



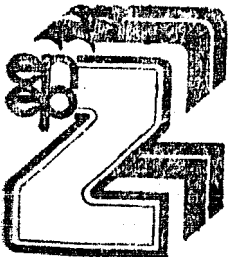
# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza

OBTENCION DE INSULINA HUMANA A PARTIR DE LA  
ASOCIACION DE LOS DERIVADOS SULFONADOS DE LAS  
CADENAS A Y B PRODUCIDAS EN BACTERIAS

**T E S I S**  
Que para obtener el Título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P r e s e n t a

**NORBERTO CRUZ GARCIA**



México, D. F.

1984



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.

## INDICE

	Pág.
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	3
2.1.- Insulina: Estructura .....	4
2.2.- Insulina: Relación estructura actividad .....	6
2.3.- Química del enlace disulfuro .....	9
2.3.1.- Síntesis de disulfuros .....	11
3. Planteamiento del problema .....	15
4. Objetivos .....	16
5. Hipótesis .....	17
6. Material .....	18
6.1.- Equipo	
6.2.- Reactivos	
7. Métodos .....	20
7.1.- Cromatografía por filtración en gel .....	20
7.2.- Cromatografía de intercambio iónico .....	21
7.3.- Cromatografía en placa fina .....	22
7.4.- Espectrofotometría .....	22
7.5.- Determinación de proteínas .....	22
7.6.- Densitometría .....	23
7.7.- Electroforesis .....	23

7.7.1.-	De péptidos A y B de la insulina	
7.7.2.-	De la mezcla de reasociación	
7.8.-	Cristalización de proteínas .....	24
7.9.-	Sulfitólisis oxidativa .....	25
7.10.-	Asociación de cadenas A y B.....	25
<b>8.</b>	<b>Desarrollo</b>	
8.1.-	Desalado de insulina comercial .....	27
8.2.-	Preparación y purificación de los derivados S-sulfonados .....	27
8.3.-	Reasociación de los péptidos A y B.....	28
8.4.-	Purificación de Insulina de la mezcla de reasociación .....	29
8.5.-	Cristalización.....	30
<b>9.</b>	<b>Resultados</b>	
9.1.-	Desalado de insulina comercial .....	31
9.1.1.-	Valoración de cinc.....	32
9.1.2.-	Valoración de proteínas .....	33
9.2.-	Preparación de cadenas A y B a partir de insulina	
9.2.1.-	Purificación.....	35
9.2.2.-	Electroforesis .....	37
9.3.-	Reasociación	
9.3.1.-	Detección en placa fina.....	38
9.3.2.-	Detección por electroforesis .....	39
9.3.3.-	Purificación de insulina reasociada .....	42

9.3.3.1.- Por cromatografía de intercambio iónico.....	42
9.3.3.2.- Por cromatografía de líquidos.....	48
9.3.3.3.- Electroforesis de insulina reasocida purificada	
9.3.4.- Análisis de aminoácidos.....	53
9.3.5.- Cuantificación.....	54
9.3.5.1.- Cromatografía de líquidos	
9.3.5.2.- Análisis de aminoácidos	
9.3.5.3.- Absorción a 280nm	
9.3.5.4.- Radioinmunoensayo	
9.4.- Cristalización de insulina.....	55
10. Discusión de los resultados.....	60
11. Conclusiones.....	62
12. Bibliografía.....	64

## INTRODUCCION

Es de suma importancia para el país, desarrollar técnicas propias que ayuden a resolver problemas de trascendencia social, en las áreas de salud, alimentos, energéticos y contaminación ambiental, ampliar las posibilidades de avance técnico y científico para independizarse cada vez más por medio de la investigación. De lo anterior se desprende la generación e impulso de nuevos conocimientos como lo es el campo de la Ingeniería Genética.

En año 1973 se realizaron experimentos con ADN recombinante y clonación molecular, dando lugar al desarrollo de técnicas que permitieron, transferir genes de cualquier origen a microorganismos. Estos avances en genética y síntesis de nucleótidos, poseen un elevado potencial para el desarrollo de cepas de microorganismos que codifiquen la síntesis de proteínas y hormonas de diferentes mamíferos, de acuerdo al gene introducido en dicho microorganismo.

Los éxitos de la recombinación artificial del ADN, están revolucionando el campo de la microbiología industrial, de los cuales el sector de productos farmacéuticos es el mas favorecido antibióticos, vacunas, enzimas y vitaminas, considerándose además que estos productos serán de mejor calidad y que su costo de producción disminuirá por el simple hecho de evitar procesos químicos complicados de elevado consumo energético y contaminante.

El primer ejemplo de la aplicación de esta tecnología, es la síntesis de insulina humana, recientemente reportada por Goeddel, et. al. (1).

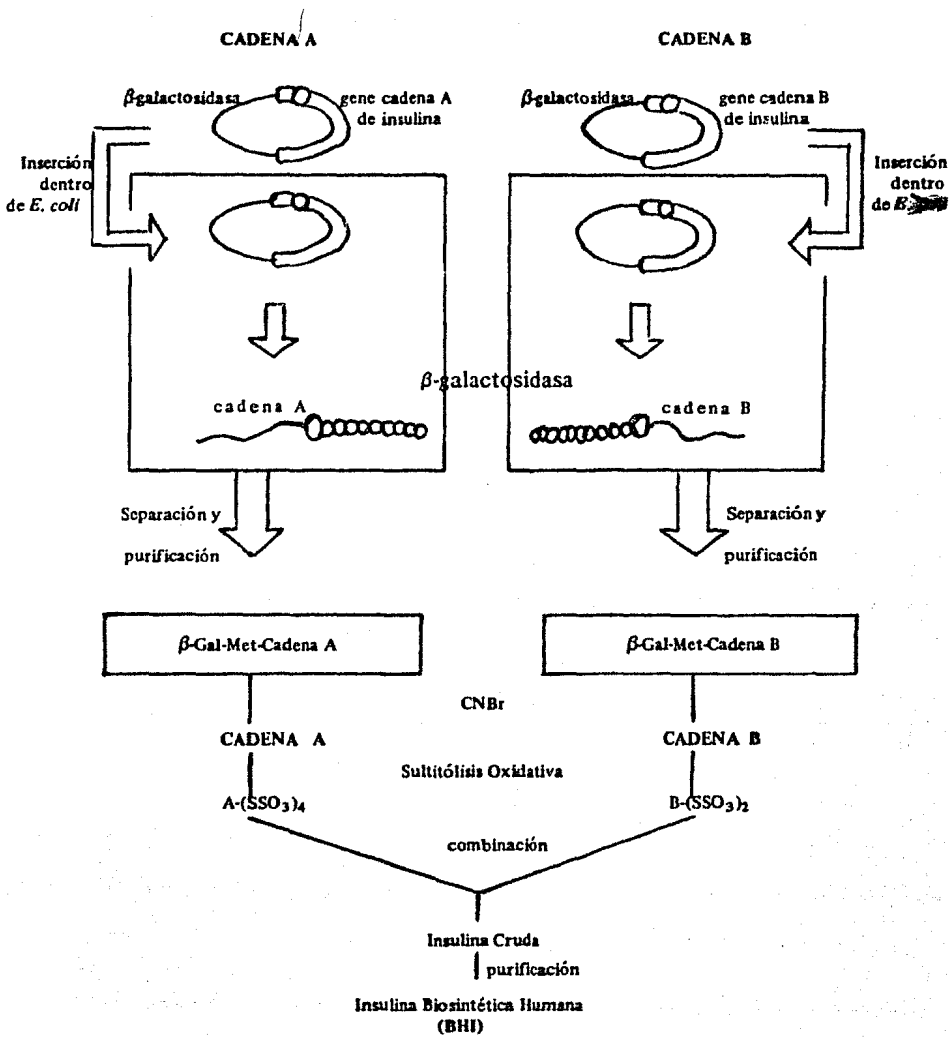


Fig. 1 Esquema general de obtención de insulina humana por ingeniería genética.

## ANTECEDENTES:

La insulina es una de las hormonas más estudiadas. Se sabe que desde 1788 el médico Cowley (2), observó una relación entre los disturbios en el funcionamiento del páncreas y la diabetes mellitus, enfermedad muy compleja que afecta varios cientos de millones de personas, y se caracteriza por un elevado nivel de glucosa en sangre y orina, la cual se excreta por orina cuando el nivel excede la capacidad de reabsorción del túbulo renal. En 1889 se demostró (3), que la diabetes mellitus se inducía al extirpar el páncreas. Con este antecedente, en 1900 (4, 5) se dieron cuenta que la sustancia pancreática responsable de la caída del nivel de azúcar en sangre se formaba en las células de los islotes de Langerhans, por esta razón la sustancia desconocida fue llamada insulina. Trabajando con glándula pancreática de buey, Banting, y colaboradores (6), y con la colaboración del bioquímico Collip (7), prepararon un extracto activo del páncreas, que al ser administrado en perros que se les había extirpado el páncreas, les alivió los síntomas de la diabetes mellitus. Desde entonces se han publicado varias preparaciones que contienen este principio activo, para usarse en el tratamiento de dicha enfermedad.

En 1926, se aisló una sustancia cristalina a partir del páncreas (8), la cual tuvo un alto grado de actividad insulínica, esto fue materia de gran interés para probar si era la responsable de la actividad o un constituyente inerte, que podía haberse asociado a la hormona en el proceso de cristalización. Posteriormente se reportaron variaciones en la actividad fisiológica de varias muestras de insulina cristalizada por el mismo método y por diferentes investigadores. Se realizó un estudio a fondo para encontrar evidencias sobre esta variación, y la conclusión fue que la actividad era uniforme para todas las muestras, y que las diferencias



encontradas por los otros investigadores se debían a los métodos de medición.

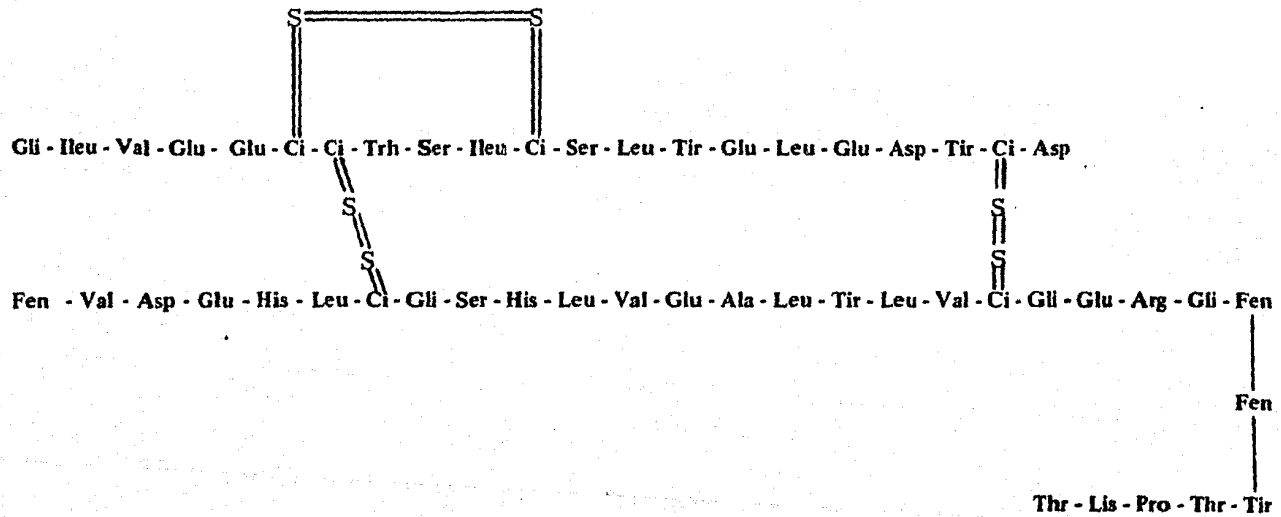
Desde entonces el proceso de cristalización se convirtió en un aspecto muy importante y varios investigadores se dedicaron a su estudio (9-22), aportando amplia información sobre el comportamiento químico de la insulina, lo cual condujo en el año de 1955 a la elucidación de su estructura y secuencia de aminoácidos por Sanger (23), Fig. (2).

## 2.1 Estructura primaria.

En forma general, la insulina consiste de dos cadenas peptídicas A y B, las cuales se encuentran unidas por tres enlaces disulfuro que comprenden residuos de cisteína, dos de los cuales unen los residuos 7-7 y 20-19 sobre las cadenas A y B respectivamente, el tercero forma un puente intracadena uniendo los residuos 6 y 11 del péptido A (24).

Aunque su actividad biológica es siempre la misma, todas las moléculas de insulina aisladas de diferentes especies animales, varían considerablemente en la composición de aminoácidos (25) (Tabla 1). La mayoría de las variaciones entre las especies de insulina con actividad biológica similar, se encuentran en los aminoácidos A8-10 debajo del puente disulfuro, A12-15, B1-3, y B30, a estas porciones probablemente no se deba la actividad de la hormona. Posiblemente los residuos de histidina y serina sean importantes para la actividad biológica; la insulina de bacalao contienen poca cantidad de serina e histidina, esto concuerda con su baja actividad biológica (26).

Se han encontrado grandes diferencias en las insulinas de mamíferos, por ejemplo, las



**Fig. 2 Molécula de la Insulina Humana**

insulinas de rata y cuyo, difieren de la insulina de puerco por más de 17 de 51 aminoácidos (27). Por su estructura y composición similar a la humana, la insulina porcina se ha empleado en el tratamiento de la diabetes mellitus (28-31).

ESPECIE	CADENA A	CADENA B
Oveja	Ala <sub>8</sub> , Gli <sub>9</sub> , Val <sub>10</sub>	Ala <sub>30</sub>
Bovina	Ala <sub>8</sub> , Val <sub>10</sub>	Ala <sub>30</sub>
Conejo	-----	Ser <sub>30</sub>
Porcina	-----	Ala <sub>30</sub>

TABLA (1). Diferencias en la secuencia de aminoácidos de algunas especies con respecto a la insulina humana

## 2.2 Relación estructura actividad.

Por medio de reacciones se intentó encontrar la relación entre estructura química y actividad biológica (32), suponiendo que si un grupo funcional no es esencial en la actividad de la hormona, el modificarlo químicamente, no debe influir en su acción biológica. Encontrándose que no se requieren los grupos amino de los aminoácidos terminales y los amino epsilon de los residuos de lisina, ya que su acetilación no causa pérdida en la actividad biológica.

gica. De modo semejante la remoción de la amida en la asparagina terminal de la cadena A no tiene efecto, aunque la remoción del ácido aspártico mismo causa pérdida completa de la actividad. La remoción del octapéptido terminal de la cadena B inactiva a la insulina, aunque la remoción del carboxiaminoácido terminal de la misma B30 no afecta la actividad. Los grupos hidroxilo alifáticos de serina y treonina se pueden modificar por sulfatación con poca pérdida de la potencia, mientras que los grupos hidroxil - fenólico, imidazol de la histidina, y grupos carboxilo son esenciales para la actividad. Aunque la mayor parte de las cadenas se pueden modificar sin interferir con la actividad. La reacción de los mismos sitios con moléculas suficientemente grandes para producir impedimento estérico puede causar inactivación. También se sabe que los enlaces disulfuro son de vital importancia para la actividad hipoglucémica de la insulina, ya que se ha demostrado que el rompimiento de cualquiera de los tres enlaces provoca la pérdida completa de la actividad (33).

#### **Estructura secundaria y terciaria de la Insulina.**

Las estructuras secundaria y terciaria de la insulina porcina y bovina fueron determinadas por cristalografía con rayos X (34). Estos estudios indican que la cadena A de la molécula es la más expuesta, incluyendo el puente disulfuro  $A_6 -_{11}$ , que posiblemente toma parte de la actividad hormonal, (Fig. 3). La cadena B se encuentra en la porción interna de la molécula; el enlace no covalente entre las cadenas B,  $B_{13} -_{28}$  es responsable de la formación del dímero de la insulina y probablemente de polímeros superiores. El hexámero cristalizado de la insulina se forma por la coordinación de tres dímeros alrededor de dos átomos de cinc. Cada ión de cinc está en contacto con tres residuos de histidina  $B_{10}$ , otras contribuciones a la estructura del hexámero pueden ser las interacciones del ión cinc con tiro-

sinas, enlaces hidrógeno entre los dímeros, particularmente de los residuos de ácido glutámico.

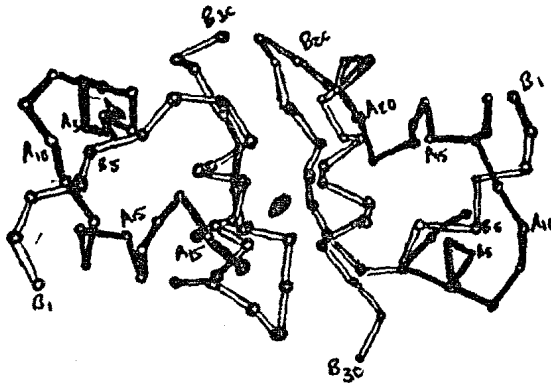


Fig. 3. Estructura del dímero de insulina. Cadena A sombreada; Cadena B sin sombra. de Adams, et. al (1969)

La insulina en solución sufren un fenómeno de asociación y disociación estructural, el cual varia con la temperatura, concentración y pH (35). La unidad estable en solución acuosa de insulina, cinc, abajo de pH=2 es un dímero y se encuentra como monómero en ácido acético al 30% a un pH=4 a 7, la proteína es generalmente insoluble debido a la formación del hexámero, a pH=7 a 9 la insulina puede tener un peso molecular entre 36000 a 48000. Las recientes observaciones establecen que la insulina libre de cinc tiene un peso molecular de 12000 en medio ácido, pero se disocia a un peso molecular de 6000 entre pH= 8-9 (36).

### 2.3 Química del enlace disulfuro.

El enlace disulfuro úne entre sí a dos cadenas paralelas mediante los residuos de cisteína. este enlace es relativamente estable y no se rompe fácilmente en las condiciones usuales de desnaturalización. El tratamiento con ácido perbórmico empleado por Sanger (37). Oxida los enlaces S-S de la insulina separando las cadenas polipeptídicas que la constituyen, sin afectar las otras partes de la molécula. Esta reacción de rompimiento de insulina se puede llevar a cabo por oxidación o reducción de los puentes disulfuro de la cisteína Fig.

(4).

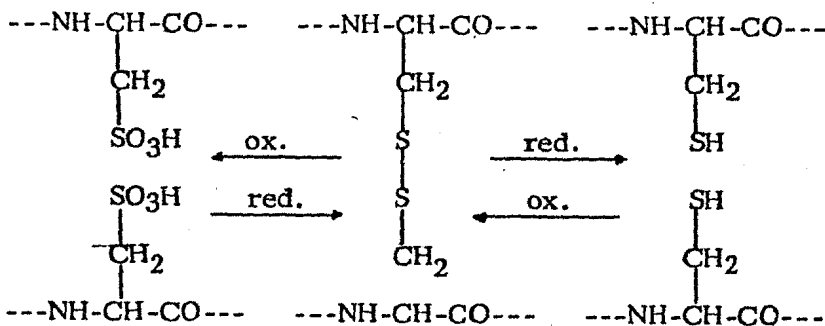


Fig. 4

La oxidación de un grupo sulfhidrilo de la cisteína a un grupo disulfuro de la cistina se efectúa fácilmente en oxígeno atmosférico en presencia de trazas de iones metálicos (ión cobre), pero cuando se trata la cisteína con agua de bromo, la oxidación va más allá del estado disulfuro, y el grupo sulfhidrilo se convierte en ácido sulfónico. Otra reacción importante y característica del grupo tiol, ocurre con metales pesados como mercurio, plata, con los que forma mercapéptidos.

El rompimiento de insulina también se logra empleando un agente reductor, por

ejemplo mercaptoetanol (Fig. 5).

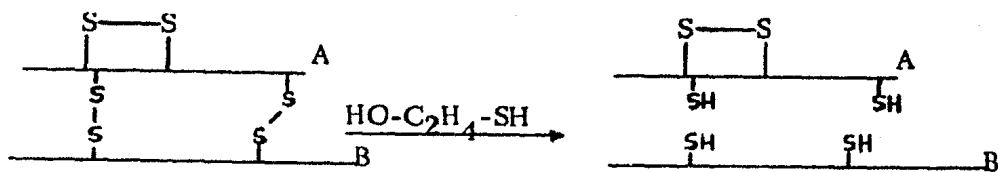


Fig. 5 Rompimiento de insulina por un agente reductor

También ocurre el rompimiento de los disulfuros con sulfito de sodio (38-40), en presencia de un agente oxidante suave como tetrionato de sodio (sulfitolisis oxidativa). Así, los enlaces rotos de las cadenas A y B se convierten a los correspondientes derivado S-sulfonados (sales de Bunte), (Fig. 6).

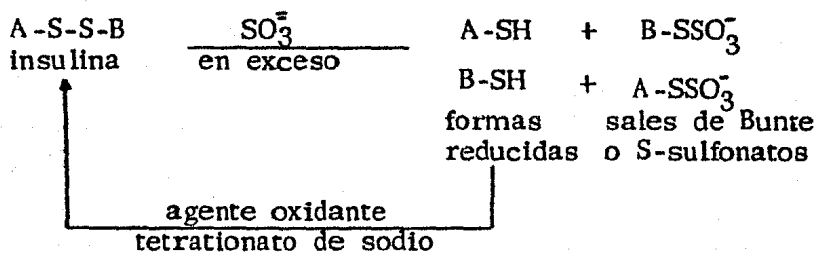


Fig. 6 Sulfitolisis oxidativa

Dentro de esta reacción se sabe que el puente intracadena es más difícil de atacar que los otros dos puentes disulfuro, la reacción se lleva a cabo en un medio desnaturizante para lograr el rompimiento completo. Los péptidos S-sulfonados son los suficientemente estables

para su purificación (32, 39), además que fácilmente pueden transformarse tanto a sus correspondientes formas reducidas (A-SH, B-SH), así como a sus formas oxidadas (A-S-S-B), propiedad que se emplea para la síntesis de disulfuros, (40, 41).

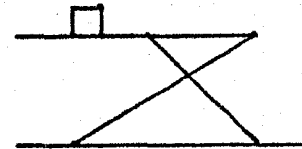
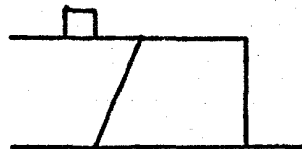
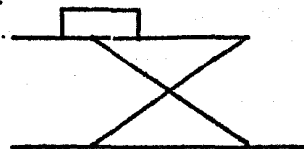
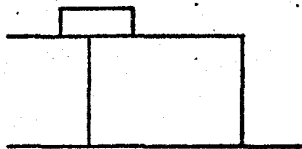
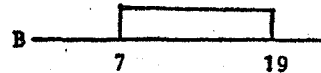
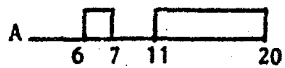
### 2.3.1 Asociación de cadenas A y B (Síntesis de disulfuros).

Se ha establecido que la asociación de cadenas A y B para formar insulina, puede llevarse a cabo por combinación de cadenas tanto de origen natural (42-45), como sintético (46, 47), inclusive se han preparado insulinas semisintéticas constituidas por cadenas de origen natural y sintético (48). De los muchos intentos por regenerar la hormona natural, solo algunos son útiles. Por ejemplo, la regeneración oxidativa a partir de productos reducidos puede conducir a un gran número de productos; monómero, oligómeros y polímeros e insulina. Así la probabilidad de la unión correcta por la oxidación simultánea a partir de cada una de las cadenas reducidas es muy baja (Fig. 7).

Por otro lado, algunos investigadores, (40, 49) fueron capaces de reasociar insulina a partir de las cadenas en forma de S-sulfonato (38-39). Las cadenas inactivas fueron reducidas en exceso de mercaptoetanol y precipitadas como cadenas -SH reducidas. Cuando los precipitados fueron mezclados y oxidados con aire a pH=8.5 a 9, se obtuvo insulina con un rendimiento de 1 a 2%.

Variando las condiciones de reacción, el rendimiento se fue incrementando inicialmente de 5 a 10% (49, 50), y así Tsou y colaboradores (51), reportan un rendimiento del 50% empleando cadena A, en un exceso del 50% a pH=10.6 para evitar agregación de ca-





Hormona Natural

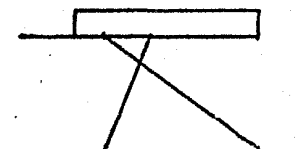
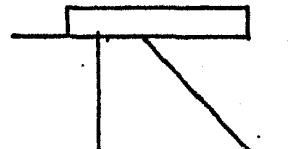
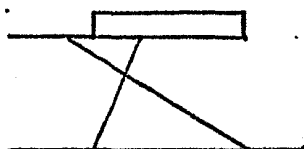
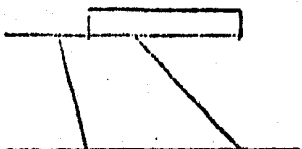
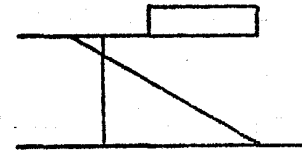
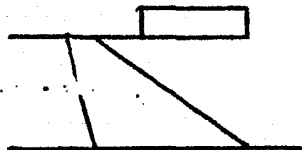
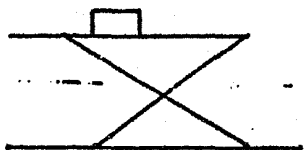
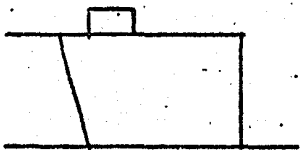


Fig. 7 Probables combinaciones entre las cadenas A y B de la insulina.

denas individuales. La mezcla de reasociación se pasó por filtración en gel encontrándose monómeros, oligómeros y polímeros de A, pero muy poco de B. Sin embargo los autores de artículos más recientes (52) al emplear este método, reportan rendimientos de solo un 10 a 20%.

En forma paralela (53), también reportaron rendimientos del 50% cuando se oxidó la cadena A hasta que un 50% de los grupos SH fueron convertidos a grupos disulfuro, adicionando la cantidad equivalente de cadena B reducida y finalmente completando la oxidación a pH=8.9. Por este procedimiento se forma primero el puente disulfuro  $A_4^{-11}$ , sobre la subsecuente combinación con cadena B, prácticamente solo se forma insulina, además del isómero con arreglo antiparalelo, (Fig. 8).

El rendimiento de insulina se puede incrementar a un rango del 70% por reacción de la cadena B en forma de S- sulfonato. En este caso probablemente se evita la formación de monómeros y polímeros  $[B]_n$ ,  $[AB]_n$ .

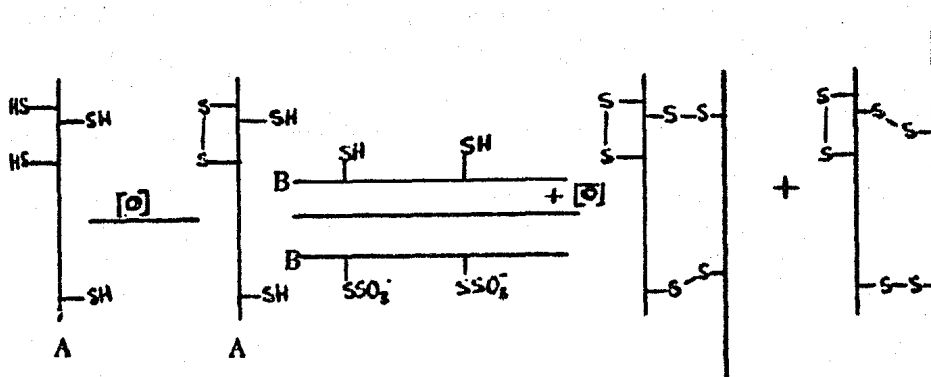


Fig. 8 Asociación de cadenas A y B de la Insulina

La asociación de cadenas para la formación de insulina, también se ha empleado para la preparación de insulinas semisintéticas, "insulina híbrida", constituidas por cadenas obtenidas de diferentes especies o bien empleando cadenas sintéticas y naturales (49, 51, 52, 44, 49). Sin embargo el rendimiento máximo que ha alcanzado hasta la fecha, lo dá el método reportado por Katsoyannis, 60-80%. Este consiste en reducir el S-sulfonato de la cadena A, al correspondiente tiol (A-SH) a pH=5 en atmósfera de nitrógeno, empleando como agente reductor un exceso de mercaptoetanol, de esta forma, la cadena A reducida se trata en exceso (6: 1) con la cadena B en forma de S-sulfonato a pH=9.6 y a bajas temperaturas (0-2°C) durante 24 horas, figura 9.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como puede observarse en la figura 1 el proyecto global implica varias etapas, en cada una de las cuales interviene un grupo de investigadores. La parte de biotecnología se encarga del estudio y producción de las cepas microbianas de *Escherichia coli*. La sección de ingeniería genética comprende la producción de genes y su introducción a las células microbianas, para la producción de cada uno de los péptidos que forma la insulina. El grupo de química se encarga de la separación, purificación de los péptidos A y B, así como los estudios de reasociación, purificación y cristalización de insulina. Y finalmente, la parte inmunológica, se relaciona con la preparación de los anticuerpos tanto para cadenas como para insulina y la cuantificación de la misma.

El presente trabajo corresponde a la parte química, así, en una etapa inicial, surge la necesidad de desarrollar la metodología que abarca desde la purificación de los péptidos empleados, hasta la cristalización de insulina. Una vez establecida, se aplicará a los estudios de asociación de los péptidos A y B producidos por bacterias modificadas por ingeniería genética.

Para el desarrollo de esta metodología, será necesario preparar los péptidos A y B, a partir de insulina comercial, debido a que en este momento, los péptidos que se han obtenido por fermentación microbiológica se encuentran en la etapa de purificación y en cantidades muy pequeñas.

## **OBJETIVOS**

**A). Obtención de los péptidos A y B por sulfitolisis oxidativa de insulina comercial para emplearlos como materia prima.**

**B). Preparación de un estándar de insulina libre de cinc, a partir de insulina comercial para utilizarlo como patrón de referencia.**

**C). Desarrollar métodos de detección, purificación y cuantificación de insulina comercial, para aplicarlos a la insulina obtenida por fermentación microbiológica.**

**D). Optimizar el método de asociación de péptidos A y B para regenerar la insulina.**

**E). Desarrollar el método de cristalización, empleando como materia prima la insulina amorfa, método que se empleará en la insulina obtenida a partir de cepas microbianas.**

## **HIPOTESIS**

Los estudios que se realizarán en el presente trabajo serán adecuados para la detección, purificación, cuantificación y cristalización de insulina comercial. Se espera que estos estudios también sean convenientes para aplicarse a la insulina humana de origen bacteriano, debido a que ésta puede presentar las mismas propiedades físicas, químicas y fisiológicas a las de la insulina de referencia.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Equipo:**

**Colector LKB Bromma multirac 2111 equipado con Uvicord, bomba y graficador**

**Columnas de cromatografía LKB, Cromaflex y Pyrex de diferentes tamaños y diámetros.**

**Colorímetro; Sepctronic 21 Bausch & Lomb.**

**Potenciómetro; Beckman modelo 3500.**

**Centrífuga; Sorvall RC-5 Instruments Dupont.**

**Parrilla de agitación y calentamiento SYBRON Thermolyne 1000.**

**Vórtex; Super-mixer Lab-line Instruments.**

**Balanza analítica; Basch S-2000.**

**Microbalanza; Mettler M-5 Instruments A.G.**

**Liofilizador; CRYOLIZER New Brunswick Scientific.**

**Cámara de electrofóresis; Bio Rad Laboratories.**

**Fuente de poder; ISCO y Bio Rad.**

**Espectrofotómetro DU-8; Beckman.**

**Horno de vacío; modelo Vacuum Oven Presición, G.C.A. Corporation.**

**Microscopio AO Spencer 20 equipado con cámara fotográfica.**

**Microscopio; ZEISS West Germany.**

**Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Spectra Physics 8000 B.**

**Placas de cromatografía en placa fina C-18 Whatman.**

**Secador de geles; Bio Rad.**

**Speed Vac Concentrator; svc100h Instruments Inc. Hickville N.Y.**

### Reactivos:

Insulina cinc bovina, cristales; SIGMA.

Insulina cinc porcina, cristales SIGMA.

Acido acético R.A.; J.T. Baker.

Acido sulfúrico R.A.; J.T. Baker.

Acido clorhídrico R.A.; J.T. Baker.

Alcohol etílico absoluto R.A.; J.T. Baker.

Acetona R.A.; J.T. Baker.

Acido tricloroacético R.A.; J.T. Baker.

Hidróxido de amonio R.A.; J.T. Baker.

Cloruro de sodio R.A.; J.T. Baker.

Urea R.A.; J.T. Baker, Bio Rad, y Merck.

Tris (hidroximetil) aminometano R.A.; Merck.

Acido bórico R.A.; J.T. Baker.

Acrilamida; Bio Rad laboratories.

Bis-acrilamida; Bio Rad laboratories.

TEMED; Bio Rad Laboratories.

Persulfato de amonio; Bio Rad Laboratories.

Carbonato de sodio R.A.; J.T. Baker.

Tartrato de sodio y potasio R.A.; J.T. Baker.

Sulfato de cobre R.A.; J.T. Baker.

Reactivo de Folin-Cicalteu; Sigma.

Citrato de amonio R.A.; J.T. Baker.



## **MÉTODOS**

### **7.1. Cromatografía por filtración molecular.**

La amplia variedad de geles granulados ha hecho de la cromatografía en columna, el procedimiento más comúnmente empleado para la separación de proteínas. Uno de estos métodos es la cromatografía por filtración molecular; en la cual se toma en cuenta las propiedades del tamiz molecular del gel y la separación se lleva a cabo por las diferencias en el tamaño molecular de los péptidos a separar. Las moléculas con peso molecular cercano o por encima del límite superior del rango de exclusión son totalmente excluidas del gel y emergen en el volumen vacío de la columna, y las moléculas cuyo peso molecular se encuentra dentro del rango de exclusión son separadas.

**Preparación de los soportes para filtración molecular en geles formados por entrecruzamiento de dextrano con epieclorhidrina (Sephadex G-15, 25 y 75).**

En forma general los soportes se tratarán de la siguiente manera; en un matraz Kitasato se coloca la cantidad necesaria de sephadex, se adiciona una solución de ácido acético al 5% y se dejó en reposo durante tres horas. Después se conectó a la línea de vacío durante una hora, se elimina el sobrenadante reemplazándolo por nueva solución de ácido acético al 5% la resina se resuspende y se deja sedimentar. La operación se repite tres veces.

Una vez equilibrado el sephadex con ácido acético al 5%, se vierte en la columna en forma de una suspensión gruesa.

## 7.2. Cromatografía por intercambio iónico.

Es una técnica de gran aplicación en la separación de proteínas. El enlazamiento de proteínas a intercambiadores iónicos se basa en la formación de múltiples enlaces iónicos reversibles entre los grupos cargados de la proteína y la matriz sólida. La afinidad de un intercambiador iónico hacia la proteína, y también su capacidad de intercambio, está determinada por la fuerza iónica y el pH. La separación de las proteínas enlazadas al intercambiador se basa en cambios en la carga de la proteína causada por variaciones en el pH, o afectando los enlaces por medio de sustancias que compitan con la proteína por las cargas del intercambiador.

### Preparación del Soporte.

En un matraz Kitasato se coloca la cantidad necesaria de carboximetilcelulosa CM 52 (intercambiador de cationes), se le adiciona solución amortiguadora de acetatos 0.04M urea 8M y ácido acético hasta pH=4.6. Se deja toda la noche conectada a la línea de vacío para eliminar el aire atrapado. Después se elimina el sobrenadante reemplazándolo por solución nueva, se agita suavemente hasta suspender toda la resina, se deja sedimentar. La operación se repite tres veces, este mismo tratamiento se emplea para preparar el soporte, para la cromatografía de la mezcla de reasociación, en una solución amortiguadora de urea 8M, ácido acético 0.1M y Tris hasta pH=4.6.

## 7.3. Cromatografía en placa fina.

Se emplearon placas de sílica fase invertida KC<sub>18</sub>F Whatman de 5 x 10cm, como eluyente etanol al 45% en NaCl 0.5M, y como revelador fluorescamina en acetona al 0.1%

#### 7.4. Espectrofotometría.

Por este método se logra una rápida estimación de la concentración de proteínas que eluyen en cada una de las fracciones de una columna y se obtiene por la medida de la absorción de la luz en la región ultravioleta, particularmente a 280nm. La absorción a esta longitud se debe a los grupos aromáticos presentes en los aminoácidos por ejemplo, triptofano, tirosina y fenilalanina. Las ventajas de este método es que es rápido, sencillo de efectuar, no destructivo y conveniente para el seguimiento de una muestra. Sin embargo, el método tiene varias desventajas y por el momento se recomienda solo para proteínas y péptidos grandes, no puede recomendarse para análisis de mezclas desconocidas de péptidos, o porque únicamente pueden seguirse proteínas que contienen aminoácidos aromáticos, ya que muchos componentes pueden interferir en su determinación. Es posible determinar la concentración de péptidos totales, sin tomar en cuenta su composición de aminoácidos, si se mide la absorbancia a 180-220nm, en esta región la mayor parte de la absorción se debe a los enlaces peptídicos.

#### 7.5. Proteínas totales método de Folin-Lowry.

Este método fue desarrollado principalmente con fines de ser usado rutinariamente para determinar la concentración de proteínas en solución. El principio de este método, es que el complejo tartrato de cobre reacciona con péptidos en medio alcalino. El complejo cobre-proteína puede reducir al fosfotungstano para formar un color azul que absorbe a 750nm.

## 7.6. Densitometría.

Este método consiste como su nombre lo indica, en la medida de la densidad óptica de una placa negativa de un gel electroforético, la medida se lleva a cabo a 540nm, usando como blanco una región de la placa donde no aparezcan bandas de proteína.

## 7.7. Electrofóresis.

Este método se emplea para la separación de proteínas en geles de almidón y poliacrilamida, resulta conveniente ya que puede ser usado para el análisis en paralelo de numerosas muestras; además de que se detectan, separan y cuantifican cantidades muy pequeñas de proteína. Su principio se basa en lo siguiente; en soluciones amortiguadas a un determinado pH. Las proteínas se ionizan, es decir muchos de sus grupos especialmente COOH y NH<sub>2</sub> característicos de los aminoácidos adquieren carga eléctrica. A cualquier valor de pH que no sea el del punto isoelectrico, estas cargas no se neutralizan entre sí y, por lo tanto, migran en un campo eléctrico.

### **Método:**

Se prepara una solución de 15g de acrilamida, 0.5g de bis-acrilamida y 48g de urea en 100ml de agua (gel separador).

Preparación del gel separador; se colocan en un vaso de precipitados de 100ml, 9ml de la solución al 15% de acrilamida, 1ml de solución amortiguadora de Tris 1.716M y HCl a pH=8.47, 50μl de persulfato de amonio al 10%, y al 10μl de TEMED, se mezcla y se vierte en la cámara de electrofóresis, dejando gelificar.

Preparación del gel concentrador; en un vaso de precipitados de 50ml, colocar 1ml, de la solución de acrilamida al 30%, 1ml de solución de Tris 0.0541M,  $H_2SO_4$  a pH=6.1, 3ml de agua destilada, 20 $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 8 $\mu$ l de TEMED, se mezcla y se vierte sobre el gel separador que a solidificado en la cámara de electrofóresis.

#### Gel continuo de boratos para electrofóresis de cadenas.

En un vaso de precipitados de 100ml, se colocan 1,368g de acrilamida, 0.072g de bis-acrilamida, 5g de urea, 3ml, de solución de Tris 0.486M y ácido bórico 0.443M pH=8,66, aforar a 12ml una vez que se ha disuelto todo, agregar 100 $\mu$ l de persulfato de amonio al 5% y 10 $\mu$ l de TEMED, mezclar y verter sobre la cámara de electrofóresis.

#### 7.8. Cristalización de proteínas.

La cristalización de proteínas puede tomarse en cuenta como un índice de pureza por la forma y tamaño de la red cristalina. Las proteínas al igual que los anfólitos son capaces de formar sales de dos tipos; hay proteínas aniónicas que se pueden unir con cationes y proteínas catiónicas que se pueden unir con aniones. Ciertamente a un valor de pH, una mezcla de proteínas estará integrada por aniones y cationes siempre que sus puntos isoeléctricos se hallen en lados opuestos del valor citado de pH y se formarán uniones proteína - proteína.

Muchos iones forman sales insolubles con las proteínas y son excelentes agentes precipitantes. Para desproteínizar se emplean ácidos como tricloroacético, pícrico y perclórico, puesto que los aniones de estos ácidos dan sales insolubles con las proteínas cuando se encuentran como cationes. Frecuentemente se utilizan iones de metales pesados tales

como Hg, Cu, Zn, Ba.

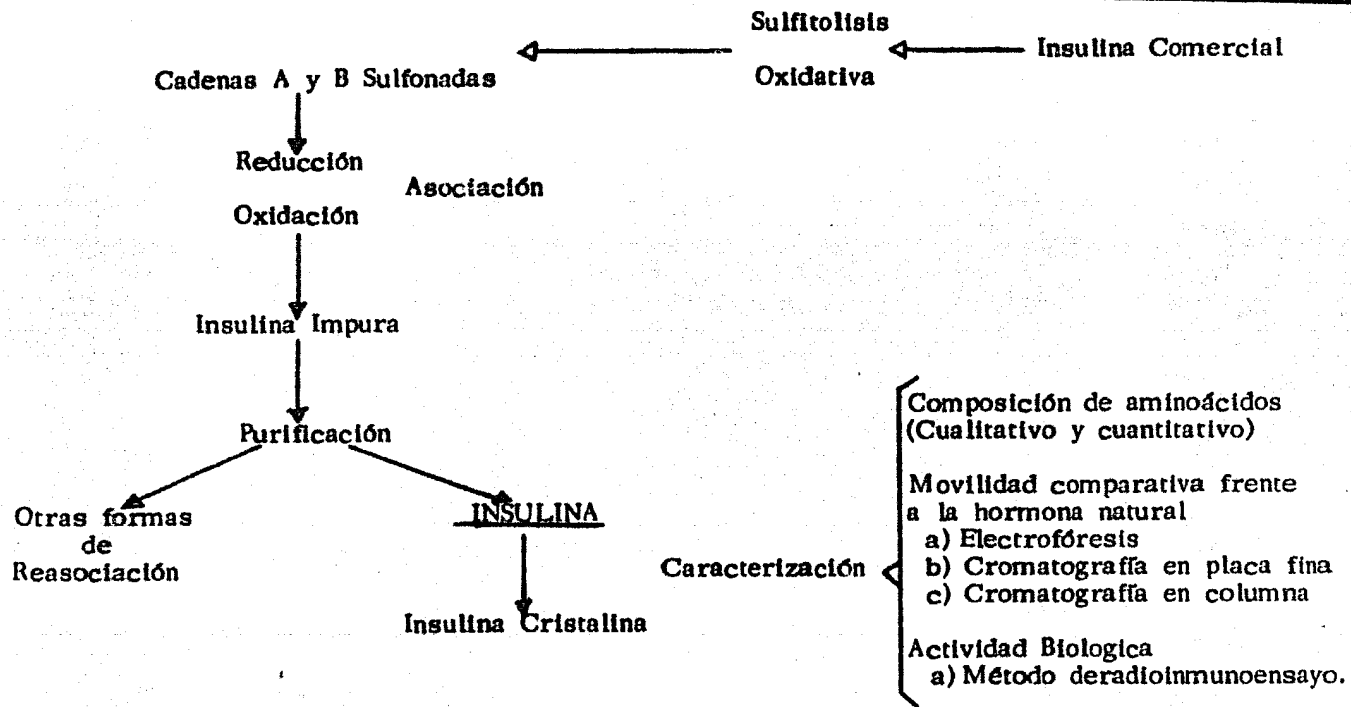
### 7.9. Sulfitólisis oxidativa.

Es un método químico que rompe selectivamente enlaces disulfuro en condiciones suaves, y da como productos los péptidos S-sulfonados (sales de Bunte), que constituyen la insulina, estos péptidos presentan la estabilidad necesaria para su separación, purificación y caracterización, además de que fácilmente pueden transformarse a sus formas reducidas (A-SH, B-SH), y oxidadas (A-S-S-B), propiedad que también se aprovecha para la asociación de cadenas y que se describe más adelante.

### 7.10. Asociación de Cadenas A y B.

Este método consiste en reducir el S-sulfonato de la cadena A, al correspondiente tiol (A-SH) a pH=5 en atmósfera de nitrógeno empleando como agente reductor un exceso de mercaptoetanol. De esta forma la cadena A reducida, se trata en exceso (6:1) con la cadena B en forma de S-sulfonato (B-SSO<sub>3</sub>), a pH=9.6 y a bajas temperaturas de 0.2°C durante 24 horas, como lo indica la siguiente reacción.





Esquema General de Trabajo

## DESARROLLO

### 8.1. Preparación de insulina libre de cinc.

Se aplicaron 100mg de insulina-Zn bovina comercial, disuelta en 5ml de ácido acético al 50%, en la parte superior de una columna de sephadex G-25 (120 x 2.5cm), previamente equilibrada con la misma solución. Se colectaron las fracciones registradas por el uvicord el cual se calibró a una longitud de onda de 280nm.

Se corrieron placas de silica gel KC-18 fase apolar identificando las fracciones que correspondían a la proteína por medio de revelado con fuoescamina, la cual se dializó contra agua por 24 horas, liofilizó, obteniendo un polvo esponjoso blanco, al que se le determinó el contenido de cinc por el método de la ditizona (54).

### 8.2. Sulfitólisis oxidativa.

Se adicionó en un matraz de 250ml 1g de insulina bovina o porcina, 40ml de agua recién hervida, 23g de cloruro de guanidinio, 1.4g de fosfato de sodio dibásico, se ajustó el pH entre 7.6 a 7.8 con hidróxido de sodio 0.1M, se adicionó en forma simultánea durante un periodo de 30 minutos una mezcla de 1.4g de sulfito de sodio y 1.4g de tetrionato de sodio, dejando la reacción de 12 a 15 horas a temperatura ambiente con agitación suave y en atmósfera de nitrógeno.

Terminando el tiempo de reacción se agregaron 100ml de agua fría recién hervida centrifugando la mezcla de reacción por 10 minutos de 0-5°C a 7000 rpm, se puso el sobrenadante y el precipitado por separado en sacos de dialisis de PM 1000, y dialisando contra



agua durante 24 horas, con cambios constantes de agua.

La purificación de estos péptidos se llevó a cabo por cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de CM- celulosa (60 x 4cm), equilibrada con solución amortiguadora de acetatos (método pág. 21).

La eliminación de urea y sales después de su purificación se realizó para cadena A en filtración en sephadex G-15, y para cadena B por medio de diálisis contra agua. Estos péptidos se liofilizaron y guardaron en refrigeración para su utilización.

### 8.3. Reasociación de péptidos A y B.

Reducción de la cadena A sulfonada ( $A-SSO_3^-$ ) al correspondiente tiol ( $A-SH$ ). En un tubo de centrifuga de 30ml, se adicionaron 20mg de cadena A sulfonada, 5ml de agua se ajustó el pH=5 con una solución 0.1N de hidróxido de sodio, enfriando la solución a 0°C y pasando una corriente de nitrógeno. Se agregó 0.1ml de mercaptoetanol, tapando el tubo con un globo inflado con nitrógeno y calentando la mezcla en baño maría a ebullición durante 7 minutos con agitación constante.

Cuando se terminó el tiempo de reacción, se enfrió la solución a 0°C, y ajustando el pH=3.8 con ácido acético 1M, se centrifugó durante 7 minutos: a 7000 rpm y a 0°C, decantando el sobrenadante.

Se adicionaron 3ml de solución amortiguadora de acetatos 0.1M pH=3.8 agitando

y volviendo a centrifugar, se repitió el mismo proceso pero ahora lavando con 3ml de buffer de acetatos 0.02M.

Asociación de péptidos; disolver la cadena A reducida en 10ml de solución amortiguadora de glicina pH=9.6, esta solución se libera previamente de oxígeno, pasando una corriente de nitrógeno por 5 minutos. Se agregaron 5mg de cadena B en forma de S-sulfonato (B-SSO<sub>3</sub>), agitando hasta su disolución.

Se pone la mezcla de reacción con agitación suave en el cuarto frío 0-5°C durante 18 a 22 horas.

Terminado el tiempo de reacción se toman alícuotas de 0.1ml para electrofóresis y radioinmunoensayo, ajustando el pH=3 de la mezcla para agregar un volumen igual de solución saturada de ácido pícrico y se guarda en refrigerador durante 24 horas.

Se centrifuga la mezcla a 7000 rpm durante 10 minutos. 0-5°C se elimina el sobrenadante y el precipitado se disuelve en la mínima cantidad de amoníaco 0.1N y se agregan 10ml de acetona, se deja reposar por 15 minutos en congelador y se centrifuga, se elimina el sobrenadante y el precipitado es el producto final.

#### **8.4. Purificación de la mezcla de reasociación.**

Se disolvieron 25.4mg de mezcla de reasociación en 2ml de solución amortiguadora de urea 8M ácido acético 0.1M Tris pH=4.6, se centrifugó y se aplicó el sobrenadante en una

columna de CM-celulosa (20 x 2cm) equilibrada con la misma solución amortiguadora, después de dos volúmenes de columna se aplicó un gradiente lineal de cloruro de sodio 0.2M, colectándose la fracción correspondiente al pico que eluye a una misma fuerza iónica que el estándar.

El desalado de las fracciones colectadas se llevó a cabo en sephadex G-25 y ácido acético al 5% las fracciones eluidas se liofilizaron chequeando su identidad por electroforesis y análisis de aminoácidos principalmente.

#### 8.5. Cristalización.

En un vaso de precipitados de 50ml se colocan 0.05g de insulina libre de cinc (insulina amorfa), adicionar 5ml de ácido clorhídrico 0.02M, 0.5ml de sulfato de cinc 0.12M, 0.5ml de agua 2.5ml de citrato trisódico 0.2M y finalmente adicionar en forma lenta y sobre la superficie 1.5ml de acetona, dejar precipitando durante la noche en refrigeración.

## RESULTADOS

### 9.1. Desalado de insulina cinc comercial.

El desalado de insulina-cinc bovina se llevó a cabo en las condiciones previamente en la página 28. El perfil de elución obtenido (fig. 11), muestra dos componentes, donde el primero corresponde a la insulina y el segundo al ión metálico de cinc.

D.O. (280nm)

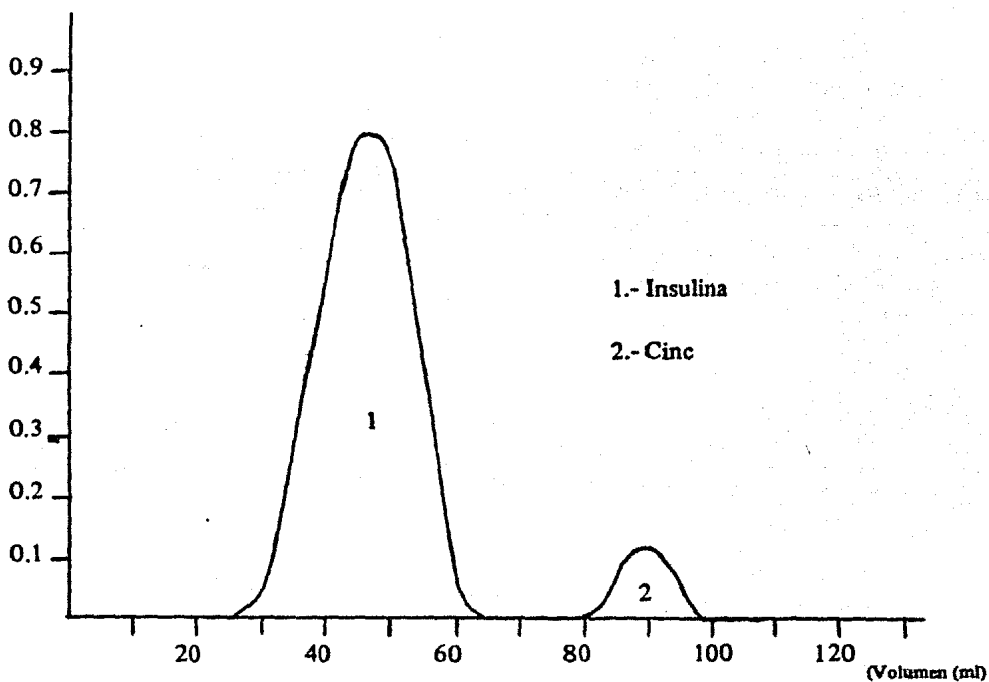


Fig. 11 Cromatograma de desalado de insulina-cinc comercial en una columna de sephadex G-25 (120 x 2.5cm), eluyente ácido acético al 50%.

### 9.1.1. Valoración del cinc.

La determinación cinc para las fracciones que aparecen en la figura 11, se llevó a cabo por el método de la ditizona (54), encontrando 0.009% de cinc en la fracción correspondiente a la insulina y 0.55% de cinc en una muestra de insulina-Zn bovina comercial que corresponde a lo reportado en el marbete. Para esto fue necesario la construcción de una curva estándar de cinc, (fig. 12).

Cinc $\mu\text{g}$ .	Absorbancia a 530nm
5	0.009
10	0.021
15	0.032

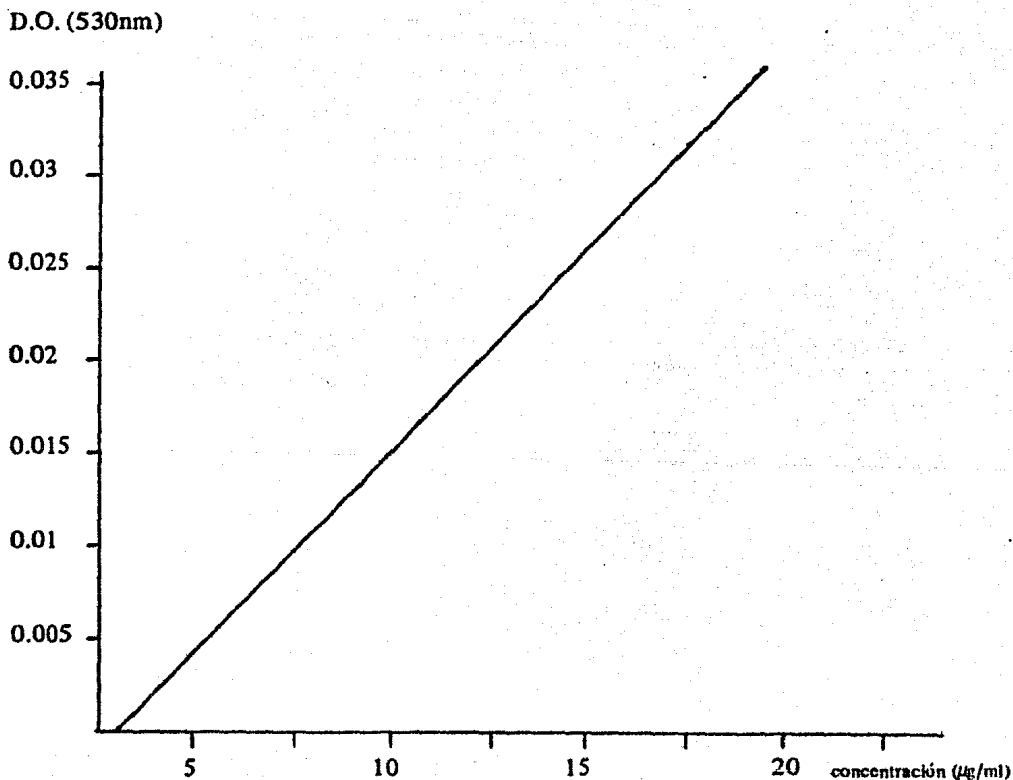


Fig. 12 Curva estándar de cinc.

### 9.1.2. Cuantificación de proteínas.

La valoración de proteína total de una muestra es importante, sobre todo cuando éstas se emplean con fines cuantitativos.

Después de haber colocado las muestras de insulina durante 24 horas en un horno de vacío sobre pentóxido de fósforo y a una temperatura de 60°C, se determinó la cantidad de proteína empleando el método de Lowry, obteniendo los siguientes resultados de dos muestras de insulina libre de cinc con respecto a una curva estándar de albúmina.

#### Curva Estándar

Albúmina $\mu\text{g}$	Abs. (625nm)
50	0.13
100	0.25
200	0.49
300	0.72
400	0.96

#### Resultados de las dos muestras de insulina analizadas por este método.

Muestra mg	% de proteína
1.93	84.9
1.81	86.5

D.O. (625nm)

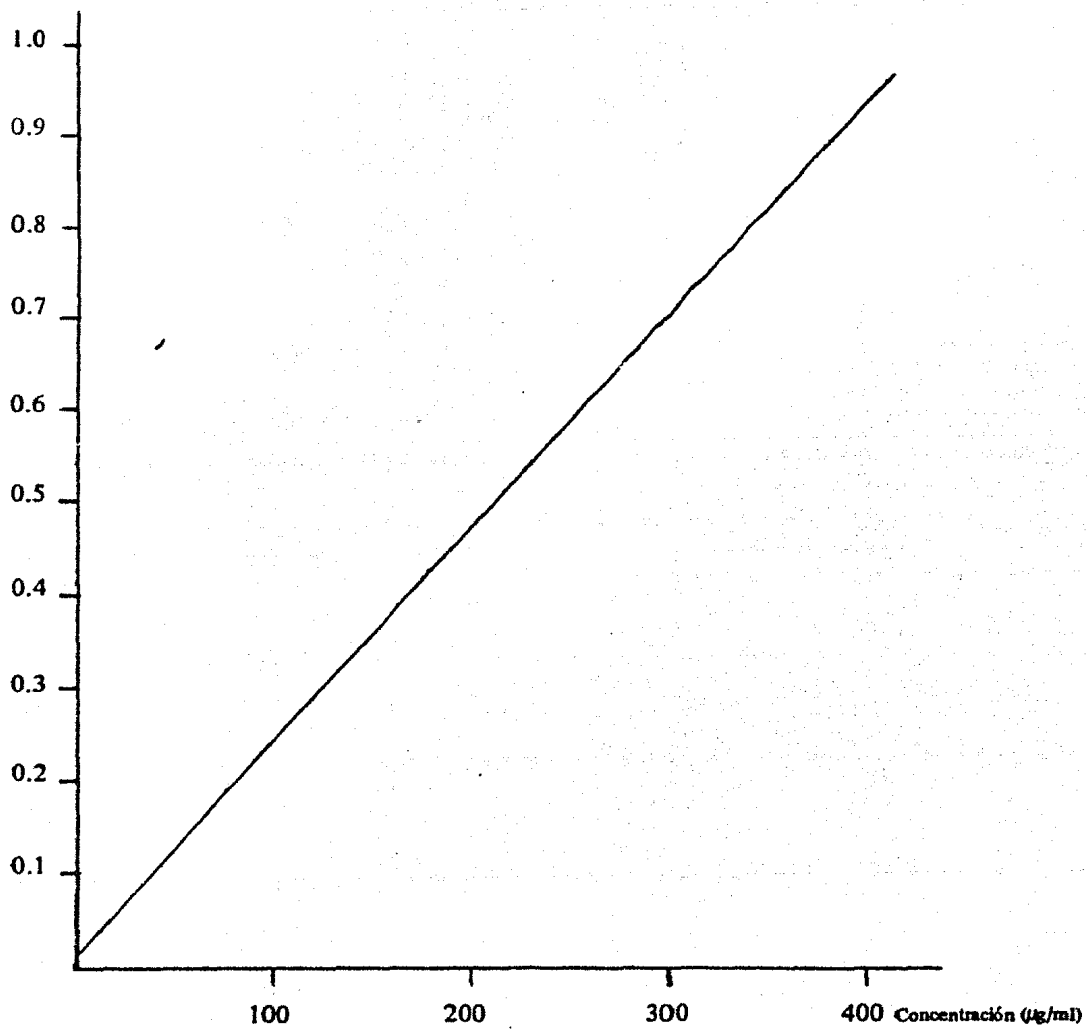


Fig. 13 Curva estándar de albúmina.

## 9.2. Preparación de las cadenas A y B de la insulina.

### 9.2.1. Purificación.

Los péptidos obtenidos de la sulfitólisis oxidativa de la insulina, se purificaron por cromatografía de intercambio iónico sobre CM-celulosa (pág. 29), los perfiles de elución son los siguientes (figs. 14 y 15 ).

D.O. (280nm)

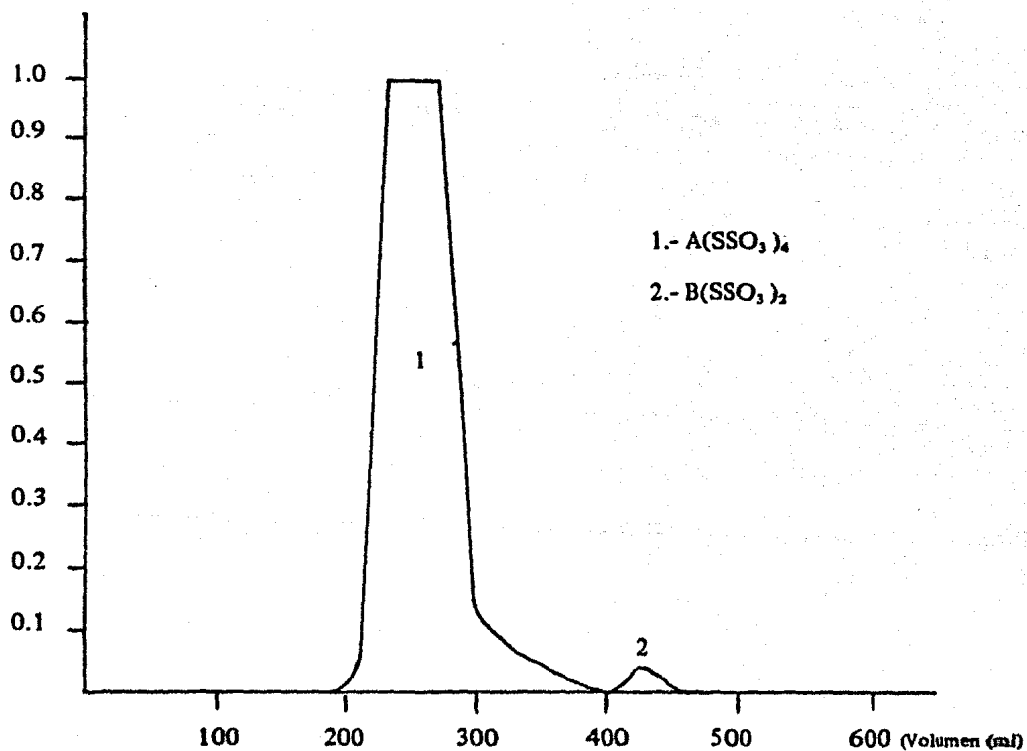


Fig. 14 Purificación de cadena A.



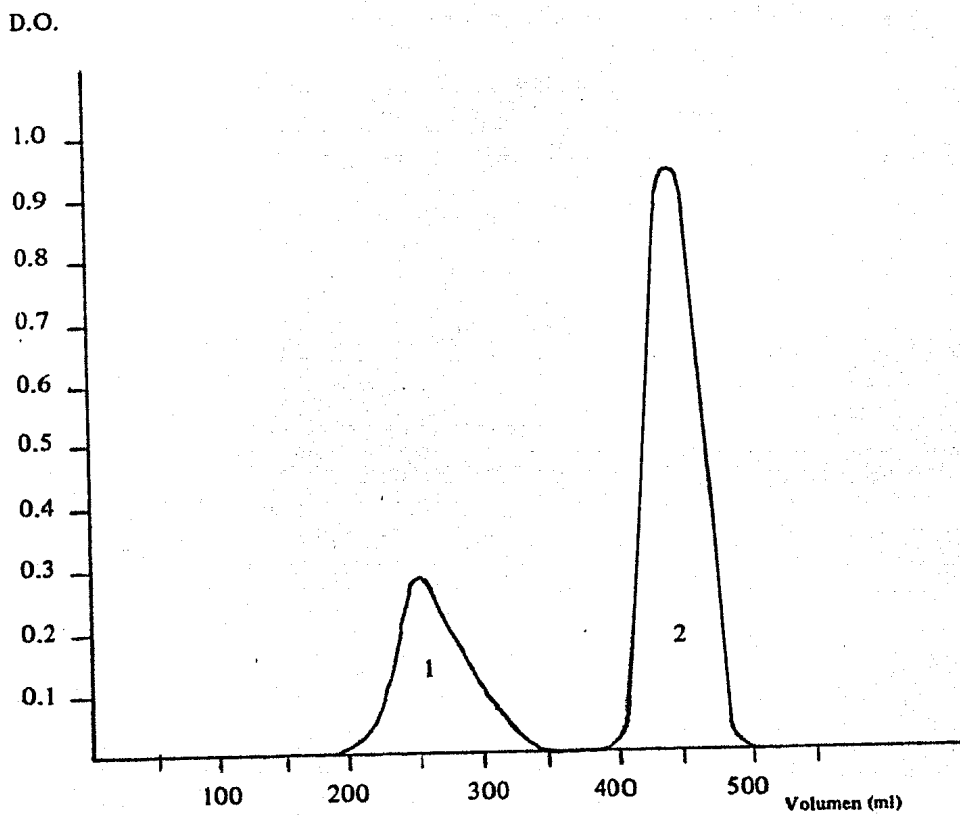


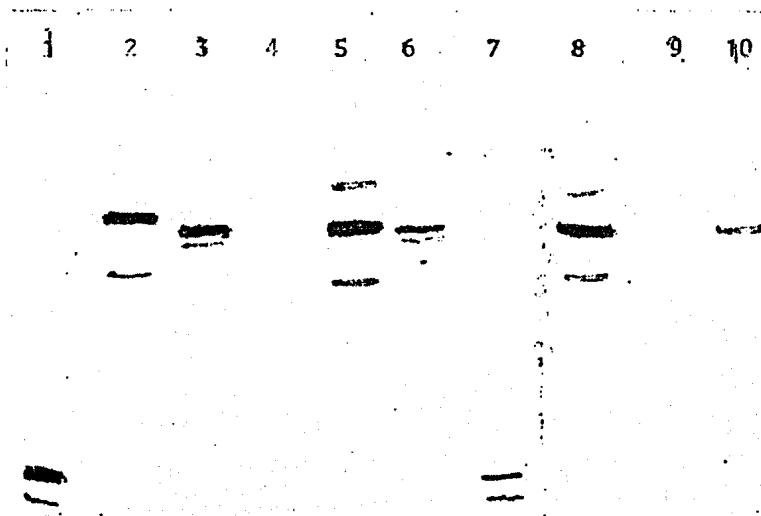
Fig. 15 Purificación de cadena B

1.-  $A(SSO_3)_4$

2.-  $B(SSO_3)_2$

### 9.2.2. Electroforesis de las cadenas A y B.

Para verificar la pureza de los péptidos purificados en el punto anterior se realizó un electroforesis en un sistema continuo de Tris - Boratos. Los resultados se presentan en la (Fig. 16) donde puede observarse la aparición de dos bandas tratándose probablemente de que una de ellas sea la forma desamido.



#### LEYENDA

1. Cadena A sulfonada.
2. Cadena B sulfonada purificada por HPLC.
3. Insulina comercial purificada por HPLC.
4. Sin muestra.
5. Cadena B sulfonada.
6. Insulina comercial.
7. Cadena A sulfonada
8. Cadena B sulfonada
9. Sin muestra.
10. Insulina reasociada.

### 9.3. Reasociación de cadenas A y B.

Este procedimiento de reasociación de cadenas se llevó a cabo por el método reportado por Katsoyannis (44), empleando cadenas obtenidas por sulfitolisis oxidativa de insulina bovina.

9.3.1 Detección de la insulina reasociada por cromatografía en placa fina antes de precipitar la mezcla de reacción, se corrieron una placa en fase invertida KC 18 Whatman (Métodos pág. 22) la mezcla de la reasociación se comparó contra un estándar de insulina bovina disuelto en buffer de glicina 0.05M a pH=9.6, usando como revelador fuoescamina en acetona, los resultados pueden observarse en la siguiente figura, donde se aprecia la posición de una banda bien definida con el mismo Rf de la banda de la insulina comercial.

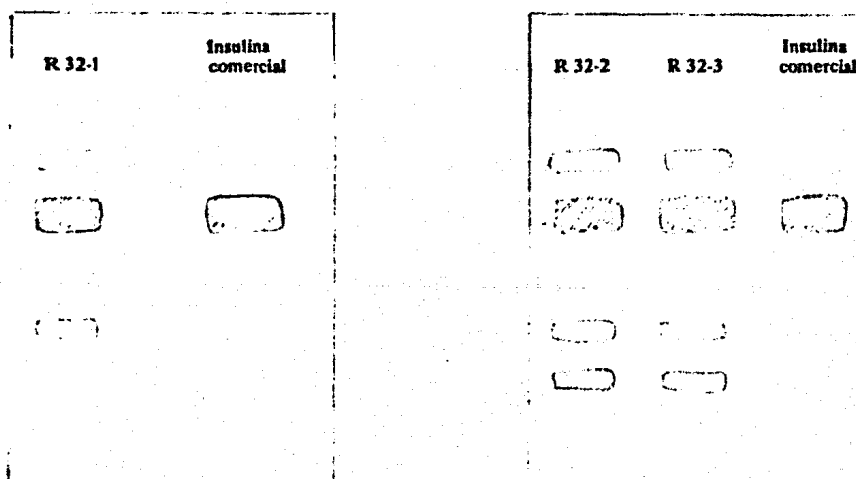


Fig. 17 Cromatografía en placa fina fase invertida KC-18 de la mezcla de reasociación contra un estándar de insulina bovina.

### 9.3.2. Detección de insulina reasociada por electrofóresis.

Debido a que el sistema de electrofóresis fue empleado cuando ya se habían realizado las primeras reasociaciones 1-24, este sistema se reporta a partir de las reasociaciones 25 en adelante.

Empleando el sistema multifásico reportado por Jovin (55), con el cual se logró una buena resolución para la mezcla de reasociación de péptidos A y B, en la figura 18 se presenta la electrofóresis de las reasociaciones número 25 a 30, donde se puede apreciar una banda que corresponde con el estándar de insulina, aunque en una proporción muy baja, comparándola contra los péptidos totales que aparecen. En esta misma electrofóresis se colocó un estándar de cadena B y puede apreciarse que tiene un corrimiento menor con respecto a la insulina, además de la diferencia en afinidad por el colorante (la cadena B se tinte más fuertemente). Dentro de este mismo sistema también puede apreciarse que la cadena A corre al frente.

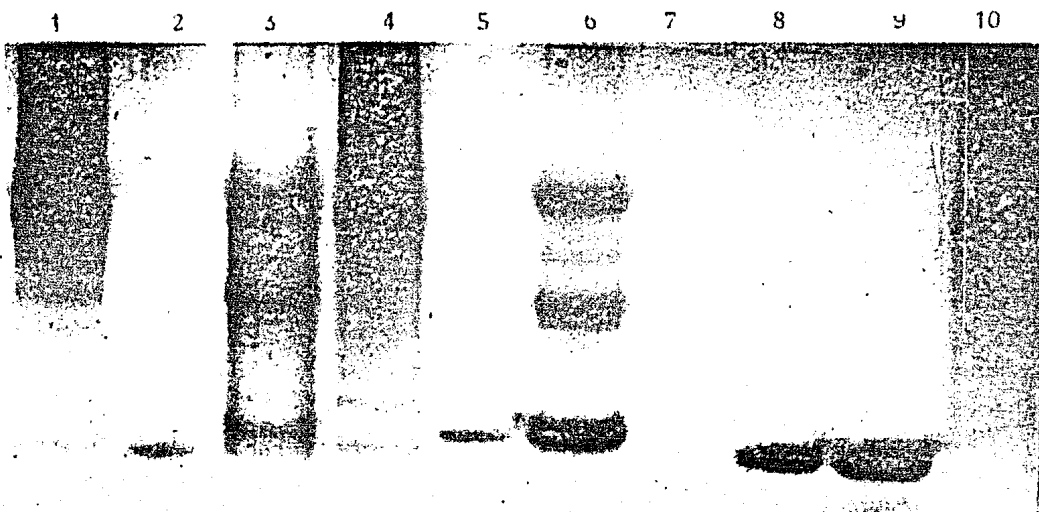


Fig. 18 Reasociaciones 25 a 30 (R-25 a R-30).

**LEYENDA**

1. Reasociación # 25
2. Estándar de insulina-Zn comercial  $1\mu\text{g}$
3. Reasociación # 26
4. Reasociación # 27
5. Estándar de cadena B sulfonada
6. Reasociación # 28
7. Sin muestra
8. Estándar de insulina comercial  $3\mu\text{g}$
9. Estándar de insulina comercial  $5\mu\text{g}$
10. Reasociación # 24

De acuerdo a los resultados que se muestran más adelante, se puede concluir que en las reasociaciones # 32 se obtuvieron buenos resultados, esto se logró evitando la oxidación de la cadena A por medio de atmósfera de nitrógeno lo que se puede apreciar en la siguiente figura.

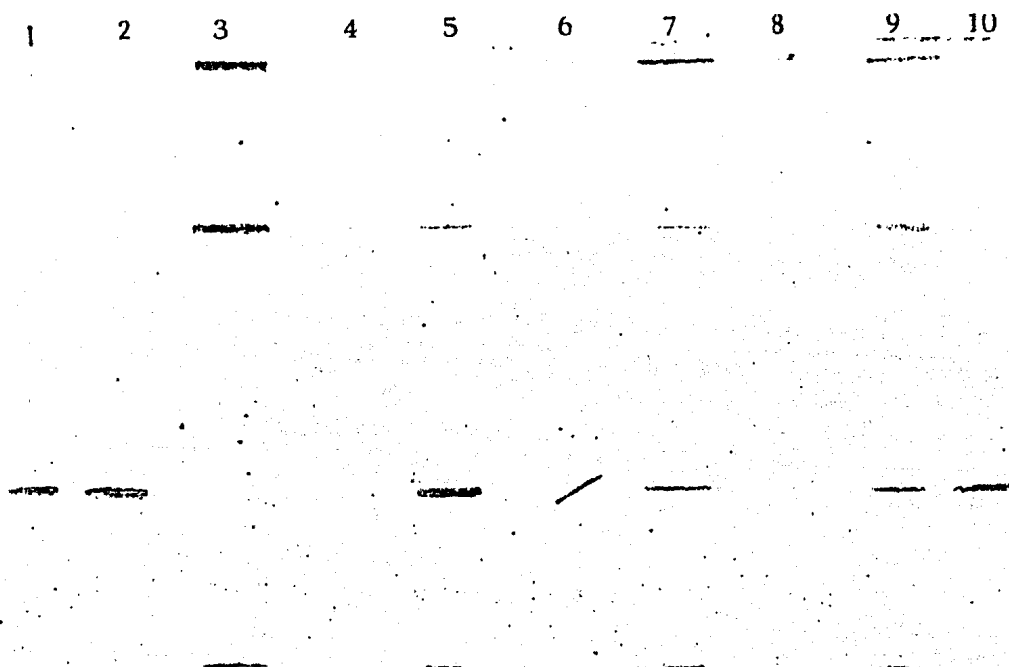


Fig. 19 Reasociaciones # 31-32

**LEYENDA**

1. Insulina comercial  $1\mu\text{g}$
2. Reasociación # 26
3. Reasociación # 31-3.
5. Reasociación # 32-1
7. Reasociación # 32-2
9. Reasociación # 32-3
10. Insulina comercial  $3\mu\text{g}$

Las reasociaciones 31-34 se realizaron por triplicado lo cual se indica por los números separados por un guión -1, 2 y 3.

La reasociación 31-3 (R 31-3), prácticamente no presentó insulina, debido a que hubo exceso de calentamiento en la reducción de la cadena A, y el precipitado gelatinoso formado no se disolvió en la solución amortiguadora de glicina.

Otra observación importante es que la banda de insulina en la electrofóresis representa aproximadamente el 80% de las proteínas presentes. Las variaciones entre las reasociaciones 32-1, -2 y 3, se deben principalmente, a la cantidad de hidróxido de amonio que se le adicionó para eliminar el picrato. Esta diferencia también puede apreciarse en los cromatogramas de purificación que se encuentran más adelante.

### 9.3.3. Purificación de insulina reasociada.

#### 9.3.3.1 Intercambio de iones.

Los resultados encontrados para la purificación de insulina de la mezcla de reasociación por cromatografía de intercambio iónico, se muestran en las siguientes figuras. Las figuras 20, 21 representan los cromatogramas de las reasociaciones R32-1, R32-3 respectivamente donde se observa claramente la diferencia en la proporción de absorbancia de la primer fracción, que corresponde a la cantidad de ácido picrico presente en las muestras.

Comparando estos cromatogramas con el de un estándar (fig. 22), se observa la elución de un componente que corresponde exactamente con el del estándar, en volumen de

elución y fuerza iónica. Después de desalar estas fracciones por filtración en gel, en una columna de 20 x 1cm, sobre sephadex G-25 en ácido acético al 5% y liofilizar, se realizó la electrofóresis de estas fracciones en los dos sistemas antes mencionados (pág. 23, 24). Encontrando que dicha proteína reasociada tiene la misma movilidad electroforética que un estándar de insulina comercial, (fig. 19, 23).



D.O. (280nm)

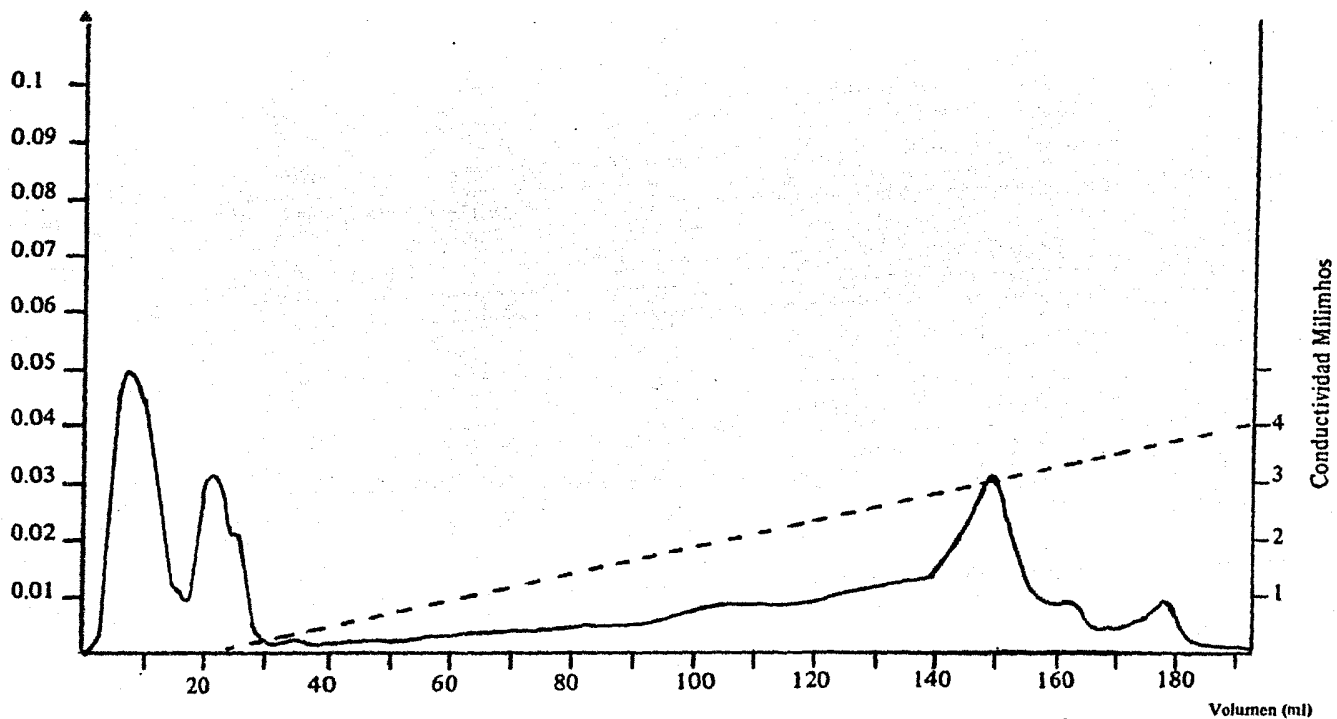


Fig. 20 Cromatograma de 25.4mg de mezcla de reasociación (R32 I) en una columna de 2 x 20cm de CM-celulosa a pH=4.6 con ácido acético 0.1M/Tris y urea 8M. A partir de la fracción 5 se aplicó un gradiente lineal de cloruro de sodio 0.2M.

D.O. (280nm)

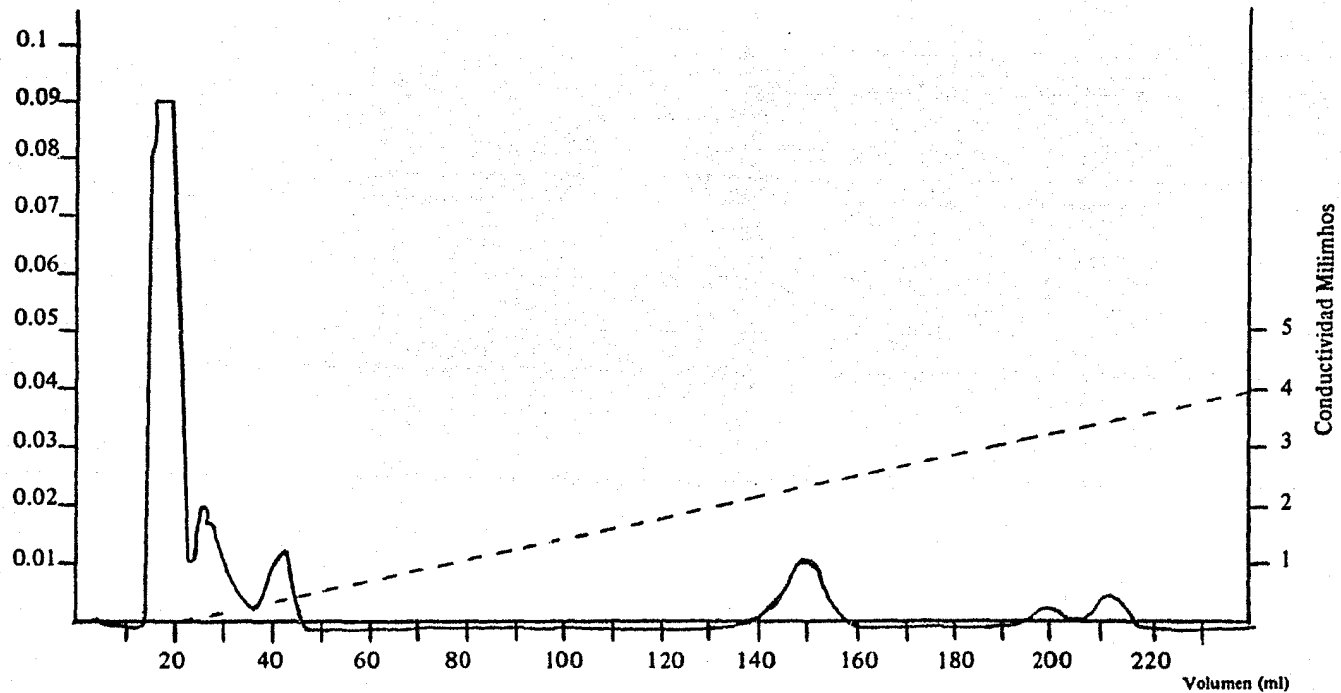


Fig. 21 Cromatograma de 16mg de mezcla de reasociación (R32-3) en una columna de 2 x 20cm de CM-celulosa a pH=4.6 con ácido acético 0.1M/Tris y urea 8M. A partir de la fracción 5 se aplicó un gradiente lineal de cloruro de sodio 0.2M.

D.O. (280nm)

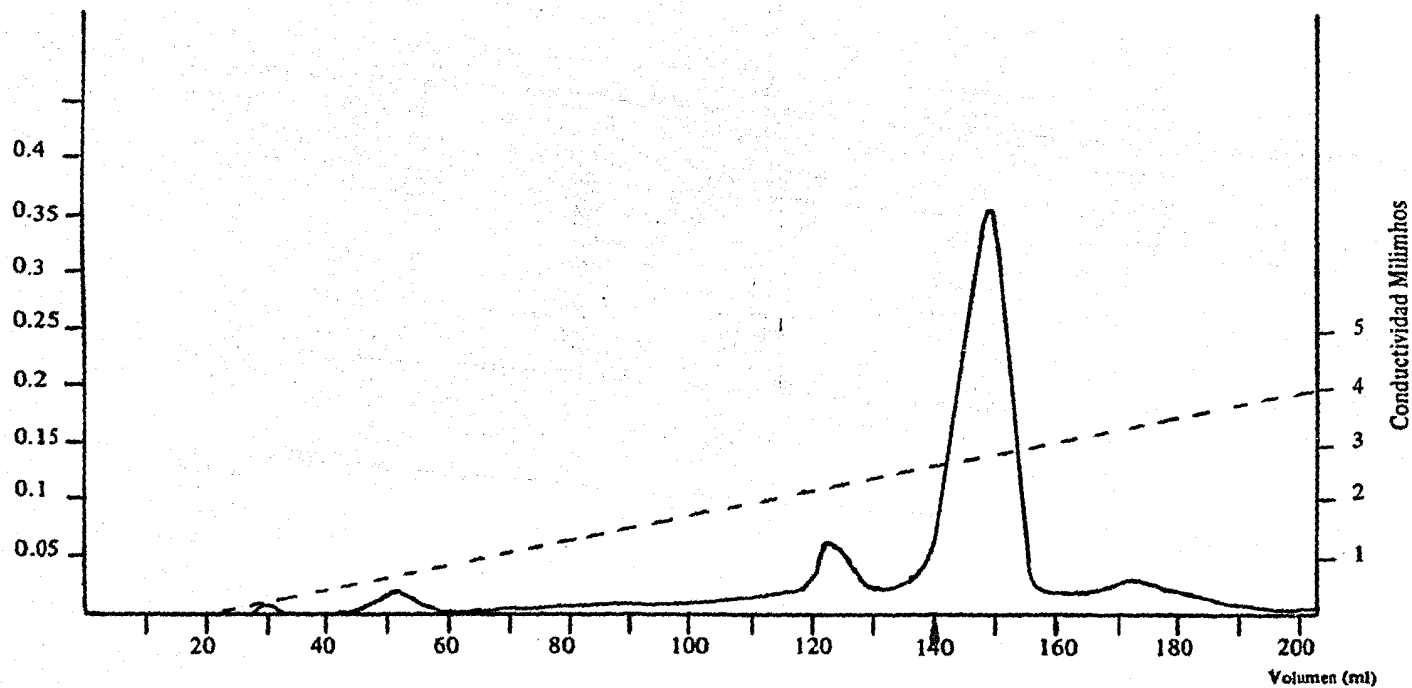


Fig. 22 Cromatograma de 20mg de insulina libre de cinc en una columna de 2 x 20cm sobre CM-celulosa a pH=4.6 con ácido acético 0.1M/Tris y urea 8M. A partir la elución de 19ml se aplicó un gradiente lineal de cloruro de sodio 0.2M.

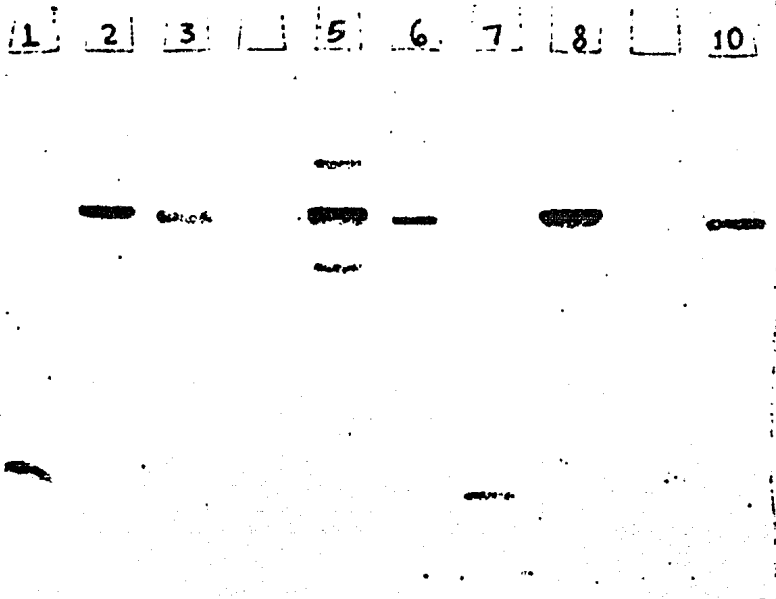


Fig. 23

**LEYENDA**

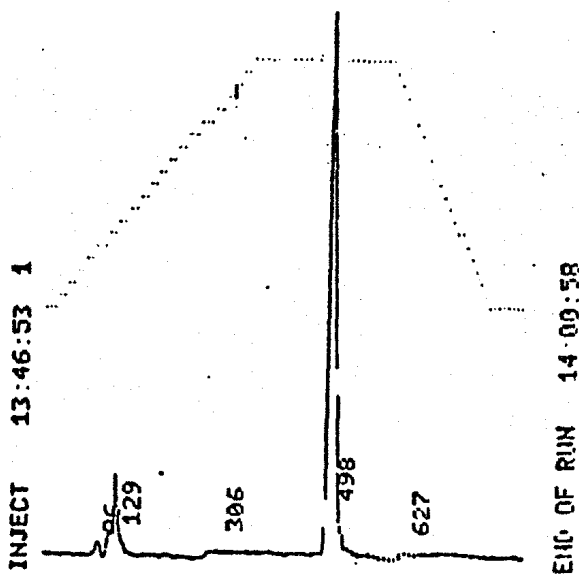
1. Cadena A sulfonada.
2. Cadena B sulfonada.
3. Insulina purificada por HPLC.
4. Sin muestra.
5. Cadena B sulfonada.
6. Insulina comercial.
7. Cadena A sulfonada.
8. Cadena B sulfonada.
9. Sin muestra.
10. Insulina reasociada 32-3 purificada por cromatografía de intercambio iónico.

En las figuras 19 y 23, se puede observar que existe muy poca diferencia en la migración de la cadena B con respecto a la insulina, sin embargo, se puede distinguir una de otra por la diferencia en la afinidad por el colorante. La cadena B se tiñe fuertemente que la insulina y que la cadena A.

### 9.3.3.2. Cromatografía de líquidos.

La purificación se llevó a cabo en un cromatógrafo Spectra Phycis- 8000 B empleando un sistema de eluyentes; 2.5% de ácido fórmico (solución A), 80% acetonitrilo (solución B), y un gradiente de 20 a 40% de acetonitrilo.

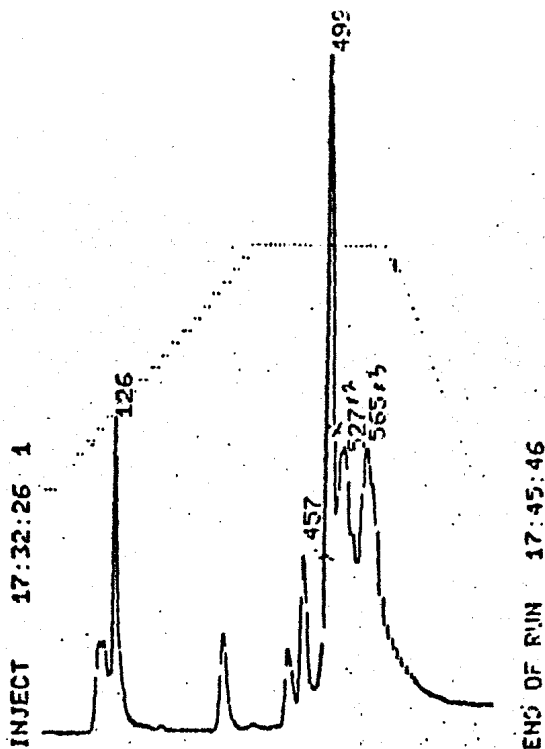
Para fines de identificación y cuantificación, se corrió un estándar en las condiciones antes mencionadas (fig. 24), donde se observa la elución de un compuesto definido con un tiempo de retención de 498 segundos.



25.9  $\mu$ g de insulina bovina

pico #	área %	RT
1	1.15	96
2	12.69	129
3	86.16	498

En la figura 25 se representa el cromatograma de la mezcla de reasociación R32-I, eluido bajo las mismas condiciones que el estándar, y en éste se aprecia un pico bien definido con un tiempo de retención similar al del estándar de insulina.



En estas figuras no se anota el % de área debido a que las muestras no se solubilizaron completamente.

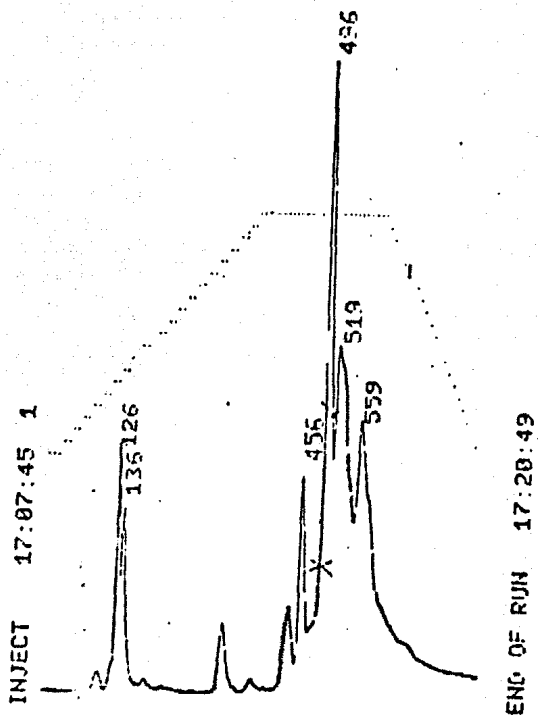


Fig. 26 Cromatograma de la mezcla de reasociación R32-2 donde al igual que la anterior se observa un pico con un tiempo de retención cercano al del estándar de insulina.

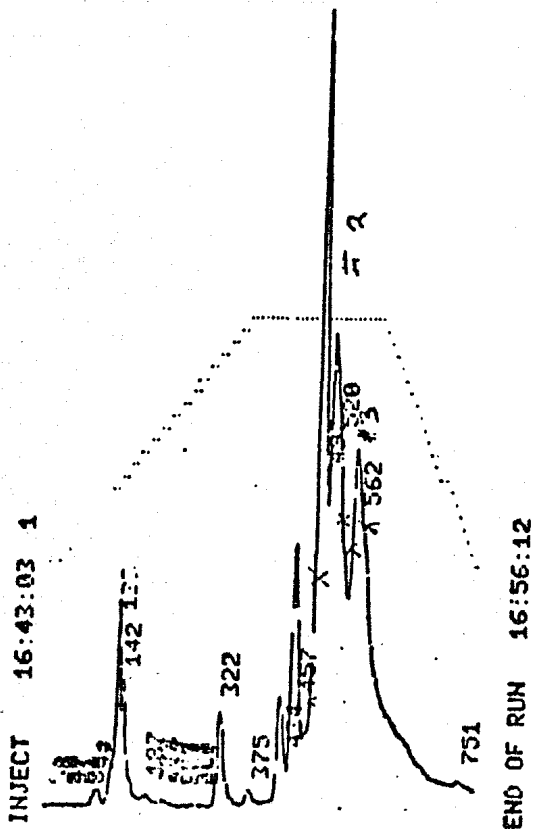


Fig. 27 En esta figura también existe un pico bien definido con un tiempo de retención similar al del estándar R32-3.

En las tres figuras anteriores, se puede observar que prácticamente todos los cromatogramas son idénticos, y que en las tres muestras aparece una fracción que corresponde con el del estándar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por cromatografía en placa fina y electroforesis. Ahora en la figura 28, se representa el cromatograma de la mezcla de reasociación R31-3 en donde hubo problemas de solubilidad, por sobrecalentamiento en el paso



de reducción de la cadena A, y por lo tanto, se observa un pico muy pequeño que corresponde al de la insulina.

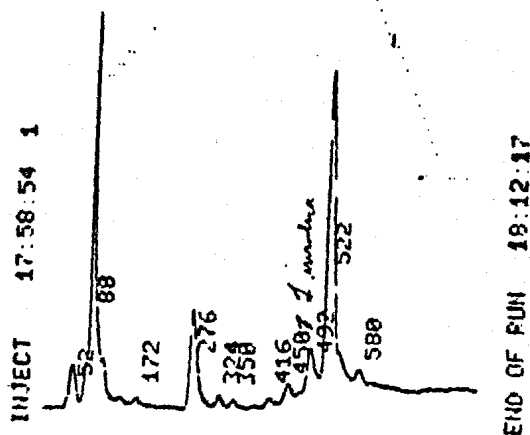


Fig. 28 Cromatograma de la R31-I donde hubo sobrecalentamiento.

Por medio del área bajo la curva se cuantificó la insulina en cada una de las muestras, el porcentaje de rendimiento calculado por este método es de aproximadamente 20% para las reasociaciones R32, y del 2% para la R31-I, es importante aclarar, que hubo problemas de solubilidad de las muestras y de éstas, sólo se aplicó el sobrenadante, por lo tanto, se piensa que pudo haber absorción de la insulina por proteínas de mayor peso molecular presentes en el precipitado, por lo que este método no se puede tomar como cuantitativo hasta no resolver el problema de solubilidad.

### 9.3.4 Análisis de aminoácidos.

Se envió una fracción de insulina reasociada (R32-2), purificada por cromatografía de líquidos, a la unidad de aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, y un estándar de insulina comercial libre de cinc, encontrando que ambas muestras presentan la composición esperada para la insulina.

AMINOACIDO	ESPERADO	INSULINA COMERCIAL	INSULINA REASOCIADA
Acido Aspártico	3	3.05	2.98
Treonina	1	1.03	0.98
Serina	3	3.02	2.78
Acido Glutámico	7	6.9	7.1
Prolina	1	0.3	0.68
Glicina	4	3.96	3.94
Alanina	3	3.0	3.23
Cisteína*	6	---	---
Valina	4	4.3	4.39
Isoleucina	2	0.2	0.07
Leucina	6	5.1	5.86
Tirosina	4	3.37	4.52
Fenilalanina	3	2.32	3.0
Histidina	2	2.07	1.9
Lisina	1	0.83	0.79
Arginina	1	0.81	0.88

\* No determinado.

### **9.3.5. Cuantificación.**

9.3.5.1. Cromatografía de líquidos, la cuantificación de insulina presente en la mezcla de reasociación, fue determinada por los encargados de cromatografía de líquidos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, los cuales reportaron rendimientos máximos del 20% para las reasociaciones 32, sin tomar en cuenta que hubo problemas en la solubilidad de la muestra.

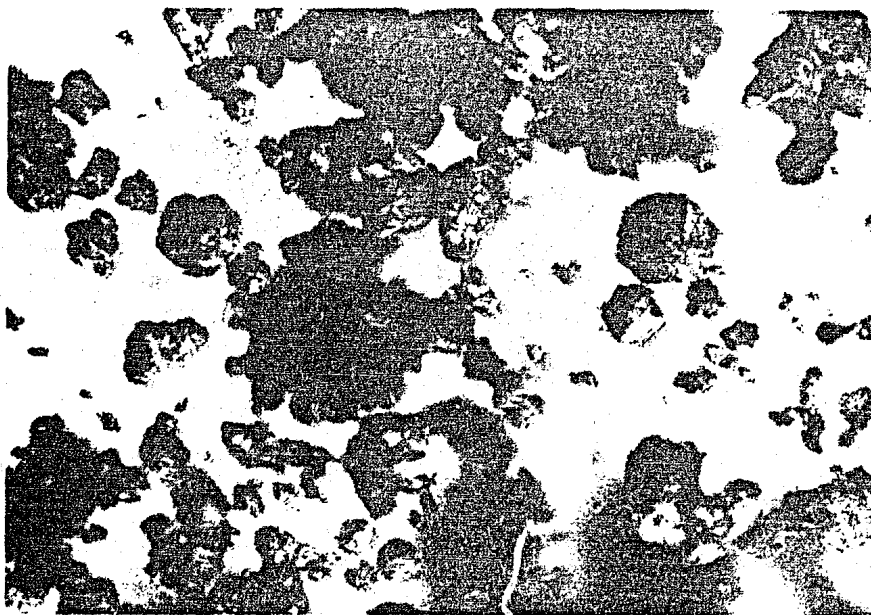
9.3.5.2. Análisis de aminoácidos, este análisis se llevó a cabo por la Unidad de Aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, reportando un rendimiento del 44%.

9.3.5.3. Absorción a 280nm se cuantificó la insulina reasociada en el proceso de purificación, empleando los cromatogramas respectivos para encontrar el área bajo la curva comparada contra un estándar eluido en las mismas condiciones, el resultado es del orden del 48%.

9.3.5.4. Radioinmunoensayo. Esta determinación fue realizada por el grupo de la Dra. Patricia Joseph, reportando rendimientos del 60% para las reasociaciones 32.

#### 9.4. Cristalización de insulina.

Para estandarizar este método y aplicarlo particularmente a la insulina obtenida en bacterias, fue necesario obtener insulina libre de cinc (amorfa), figura 29.



Se probaron distintos métodos de cristalización reportados encontrándose considerablemente variaciones en la forma y tamaño de los cristales obtenidos.

Las figuras (30 y 31) muestran los cristales de insulina de cerdo y bovino comerciales. En estos cristales comerciales se aprecia la forma de rombohedro con variaciones en el tamaño de los cristales, y presencia de partículas amorfas.

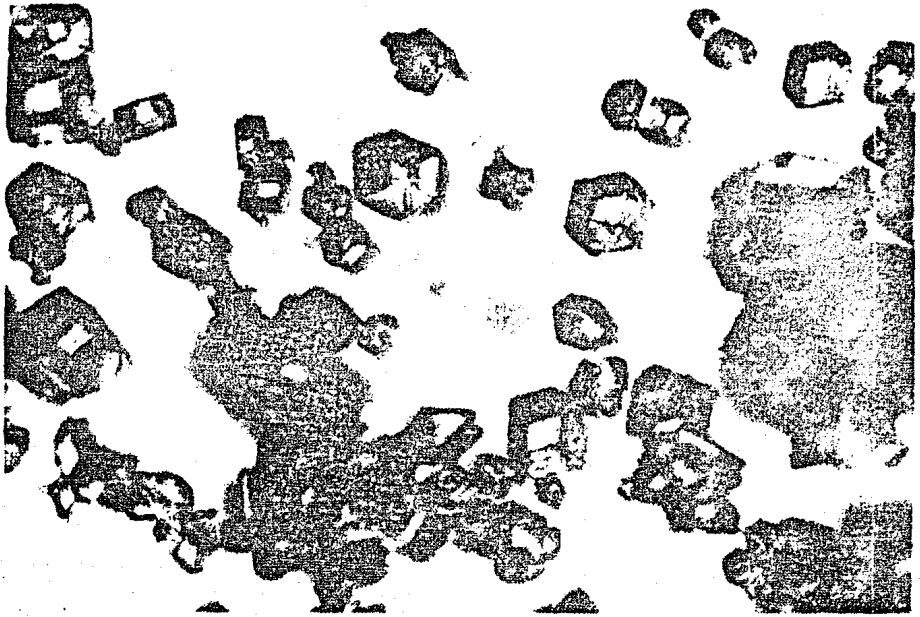


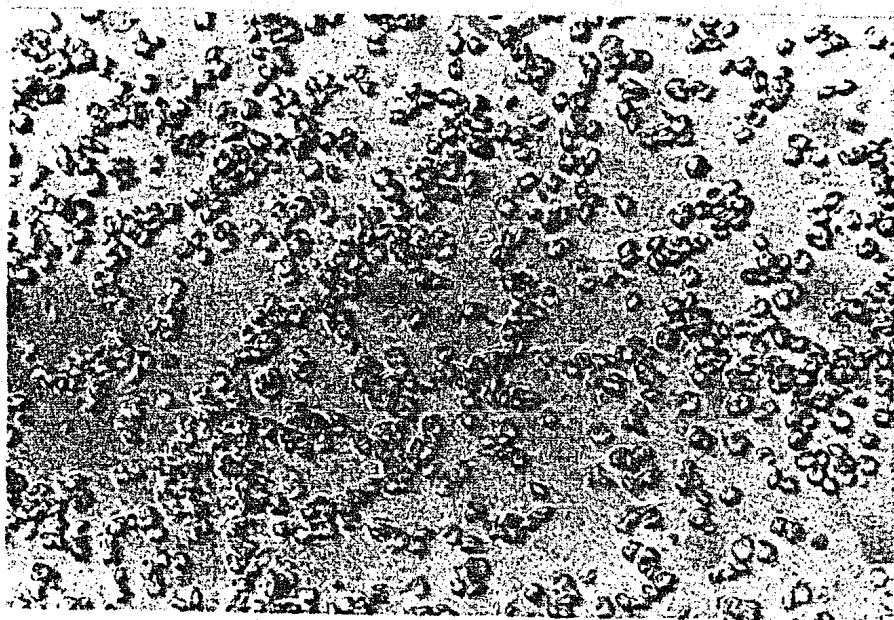
Fig. 30 Cristales de insulina de cerdo.



Fig. 31 Cristales de insulina bovina.

Al probar la cristalización de la insulina amorfa, se encontró que el tamaño de los cristales obtenidos por cualquiera de los métodos empleados, está sujeto a la velocidad de formación, agitación y a la concentración de iones cinc en solución.

Lo anterior puede observarse en la fig. (32), donde se observa una gran cantidad de cristales pequeños. Esto probablemente se debe a su rápida formación. Evitando la agitación en este proceso los resultados fueron idénticos.



(fig. 32)

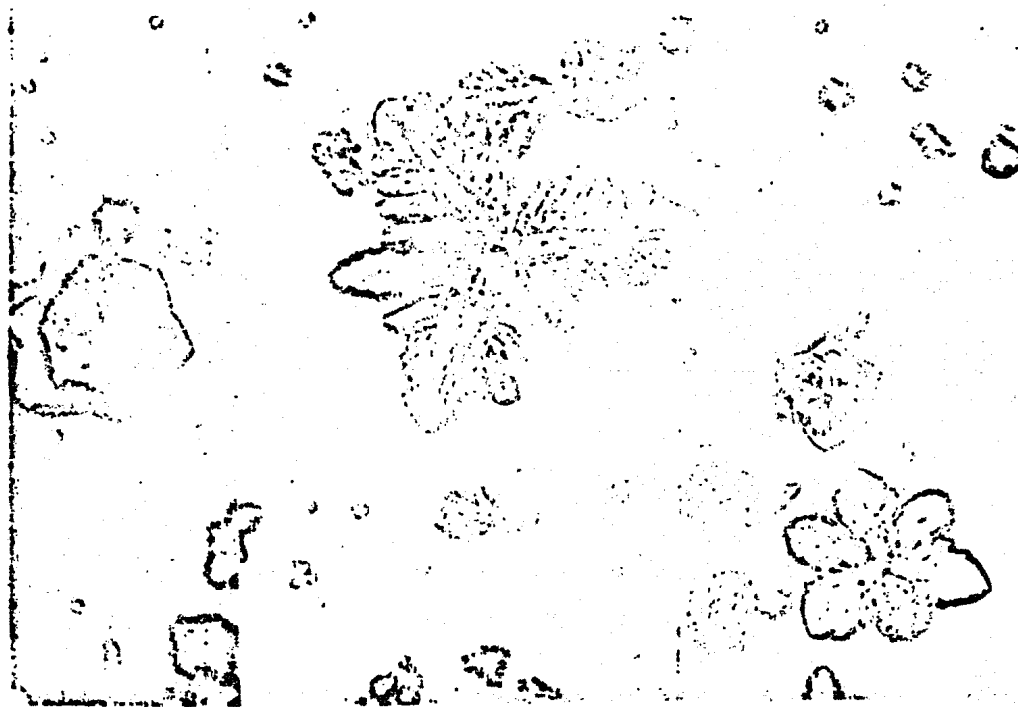
Cuando se adicionó la acetona rápidamente, por el método de Schlichtrull (21), los cristales formados instantáneamente fueron muy pequeños, en cambio cuando la adición de acetona se llevó a cabo lentamente sobre la superficie de la mezcla cristalizante, los cristales se fueron precipitando lentamente en forma de rombohedros bien definidos, y de tamaño uniforme comparable con los cristales de insulina comerciales, además de que no se apreciaron partículas amorfas, fig. (33).



(Fig. 33).

Empleando el método de Zahan H., et al. (56), cuando se ajusta al  $\text{pH}=6$ , se formó un precipitado rápidamente, la insulina cristalizó en forma de estrella y de rombohedros no bien definidos, Fig. (34).

Con este mismo método se obtuvieron resultados similares a los de la Fig. (33), cuando se adicionó acetona lentamente como último paso de la cristalización.



( Fig. 34)

Cristales de insulina en forma de estrella y rombohedros en proceso de transformación a la forma estrellada.



## **DISCUSION DE RESULTADOS.**

En primer término fue necesario desarrollar el método de desalado de insulina comercial por filtración en gel, con el propósito de obtener insulina libre de cinc, para emplearla como patrón de referencia y para los estudios de cristalización. Para verificar los resultados del proceso anterior, y poder trabajar en forma cuantitativa se realizó la valoración de proteínas. A este mismo péptido como a una muestra de insulina sin desalar, se le determinó la cantidad de cinc, encontrando que los resultados concuerdan con los reportados.

La insulina obtenida en el proceso anterior se sometió a la reacción de sulfitólisis oxidativa, reportada por J.L. Bailey (39), para obtener cada uno de los péptidos A y B en forma S-sulfonada, resultando para cada caso polvos blancos muy ligeros. Su purificación se llevó a cabo por intercambio iónico en medio ácido. Debido a que ambos péptidos presentan propiedades diferentes, la separación fue satisfactoria, posteriormente fue necesario dializar contra agua y después liofilizar. Finalmente, estos péptidos se caracterizaron básicamente por su composición de aminoácidos y movilidad electroforética.

Uno de los aspectos más importantes de este trabajo fue la adaptación del método de reasociación (29, 30), sobre el cual se lograron eficiencias del 60% medidas por radioinmunoensayo.

Con respecto a los métodos de detección de insulina, la cromatografía en capa fina resultó ser conveniente para detectar insulina de la mezcla de reasociación.

La movilidad electroforética de la mezcla de reasociación, frente a un estándar de insulina, indica probablemente la migración de un péptido con la misma movilidad electroforética que el estándar.

La cromatografía de líquidos para muestras de insulina reasociada, también se empleó como método de identificación y purificación, comparando los tiempos de retención contra un estándar. Sin embargo, debido a los problemas de solubilidad no se utilizó este método con fines cuantitativos.

Se logró la purificación de la insulina reasociada por intercambio iónico lo que se verificó por electrofóresis y análisis de aminoácidos.

En lo referente a la cristalización, los resultados encontrados fueron muy interesantes debido a las diferentes formas y tamaño de los cristales obtenidos y dependiendo del procedimiento empleado. Finalmente, se logró cristalizar la insulina con la forma (rombohedros) y tamaño requerida para este trabajo.

## **CONCLUSIONES**

El método empleado para desalar la insulina-cinc comercial bovina, fue adecuado. De acuerdo a los resultados encontrados para la determinación de cinc donde su concentración en la insulina desalada, resultó ligeramente menor que la reportada por otros métodos de desalado. Además el análisis de aminoácidos reportó una pureza del 98%, por lo que esta muestra se empleó como patrón de referencia y como materia prima para el desarrollo del método de cristalización.

Los péptidos obtenidos por sulfitólisis oxidativa de insulina cinc comercial o insulina amorfa, cumplieron con los requerimientos necesarios para los objetivos planteados. Dichos péptidos mostraron la composición y pureza indispensable para usarse como patrones de referencia, y para la adaptación del método de asociación, lo que fue corroborado por su análisis de aminoácidos y estudios de electrofóresis.

La reasociación de las cadenas A y B, demostró la presencia de un péptido con las mismas propiedades fisicoquímicas y biológicas que el estándar de insulina empleado, de acuerdo a las pruebas de caracterización empleadas como la composición de aminoácidos, movilidad comparativa frente a la hormona natural y estudios de actividad biológica por radioinmunoensayo.

Los métodos de purificación de insulina de la mezcla de reasociación son satisfactorios, de acuerdo a los resultados encontrados por electrofóresis y composición de aminoácidos.

**El método de cristalización desarrollado en este trabajo cumplió con los objetivos planteados, e inclusive superó en homogeneidad de forma y tamaño a diferentes muestras comerciales utilizadas como referencia.**

## BIBLIOGRAFIA

1. Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 106, (1979).
2. Cowley, London Med. Journal (1788).
3. Von Mering, J. and Minkowki., Arch. Exp. Pathol. Pharmacol, **26**, 231 (1889).
4. Schulze. Arch. F. Mikroskop. Anat. U. Entwickhings Mech. **56** (1900).
5. Ssobolew. Zentralblatt Phatol. **11**, 202, (1900).
6. Banting, F.G. and Best, C.H., J. Lab. Clin. Med. **7**, 251, (1922).
7. Collip, J.B. Best, C.H., J. Lab. Clin. Med. **7**, 251, (1922).
8. Abel, J.J., et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **12**, 132, (1926).
9. Harington, C.R. and Scott, D.A., J. Biochemical, **23** 384-397, (1929).
10. Scott, D.A., J. Biochemical **28**, 1592, (1934).
11. Lutz, J. Ind. Hygiene, **8**, 177 (1926).
12. Scott, D.A. and Fisher, A.M., J. Biochemical, **29**, 1048 (1935).
13. Romans, R.G., Scott, D.A., and Fisher, A.M., Industrial Engineering Chemistry, **32**, 908-910 (1940).
14. Cohn, E.J. et. al. Science, **90**, 185 (1939).
15. Maxwell, L.C., and Feldkamp, R.F., American Chemical Society, Detroit, september **12**, (1940).
16. Sahyun, M., J. Biol. Chem., **138**, 487-491, (1941).
17. Cohn, E.J., et. al., J. Am. Chem. Soc. **63**, 17-25, (1941).
18. Eisenbrand, J., et. al., Z. physiol, Chem. **268**, 26, (1941).
19. Schlichtrull, J., Acta Chemica Scandinavica, **10**, 1455-1458, (1956).
20. Crowfoot, D., Nature, **135**, 591, (1935).

21. Schlichtrull, J., Acta Chemica Scandinavica 11, 291-298 (1957).
22. Marker, K., Acta Chemica Scandinavica 13, 2036-2038, (1959).
23. Ryle, A.P., et. al. Biochem. J. 60, 556-565, (1955).
24. Mazur, A., Bioquímica Básica, ed. 10 Ed. Interamericana 60, 63, 320 (1973).
25. Ronald, E.C., et. al. Diabetes care, 4, 147-153, (1981).
26. Weitzel, G., et. al., Ann. Chem. 687, 248, (1965).
27. Davidson, J.K., et. al., Diabetes care 18, 212, (1969).
28. Akre, P.R., et. al., Diabetes care 13, 135, (1964).
29. Boshhell, B.R., et. al. Diabetes 13, 144, (1964).
30. Feldman, R., et. al. Amer. J. Med. 35, 411, (1963).
31. Berson, S.A., and Yallow, R.S., Science 134, 844, (1963).
32. Cecil, R., and Loenning, U.E., Biochem. J. 66, 18, (1977); 76, 146, (1960).
33. Wintersteiner, O., J. Biol. Chem., 102, 473-488, (1933).
34. Adams, M.J., et. al. Nature (London), 224, 494 (1969).
35. Frederieq, E., Arch. Biochem. Biophys. 65, 218, (1956).
36. Reither, E.J., Advances in Protein Chemistry 18, 158 (1963).
37. Sanger, F., Nature (London) 160, 295, (1947).
38. Swan, J.M., Nature (London) 180, 643 (1957).
39. Bailey, L., and Cole, R.D., J. Biol. Chem. 234, 1733, (1959).
40. Du, Yu-cang., et. al., Scientia sinica 10, 84-104, (1961).
41. Du, Yu-cang, Jiang Rong-quiring, Scientia sinica 14, 231-243, (1965).
42. Krasnoshchekova, S.P., Zhurnal Obshchei Khimii, 44, 2341-2346, (1974).
43. Kung Yueh-ting, et. al. Scientia sinica, 15, 544-561 (1966).

44. Katsoyannis, P.G., and Tometsko, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 55, 1554, 1561, (1966).
45. Langdon, R.G., J. Biol. Chem. 235, 15, (1960).
46. Katsoyannis, P.G., et. al., Biochemistry, 6 2635-2668, (1967).
47. Adams, W.R., et. al., J. Am. Chem. Soc. 5, 164-166, (1966).
48. Niu, Ching-i., et. al. Scientia sinica (Notes) 14, 1386-1388, (1965).
49. Wilson, S., Dixon, G.H., and Wardlaw, A.C., Biochim. Biophysica Acta, 62 483-489. (1962).
50. Tsou, C.-I., et. al. Scientia sinica 10, 332-343, (1961).
51. Du, Yu-cang., et. al. Scientia sinica 14 229, (1965).
52. Niu, Ching-i., et. al. Scientia sinica, 15, 231, (1966).
53. Zahn, H., Gutte, E.F., Pfeiffer, and Ammon Liebliigs. Ann. Chem. 691, 225 (1966).
54. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. SSA. 4a. ed. 424, (1974).
55. Jovin, T.M., Biochemistry, 12, 890, (1972).
56. Zahn, H. et. al., Z. Naturforsch., 24b 1127-1139, (1969).