los resultados se dan en la tabla IV.

Las mayores concentraciones de la hormona se encontraron en las fracciones 6, 12 y 19.

Actividad biológica de la HCH.

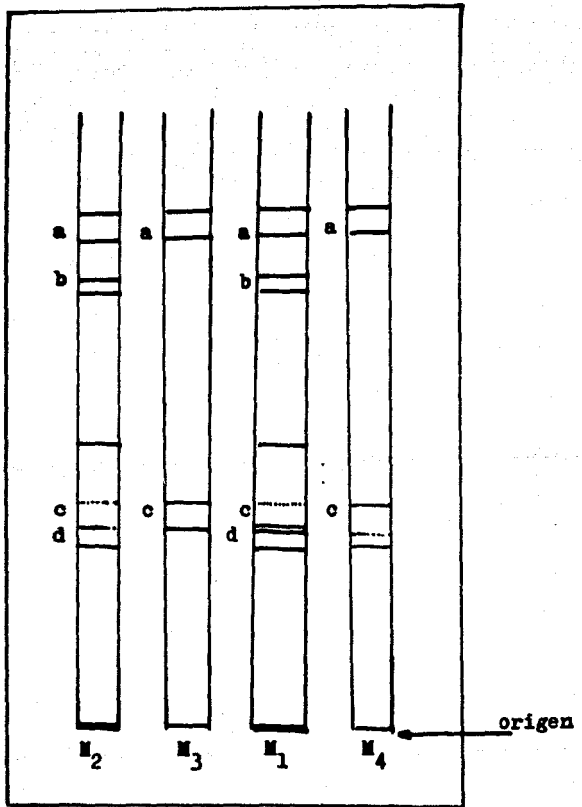
Una muestra de HCH de aproximadamente 10 μ g (determinada por RIA) obtenida siguiendo la metodología descrita en detalle exacto, es enviada a "The National Pituitary Agency, Suite 503-9, 210 West Fayette Street Maryland, 21201" para determinar su actividad biológica, resultando -

ser de 1.01 I.U./mg de HCH, determinada por el ensayo de ganancia en peso de ratas hembras hipofisectomizadas, usando como referencia USP estandar de hormona de crecimiento bovina.

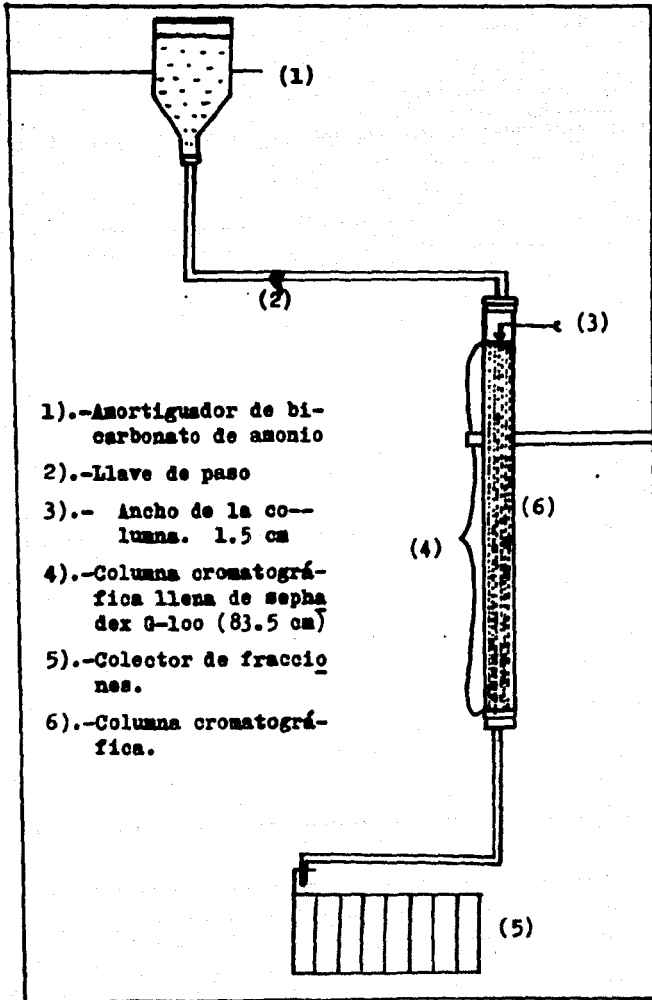
Cuadro de pureza.

(nomenclatura tomada del esquema del proceso de 5 hipófisis con un peso seco de 750 mg)

	Volúmen (ml)	mg totales de HCH.
1.-Sobrenadante ₁	20.0	0.0
2.-Sobrenadante ₂	10.4	1.8
3.-Sobrenadante ₃	10.0	0.0
4.-Residuo ₅	10.0	0.075
5.-Sobrenadante ₆	75.6	0.0
6.-Residuo ₇	6.0	3.75
7.-Sobrenadante ₇	6.0	18.75



ESQUEMA I



ESQUEMA II

TABLA I

fracción	cpm
1	0
2	9
3	0
4	7
5	530
6	714
7	439
8	169
9	156
10	643
11	2118
12	1466
13	446
14	183
15	119
16	131
17	160
18	536
19	1291
20	343
21	91
22	66
23	39
24	22
25	15
26	7

TABLA II

fracción	D.O.
1	0.0
2	0.0
3	0.0
4	0.0
5	0.0
6	2.7
7	3.5
8	1.02
9	0.69
10	0.65
11	0.90
12	1.25
13	1.25
14	1.03
15	0.98
16	1.35
17	2.0
18	2.3
19	15.8
20	1.45
21	0.35
22	0.04
23	0.03
24	0.0
25	0.0
26	0.0

TABLA III

fracción	proteína (mcg/ml)
1	0.0
2	0.0
3	0.0
4	0.0
5	8.0
6	700
7	900
8	350
9	350
10	100
11	150
12	10
13	50
14	0.0
15	0.0
16	150
17	250
18	100
19	480
20	8.0
21	10
22	0.0
23	0.0
24	0.0
25	0.0
26	0.0

TABLA IV

fracción	HCH (ng/ml)
6	3300
7	3200
8	710
9	460
10	230
11	510
12	7800
18	660
19	7000
20	3300
21	200

TABLA V

FRACCION	HCH(ng/ml)	cpm	D.O.	PROTEINA(mcg/ml)
6	3300	714	2.70	700
7	3200	439	3.50	900
8	710	169	1.02	350
9	460	156	0.69	350
10	230	643	0.65	100
11	510	2118	0.90	150
12	7800	1466	1.25	10
18	660	536	2.30	100
19	7000	1291	15.60	480
20	3300	343	1.45	8
21	200	91	0.35	10

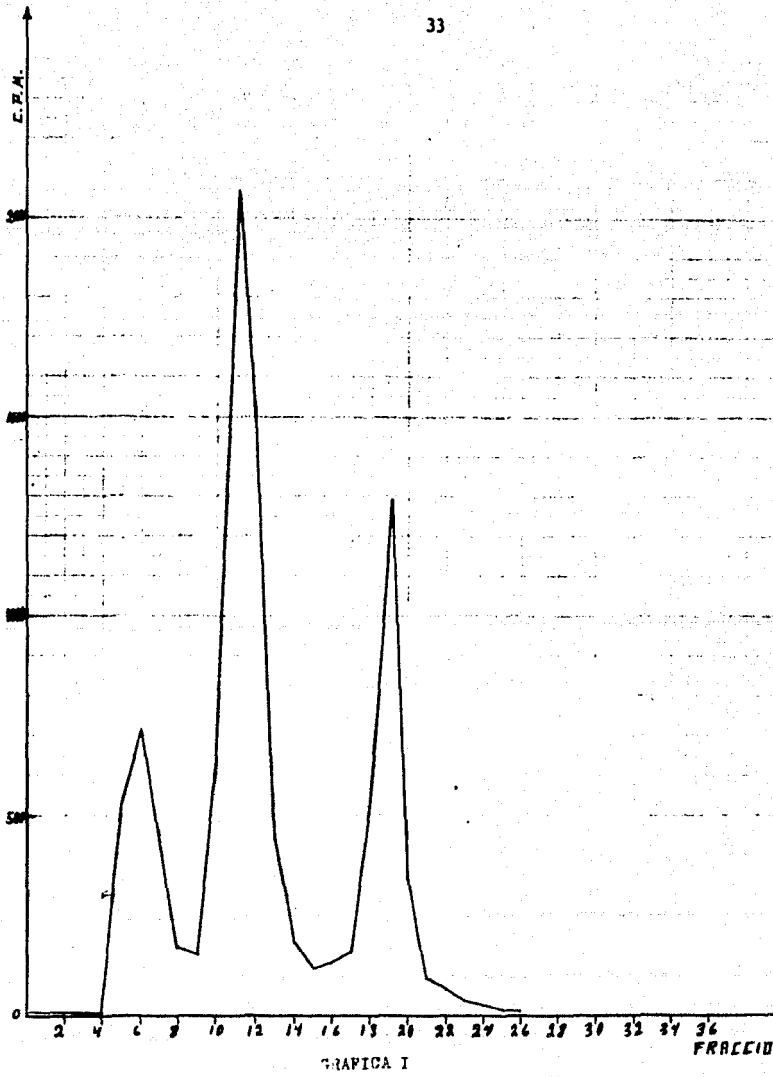
TABLA VI

Método propuesto	Raben	Stockell	Parlow	Frygstad	
Producto por hipófisis al macenada en acetona.	3.75 mg	3.1 mg	3.1 mg	5.6 mg	3.5 ¹ mg
Actividad biológica. (I.U./mg HCH)	1.01	0.89 ²	0.89	1.0	2.0 ³

1).-Frygstad (36) reporta producto final de 7 mg/ gr de glándula pituitaria fresca, si se considera que cada glándula fresca pesa aproximadamente 0.5 gm (35), el autor obtiene 3.5 mg de HCH/hipófisis almacenada en acetona.

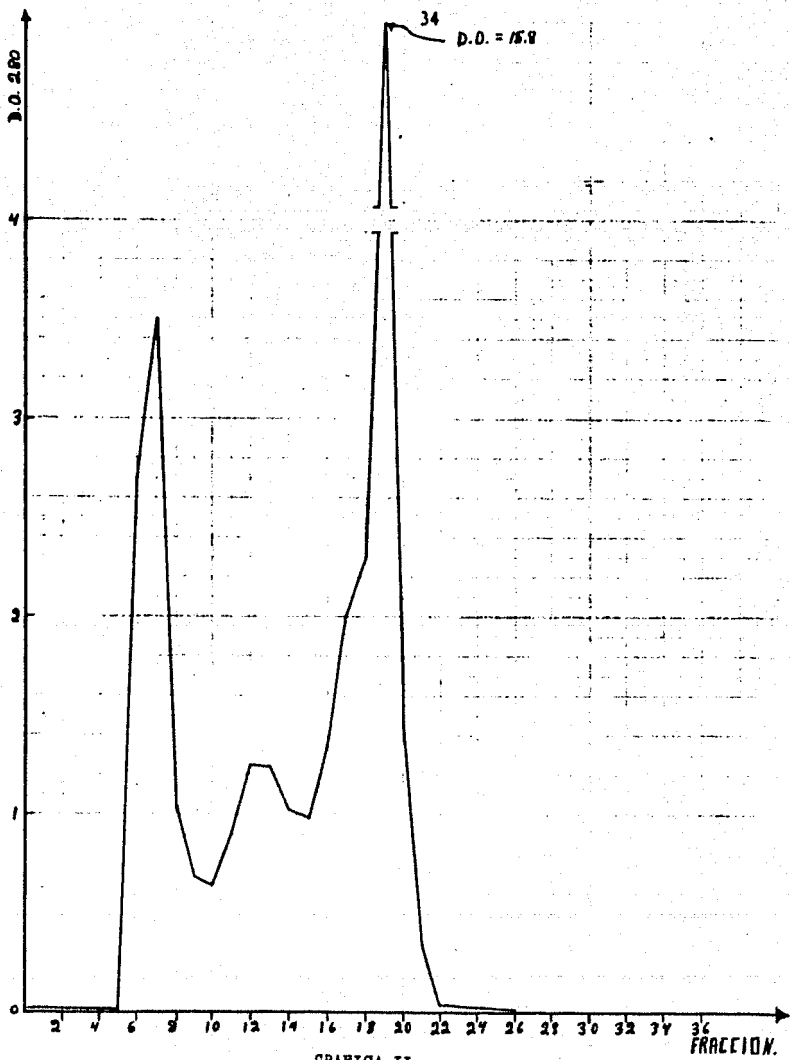
2).-Actividad biológica reportada por Stockell (33) quien trabajó el método de Raben en detalle exacto (se tomó este dato por que Raben no reporta en I.U.)

3).-Este dato se obtuvo por método distinto al de ganancia en peso de ratas hipofisectomizadas (9).

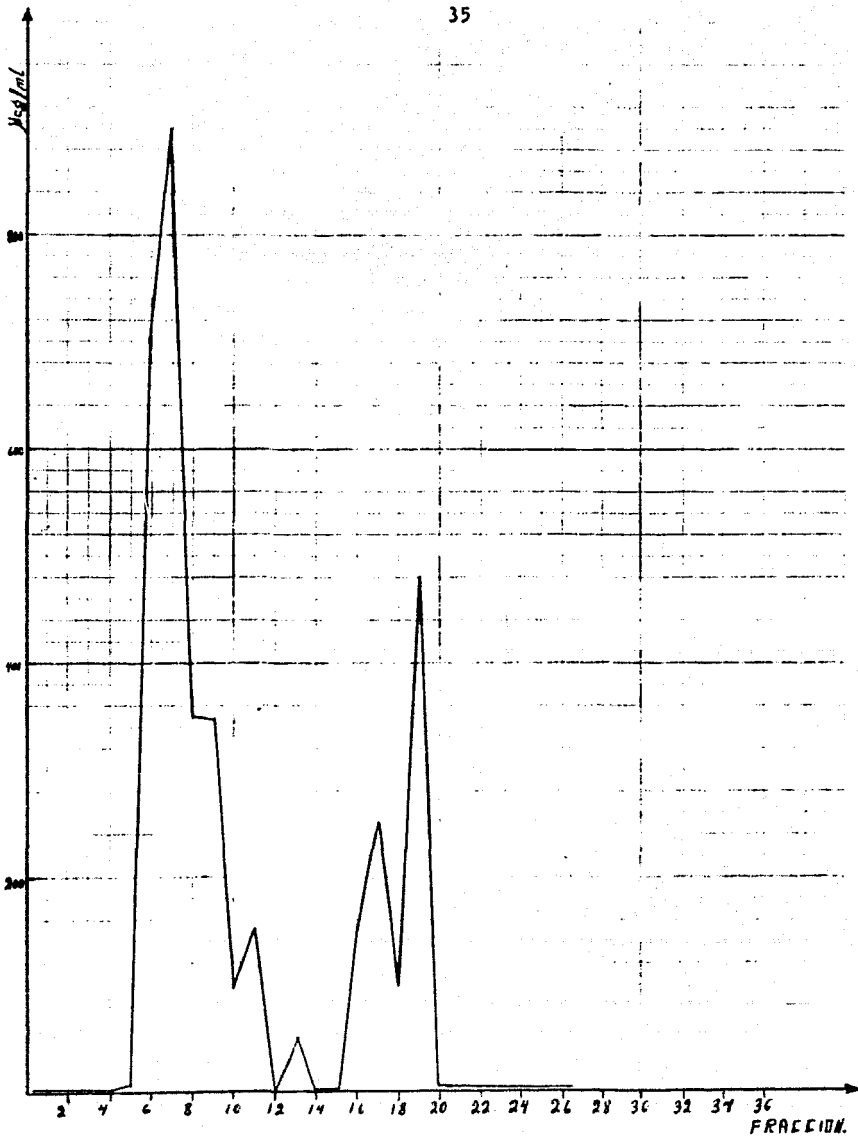


GRAFICA I

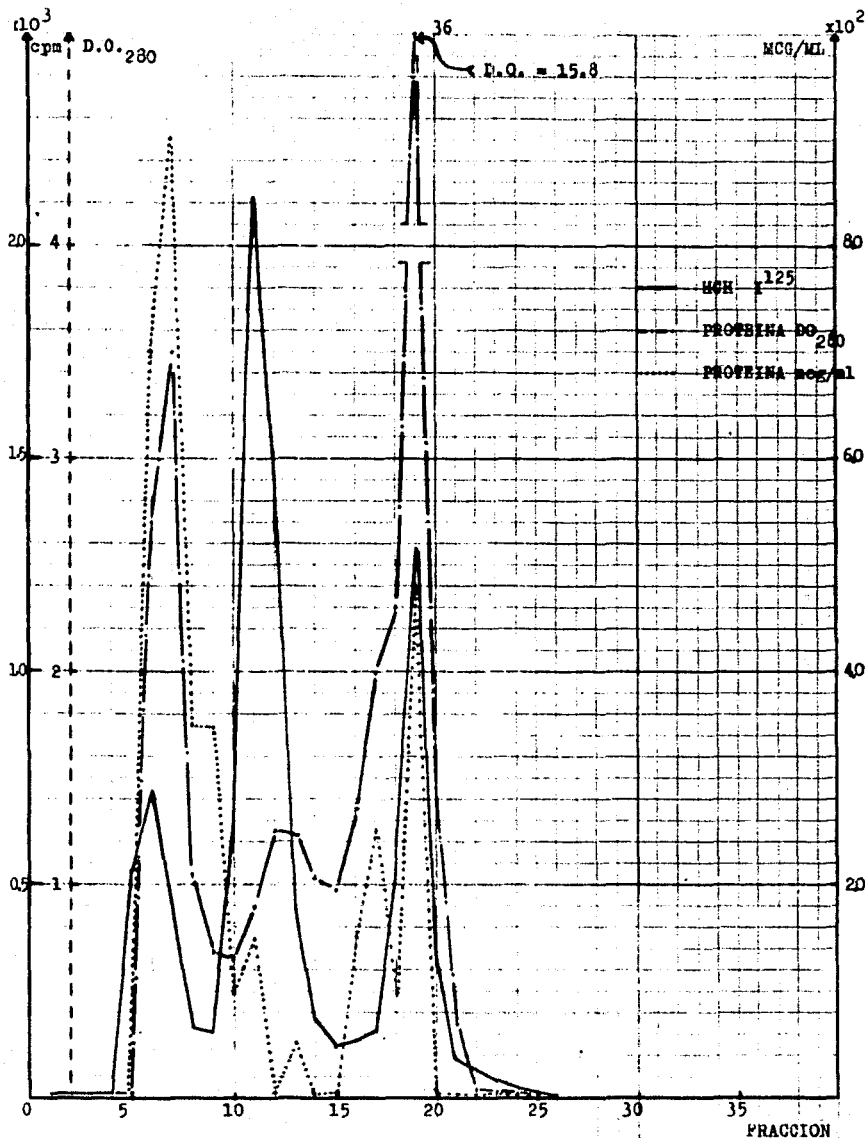
FRACCIO



GRAFICA II

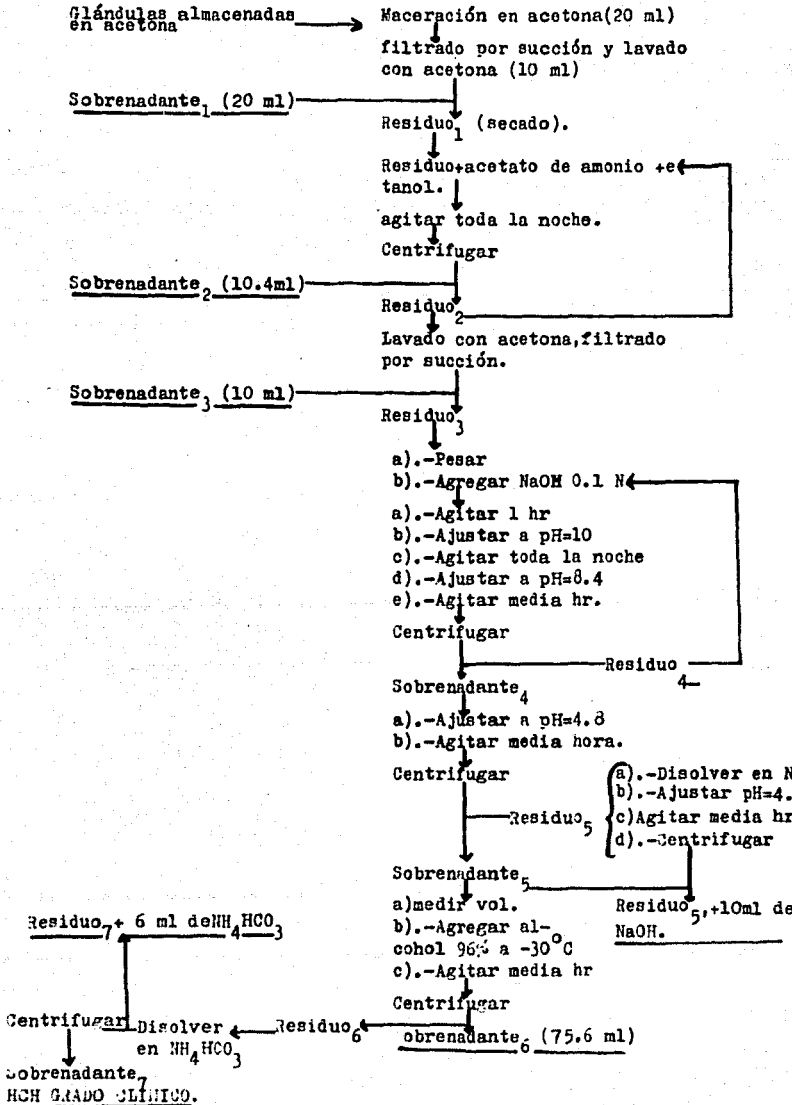


GRAFICA III



GRAFICA IV

ESQUEMA DEL PROCESO DE 5 HIPOFILIS.



DISCUSION.

Los picos cromatográficos, determinando cps, proteínas y D.O., tienen el mismo volumen de elución, ya que las fracciones de mayor concentración de estas son 6, 11 y 19. A estos picos cromatográficos (asignados como A, B y C) se les puede comparar con los obtenidos por diversos autores (24), (29) y (23) encontrándoseles muy semejantes.

Estos picos tienen el mismo volumen de elución — la HCH marcada con I^{125} en los picos A y C en el pico B se observa el corrimiento de una fracción, debido seguramente a la diferente metodología empleada para obtener la HCH.

Los datos obtenidos indican que se obtienen tres tipos de HCH, La fracción C conteniendo un monómero, la fracción B un dímero y la fracción A polímeros con aproximadamente un 50 % de proteína inerte (29), la mezcla de estos tres volúmenes de elución tiene una mayor pureza que la de grado clínico empleado por Raben (25) dado que muestra un patrón electroforético más homogéneo, esto no implica la existencia de una sola banda, sino de una menor cantidad de bandas, de las cuales no se puede decir que alguna sea contaminante, ya que las muestras más puras de HCH, analizadas por técnicas de inmunodifusión muy sencibles — (12) reportan al menos 5 líneas de precipitación como evidencia de diversos componentes antigénicos, de los cuales no se ha aclarado si se encuentran presentes en la hormona nativa o se forman en el curso del tratamiento para la purificación de la hormona. Aunque estudios más recientes (15) sugieren que al menos cuatro formas de HCH inunoreactiva con pesos moleculares aparentes aproximados de 20,000 g/mol 40,000 g/mol 80,000 g/mol y mayores de 150,000 g/mol son —

secretadas dentro de la circulación periferal por las pituitarias normales.

Es interesante hacer notar que la actividad somatotrópica de la hormona puede ser destruida por un tratamiento enzimático o de otro tipo sin que necesariamente sean alteradas sus características inmuoquímicas (15).

Tal situación implica la posibilidad de que el RIA de HCH pueda medir componentes biologicamente inertes y contribuyan por lo tanto a una pobre correlación entre un nivel elevado de HCH, por ejemplo, y las manifestaciones de ciertos desordenes tales como la acromegalia(15).

Ahora bien, siendo la hormona monomérica el componente inmuoreactivo mayoritario en la pituitaria y en circulación (28) y sabiendo que los agregados de HCH son inmuoquímicamente similares a la HCH monomérica, su cuantificación por el RIA puede considerarse como válida. En realidad las distintas formas en que se encuentra la HCH tiene aún una obscura significancia.

Con relación a los objetivos planteados al inicio del trabajo se puede decir que, respecto al método de Raben (25) el presente método ofrece varias ventajas como es el hecho de que en realidad se elimina una elevada cantidad de impurezas (el producto de Raben al final del tratamiento - contiene aún hormonas contaminantes). No es necesario utilizar temperaturas elevadas ni una diversidad de solventes.

Stockell (32) usa el mismo método de Raben, modificandolo unicamente al principio del tratamiento, con lo que logra obtener una HCH más pura, aislando hormonas "contaminantes", subproducto muy importante del tratamiento, modificación muy apropiada que fue incorporada al presente traba-

jo.

Trygstad(36) se vale de cambios en la concentración de hidrogeniones para eliminar impurezas, y una posterior saturación con sulfato de amonio para precipitar la hormona, situación poco deseable ya que posterior a este tratamiento se necesita dializar el producto, etapa en la que es necesario invertir bastante tiempo. Los primeros elementos de su -- trabajo son apropiados, siendo más adecuado en la parte final precipitar la hormona con etanol para evitar el dializado. Esta observación es considerada en el desarrollo del trabajo.

El método de Parlow (24) es tomado en consideración en la última etapa del trabajo, por la siguiente razón. La purificación de la hormona de crecimiento se realiza mediante -- el paso a través de una columna de sephadex, Parlow usa como eluyente bicarbonato de amonio, solución que inhibe el crecimiento de bacterias en la columna y las fracciones se pueden liofilizar directamente sin pérdida de tiempo por no necesitarse dializar.

En la tabla VI se muestran los resultados obtenidos en el presente trabajo y los resultados obtenidos por diversos autores, existe una gran discordancia entre la actividad biológica reportada por Trygstad y la de los otros métodos pero debe hacerse notar que es el único que utiliza un ensayo -- distinto al de ganancia en peso (usa método de la tibia,9) que puede ser una explicación. Otro dato que presenta discordancia es el excesivo producto de HCH obtenido por Parlow, cabe hacer dos comentarios a este respecto.

a).-La cantidad de HCH por hipótesis no varía con la edad pero si con la causa de muerte(4) y debe notarse que resulta

imposible hacer una selección de glándulas(por ejemplo - por causa de muerte, tipo de selección, almacenamiento - etc.) esto puede ser una causa en la variación de los datos reportados.

b).-Parlow usa el método de Raben, a pesar de lo cual obtiene casi el doble de producto que este autor.

En la tabla V se muestran los datos de cpm,D.O - proteína y contenido de HCH (para las fracciones analizadas) observandose la gran correlación que existe entre los distintos ensayos(particularmente en las fracciones que - presentan mayor contenido de HCH).

CONCLUSIONES.

El producto final de hormona de crecimiento humana de grado clínico purificado, por hipófisis, fue de 3.75 mg con una actividad biológica de 1.01 I.U./mg de HGH, este producto es apropiado para aplicación clínica, de manera que se puede hacer una selección del tipo de tratamiento según las condiciones en que se desee trabajar.

Una combinación de los tres picos de elución (A, B y C) da una buena actividad biológica, pero el uso del pico A debe implicar algunos efectos de reacciones antígeno anticuerpo, que a pesar de no ser muy importantes pueden eliminarse suprimiendo el uso del pico A, que se puede intentar purificar posteriormente. Al eliminar este pico no debe reducirse significativamente la actividad de la hormona.

Finalmente es posible decir que el método de obtención y purificación de la HGH resulta de lo más simple ya que con el presente método, utilizando la baja solubilidad de la hormona en etanol, en determinadas condiciones, se precipita con relativa sencillez, este precipitado no presenta dificultad para una posterior purificación, por su simple paso a través de una columna de sephadex G-100, además de que el tipo de amortiguador utilizado en la metodología como ya se señaló, evita contaminaciones microbiológicas y permite liofilizar directamente si se requiere.

De los resultados experimentales se puede observar también que existe una gran coincidencia de los picos cromatográficos y el contenido de hormona, lo que permite seleccionar el ensayo más sencillo (D.O. a 280 nm por ejemplo)

para determinar en donde existen las fracciones con mayor contenido de HCH sin necesidad de refinamientos sofisticados. Un estudio estadístico adecuado permitirá posteriormente determinar la concentración de HCH en función de la lectura de D.O.

BIBLIOGRAFIA.

1.-Beck, J.C., Mc Garry, E.E., Dyrenfurth, I. and Venning, E.H.
Science., 125:884-885., 1957.

2.-Bornsnes, R.W. and White, A.
Endocrinology., 26:990-995., 1940.

3.-Brazeau, P.W. and Vale, R.B.
Science., 179:77-79., 1973.

4.-Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology.
Human Pituitary Hormones.
13:17-155., 1960. J.yA.Churchill Ltd.

5.-Dainabot Radioisotope Lab., Ltd.
2-8, Hatchobori 1-Chome.
Chou-Ku, Tokyo 104, Japon.
HGH-Riakit.

6.-Dimond, R.C. and Rosen, S.W.
Clin. Res., 233:253-259 A., 1975.

7.-Ellis, S.
J. Biol. Chem., 233:63-73., 1958.

8.-Fevold, H.L., Lee, H., Hisaw, F.L. and Cohn, E.J.
Endocrinology., 26:99-85., 1940.

9.-Greenspen, F.S., Li, C.H., Simpson, M.E. and Evans, H.M.
Endocrinology., 45:45-52., 1949.

10.-Harper, H.A.
Manual de Química Fisiológica.
Edit.El Manual Moderno.1975, p 524-529.

11.-Hartree, E.F.
Analitical Biochem., 48:422-427., 1972.

12.-Hayashida, T and Grunbaum, B.W.
Endocrinology., 71:734-739., 1962.

13.-Illing, R., In Mason A.S. (ed)
Human Growth Hormone.
Heinemann, London 1963 p 144-150.

14.-Knobil, E. and Greep, R.O.
Recent Progr.Hormone Res., 15: 1-12., 1959.

15.-Laron, Z.A., Pertzalan. and Mannheimer.
Israel J.Med.Sci., 2:152-159., 1966.

16.-Li, C.H.
Proceed Am.Philosophy Soc., 116:365-368., 1972.

17.-Li, C.H. and Papkoff, H.
Science., 124:1293-1299., 1956.

18.-Li, C.H.

J.Biol.Chem., 211:555-562., 1955.

19.-Li, C.H., Evans, H.M. and Simpson M.E.

J.Biol.Chem., 159:353-359., 1945.

20.-Manual of Clinical Immunology.

Edited by Noel R. and Friedman.

Amer.Soc.Microbiol., (Washington). 1976. p 197-204.

21.-Martin, J.B.

N.Engl.J.Med., 288:1384-1393., 1973.

22.-Mills, J.B., Ashworth, R.B., Wilhelmi, A.E. and Stockell, H.A.

J.Clin.Endocrin.Metab., 29:1456-1459., 1969.

23.-Parlow, F.A., Wilhelmi, E.A. and Reichter, L.E. jr.

Endocrinology., 77:1126-1134., 1955.

24.-Parlow F.A., Shome, B.

J.Clin Endocrinol.Metab., 43:224-226., 1975.

25.-Raben, M.S.

Recent Progr.Hormone Res., 15:76-81., 1959.

26.-Raben, M.S. and Westermayer, V.W.

Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.), 78:550-555., 1951.

27.-Salas,A.

Rev.Invest.Clin.(Méx)., 30:173-174., 1978.

28.-Smith,R.W. jr., Gaebler,O.H.

The Hypophyseal Growth Hormone;Nature and Action.

Mc Graw Hill, N.Y. 1955 p1955-1959.

29.-Stoud,S.W. Hoog,J.M.C. and Bieler,E.U.

J.Clin Endocrin.Metab., 37:860-866,1973.

30.-Stryer,Lubert.

Bioquímica.

Edit.Reverté., 1976 p 803-812.

31.-Stockell,H.A., In Mason, A.S. (ed)

Human Growth Hormone, Heinemann,London. 1972. p 31-85.

32.-Stockell,H.A.

Biochem.J.,100:754-756., 1966.

33.-Stockell,H.A.,Kovacic,N and thomas,M.

J.Endocrin.,33:249-250.,1965.

34.-Tanner,J.M.

Nature,237:433-442., 1972.

35.-Textbook of Endocrinology.

Edited by Robert H Williams,M.D.

Saunders.Co. London 1968 p,27-82.

36.-Trygstad, O. and Foss, I.

Acta Endocrinologica., 66: 478-490., 1971.

37.-Wilhelmi, A.E., Fishman, J.B. and Rusell, J.A.

J. Biol. Chem., 176:735-739., 1948.

o