



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**EXTRACCION Y PURIFICACION DE  
CALCITONINA HUMANA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO - FARMACEUTICO - BILOGO**

**P R E S E N T A**

**Margarita Altamirano Aceves**

México, D. F.

17

1976



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.

Tesis  
LAB \_\_\_\_\_  
AÑO \_\_\_\_\_ 1946 \_\_\_\_\_  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROC \_\_\_\_\_ Mt 20 \_\_\_\_\_



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE:

PRESIDENTE: Dra. Estela Sánchez de Jiménez  
VOCAL: Prof. Alfredo Echegaray Alemán  
SECRETARIO: Dra. Graciela Delhumeau de Ongay  
1er. SUPLENTE: Prof. Francisco Bolívar Zapata  
2do. SUPLENTE: Prof. Guillermo Rendon Padilla

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Hormonas Proteicas,  
División de Biología de la Reproducción,  
Subjefatura de Investigación Científica  
del I. M. S. S.

SUSTENTANTE:

Margarita Altamirano Aceves

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Graciela Delhumeau de Ongay

SUPERVISOR TECNICO:

Dra. Angélica Salas Valdés

A MIS PADRES :

Como una prueba de gratitud  
y cariño por lo que han hecho  
por mí.

A MI ESPOSO HECTOR:

Por su confianza y cariño que  
me ha brindado.

A MIS HERMANOS:

Antonieta, Carlos, Natalia,  
Austacio, José, Rosario y  
Gloria.

A MIS ABUELOS ,  
TIOS Y FAMILIARES:

Por su apoyo y estímulo .

A MIS MAESTROS Y AMIGOS:

Por su orientación y ayuda  
que me proporcionaron.

Agradezco a la Subjefatura de Investigación Científica, del I. M. S. S., las facilidades proporcionadas para la realización de este trabajo y a todas las personas que me brindaron su colaboración y estímulo.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Hormonas Proteicas, División de Biología de la Reproducción, de la Subjefatura de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Angélica Salas V.

EXTRACCION Y PURIFICACION DE

CALCITONINA HUMANA

## CONTENIDO

	Pags .
Introducción	1
Material	11
Métodos	20
Resultados	48
Discusión	67
Bibliografía	79

CLAVES UTILIZADAS PARA  
LOS DIFERENTES PRODUCTOS

Números (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9): Indican en No. de lote

C: Se refiere a material que procede de cadáveres.

Q: Material quirúrgico

PA: Polvo de Acetona

S: Sobrenadante

R: Residuo

I y II: fracciones obtenidas en la filtración en Sephadex.

XM-50, PM-10, UM-2: Productos obtenidos retenidos por las membranas de ultrafiltración.

DEAE-C-I,II,III y IV: Fracciones (I,II,III,IV) obtenidas en dietil-etil-amino-etil-celulosa (DEAE-C)

CM-C-I: fracción (I) obtenida en carboxi-metil-celulosa (CM-C).

Ejemplo: 4Q-S-II-PM-10-DEAE-C-III.

Esta clave quiere decir: Es un producto que viene del lote 4, que procede de material quirúrgico (Q), de donde se obtuvo un sobrenadante (S), el cual - pasó por sephadex del cual se recolectó la fracción (II), que pasó a ultrafiltración, obteniéndose el producto retenido en la membrana PM-10, que finalmente fue purificado en cromatografía en DEAE-C, de donde se obtuvo la fracción III.

## INTRODUCCION

La calcitonina o tirocalcitonina es una hormona proteica secretada por la tiroides de los vertebrados superiores y por el último cuerpo branquial de los vertebrados inferiores; tiene un efecto hipocalcémico en los roedores y los mamíferos y por lo tanto, su efecto es antagónico al de la hormona paratiroidea.

En 1955, Munson (1) observó que cuando practicaba la paratiroidectomía en ratas utilizando un cauterio, se producía una hipocalcemia sanguínea que atribuyó a la falta de la hormona paratiroidea.

El mismo Munson (2) informó que desde 1958 Gauthier había observado que la hipocalcemia producida por la paratiroidectomía quirúrgica era de menor importancia que la de la operación practicada con cauterio.

En ese mismo año (1961) Copp (3) sospechó la existencia de una sustancia hipocalcemiante porque observó que cuando se perfundía sangre rica en calcio y extractos tiroideos y paratiroideos a perros, se producía un decremento de calcio en sangre; él concluyó que dicho principio existía en la paratiroides, ya que la hipocalcemia solo se presentaba cuando se perfundían las paratiroides, lo que no sucedía con la perfusión de la tiroides; ya que la sustancia en cuestión intervenía en el metabolismo del calcio, la designó con el nombre de "Calcitonina".

En 1936, Hirsch (4) comprobó los experimentos de Munson y Gauthier y demostró que la lesión del tejido tiroides de las ratas producido por el cauterio al realizar la paratiroidectomía, era un mejor estímulo para la hipocalcemia, que la excisión quirúrgica. Concluyó así, que la fuente del principio hipocalcemiante era la tiroides y no la paratoroides como había señalado Copp. Para comprobar su hipótesis inyectó extracto tiroideo a las ratas y produjo una hipocalcemia en el suero de 2.3 mg/100 ml una hora después de la inyección del extracto.

Así se confirmó la existencia de una sustancia hipocalcemiante que Hirsch denominó tirocalcitonina, que es la misma calcitonina que Copp había señalado dos años antes.

Una vez aceptada la existencia de la tirocalcitonina el mismo Hirsch (4) demostró que se trataba de una hormona diferente a las ya conocidas de la tiroides: la tiroxina (T<sub>4</sub>) y la triyodotironina (T<sub>3</sub>) que no produjeron hipocalcemia cuando se inyectaron a las ratas.

Después de los experimentos de Hirsch, otros autores (5, 6, 7, 8, 9) demostraron la existencia de esta hormona en el salmón, el pollo, el cobayo, el conejo, el borrego, la vaca, el mono y el gato.

Hirsch (8) fue también el primer en informar la presencia de la calcitonina en el hombre y que más tarde fue confirmada por Millhaud (10) y Aliapoulios (11) al inyectar

extractos tiroideos humanos y producir hipocalcemia en los animales de experimentación.

El papel determinante de la calcitonina en la patología humana (11) se encontró en un caso de pseudohipoparatiroidismo, en el que los niveles de hormona paratiroidea eran normales, mientras que los de la calcitonina eran 100 veces mayores que la de los normales.

Origen de la Calcitonina:

La estructura histológica de la tiroides que da origen a la calcitonina fue primero señalada por Foster (12), quien en 1964 lo adscribió a las células claras o inter o parafolliculares de la tiroides y que más tarde Pearce (13) denominó "células C".

Estudios posteriores del mismo Pearce y Cavalheira (14) demostraron con técnicas histoquímicas que las células C de la tiroides procedían embriológicamente de la última bolsa branquial, la que en los vertebrados inferiores forma una glándula individualizada que recibe el nombre de último cuerpo branquial.

La demostración de Copp en 1967 (15) de que este órgano en el pollo es muy rico en calcitonina llevó a la conclusión de que esta hormona procede esencialmente de dicha glándula y que su presencia en la tiroides de los mamíferos, es la resultante de la emigración de las células C y su incorporación al tejido tiroideo durante el período embrionario.

Los trabajos recientes de Galante (16) sugirieron que las células C están ampliamente distribuídas, ya que él ha demostrado la presencia de calcitonina en la tiroides, la paratiroides y el timo del hombre.

Los estudios ultraestructurales de la tiroides de los mamíferos (17) revelaron que las células "C" o parafoliculares contienen gránulos de secreción en el citoplasma, que son muy sensibles a los cambios de calcio en la sangre.

Estas mismas observaciones han sido repetidas en la tiroides del hombre (18), aunque los gránulos no son tan numerosos ni tan bien delimitados como en la glándula de los otros mamíferos.

Aliapoulios y Morain (19) utilizando el bioensayo encontraron que la calcitonina se localizaba en las porciones laterales de las tiroides humanas. Muy recientemente Mc-Millan (20) ha precisado con técnicas inmunohistoquímicas que la distribución de las células C es mayor en la región central de cada lóbulo de la tiroides.

Función de la calcitonina:

Las observaciones de Munson (21) en ratas íntegras y paratiroidectomizadas llevaron a la conclusión de que el efecto de la calcitonina era antagónico al de la hormona paratiroidea, concepto que más tarde fue confirmado por Milhaud y Moukhtar (22).

Por el mismo tiempo Kenny (23) informó el efecto hipofosfatemico e hipomagnasémico de la calcitonina humana en las ratas.

Ya que evidentemente la calcitonina juega un papel - importante en la regulación de los minerales del plasma, especialmente el calcio, el interés por saber su sitio de acción se enfocó a dilucidar como actuaba a nivel del - hueso. Friedman (25) y Aliapoulios (26) demostraron que su función era la de inhibir la reabsorción del hueso. - Mayer (27) lo comprobó en vacas y más tarde Lewis (28) confirmó la acción protectora de la hormona a la excesiva reabsorción del hueso provocada por la hiperactividad de las paratiroides durante el embarazo y la lactancia de las vacas, mientras que Cushard (29) lo confirmó en los humanos.

Staehein (30) enumeró los trabajos que señalan que - la calcitonina tiene una acción sobre la excreción renal de los electrolitos y la producción de ácido clorhídrico del jugo gástrico.

Bijvoet (31) presentó evidencias de que la hormona es antidiurética y aumenta la excreción del calcio y de la - hidroxiprolina; sus resultados se confirmaron parcialmente con los hallazgos de Haas (32), que además encontró un aumento en la depuración de fosfatos, potasio y magnesio.

Numerosos estudios posteriores a los ya señalados han confirmado plenamente la acción de la calcitonina a nivel del túbulo renal.

Otro punto de acción de la hormona es el intestino, - en donde inhibe la absorción del calcio. Olson (33) lo demostró por primera vez y otros lo han confirmado plenamente.

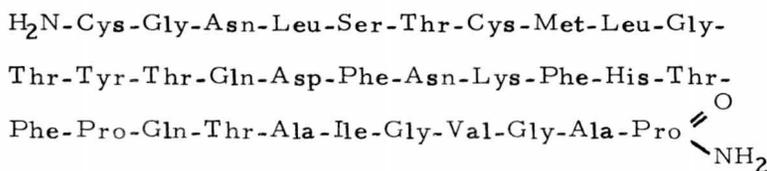
Todos los datos anteriores dejan establecido que la calcitonina actúa sobre el hueso, el intestino delgado y el riñón para regular el metabolismo del calcio y otros electrolitos en mamíferos. Su posible acción a nivel del hígado, bazo y músculo esquelético (34) son motivo de numerosos estudios en la actualidad.

Propiedades químicas de la calcitonina:

Es una proteína lineal constituida por 32 aminoácidos (35, 36, 37) que tiene un puente disulfuro entre los aminoácidos 1-7; su grupo carboxilo terminal corresponde a la prolinamida, el cual parece ser esencial para conservar su actividad biológica. Cualquiera que sea su origen, tiene los mismos aminoácidos en la posición 1 a 9, 28 y 32. Según Haymovits (24) tiene un peso molecular de - 5000 a 8000, estimado por velocidad de sedimentación, - mientras que Riniker (35) le asignó un PM de 3419 determinado por análisis de aminoácidos. Por su comportamiento electroforético se le considera una proteína básica.

Es estable en medio ácido por debajo de pH 4.6, se precipita a pH 7.2 perdiendo actividad por arriba de este pH (38). Baghdiantz estableció estas características para la calcitonina porcina, que después se han aplicado al estudio de las otras calcitoninas. Es relativamente estable al calor y es inactivada por los ácidos y álcalis cuando se les somete a su acción por largo tiempo. La pepsina y la tripsina la desnaturalizan. Es soluble en agua y solución de acetona; insoluble en álcalis, benceno, cloroformo y éter (39).

La estructura de la calcitonina humana es la siguiente (36):



Sus características estructurales y químicas de proteínas ácida permiten extraerla en medios ácidos sin que pierda su actividad.

Importancia Clínica de la Calcitonina:

La extracción, identificación y más recientemente la síntesis por Rivaille (40) y Sieber (41), de la calcitonina han hecho posible su utilización en los procedimientos diagnósticos de las enfermedades con metabolismo alterado del calcio. El bioensayo, la inmunodifusión y el inmuno-

munoensayo son ahora procedimientos que utilizan la calcitonina y sus correspondientes anticuerpos para el estudio de la fisiología y la patología humanas.

Las determinaciones de calcitonina ya sea en sangre, orina y tejidos permite el diagnóstico temprano y diferencial de algunos padecimientos como son: el adenoma y el carcinoma medular de tiroides, el cáncer trabecular de la misma glándula, las diferentes variedades de osteoporosis, la enfermedad de Paget y todos los padecimientos que cursan con hipercalcemia, como la etapa generalizada de los cánceres (42).

En los últimos tiempos otros padecimientos tales como: la enfermedad periodontal (que según la Organización mundial de la Salud está muy generalizada en todo el - - Mundo), los carcinoides del aparato digestivo y los feocromocitomas (42) (por su frecuente asociación a carcinomas medulares del tiroides) comienzan a caer en el área de estudio de la calcitonina, lo que señala la importancia de conocer el campo opuesto a la muy estudiada acción de la hormona paratiroidea, que durante muchos años dominó el campo de las investigaciones del metabolismo del calcio.

Ahora se sabe que el adenoma y el carcinoma medular y trabecular del tiroides, los carcinoides de aparato digestivo y los feocromocitomas cursan con elevadas concentraciones de calcitonina, mientras que la enfermedad perio--

dontal, las osteoporosis, la enfermedad de Paget y las - - hipercalcemias malignas tienen bajas concentraciones - - - plasmáticas de la hormona (42).

La aplicación terapéutica de la calcitonina depende - - de su modo de acción, que es la de inhibir la reabsorción del hueso. A su primera aplicación en 1967 (43) en los casos de osteoporosis con calcitonina porcina, siguió su uso en la enfermedad de Paget y en la enfermedad periodontal con excelentes resultados. Ya Milhaud y Job en 1966 (44) aplicaron por primera vez la calcitonina humana a un caso de hipercalcemia idiopática que mejoró dramáticamente.

La experiencia obtenida hasta el presente permiten concluir que la calcitonina porcina o del salmón (las más frecuentemente utilizadas) o cualquiera otra que demuestre - tener acción biológica en el organismo humano son un recurso muy valioso para el tratamiento de los padecimientos que cursan con reabsorción exagerada del hueso.

La calcitonina ideal para la terapeutica humana es desde luego la misma humana, que lamentablemente se encuentra en muy bajas concentraciones en las tiroides humanas (10, 11), lo que justifica el empleo de la hormona de origen animal.

Es evidente (de todos los datos antes enumerados) la - importancia que la calcitonina ha ganado en el campo de la Endocrinología y la Medicina en general y a nadie escapa -

el entendimiento de las ventajas de contar con esta hormona pura.

Aunque en el mercado existen calcitoninas de origen animal que pueden ser aplicadas a los procedimientos diagnósticos, ellas tienen la desventaja de ser poco específicas. Así, la tarea de obtener calcitonina humana, aunque laboriosa, permite obtener a través de ella un antígeno específico que conduzca a la elaboración de un suero homólogo, que elimine los errores que se cometen cuando se trabaja con sistemas heterólogos (45,46).

El propósito de este trabajo es extraer y purificar calcitonina de tiroides humanas con la que puedan montarse técnicas inmunológicas que faciliten el diagnóstico de las enfermedades que cursan con un metabolismo del calcio alterado.

La revisión bibliográfica del tema permitió saber que todas las técnicas utilizadas para extraer y purificar calcitonina humana (10, 11, 24, 35, 47, 48) se basan en las aplicadas a las de origen animal (8, 38, 49, 50) las que a su vez derivaron a la extracción y purificación de la hormona paratiroidea (51).

Todas ellas tienen en común la de mantenerse en un pH ácido a través de todos los pasos del procedimiento, con lo que se conserva la solubilidad de la proteína y se facilita su extracción.

En el laboratorio donde se desarrolló este trabajo se utiliza una técnica de extracción ácida (52) para las hormonas hipofisarias, que ha dado buenos rendimientos para las glicoproteínas hipofisarias.

Tomando en cuenta que se tenían todos los recursos en el laboratorio para extraer una proteína de tejidos, - el buen resultado con las hormonas hipofisarias y el que la técnica de extracción era ácida, se decidió utilizarla - para la calcitonina de la tiroides humana, al mismo tiempo que se intentó utilizar la técnica de Riniker (35) que ya Arnaud (53) había demostrado daba los mejores rendimientos para calcitonina porcina. Con el objeto de - poder contar con preparaciones de calcitonina humana con mayor pureza que las existentes para usos clínicos y diagnóstico y en una mayor cantidad de la que puede disponerse en la actualidad.

Como para toda proteína que se extrae de un tejido, - fue necesario resolver los problemas de:

- Recolección de las tiroides
- Conservación del material biológico
- Extracción de la proteína
- Purificación de la hormona
- Identificación de la hormona
- Cuantificación de la actividad de la hormona

La metodología para resolver estos problemas y los resultados se presentan a continuación.

## MATERIAL

## 1. - Material biológico:

Ratas de Cepas Sprague-Dowley y Long-Evans  
Tejido de tiroides de material quirúrgico  
Tiroides de cadáveres  
Sangre humana

## 2. - Equipo:

Agitador mecánico (American Optical Mod. 021 56)  
Agujas de acero inoxidable 21 x 1½ (Hipodermex)  
Agujas de acero inoxidable 27 x 1½ (Hipodermex)  
Cámaras de ultrafiltración con agitador (cap. 200 y 400 ml)  
Cámara electroforética (Buchler)  
Centrífuga (International Refrigerated Mod. PR-6)  
Centrífuga (Sorvall Mod. RC2-B)  
Colector de fracciones con Uvicod y Registrador (LKB Bromma, Tipo 65209).  
Columna de cromatografía (Pharmacia)  
Espectrofotómetro de Absorción atómica (Unicam)  
Espectrofotómetro de doble haz (Hitachi Coleman 124)  
Filtro (Millipore)  
Fuente de poder (Gelman)  
Jeringas desechables de 5 ml (Plastipak)  
Lámpara de gas neón.

Licuadaora (Waring, Mod. 5011)

Liofilizador (Virtis, Mod. 10-140 BA).

Membrana (Millipore 0.22  $\mu$  142 mm).

Membrana de ultrafiltración XM-50, PM-10, UM-2 (Amicon, diámetro 62 x 76 mm).

Molino de carne

Potenciómetro (Coleman, Mod. 38)

Prefiltro (Millipore AP 2012450).

Tubo para diálisis (No. 36 Curtfn Scientific No. de Cat. 077-03).

Tubos siliconizados (Pyrex 10 cm x 6 mm y 10 cm x 9 mm).

### 3.- Preparación de reactivos y sistemas:

#### Determinación de proteínas.

Solución tipo de albúmina de suero humano normal (Cutter) 100  $\mu$ g/ml, del frasco original que tiene - una concentración de 0.25 g/ml se tomó con micro pipeta 100  $\mu$ l y se aforó a 250 ml, con solución salina fisiológica. Se conservó a 4°C.

Dodecil sulfato de sodio (Mallinckrodt).

Ficoll (Pharmacia).

Acido ribonucleico 85% de pureza (RNA de levadura) (Sigma).

#### Solución A

2 g Tartrato de sodio y potasio (Mallinckrodt).

100 g Carbonato de sodio anhidro (Baker)

Se disuelven en 500 ml de hidróxido de sodio (Merck) IN y se afora a 1 litro.

#### Solución B

2 g Tartrato de sodio y potasio (Mallinckrodt)

1 g Sulfato Cúprico penta-hidratado (Mallinckrodt)

Se disuelven en 90 ml de agua y se agregan 10 ml de Hidróxido de sodio IN.

Se guarda en frasco ámbar.

#### Solución C

1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteau-Fenol (Tungstato de Na  $2H_2O$ , Molibdato de sodio  $2 H_2O$ , - - Acido ortofosfórico, HCl) (Merck).

15 ml de agua

Esta solución se prepara en el momento de usarla.

#### Electroforesis Discontinua

##### Solución A (pH 8.9)

Acido clorhídrico (Merck) 0.1N 48 ml

Tris (Tris-hidroximetil-amino-metano) (Merck)  
36.6 g

TEMED (N, N, N', N', tetrametiletilendiamina)  
(Merck) 0.23 ml.

Disolver el tris, con el ácido clorhídrico, agregar el TEMED, ajustar pH con HCl y aforar con agua.

## Solución B (pH 6.7)

Acido Clorhídrico (Merck)	48.0 ml
Tris-hidroximetilaminometano (TRIS)	5.98 g
TEMED	0.46 ml
Agua c. b. p.	100.0 ml

## Solución C

Acrilamida (Merck)	28.0 g
Bisacrilamida (Merck)	0.735 g
Agua c. b. p.	100.0 ml

## Solución D

Acrilamida	10.0 g
Bis acrilamida	2.5 g
Agua c. b. p.	100.0 ml

## Solución E

Rivoflavina (Merck)	4.0 mg
Agua	100.0 ml

## Solución F

Sacarosa (Merck)	40 g
Agua	100 ml

## Solución de trabajo I (poro grande)

1 volumen de solución B
2 volúmenes de solución D
1 volumen de solución E
4 volúmenes de solución F

## Solución de trabajo II

Persulfato de amonio (Mallinckrodt) 140 mg

Agua c.b.p. 100 ml

La solución es estable a 4° C durante una semana.

## Solución de trabajo III (poro pequeño)

1 volumen de solución A

2 volúmenes de solución C

1 volumen de agua

4 volúmenes de solución de trabajo II

Se prepara momentos antes de emplearse y se mantiene en agitación con agitador magnético.

## Solución Amortiguadora electrodo pH 8.3 (concentrada)

TRIS 6.0 g

Glicina (Merck) 28.8 g

Agua c. b. p. 100.0 ml

el pH se ajusta con HCl 0.1N y se afora.

## Solución fijadora

Acido tricloroacético (Merck) 12.5%

## Solución colorante

Azul-brillante de Coomasie R-250 (Schuchart Muchen) 1 g.

Agua c. b. p. 100 ml

Para disolver se agita durante 30 minutos en el agitador magnético, se diluye la solución 1:20 con ácido tricloroacético al 12.5% y se filtra con papel Whatman No. 42. Se prepara solo la can-

tividad necesaria (20 ml por gel)

Solución de azul de Bromofenol

Azul de bromofenol (Merck)	1 mg
Agua c. b. p.	100 ml

Solución decolorante

Acido acético	5 ml
Agua c. b. p.	100 ml

Determinación de Calcio:

Solución tipo de calcio 100 mg/1

Pesar 0.2497 g de carbonato de calcio (Merck) seco, disolver en la mínima cantidad de ácido clorhídrico; aforar a un litro.

Solución de EDTA-Na<sub>4</sub> (ácido etilendiamino tetraacético, sal de tetra sodio)(Sigma) 3.75%.

Solución de EDTA-Na<sub>4</sub> 0.78%

Solución de ácido sulfúrico (Merck) 1/12 N.

Solución de Tungstato de sodio (Sigma) 10%

Solución de cloruro de sodio (Merck) 600 mg/50 ml

Solución de cloruro de potasio (Merck) 18 mg/50 ml

Solución de cloruro de magnesio (Merck) 2.5 mg/50 ml

Solución de EDTA-Na<sub>4</sub> 1 mM

Bioensayo:

Solución salina fisiológica (Travenol)

Eter anhidro (Productos Químicos Gadir)

Xilol (Sigma)

Conservación de material:

Acetona q. p. (Harleco)

Bióxido de carbono, CO<sub>2</sub> (hielo seco)

Polvos de acetona:

Acetona q. p. (Harleco)

Eter anhidro (Productos Químicos Gadir)

Extracción:

Solución de KCl (Merck) 0.3 M-tioetanol (Eastman Organic Chemical) 0.01%

Solución de n-butanol (Baker)-ácido acético (Baker) - agua (12:3:5).

Purificación:

Acido silícico (Merck)

Filtración en gel:

Sephadex G-100 (super fino), G-75 (super fino), G-50 (medio) Sigma.

Hidratado con exceso de eluyente; se pone a baño maría cuatro horas, se enfría a temperatura ambiente y luego a 4<sup>o</sup> C.

Volumen de elución:

Solución de azul dextrán (Merck) 0.1%

Volumen interno:

Solución de hidroxicoalamina 300 µg/1 ml

Ultrafiltración:

Gas nitrógeno (Industrias Franco).

Agua deionizada pH 5.2

Cromatografía de intercambio iónico:

Carboxi-metil-celulosa (CM-C) (Sigma).

Dietil-amino-etil-celulosa (DEAE-C) (Sigma)

Solución de ácido clorhídrico (Merck) 1.0 M.

Solución de hidróxido de sodio (Merck) 1.0 M y 0.1 M.

Solución de bicarbonato de amonio (Mallinckrodt) 0.002 M, 0.01 M y 1.0 M.

Solución de acetato de amonio (Mallinckrodt)

0.01 M, pH 5.5., amortiguador (1) y 0.1 M pH 6.2, amortiguador (2) de estas soluciones se prepararon las siguientes:

Mescla No.	Amortiguador 1	Amortiguador 2	pH
1	250 ml	25 ml	5.50
2	225 ml	25 ml	5.60
3	200 ml	50 ml	5.60
4	175 ml	75 ml	5.65
5	150 ml	100 ml	5.70
6	125 ml	125 ml	5.75
7	100 ml	150 ml	5.80
8	75 ml	175 ml	5.85
9	50 ml	200 ml	6.00
10	25 ml	225 ml	6.15
11	-----	250 ml	6.20

## M E T O D O S

- I. - Técnica para determinar la concentración de de proteína.
- II. - Electroforesis discontinua
- III. - Determinación de la concentración de calcio
- IV. - Bioensayo  
Técnicas de extracción y purificación de proteínas
- V. - Recolección de tiroides
- VI. - Conservación del material
- VII. - Elaboración del polvo de acetona
- VIII. - Extracción de proteínas y esterilización
- IX. - Filtración en gel
- X. - Ultrafiltración
- XI. - Cromatografía de intercambio iónico —

### I.- Técnica para determinar la concentración de proteína

La determinación se realizó con la técnica de Hartree (54), que se basa en la producción de un complejo colorido que forman los grupos amino de las proteínas con iones cobre presentes, en medio alcalino, cuyo color se intensifica con la presencia del reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol.

#### Técnica:

A un ml de la solución de la muestra, se agregaron 0.9 ml de la solución A, se agitaron e incubaron en baño María a  $51^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos, después de lo cual se enfriaron a  $4^{\circ}\text{C}$  también durante 10 minutos; 0.1 ml de la solución B se añadieron con agitación, después de lo cual quedó en reposo a temperatura ambiente otros 10 minutos; 3 ml de la solución C recién preparada, se agregaron finalmente y se repitieron los pasos de agitación, incubación y enfriamiento; el producto colorido se leyó a 500 nm contra blanco de reactivos.

La concentración de proteínas se obtuvo de soluciones de polvo a concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de solución salina o con volúmenes 0.5 y 1 ml cuando la muestra era líquida.

El estudio de la técnica comprendió el espectro de absorción del producto colorido y su estandarización (precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad).

Aunque no se llevó control de calidad con ningún estándar, esta omisión se compensó con la curva tipo determinada en cada experimento.

**Espectro de absorción.**- Se hizo con la reacción colorida de un estándar de 50  $\mu\text{g}$  de albúmina humana y un blanco de reactivos leídos contra agua.

**Precisión.**- Se determinó por la reproducibilidad en diez muestras, con concentraciones de 80, 40 y 10  $\mu\text{g}$  de albúmina humana.

**Exactitud.**- Obtenida por la recuperación de proteína, agregada en concentraciones progresivamente crecientes, a una solución de proteína de concentración conocida.

**Sensibilidad.**- Determinada por la curva tipo, descrita en la siguiente tabla.

Tubo No.	Proteína $\mu\text{g}$	Albúmina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Agua ml	Solución A ml	Solución B ml	Solución C ml
1	5	0.05	0.95	0.9	0.1	3
2	10	0.1	0.90	0.9	0.1	3
3	20	0.2	0.80	0.9	0.1	3
4	30	0.3	0.70	0.9	0.1	3
5	40	0.4	0.60	0.9	0.1	3
6	50	0.5	0.50	0.9	0.1	3
7	60	0.6	0.40	0.9	0.1	3
8	70	0.7	0.30	0.9	0.1	3

Tubo No.	Proteína	Albúmina	Agua	Solución A	Solución B	Solución C
9	80	0.8	0.20	0.9	0.1	3
10	90	0.9	0.10	0.9	0.1	3
11	100	1.0	----	0.9	0.1	3
12		---	1.0	0.9	0.1	3

Soluciones A, B, C, fueron ya descritas en el capítulo de Material, Sección 3.

Especificidad.- Se estudiaron las interferencias que producen el ficoll como representante de carbohidratos, el dodecil sulfato de sodio, de grasas y el ácido ribonucleico, de los ácidos nucleicos; haciendo una solución mezcla de estas sustancias más albúmina humana en concentraciones de todas ellas de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , en solución salina fisiológica (solución A), que se agregó a una solución de albúmina humana 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (solución B), en la forma siguiente:

Tubo No.	Solución A ml	Solución B ml	Concentración teórica final de proteína $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	0.0	1.0	100
2	0.1	0.9	100
3	0.2	0.8	100
4	0.3	0.7	100
5	0.4	0.6	100
6	0.5	0.5	100

Tubo No.	Solución A	Solución B	Concentración teórica final de Proteína
7	0.6	0.4	100
8	0.7	0.3	100
9	0.8	0.2	100
10	0.9	0.1	100

## II.- Electroforesis discontinua

Es un método (55) de purificación e identificación de moléculas (proteínas), que se basa en la propiedad que presentan las proteínas de emigrar en un campo eléctrico a diferentes velocidades, en un soporte sólido con porosidad selectiva como es el gel de poliacrilamida. La posición de la proteína sobre el gel puede detectarse en forma de discos coloreados por tinciones específicas para proteínas.

El equipo necesario para la realización de la técnica consta de:

Una cámara electroforética que está formada por dos recipientes cilíndricos, uno inferior de doble pared para circulación continua de agua, que lo mantiene a temperatura constante; un recipiente superior con 12 perforaciones, en las cuales se colocan los geles, y el vástago que en su extremo superior tiene el cátodo y el inferior el ánodo. Los dos recipientes contienen la solución amortiguadora electrodo en donde los electrodos quedan sumergidos.

Una fuente de poder con capacidad de 300 volts y de -  
1-125 mA .

Una gradilla para tubos con nivel, y una lámpara fluorescente (de gas neón) que se utiliza para fotopolimerizar.

#### Preparación de los Geles:

- 1.- Sellar con parafilm los tubos de 10 cm x 6 mm .
- 2.- Agregar 0.1 ml de solución de poro grande a los tubos.
- 3.- Poner la muestra de 100-200  $\mu$ g de proteínas en polvo.
- 4.- Borrar el menisco con agua, con ayuda de una micropipeta.
- 5.- Fotopolimerizar 20 minutos.
- 6.- Eliminar el agua de cada uno de los tubos.
- 7.- Lavar con solución de poro grande y escurrir.
- 8.- Agregar solución de poro grande 0.2 ml .
- 9.- Fotopolimerizar 20 minutos.
- 10.- Escurrir el agua y lavar con solución de poro pequeño.
- 11.- Llenar el tubo con solución de poro pequeño.
- 12.- Borrar el menisco.
- 13.- Polimerizar 45 minutos.
- 14.- Los geles se guardaron en el cuarto frío (4° C) para continuar al siguiente día.

#### Electroforesis:

- 15.- Colocar los geles en la cámara, con la muestra hacia arriba.

- 16.- Poner una o dos gotas de amortiguador electrodo en el extremo inferior de los tubos de los geles, con el fin de que no haya burbujas que se opongan al paso de la corriente.
- 17.- Repartir la solución amortiguador electrodo en los compartimientos de la cámara electroforética.
- 18.- Poner 2 ml de solución de azul de bromofenol - al 0.001% en el compartimiento superior.
- 19.- Colocar la tapa de la cámara y conectar en los - electrodos correspondientes, nivelar y conectar a la fuente de poder; se aplica un voltaje inicial de 2mA por tubo de gel durante 2 minutos, y después se aumenta a 5 mA por tubo.
- 20.- Detener el paso de la corriente cuando el disco - de bromofenol (frente de referencia), llegue a una distancia de 1 cm del extremo inferior del gel.

#### Fijación de protefnas:

- 21.- Poner los geles en ácido tricloroacético al 12.5%. 30 minutos con agitación mecánica.

#### Tinción:

- 22.- Poner los geles en 20 ml de colorante azul de - Coomasie, 1 hora 15 minutos.

#### Decoloración:

- 23.- Pasar los geles por agua y colocarlos por separado en 20 ml de ácido tricloroacético al 10%. 24 horas.

#### Montaje de Geles:

- 24.- Pasar los geles momentáneamente en formol al 2% y montar en tubos de vidrio de 10 cm x 9 mm .
- 25.- Sellar los extremos del tubo con parafilm, cuidando que no queden burbujas de aire, y conservar los geles en la obscuridad.

### III.- Determinación de la concentración de Calcio.

La determinación de calcio (56) por absorción atómica se basa en la propiedad que presentan los compuestos de calcio de absorber luz de longitud de onda característica producida por una lámpara de cátodo hueco, cuando se encuentran disociados en átomos de calcio libre por el efecto de una flama.

La medición se lleva a cabo con un espectrofotómetro de absorción atómica Unicam Sp 90, que consta de:

Una lámpara de cátodo hueco que es del metal que va a analizarse y es diferente para el análisis de cada metal y que produce luz de una longitud de onda específica.

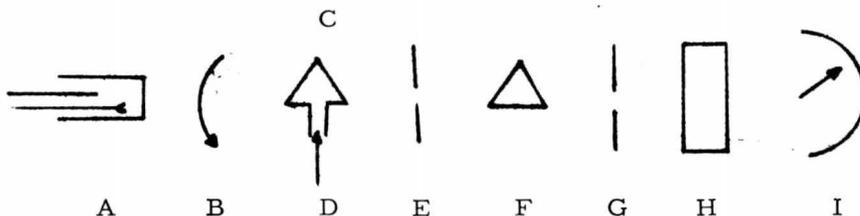
Un quemador de premezcla que tiene por función mezclar los gases de combustión (aire y acetileno) con la muestra antes de ser quemados.

Un sistema de atomización por medio del cual la muestra es introducida al quemador, que tiene por función romper la solución en finas gotitas para provocar el estado de disociación de los átomos.

Una hendidura de entrada que reduce al mínimo la dispersión de la luz, la que al atravesar el monocromador a su vez proporciona un rango de luz espectral pura.

Un fotomultiplicador que convierte la energía luminosa a eléctrica y amplifica ésta para mover un dispositivo de lectura o un registrador.

Es esquema siguiente muestra las partes fundamentales del aparato.



(A) Cátodo hueco, (B) Hendidura, (C) Llama, (D) Atomizador, (E) Hendidura de entrada, (F) Monocromador, (G) Hendidura de salida, (H) Fototubo, (I) Detector.

Las condiciones del aparato para la realización de la medición son:

Longitud de onda	422.7 $\mu$
Rendija	0.008 mm
Filtro	2
Corriente de la lámpara	12 mA
Mechero	10 cm acetileno
Altura del mechero	1.0 cm
Gas	Acetileno con presión de 0.7 Kg/cm <sup>2</sup> y flujo 1500 cc/min
Aire	2.1 Kg/cm <sup>2</sup> y flujo de 5 l/min

Experimentalmente se determinó el rango de longitud de onda en que hubo absorción.

## Preparación de la curva tipo:

Matraz de 100 ml No	Sol Ca 100 mg/1 ml	EDTA-Na 3.75% ml	Aforar con H <sub>2</sub> O deionizada 100 ml	Ca mg%	Ca mEq/l
1	1	20	"	2.5	1.25
2	2	20	"	5.0	2.50
3	3	20	"	7.5	3.75
4	4	20	"	10.0	5.00
5	5	20	"	12.5	6.23
6	6	20	"	15.0	7.50
* 7	-	20	"	----	----

\* Blanco de reactivos.

## Preparación de los problemas:

Se prepararon con 0.4 ml de suero más 9.6 ml de solución de EDTA-Na<sub>4</sub> al 0.75% y agitación.

El aparato se ajustó con el blanco de reactivos al cero de D.O. (Densidad optica), para leer los estándares y la muestra problema entre 420 y 424 nm .

## Estandarización de la técnica:

El estudio comprendió los siguientes experimentos:

**Espectro de Absorción:** Con una muestra de suero preparada para calcio, se leyó (D.O.) a diferentes longitudes de onda, desde 300 - 500 nm .

**Precisión del aparato:** Se obtuvo con las lecturas repetidas diez veces cada 3 minutos de cada uno de los puntos de la curva tipo.

**Selección del producto biológico:** Se estudió la concentración de calcio en 0.4 ml de cinco muestras de suero, plasma y desproteinizado de sangre humana. El plasma se obtuvo de sangre tomada con heparina (anticoagulante) y el desproteinizado con la técnica de Folin-Wu: Por cada ml de sangre se adicionaron 8 ml de ácido sulfúrico 1/12 N; enseguida se agitaron y se agregó 1 ml de tungstato de sodio al 10%, y finalmente se agitó y filtró.

**Determinación del volumen del suero:** Con la concentración de calcio por triplicado en volúmenes de 0.4, 0.2 y 0.1 ml.

**Efecto del tiempo:** Las concentraciones de la curva tipo se leyeron al tiempo 0 y a las 24 horas.

**Curva tipo:** Se hicieron tres curvas que comprendieron concentraciones desde 0.0 a 15 mg/100 ml.

**Precisión de la técnica:** Determinada por la reproducibilidad de la concentración del calcio en diez muestras del mismo suero.

**Exactitud de la técnica:** Se obtuvo por la recuperación del calcio añadido a un suero previamente dializado con EDTA- $\text{Na}_4$  1 mM (para eliminar calcio) y con adición de solución stock de calcio 100 mg/l, en las proporciones siguientes:

Muestra No.	Suero dializado (ml)	Ca mg/ml	Solución de Ca ml	Calcio agregado 100 mg/1 Ca (mg)	Valor teórico Ca mg/6 ml
1	6	0.016	0	0.00	0.096
2	5	0.080	1	0.10	0.18
3	4	0.064	2	0.20	0.26
4	3	0.048	3	0.30	0.35
5	2	0.032	4	0.40	0.43
6	1	0.016	5	0.50	0.52
7	0	0.00	6	0.60	0.60

**Sensibilidad de la técnica:** Experimentalmente corresponde a la curva tipo: 25, 5, 7.5, 10 12.5 y 15 mg % de calcio.

**Especificidad de la técnica:** Se hizo con el mismo suero - dializado ya descrito, al que se agregaron concentraciones de diferentes electrolitos como se indica a continuación:

Tubo No.	Suero dializado ml	Na Cl 12 mg/ml ml	K Cl 0.31 mg/ml ml	Mg Cl <sub>2</sub> 0.05 mg/ml ml
1	1			
2	1	1		
3	1		1	
4	1			1
5	1	1	1	1

#### IV - Bioensayo:

Este método se realizó en base a las técnicas ya informadas en la literatura por Hirsch (8), Kumar (57), Schlue-ter (58), Cooper (59) y de acuerdo a las condiciones del - laboratorio.

El método se base en la hipocalcemia que la hormona - (Calcitonina) produce una hora después de su administración por vía intravenosa en ratas machos y/o hembras de las - cepas Sprague-Dawley y Long-Evans.

Se utilizaron ratas de 100-150 g , en ayuno durante 18-20 horas, pero con administración de agua corriente ad-li-bitum. La sustancia problema se administró en la vena - caudal con aguja de número 27 x 1/2 pulgadas, en 0.5 ml - de solución salina fisiológica (control 0.5 ml de solución - salina únicamente), después de haber producido vasodilata-ción y aclaramiento en la cola de la rata por medio de la aplicación de xilol.

Una hora después de la inyección se anestesiaron lige-ramente con éter, se abrió la cavidad abdominal y se san-graron de la arteria aorta con aguja del número 21 x 1/2 pulgadas. El objetivo de la anestesia era mantenerlas vivas para que la presión sanguínea proporcionara el máximo vo-lumen de sangre.

La sangre coagulada se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos; el calcio se determinó en el suero así obtenido.

Tanto para el control como para los problemas se utilizan grupos de cinco animales.

Estandarización del bioensayo:

Estudio de la alimentación basal: Las ratas se sometieron a diferentes condiciones para estudiar el efecto de la alimentación basal sobre los niveles de calcio en el suero.

- 1.- Ratas alimentadas con dieta normal (Purina) antes de la prueba.
- 2.- En ayuno 18-20 horas con administración de agua corriente.
- 3.- En ayuno 18-20 horas con administración de solución glucosada al 6%.
- 4.- Ayuno total durante 18-20 horas.
- 5.- Ayuno 18-20 horas con administración de agua deionizada libre de calcio.

Selección del sexo: Se hicieron determinaciones de los niveles de calcio en suero de hembras y machos sometidos a las dietas ya señaladas.

Selección de la dosis: De datos tomados en la literatura, que oscilaron de 5-100  $\mu\text{g}$  de proteína, se seleccionaron las dosis de 17, 34 y 68  $\mu\text{g}$  de proteína; cuando se encontró el primer polvo con actividad biológica que fue el de la clave 4Q-S-I, se probaron las dosis de 5, 7, 10, 14, 21, 28 y 40  $\mu\text{g}$  de proteína, de las cuales se seleccionaron las dosis para posteriores bioensayos.

## TECNICAS DE EXTRACCION Y PURIFICACION

V.- Recolección de material biológico:

Se recolectaron nueve lotes de material biológico (tiroides) para la realización de los experimentos.

Los lotes 1, 2, 5, 6, 8 y 9 (1C, 2C, 5C, 6C, 8C, 9C), se obtuvieron de cadáveres del Hospital General del Centro Médico Nacional, cinco horas después de la muerte, durante la autopsia de pacientes que fallecieron de diferentes padecimientos.

El material de los lotes 4 y 7 (4Q y 7Q) se obtuvo de tiroides extirpadas quirúrgicamente en el Hospital de Oncología y Hospital General del Centro Médico Nacional, inmediatamente después de la intervención. Este material estuvo constituido por adenomas y carcinomas.

El material del lote 3 (3C) se obtuvo de tiroides de cadáveres del Servicio Médico Forense, unas 8 horas después de la defunción, durante la autopsia. El tejido obtenido fue de personas aparentemente sanas, que murieron por accidente o agresión.

Todo el material recolectado fue de adultos de ambos sexos.

VI.- Conservación de material biológico:

El material recolectado y mantenido a 4° C durante las

primeras 12 horas, se lavó con solución fisiológica, se limpió eliminando las glándulas paratiroides, la mayor parte de tejido adiposo y tejido conectivo superficial; en seguida se cortó en pequeños trozos.

La conservación se hizo:

- a).- En acetona a  $4^{\circ}\text{C}$ , lo que tuvo por objeto la eliminación de lípidos del tejido para la fácil elaboración del polvo de acetona (PA). El procedimiento se aplicó a los lotes 1C, 5C, 6C, 8C.
- b).- En congelación que evitó la desnaturalización de las proteínas hasta la elaboración del polvo de acetona. El tejido recolectado se congeló rápidamente con hielo seco guardándose posteriormente en un congelador a  $-30^{\circ}\text{C}$ ; por este procedimiento se conservaron los lotes 2C, 3C, 4Q, 7Q y 9C.

#### VII.- Elaboración del polvo de acetona:

Tiene por objeto eliminar la mayor parte de lípidos presentes en el tejido por medio de solventes orgánicos (acetona y éter).

El tejido conservado en acetona o en congelación, se pesó y molió en una licuadora con 50 ml de acetona previa-

mente enfriada con hielo seco por gramo de tejido, durante 1 minuto a alta velocidad. En un vaso de precipitados se agitó con agitador magnético durante 10 minutos y centrifugó a 1000 g durante 15 minutos. La operación se repitió tres veces más sobre el residuo, y la deslipidización final se hizo con éter frío (100 ml/g de tejido).

El tejido deslipidizado se extendió sobre papel filtro para permitir la evaporación de los solventes residuales a temperatura ambiente durante 20 horas y se guardó en un desecador hasta peso constante.

Todos los lotes se trataron con este procedimiento a excepción del lote 4Q, que se congeló y molió en un molino de carne y los lotes 1C y 2C que no se centrifugaron, sino que se filtraron al vacío para eliminar los solventes.

#### VIII.- Extracción de proteínas y esterilización:

De los nueve lotes reducidos a polvo de acetona, cinco de ellos (1C, 2C, 3C, 4Q, 9C) se sometieron a los siguientes procedimientos de extracción:

a).- Extracción salina con KCl (52) basado en la propiedad de que tienen las sales neutras (KCl) a concentraciones bajas de incrementar la solubilidad de muchas proteínas por el fenómeno llamado desalazón (salting-in), que es función de la concentración de la sal y el número de cargas y especies iónicas en solución. Los efectos del desalazón

son causados por la tendencia de los grupos no disociables de la proteína a ionizarse.

Para cada gramo de polvo de acetona se agregaron 30 ml de una solución de KCl 0.3 M - tio etanol 0.01 % con lo que se agitó en agitador mecánico durante 4 horas, a  $4^{\circ}\text{C}$ ; a esto siguió una centrifugación a 34,800 g, durante 15 minutos. El residuo se extrajo tres veces más con el mismo solvente y con agitación de 4, 2 y 1 hora; además se hizo una extracción final con agitación durante toda la noche (16 horas).

La mezcla de todos los sobrenadantes se pasó por filtro Millipore (previamente esterilizado), el cual está formado por un prefiltro y la membrana Millipore de  $0.25\ \mu$ . El sobrenadante se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$  en condiciones estériles. Mientras tanto el residuo se colocó en bolsas de celofán y dializó durante 72 horas con agua deionizada, renovada cada 24 horas hasta eliminar las sales, después de lo cual se liofilizó y conservó un desecador a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Así se procesaron los lotes 1C, 2C, 3C y 4Q.

b).- Extracción con solventes orgánicos (35).- Esta técnica se basa en el efecto que tienen los solventes orgánicos (n-butanol) de reducir la constante dieléctrica de las soluciones acuosas de proteínas, disminuyendo la solubilidad en agua de la mayor parte de proteínas, hasta el - -

extremo de precipitarlos. Lo que se explica por la competencia del solvente para atraer las moléculas de agua llevando la proteína a su punto isoeléctrico (P. I.).

40 g de polvo de acetona del lote 9C (9C-B-PA), se molió en licuadora con la mezcla de extracción (butanol-ácido acético-agua) utilizando 20 ml por gramo de polvo, durante 30 segundos a velocidad máxima. Se agitó durante 18 horas con agitador mecánico seguido de centrifugación a 700 g - 15 minutos a 4°C.

El residuo (R) se dializó, liofilizó y conservó a 4°C. -

Al sobrenadante se agregaron 80 g de ácido silícico - para eliminar partículas contaminantes. Se agitó durante 1 hora y centrifugó a 700 g 15 minutos a 4°C.

El paso siguiente de esta técnica implicaba una evaporación del butanol a 30°C y al alto vacío, condición que no fue posible realizar en nuestro laboratorio. Por este motivo esta técnica fue abandonada.

#### IX.- Filtración en gel.

Es un procedimiento cromatográfico (60), que permite la separación de sustancias (proteínas) según el tamaño molecular; esta técnica se realiza con un soporte inerte que en nuestro procedimiento fue el sephadex, que es una polisa cárido fabricado en forma de esferas, que al estar hidratado y empaquetado en una columna forma espacios entre las esferas y dentro de las mismas, por donde las sustan-

cias son seleccionadas y transportadas por el eluyente (agua); la velocidad del transporte depende del tamaño de las sustancias retenidas por los espacios del sephadex.

Los sobrenadantes (S) obtenidos de la extracción se filtraron en columnas empacadas con sephadex, previamente hidratado a baño María durante cuatro horas.

Montaje de la columna: La columna se niveló con nivel de burbuja; las burbujas de aire que podían haber quedado bajo el soporte del lecho se eliminaron, inyectando agua con una jeringa en la salida de la columna; se cerró esta y la suspensión de sephadex se dejó escurrir por las paredes; cuando el gel se había sedimentado, se abrió la columna para que el líquido por arriba de la columna del gel fluyera, pero se dejó una pequeña capa de líquido por encima de ella; después de agitar suavemente con varilla de vidrio la parte superior de la columna del gel se continuó agregando la suspensión del sephadex y se repitieron los mismos pasos cuantas veces fue necesario hasta obtener la altura de columna de gel que se deseaba; el agua se dejó fluir a través de la columna durante 24 horas para obtener la estabilización del lecho (Sephadex hidratado y empaquetado).

Aplicación de la muestra: - El sobrenadante se aplicó en un volumen del 5 al 20% del volumen total de la columna de gel, después de eliminar el líquido por encima de la misma; la muestra que se dejó resbalar cuidadosamente por la pared

de la columna, penetró al lecho, después de lo cual se aplicó en la misma forma una capa de eluyente (agua deionizada) y se permitió su flujo.

La columna se adaptó a un colector de fracciones con Uvicord y graficador.

**Parámetros de la columna.**- Cuando el sephadex está empaquetado en una columna, consta de dos fases: el solvente dentro de las partículas del sephadex y el solvente que está entre las partículas .

Para conocer el mecanismo de filtración en gel y poder caracterizar las propiedades cromatográficas de las sustancias se deben conocer los componentes del lecho de la columna .

Tres componentes contribuyen al volumen total del lecho - - ( $V_t =$  Volumen total): el volumen entre las partículas del gel, llamado volumen de exclusión o vacío ( $V_o$ ), el volumen del solvente dentro de las partículas del gel, llamado volumen interno ( $V_i$ ), y el volumen de la matriz del gel ( $V_m$ ).

Por lo tanto, el volumen total del lecho es igual a:

$$V_t = V_o + V_i + V_m \quad (1)$$

Se puede considerar entonces que el volumen total es igual al volumen de la columna ocupado por el lecho más el volumen de la matriz de éste. Desde el punto de vista práctico, el volumen total se puede calcular con la fórmula

el volumen de un cilindro, ya que el espacio ocupado por la matriz es muy pequeño.

El volumen vacío ( $V_0$ ) puede ser establecido cromatográficamente sobre el gel empaquetado, con una sustancia de peso molecular alto, como el azul dextrán con un peso molecular promedio de 2.000000, el cual no puede entrar a la partícula del gel. El volumen que sale de la columna desde el inicio de la aplicación de la sustancia y la aparición de ésta en el eluyente, corresponde al volumen vacío.

El volumen interno ( $V_i$ ) está relacionado a la porosidad del gel y se determina también cromatográficamente utilizando una sustancia de bajo peso molecular, como es la vitamina B 12 ó hidroxibalamina, cuyo peso molecular es de 1.355. El volumen de eluyente que sale desde la máxima concentración del azul dextran hasta la máxima concentración de la B 12, es el volumen interno ( $V_i$ ).

Tanto el volumen vacío como el interno, se determinaron simultáneamente con una muestra de azul dextrán al 0.1% con 300  $\mu$ g de hidroxibalamina en un volumen total de 2 ml.

Con estas tres variables  $V_t$ ,  $V_0$ ,  $V_i$ , podemos despejar  $V_m$  de la ecuación (1) en donde  $V_m = V_t - (V_0 + V_i)$

Parámetros de la sustancia.- En realidad solo el volumen de elución ( $V_e$ ) es una constante particular de la sustancia que -

corresponde al volumen del eluyente, desde la iniciación del procedimiento hasta la máxima concentración de la sustancia que es separada.

Se llama volumen de separación ( $V_s$ ), al volumen de eluyente comprendido entre la máxima concentración de dos sustancias.

El comportamiento de una sustancia se puede expresar por la constante disponible ( $K_{av}$ ) que depende de la relación entre el volumen de elución de la sustancia y el volumen total con el volumen vacío:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Estudio de Sephadex.- Para seleccionar el tipo de sephadex que debería utilizarse, se estudiaron los sephadex G-100, G-75 y G-50, a los que se aplicaron muestras de 10 y 20 ml en columnas de 2.5 x 38 cm. Con el sephadex G-50 que dió el mejor patrón se estudió el comportamiento de una columna de 2.5 x 90 cm para aumentar el volumen de la muestra.

Experimento para conocer el comportamiento de una molécula pequeña.- En una columna de 2.5 x 90 cm de sephadex G-50, se estudió el comportamiento de la insulina marcada con  $^{125}$  (101, 585 c. p. m.) que tiene un peso molecular de 6000 muy cercano al de la proteína en estudio agregada a 25 ml de sobrenadante del lote 2C-S. Las

dos fracciones obtenidas (I moléculas grandes y II moléculas pequeñas) se dializaron, liofilizaron y conservaron a 4° C.

#### X.- Ultrafiltración:

La ultrafiltración es una técnica (61) de separación selectiva de partículas en suspensión de acuerdo a su peso molecular.

El equipo para la realización de esta técnica constaba de:

Las membranas de ultrafiltración previamente lavadas para eliminar la glicerina que contenían, se colocaron en la base de las cámaras de agitación que contenían el líquido que se iba a filtrar. La cámara se conectó a un recipiente cuando el volumen excedía del volumen de la cámara, el recipiente o la cámara se conectaron a una fuente de gas nitrógeno, con presión controlada.

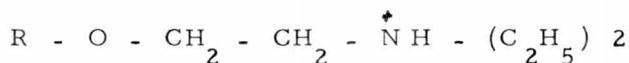
La fracción II se pasó sobre membrana XM-50 (límite de exclusión 50,000), cuyo filtrado obtenido es pasado por PM-10 (límite de exclusión 10,000) y el filtrado obtenido finalmente se pasa sobre UM-2 (Límite de exclusión 1,000). Los sobrenadantes concentrados en cada una de las membranas se lavaron finalmente con 500 ml de agua deionizada para eliminar sales residuales. En los 1C-S-II, 2C-S-II, la fracción II solo pasó por PM-10 y UM-2; y en 3C-S y 4Q-S-II por XM-50, PM-10 y UM-2.

### XI.- Cromatografía de intercambio iónico:

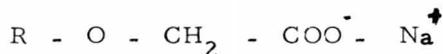
Es una técnica de separación que aprovecha las diferencias en propiedades ácido-básicas de las sustancias (proteínas), con la utilización de una fase estacionaria (resina intercambiadora de iones) a las que se unen selectivamente - las proteínas y una fase líquida (solución amortiguadora) que separa a su vez (por variaciones de pH o fuerza iónica) selectivamente las proteínas ya unidas a la resina.

Los dos tipos de resinas que se utilizan en este procedimiento, son de tipo aniónico y catiónico, lo que significa - que los grupos funcionales de la resina tienen estas características.

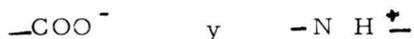
En el presente trabajo se utilizaron la DEAE-C (Diethyl-amino etil-celulosa) que tiene grupo funcional



y la CM-C (carboxi-metil-celulosa) cuyo grupo funcional es:



En ambas resinas R significa la molécula celulosa y los grupos funcionales en la ionización son:



La técnica seguida para purificar en DEAE-C se basó

en la ya publicada por Barret (48) para Calcitonina Humana. Para CM-C fue la informada por Brewer (62) para Calcitonina Bovina.

Estas resinas requieren de un procedimiento de lavado para eliminar las impurezas y además deben activarse los grupos intercambiadores de iones.

El procedimiento seguido consistió en lo siguiente:

A 100 g de DEAE-C se agregaron 3 litros de agua y se agitó durante 15 minutos; después de una hora de sedimentación espontánea se eliminó el sobrenadante que contenía las pequeñas partículas.

El procedimiento se repitió cinco veces, después de lo cual se añadieron 2500 ml de ácido clorhídrico 1 M; se agitó durante 15 minutos y filtró en tela de seda. Este lavado ácido fue seguido de lavados con agua bidestilada (pH 5.8), hasta que el filtrado tuvo el mismo pH. Después se lavó con 2500 ml de hidróxido de sodio, se agitó y filtró y el lavado del agua se repitió hasta obtener el pH de la misma. Finalmente la celulosa se lavó con amortiguador bicarbonato de amonio 0.002 M, pH 7.5 hasta que se obtuvo este pH en la suspensión.

El lavado y activación de la CM-C se hizo con la misma técnica, pero se cambió el orden de las soluciones: primero el hidróxido de sodio 1M y después el ácido clorhídrico 1M. El amortiguador fue en este caso acetato de

amonio 0.01, pH 6.2 . Ambas resinas se conservaron a - 4°C y con azida de sodio para prevenir la contaminación.

El montaje de la columna fue igual que el ya descrito para el sephadex pero en este caso se permitió que la columna alcanzara su equilibrio, el cual correspondió al momento en que el pH del eluyente fue igual al del amortiguador inicial que entró a la columna.

La muestra correspondiente entre 5-20% del polvo retenido por 1 g de resina (experimento previo), se aplicó disuelto en el volumen mínimo (de 1 a 1.5 ml) del mismo amortiguador inicial.

El sistema completo de elución para DEAE-C comprendió 200 ml de cada uno de los amortiguadores siguientes: amortiguador inicial bicarbonato de amonio 0.002M, pH - 7.5; 0.1M, pH 8.0; 1.0M, pH 8.5 y finalmente hidróxido de sodio 0.1M, pH 13.0 . Y para CM-C comprendió también 200 ml de amortiguador acetato de amonio de los siguientes pH: amortiguador acetato de amonio pH 5.5, 5.6, 5.65, 5.7, 5.75, 5.8, 5.85, 6.0, 6.15, 6.2 .

Con este procedimiento se purificaron en DEAE-C los productos de ultrafiltración:

2C - S - II - UM - 2

3C - S - - - UM - 2

3C - S - - - PM - 10

3C - S --- XM - 50

4Q - S --- UM - 2

4Q -S- II - PM - 10

Y en CM-C sólo se purificó:

4Q - S - II - UM - 2

## RESULTADOS

- I.- Estandarización de la técnica de determinación de proteínas.
- II.- Estandarización de la técnica de electroforesis.
- III.- Estandarización de la técnica de determinación de calcio.
- IV.- Estandarización del bioensayo
- V.- Recolección de tiroides
- VI.- Conservación del material biológico
- VII.- Polvo de acetona
- VIII.- Extracción de proteínas
- IX.- Filtración en gel
- X.- Ultrafiltración
- XI.- Cromatografía de intercambio iónico
- XII.- Actividad de los productos por bioensayo
- XIII.- Electroforesis de los productos activos

## RESULTADOS

## I. - Estandarización de la técnica de determinación de proteínas.

El espectro de absorción del producto colorido en la técnica de determinación de proteínas, demostró que éste absorbió adecuadamente entre 425-600 nm, rango en que el blanco de reactivos no lo hizo, como puede observarse en la Figura No. 1 .

En la Figura No. 2, se presentó el experimento realizado con una curva tipo leída a diferentes longitudes de onda desde 500-750 nm; las rectas extrapolables a cero son las que se leyeron a 500 y 550 nm, y razón por la cual se seleccionó este rango como el más adecuado para las lecturas de proteínas; todo el trabajo posterior se leyó a 500 nm.

La precisión de la técnica obtenida con concentraciones de 80 y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína fue de 93-103% para la de 80  $\mu\text{g}$  y 91-101% para la de 40  $\mu\text{g}$  lo que demostró que la reproducibilidad fue aceptable, como puede observarse en la tabla No. 1.

El análisis de la exactitud que se muestra en la Tabla No. 2; demostró que a concentraciones menores de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína, la recuperación fue menor del 100% (10% menor), y que por arriba de esta concentración

ESPECTRO DE ABSORCION DE PROTEINAS  
(Harttre)

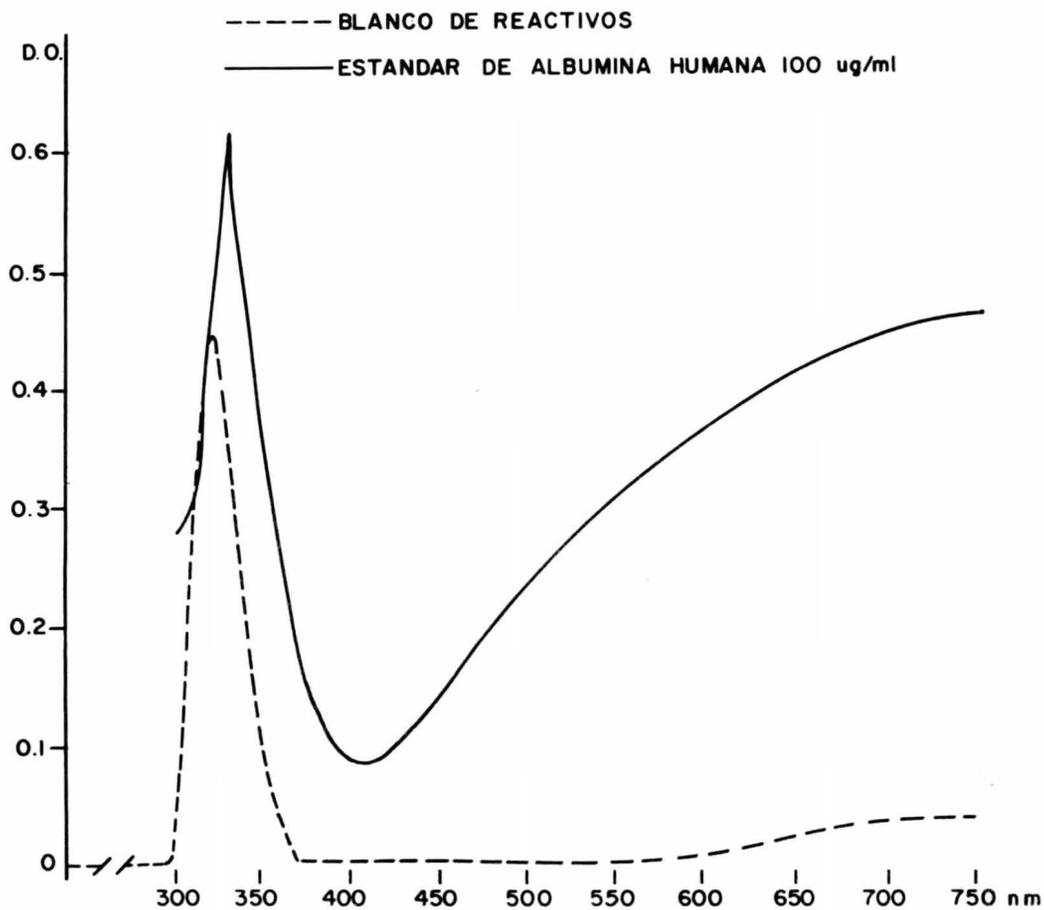


FIGURA NO. 1

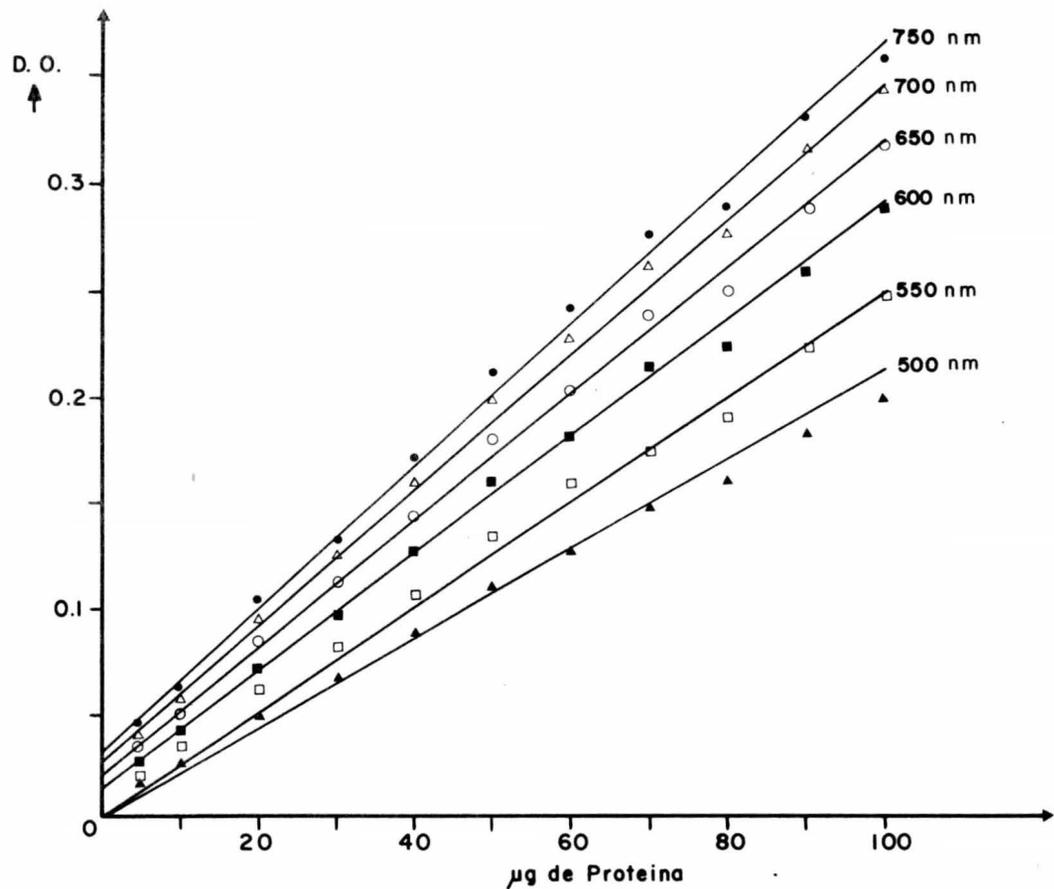


Figura No. 2.- Curvas tipo de proteína, leída a diferentes longitudes de onda. Las líneas extrapolables al cero son las leídas a 500 y 550 nm.

PRECISION

Tubo	Proteína μg/ml	$\bar{X}$ D.O.	Precisión %
1	80	0.19	93
2	80	0.20	98
3	80	0.20	98
4	80	0.21	103
5	80	0.20	98
6	80	0.21	103
7	80	0.21	103
8	80	0.21	103
9	80	0.21	103
10	80	0.20	98

$M = 0.204$        $v = 0.007$        $\sigma = 0.0000488$

Precisión de 93 a 103 %

Tubo	Proteína μg/ml	$\bar{X}$ D.O.	Precisión %
1	40	0.10	101
2	40	0.09	91
3	40	0.10	101
4	40	0.10	101
5	40	0.10	101
6	40	0.10	101
7	40	0.10	101
8	40	0.10	101
9	40	0.10	101
10	40	0.10	101

$M = 0.099$        $v = 0.01$        $\sigma = 0.001$

Precisión de 91 a 101 %

TABLA NO. 1

E X A C T I T U D

Muestra No.	Solución de Proteína 100 ug/ml		Proteína agregada		Valor teórico	Valor experimental	Exactitud
	ml	Proteína ( $\mu\text{g}$ )	ml	$\mu\text{g}$	proteína $\mu\text{g}$	proteína $\mu\text{g}$	
1	0.1	10	0.05	5	15	13.5	90
2	0.1	10	0.1	20	20	18.0	90
3	0.1	10	0.2	30	30	30.5	102
4	0.1	10	0.4	50	50	53.0	106
5	0.1	10	0.6	70	70	76.0	109
6	0.1	10	0.8	90	90	98.5	109

TABLA NO. 2

la recuperación fue menor de 9%.

La sensibilidad de la técnica se presenta en la Figura No. 3, donde se observó que la máxima sensibilidad fue de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína y la mínima de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína; y que la dispersión de las lecturas para cada punto obtenido de 3 curvas tipo, fue muy pequeña.

Estudios del mismo laboratorio que no se presentan en la Figura No. 3 habían demostrado que se perdía la linealidad a mayores concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , por lo que nuestro trabajo se limitó al rango presentado en la Figura No. 3.

La especificidad de la técnica en presencia de ficoll, dodecil sulfato de sodio y ácido nucleico demostró que a concentraciones menores de 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de las sustancias añadidas no modificaron la lectura de las proteínas y que en cambio a mayores concentraciones hubo un aumento de la concentración de las sustancias interferentes (Tabla No. 3).

## II.- Estandarización de la técnica de electroforesis.

Los datos de estandarización de la técnica de electroforesis de proteínas para la albúmina fueron los siguientes:

Precisión de 100%

Exactitud de un 99%

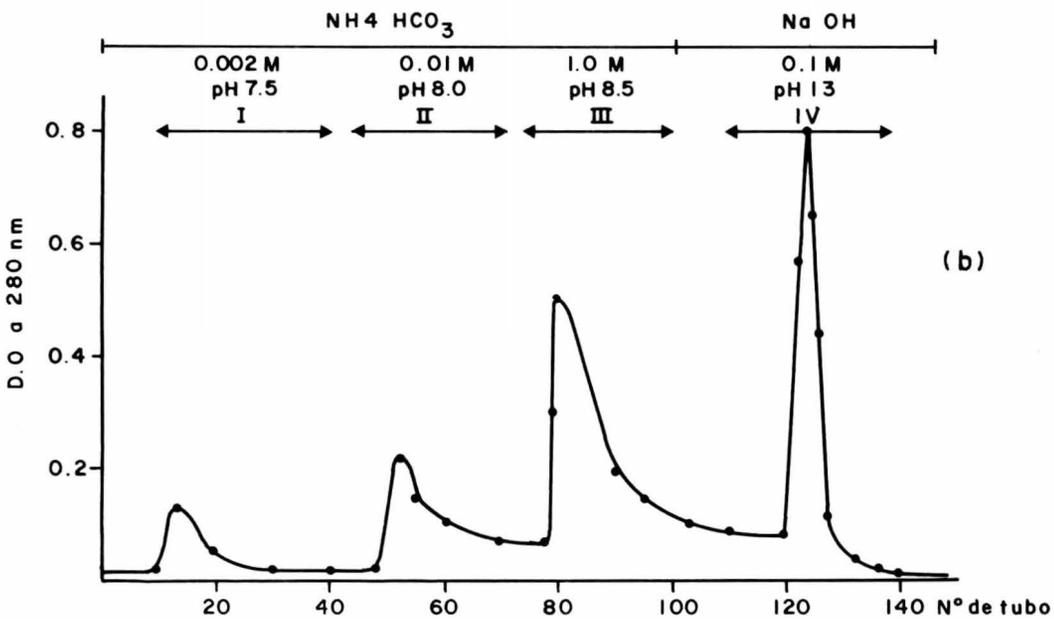
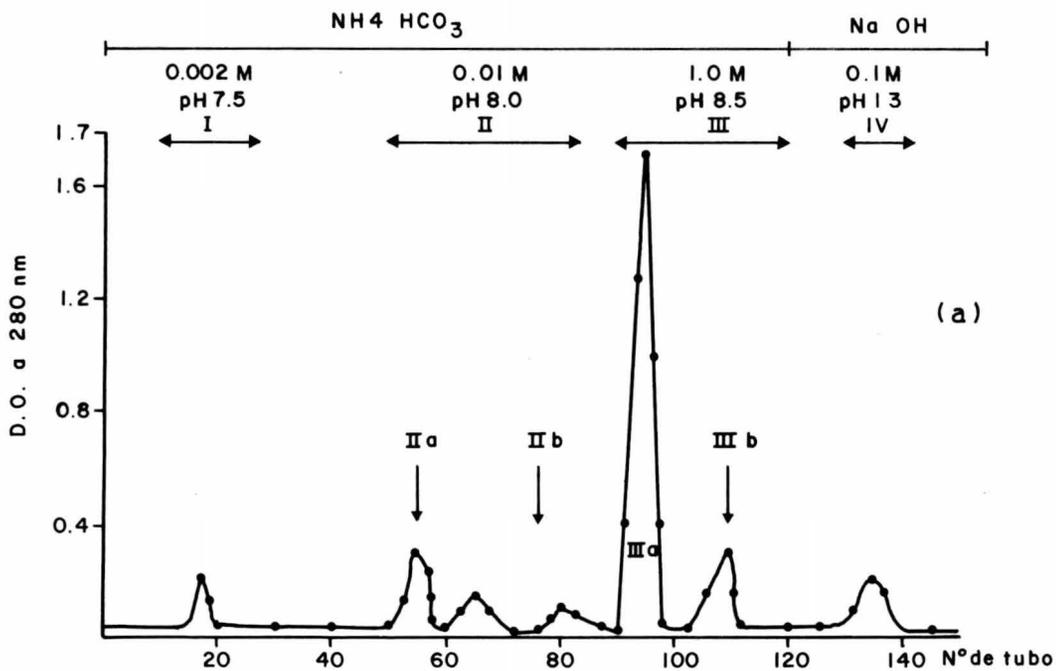


FIGURA NO. 12

# CURVA TIPO DE PROTEINAS

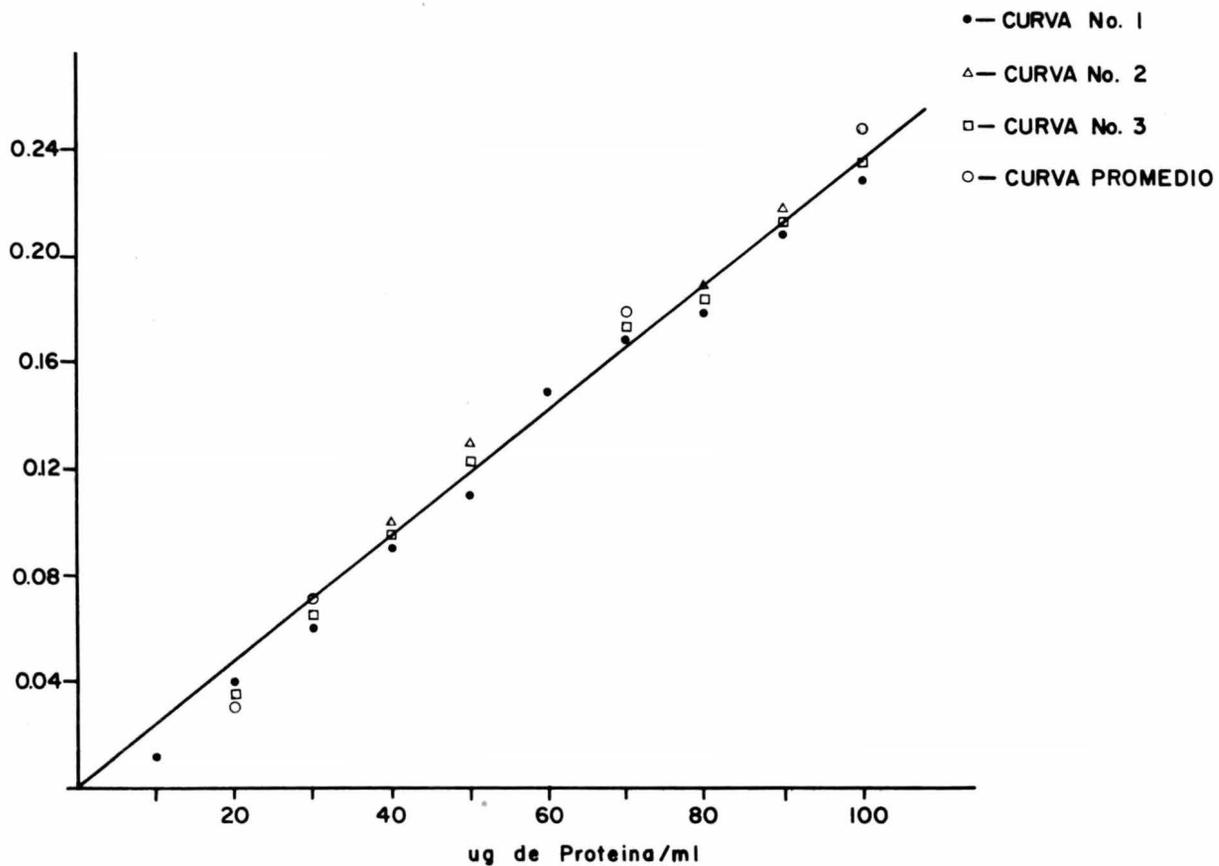


FIGURA NO. 3

E S P E C I F I C I D A D

Muestra No.	A (ml)	B (ml)	Proteína (t) $\mu\text{g/ml}$	D. O. $\bar{X}$	Valor experimental $\mu\text{g/ml}$	Interferencia %
1	0.0	1.0	100	0.21	102	-2
2	0.1	0.9	100	0.21	102	-2
3	0.2	0.8	100	0.20	100	0
4	0.3	0.7	100	0.19	92	8
5	0.4	0.6	100	0.18	86	14
6	0.5	0.5	100	0.17	82	18
7	0.6	0.4	100	0.17	82	18
8	0.7	0.3	100	0.16	77	23
9	0.8	0.2	100	0.15	72	28
10	0.9	0.1	100	0.14	67	33

A = Solución con concentración iguales de ácidos nucleicos, ficoll, dodecil sulfato y albúmina (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

B = Solución de albúmina (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

t = Valor teórico

TABLA NO. 3

Sensibilidad, la máxima fue de  $36.25 \mu\text{g}$  en  $0.5 \mu\text{l}$  y la mínima fue de  $10 \mu\text{l}$

Especificidad, dada por el colorante utilizado, que en este caso fue el azul de Coomassie.

Que la técnica fue útil para la separación e identificación de las proteínas contenidas en el tejido tiroideo, se demuestra en el esquema No. 1, en el que se pueden apreciar los patrones electroforéticos correspondientes a un polvo de acetona, el sobrenadante inicial en la técnica de extracción y el residuo correspondiente.

### III.- Estandarización de la técnica de determinación de calcio.

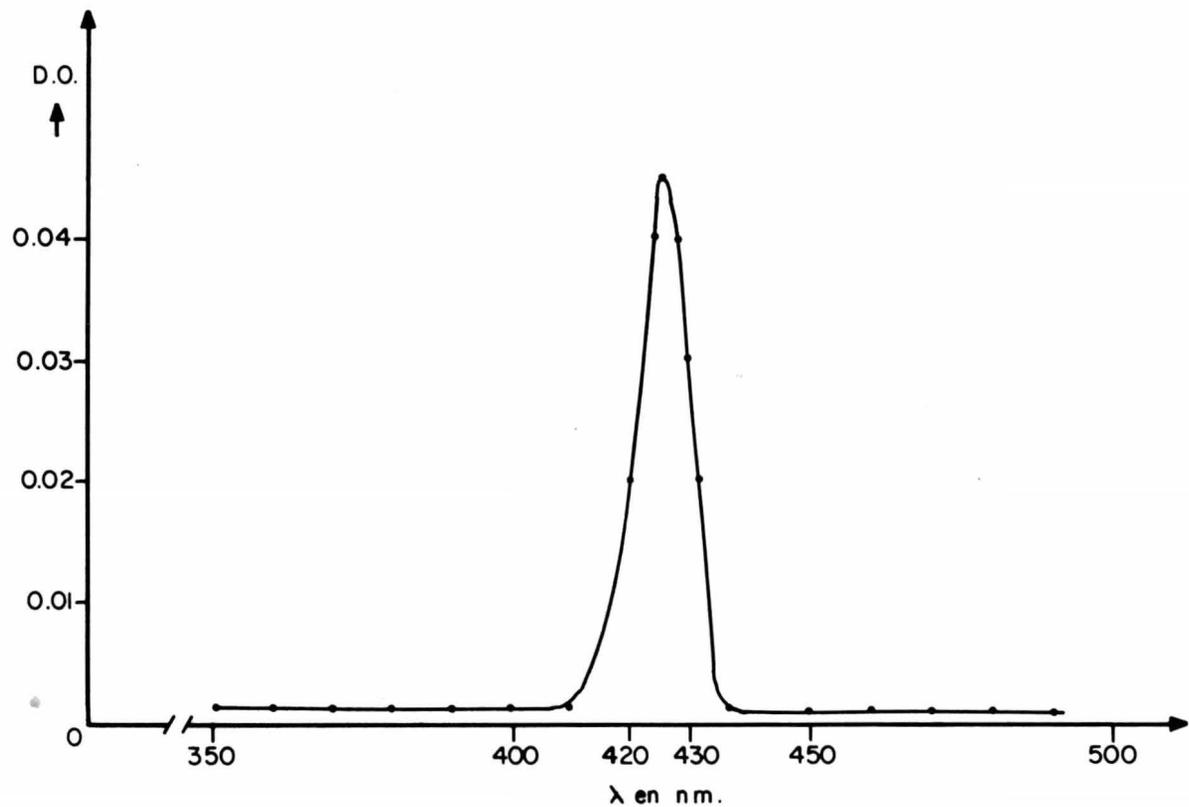
Su estudio se inició con el espectro de absorción del calcio en el aparato de absorción atómica y como se puede observar en la Figura No. 4 los límites están entre 410 y 435 nm, con una máxima absorción a 425 nm; sin embargo, fue necesario ajustar diariamente el aparato, que es sensible a cambios de temperatura y a la disminución de energía de la lámpara, por lo que la longitud de onda osciló de 421 a 424 nm.

La precisión del aparato, que se muestra en la tabla No. 4 fue 94 al 99%.

Aunque los datos de la tabla No. 5 demuestran, como era de esperarse, que el plasma tenía la mayor concentración de calcio, se eligió el suero como producto biológico



**ELECTROFORESIS DISCONTINUA**  
(Ornstein Davis)



Espectro de Absorción de Calcio.

FIGURA NO. 4

PRECISION DEL APARATO

SOLUCION ESTANDARD DE Ca mg%	D.O.	$\sigma$	PRECISION %
2.5	0.025	0.002	94
5.0	0.050	0.001	99
7.5	0.074	0.005	94
10.0	0.099	0.001	99
12.5	0.123	0.004	97
15.0	0.147	0.003	98

TABLA NO. 4

SELECCION DE LA MUESTRA

MUESTRA	Ca mg%
Suero	10.8
Plasma	11.2
Desproteinizado	2.3

TABLA NO. 5

de la rata para observar los cambios en los niveles de calcio, debido a que requería menos manipulaciones y porque los niveles de calcio en suero no fueron estadísticamente diferentes a los del plasma.

Ya que el volumen de suero que se obtenía de una rata de 100-150 g de peso corporal era muy pequeño, fue necesario encontrar el volumen mínimo de suero que permitiera una determinación de calcio aceptable y como puede verse en la tabla No. 6, volúmenes de 0.1 ml fueron suficientes para ese propósito.

Se demostró que era recomendable hacer las lecturas de calcio en suero en el mismo día de la obtención del producto, porque las lecturas disminuyeron discretamente si el producto se conserva 24 horas, aunque se conservara a temperaturas bajas. Esto se demuestra en la Figura No. 5, que corresponde a una curva tipo leída a las 24 horas. De todos modos la linealidad que presenta la curva inicial no se perdió después de las 24 horas y de la misma figura puede estimarse que la sensibilidad máxima de esta técnica fue de 2.5 mg y la mínima de 15 mg%.

La técnica tuvo una reproducibilidad del 99%, que se observa en la tabla No. 7 a excepción del tubo número 7, lo que puede deberse a errores manuales.

SELECCION DEL VOLUMEN DE LA MUESTRA

MUESTRA	SUERO ml	SOL. DE EDTA-Na <sub>4</sub> 0.78 % ml	Ca mg %
1	0.4	9.6	10.5
2	0.2	4.8	10.2
3	0.1	2.4	10.4

TABLA NO. 6

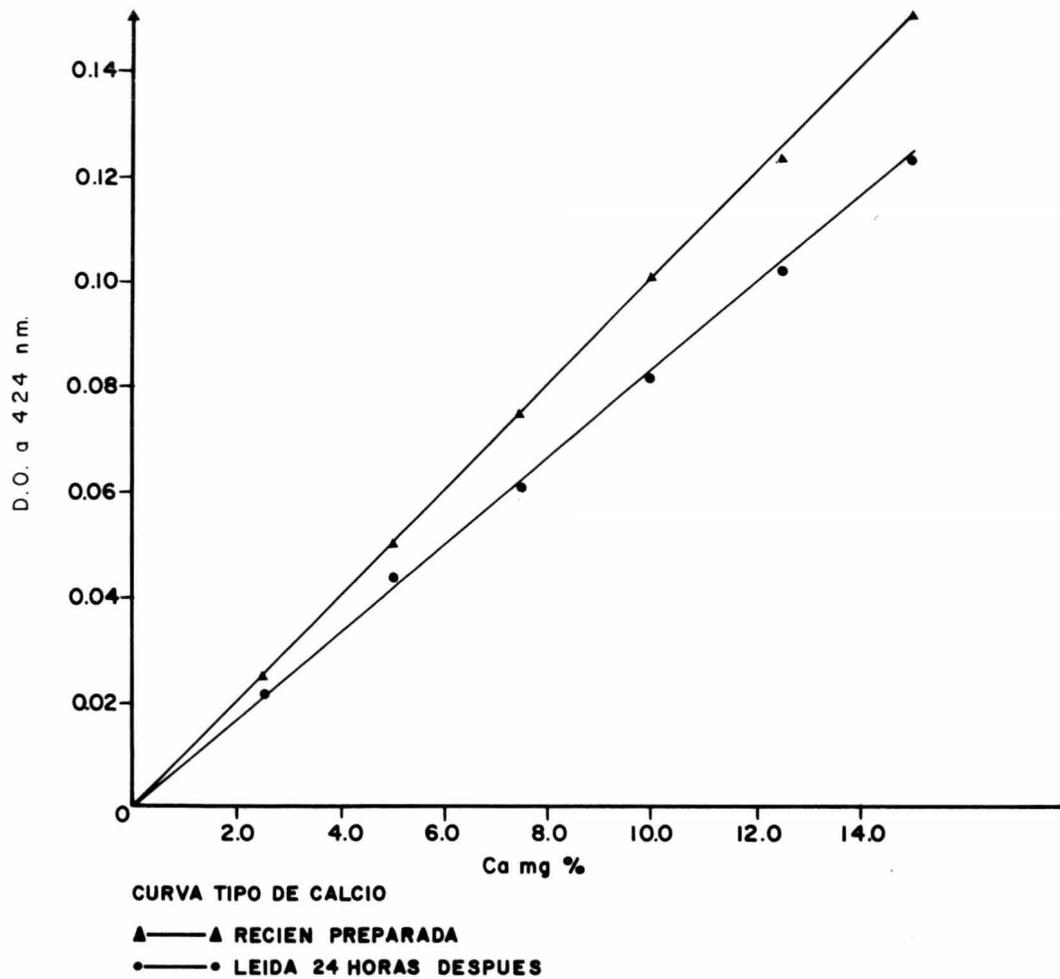


FIGURA NO. 5

PRESICION DE LA TECNICA

TUBO	Ca mg%	PRESICION %
1	10.7	99.0
2	10.7	99.0
3	10.8	99.0
4	10.9	99.0
5	10.9	99.0
6	10.7	99.0
7	10.6	99.0
8	10.7	99.0
9	10.8	99.0
10	10.8	99.0
M = 10.8	=0.011	V = 0.105

TABLA NO. 7.

En la tabla No. 8 se presentan los datos de recuperación, en la que puede observarse que fue siempre superior al 100% (hasta el 7%), lo que puede explicarse por errores técnicos en la pesada de carbono de calcio.

Aunque la técnica de absorción atómica para determinar electrolitos presupone que es específica para la sustancia - en estudio, lo que depende de la fuente de energía (Lámpara) que es específica en este caso para el calcio, se decidió comprobar si otros electrolitos que normalmente existen en el suero, modificaban los niveles de calcio, cuando ellos se agregaron en las concentraciones en que se encuentran en el suero. Los resultados se presentan en la tabla No. 9, con lo que se demostró que el NaCl y KCl aumentaron en un 5% la densidad óptica; que el  $MgCl_2$  lo hizo en 10% y una mezcla de los tres en un 25%.

#### IV.- Estandarización del bioensayo.

Con los diferentes patrones de alimentación utilizados, (tabla No. 10), no se obtuvo un cambio notorio de la calcemia, por lo que se decidió utilizar el esquema No. 2 - que corresponde a ayuno y permitiendo tomar agua corriente de la llave ad-libitum.

Por otro lado es aparente que las hembras tuvieron - niveles más altos de calcio y aunque desde este punto de vista podrían ser más útiles para hacer aparente la hipo-

EXACTITUD DE LA TECNICA

Muestra No.	Suero dializado Ca (ml)	Suero dializado Ca (mg)	Calcio agregado Solución de 100 mg/1 de Ca (ml)	Calcio agregado Ca (mg)	Valor teórico Ca mg/6 ml	Valor experimental Ca mg/6 ml	Recuperación %
1	6	0.096	0	0.00	0.096	0.096	100
2	5	0.080	1	0.10	0.180	0.210	116
3	4	0.064	2	0.20	0.264	0.270	102
4	3	0.048	3	0.30	0.348	0.370	106
5	2	0.032	4	0.40	0.432	0.480	111
6	1	0.016	5	0.50	0.516	0.520	101
7	0	0.000	6	0.60	0.600	0.640	107

TABLA NO. 8

## LA ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA

M U E S T R A	Ca mg%	Incremento de D. O. %
Suero dializado	2.0	
Suero dializado + Na Cl (12 mg/ml)	2.1	5
Suero dializado + KCl (0.31 mg/ml)	2.1	5
Suero dializado + MgCl <sub>2</sub> (0.05 mg/ml)	2.2	10
S. D. + NaCl + KCl + MgCl <sub>2</sub>	2.5	25

TABLA NO. 9

SELECCION DE LA ALIMENTACION BASAL Y DEL SEXO PARA  
EL BIOENSAYO

EXPERIMENTO NO.	ALIMENTACION BASAL	MACHOS Ca mg %	HEMBRAS Ca mg %
1	Normal con purina	9.5	10.4
2	Agua corriente	9.0	10.1
3	Sol. glucosada al 6%	9.2	9.4
4	Ayuno total	9.0	9.6
5	Agua deionizada	9.7	9.8

TABLA NO. 10

calcemia, se decidió utilizar los machos, ya que por un lado las hembras son más utilizadas en otros bioensayos (lo que disminuiría su disponibilidad) y existía la posibilidad de tener variaciones del electrolito dependientes de la fase del ciclo sexual de la rata, porque los volúmenes y las concentraciones de electrolitos, así como de otros metabolitos presentan variaciones relacionadas a los niveles hormonales que rigen o son consecuencia de la función endócrina.

Una de las fases más laboriosas fue la de selección de la dosis de los extractos, que era necesario aplicar a los animales para detectar una respuesta de hipocalcemia, se logró fijar cuando se tuvieron los productos relativamente purificados, ya que no se contaba con un producto estándar. Los resultados de esta parte experimental se presentarán en los resultados del bioensayo.

## TECNICAS DE EXTRACCION Y PURIFICACION

V.- Recolección de Tiroides.

VI.- Conservación del material biológico.

Estas dos etapas del trabajo sólo pueden valorarse en función del rendimiento que se obtuvo en polvo de acetona o de los demás productos en los subsecuentes pasos de purificación, estimados en peso o en concentración de proteína.

## VII.- Polvo de acetona .

Su rendimiento en relación a su procedencia (cadáveres o quirúrgico), y a su medio de conservación (acetona o congelación) se muestra en la tabla No. 11 en la que puede observarse que el rendimiento en peso de polvo no fue muy diferente entre el material procedente de cadáveres y el primero de los quirúrgicos que procedía de tejido neoplásico, mientras que el segundo quirúrgico que dió el más bajo rendimiento, notablemente diferente de los anteriores, procedía de tiroides con padecimientos benignos, principalmente bocios multinodulares.

Aparentemente el medio de conservación más adecuado resultó ser la congelación, que dió un rendimiento de 20% en promedio, mientras el del acetona fue de 18%.

La valoración en concentración de proteína (tabla No. 12), demuestra que el material quirúrgico fue más rico en proteínas (4Q-PA y 7Q-PA), mientras que la congelación (2C-PA y 3C-PA) permitió una mayor conservación de los mismos.

## VIII.- Extracción de proteínas.

Los sistemas de extracción se comparan en la tabla No. 13, en la que puede observarse que el butanol tuvo rendimiento opuesto al del cloruro de potasio, tanto en el sobrenadante como en el residuo (9C - B - PA - S vs 3C - PA - S y 4Q - PA - S).

POLVO DE ACETONA

MATERIAL	ACETONA			CONGELACION		
	TEJIDO TIROIDEO	PA	%	TEJIDO TIROIDEO	PA	%
	g	g	%	g	g	%
<u>Cadáveres:</u>						
IC-PA	30.1	6	22	---	-	--
2C-PA	-	-	-	20.8	4	20
3C-PA	-	-	-	171.5	36	21
5C-PA	26.3	5	19	---	-	--
6C-PA	29.1	5	17	----	-	--
8C-PA	30.3	5	16	----	-	--
9C-PA				200.0	40	20
<u>Quirúrgico:</u>						
4Q-PA	-	-	-	180	31	17
7Q-PA	-	-	-	7	0.5	7

Rendimientos de polvo de acetona del material conservado en acetona y en congelación.

POLVO DE ACETONA

M A T E R I A L	CONCENTRACION DE PROTEINA	
	ACETONA	CONGELACION
	$\mu\text{g}/\text{mg}$	POLVO
<u>Cadáveres</u>		
1C-PA	100	---
2C-PA	---	275
3C-PA	---	490
5C-PA	60	---
6C-PA	120	---
8C-PA	270	---
<u>Quirúrgico:</u>		
4Q-PA	---	540
7Q-PA	---	350

Concentración de proteína del material conservado en acetona comparado con el material conservado en congelación.

En cuanto a la procedencia del material sólo son comparables el 3C - PA - S y el 4Q - PA - S que tuvieron el mismo rendimiento en el sobrenadante pero un menor rendimiento en el residuo del que procedía de cadáver.

Los procedimientos de conservación (acetona y congelación) no tienen expresión a nivel de la extracción, porque en el único conservado en acetona (1C - PA - S) que se procesó hasta la extracción, no se tomó la muestra representativa del sobrenadante y residuo que permitiría expresar su rendimiento. Lo mismo sucedió para el sobrenadante del 2C - PA - S.

En la tabla No. 14 puede apreciarse que el material quirúrgico fue más rico en proteína en el sobrenadante de la extracción, pero que no hubo una notable diferencia entre la extracción del butanol (9C - B - PA - S) y el cloruro de potasio (3C - PA - S). La otra aparente observación es que el sobrenadante fue en cualquier condición más rico en proteína que el residuo.

#### IX.- Filtración en gel

Los parámetros de una columna de 2.5 x 37.8 cm con sephadex G-50, se presentan en la figura No. 6 y se observa que el volumen vacío ( $V_0$ ) fue de 60 ml y el interno ( $V_i$ ) de 126 ml, lo que dió un volumen total de 185.5 ml.

## EXTRACCION DE PROTEINAS

M A T E R I A L	CONCENTRACION DE PROTEINA	
	S	R
	$\mu\text{g}/\text{mg}$ Polvo	
<hr/>		
<u>Cadáveres:</u>		
1C-PA-S (Acetona)	---	---
2C-PA-S (Congelación)	---	150
3C-PA-S (Congelación)	490	115
9C-B-PA-S (Congelación)	500	70
 <u>Quirúrgico:</u>		
4Q-PA-S (Congelación)	674	90

Concentración de proteínas de los productos de extracción.

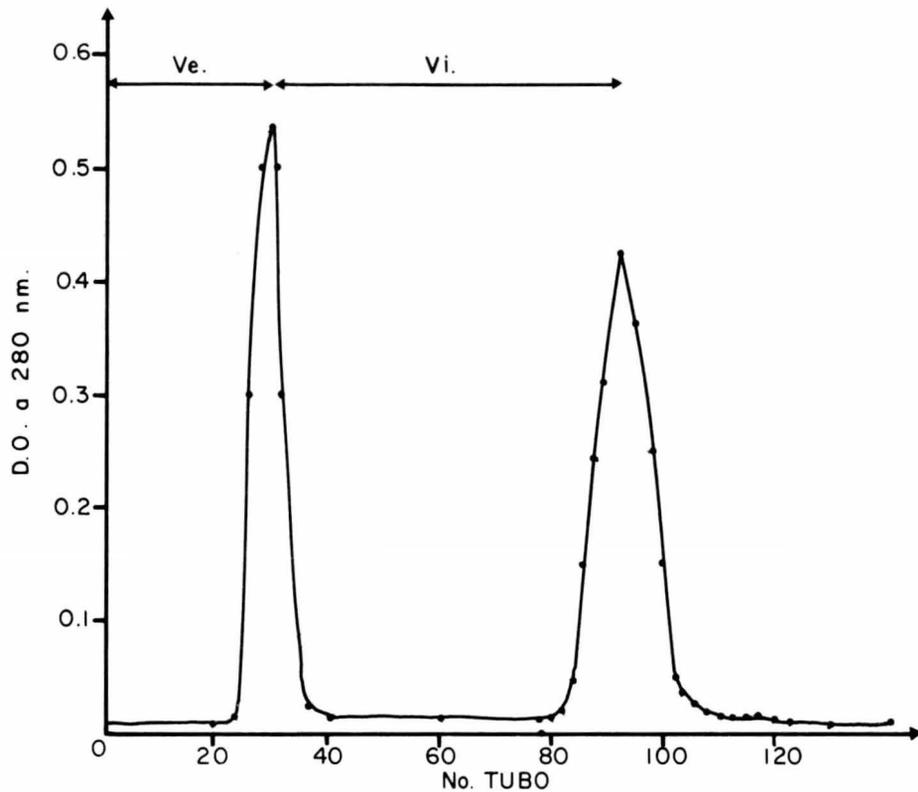


Figura No. 6.- Determinación de los volúmenes:  $V_T$ ,  $V_o$  y  $V_i$ . En columna de 2.5 x 37.8 cm, con Sephadex G-50. La muestra filtrada estuvo compuesta por 1 ml de Azul Dextrán al 0.1% mas 1 ml de vitamina  $B_{12}$  (100 mg). El eluyente utilizado fue agua deionizada pH 5.6 y las fracciones recolectadas fueron de 2 ml.

$V_T = 185$  ml                       $V_o = 60$  ml                       $V_i = 126$  ml

Con estos datos se procedió a analizar el comportamiento del sobrenadante de uno de los lotes estudiados (2C-S) en cada una de las columnas de sephadex G-50, G-75 y G-100, cuyos resultados se presentan en las Figuras Nos. 7, 8 y 9. En las tres, la sustancia se separó en dos fracciones (I y II), de las cuales la que corresponde al volumen externo fue la más abundante mientras que la que se eluyó en el volumen interno fue muy escasa. La separación de ambas fracciones fue mejor en el sephadex G-50, por lo que se decidió utilizar este sephadex en subsecuentes separaciones.

Sin embargo, como el sobrenadante tuvo que mantenerse durante tres semanas en el cuarto frío, se observó que con el tiempo las proporciones de ambas fracciones se invertían, por lo que debe suponerse que las proteínas conservadas en solución terminaron por fragmentarse.

En la Figura No. 10 que corresponde a una columna de 2.5 x 87 cm con sephadex G-50, se presenta el comportamiento de elución del mismo sobrenadante (2C-S) en línea continúa y el de la insulina marcada con  $I^{125}$  (101, 585 c. p.m.) en línea discontinua.

Como puede observarse las moléculas pequeñas (fracción II) coincidieron con las de la insulina. Las otras dos fracciones de la línea discontinua corresponden a la molécula de insulina fragmentada y al yodo libre.

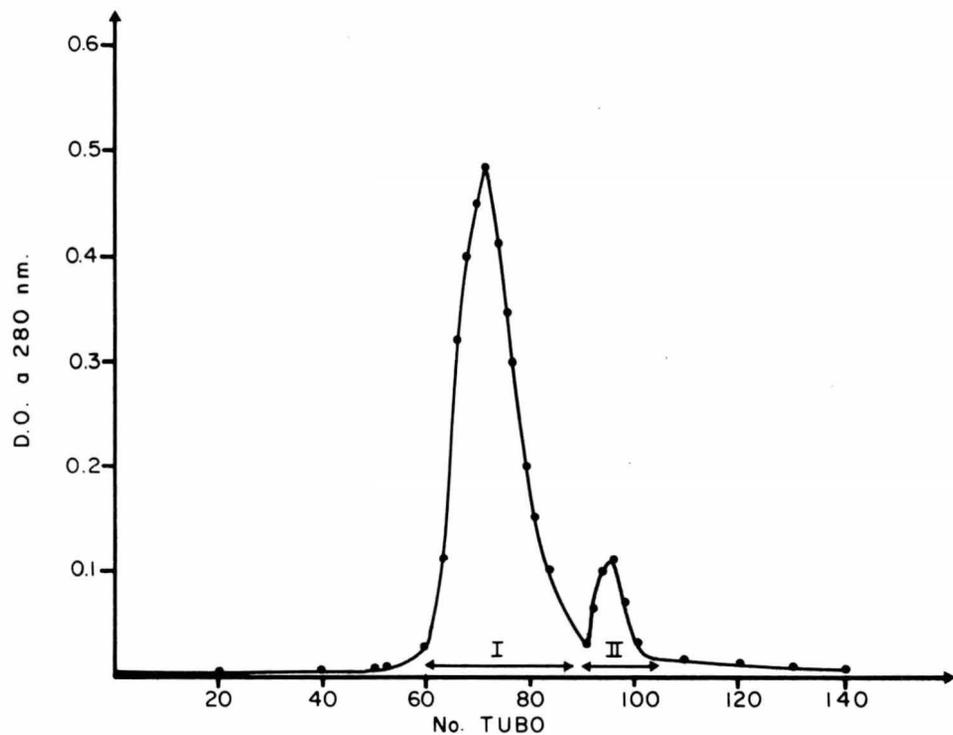


Figura No. 7.- Filtración en Sephadex G-50 de 10 ml del sobrenadante - - del lote No. 2 (2C-S), en columna de 2.5 x 37.8 cm , con  $V_T = 185.5$  ml ,  $V_o = 60$  ml y  $V_i = 120$  ml . Las fracciones-recolectadas fueron de 2 ml y el eluyente utilizado fue agua deionizada pH 5.6 .

I :  $V_e = 144$  ml

$K_{av}$  de I = 0.67

II :  $V_e = 192$  ml

$K_{av}$  de II = 1.10

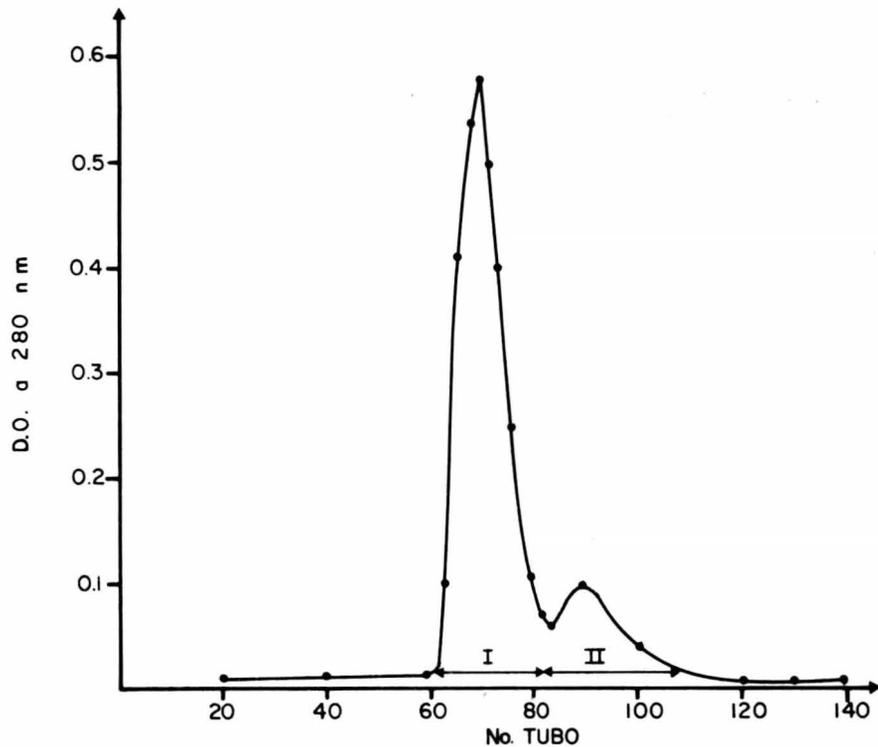


Figura No. 8.- Filtración en Sephadex G-75 de 10 ml del sobrenadante del lote No. 2 (2C-S), en columna de 2.5 x 37.8 cm, con  $V_T = 185.5$  ml,  $V_o = 60$  ml y  $V_i = 126$  ml. El eluyente utilizado fue agua deionizada pH 5.6 y las fracciones recolectadas fueron de 2 ml.

I :  $V_e = 142$  ml

Kav de I = 0.66

II :  $V_e = 180$  ml

Kav de II = 0.96

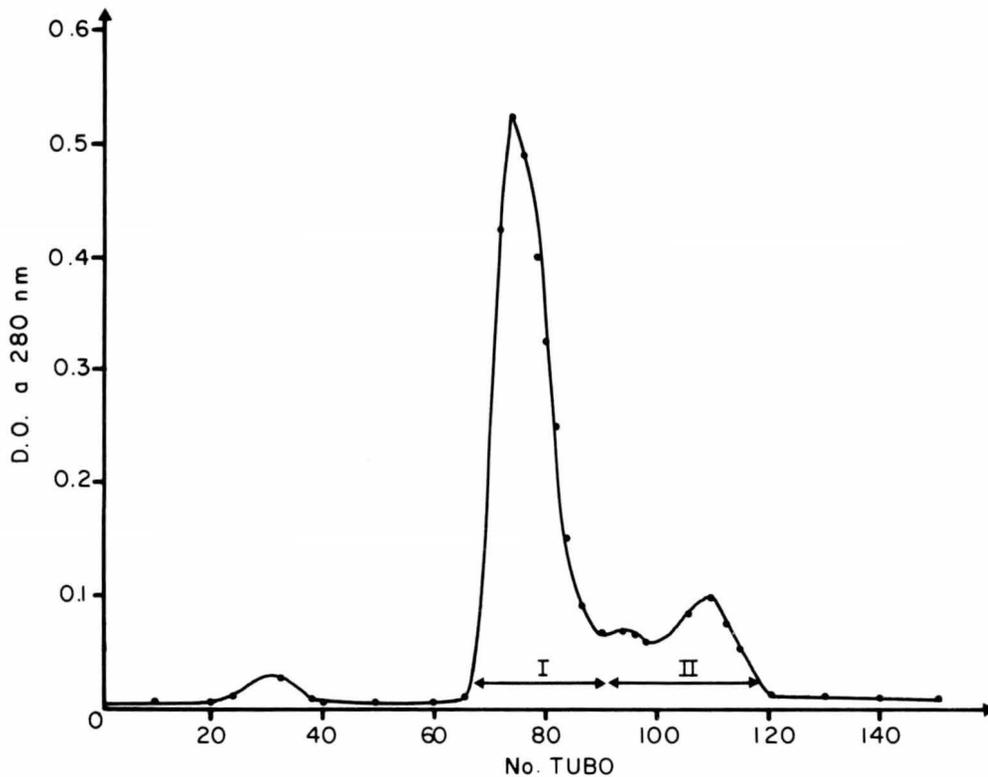


Figura No. 9.- Filtración en SEphadex G-100 de 10 ml del sobrenadante - del lote No. 2 (2C-S), en columna de 2.5 x 37 cm, con -  $V_T = 181.3$  ml,  $V_o = 60$  ml y  $V_i = 84$  ml. El eluyente utilizado fue agua deionizada pH 5.6 y las fracciones recolectadas fueron de 2 ml.

I :  $V_e = 150$  ml

$K_{av}$  de I = 0.72

II :  $V_e = 220$  ml

$K_{av}$  de II = 1.30

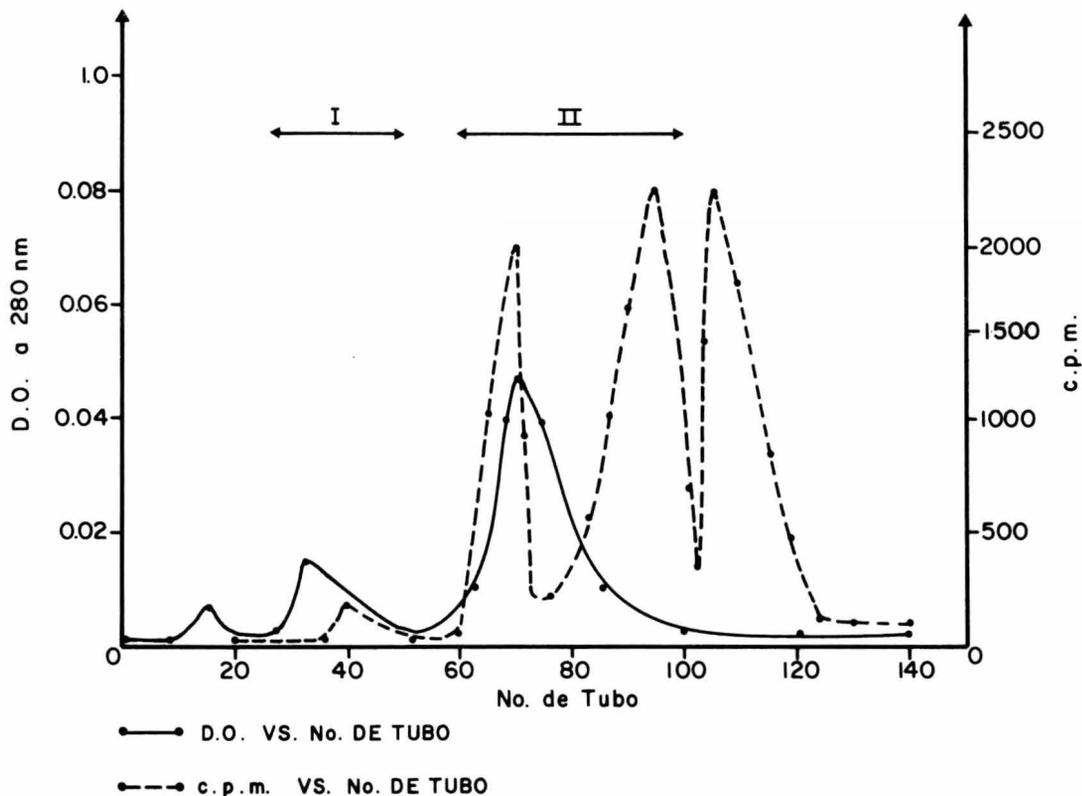


Figura No. 10.- Filtración en Sephadex G-50 de 22 ml del sobrenadante del lote No. 2 (2C-S) que contenía 1.0 ul de Insulina marcada con  $^{125}$ I, en columna de 2.5 x 90 cm, con  $V_T = 477.8$  ml,  $V_o = 150$  ml y  $V_i = 280$  ml. El eluyente utilizado fue agua deionizada pH 5.6 y las fracciones recolectadas fueron de 5 ml.

I :  $V_e = 165$  ml

$K_{av}$  de I = 0.05

II :  $V_e = 350$  ml

$K_{av}$  de II = 0.61

Los resultados de este último experimento orientaron a explorar la fracción II como fuente probable de la calcitonina buscada.

En la figura No. 11 se presentan los patrones de filtración en sephadex de los lotes 1C, 2C y 4Q en la que se observa que el patrón de elución de cada una de las fracciones no fue estrictamente reproducible aunque sí realizó separación de dos fracciones esperadas.

Ya que los lotes 1C y 2C sirvieron para explorar cada uno de los pasos de la técnica, los resultados correspondientes a la ultrafiltración y a la cromatografía de intercambio iónico fueron muy pobres tanto en el rendimiento del polvo como en concentración de proteína. Los resultados que se presentan a continuación corresponden a los lotes 3C y 4Q que se trabajaron normalmente a lo largo de toda la técnica y en el tiempo adecuado.

Para un mejor entendimiento de la técnica en ambos casos a continuación se presentan los esqueñas (2 y 3) de la técnica para cada lote.

Como puede observarse mientras que el lote 4Q pasó por filtración en sephadex, ese paso se omitió en el lote 3C, por las razones que posteriormente serán indicadas.

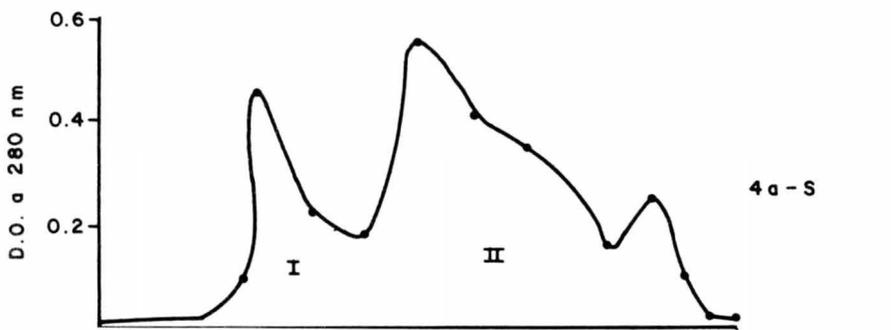
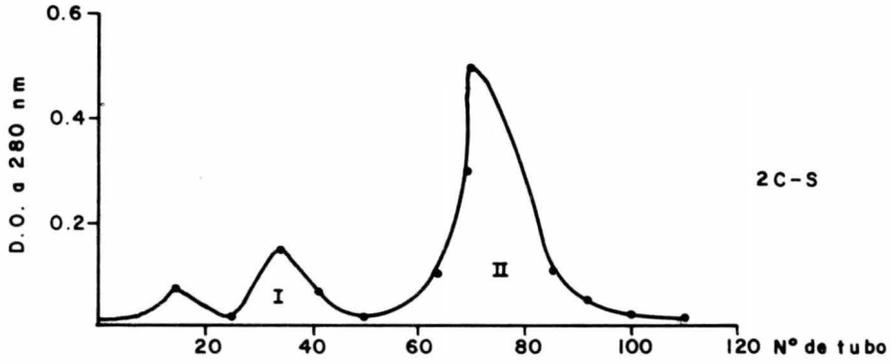
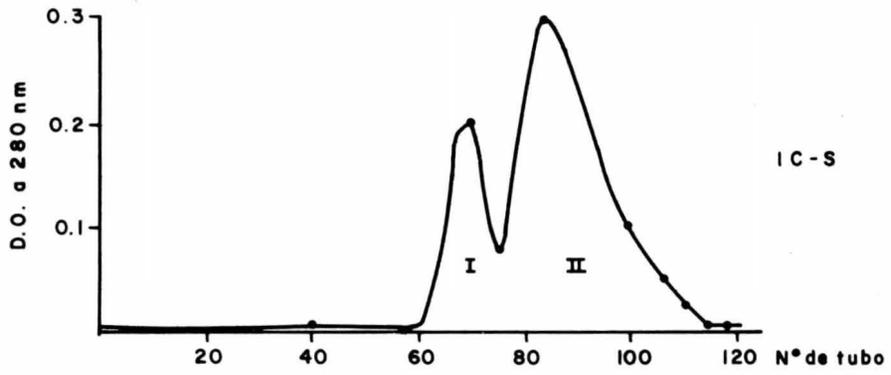
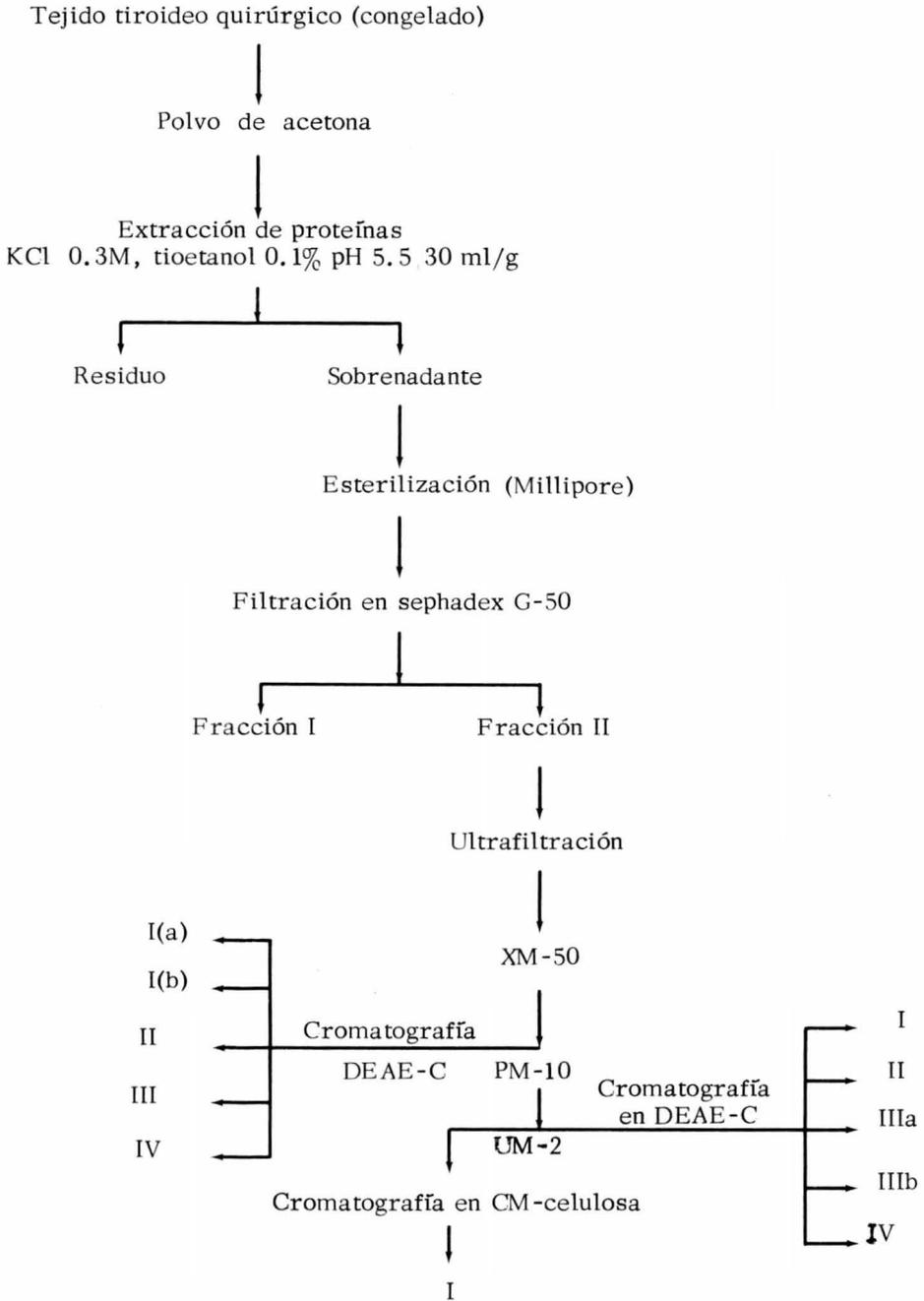


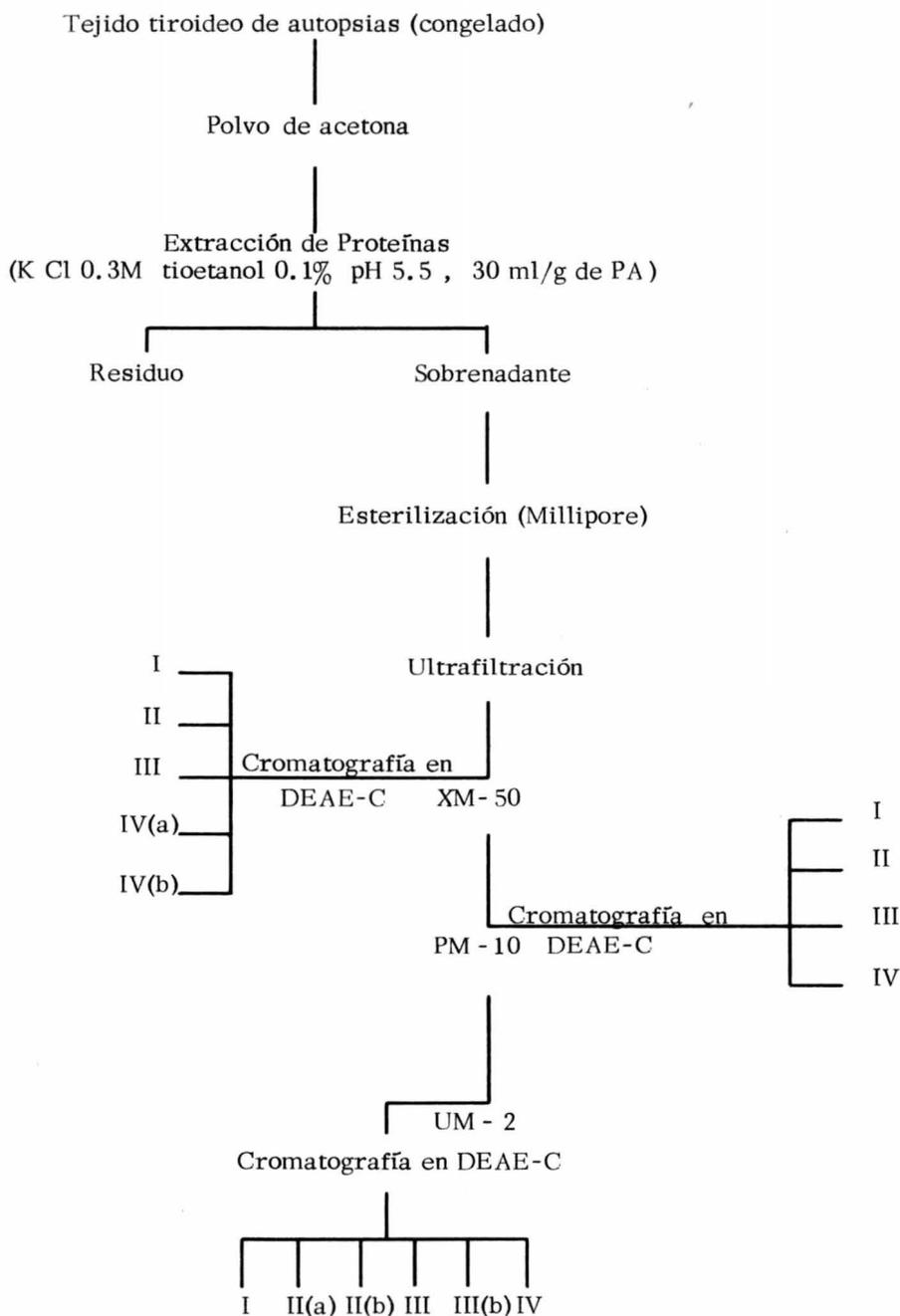
FIGURA NO . 11

2.- ESQUEMA DE EXTRACCION Y PURIFICACION DEL LOTE 4Q



Las fracciones en cada una de las etapas y productos finales se obtuvieron como polvos dializados y liofilizados.

### 3.- ESQUEMA DE EXTRACCION Y PURIFICACION DEL LOTE 3C



Las fracciones en cada una de las etapas y productos finales se obtuvieron como polvos dializados y liofilizados.

## X.- Ultrafiltración .

En la table No. 15 se presentan los rendimientos en polvo de los lotes 4Q y 3C. Puede observarse que fue mayor para el 3C (24.5 g) lo que se debe a que en ese lote el sobrenadante no pasó por sephadex G-50. En cambio, los productos del lote 4Q provenían de la fracción II del sephadex (9.2 g) que no contenía los elementos de la fracción I.

Conviene hacer notar que el rendimiento de las moléculas pequeñas (3CS-PM 10 y UM-2) fue menor en el material que no pasó por sephadex, mientras que cuando el producto inicial era ya de moléculas pequeñas, como era el caso del lote 4Q (PM-10 y UM-2), el rendimiento de estas moléculas aumentó.

Por otro lado, tanto en el lote 3C como en el 4Q la concentración de proteína fue muy parecida, a excepción de las proteínas concentradas sobre la membrana de PM-10, que fue superior en el lote 4Q.

## XI.- Cromatografía de intercambio iónico .

Los datos de cromatografía que a continuación se presentan se limitan a la DEAE-C, en la cual la fracción activa es la primera en ser eluida, según los datos de la literatura. La cromatografía de intercambio catiónico

PRODUCTOS DE ULTRAFILTRACION

ETAPAS DE PURIFICACION	PESO DEL POLVO (g)	RENDIMIENTO (%)	PROTEINAS ( $\mu$ g/mg de polvo)
4QS - II	9.2	100	720
S - II - XM - 50	3.2	35	850
<u>S - II - PM - 10</u>	1.2	13	980
S - II - UM - 2	0.4	4	450
3C - S	24.5	100	860
<u>S - XM - 50</u>	16.8	68	825
S - PM - 10	0.7	3	590
S - UM - 2	0.1	0.5	426

Los productos subrayados corresponden a las fracciones con actividad biológica.

(CM-C) también se utilizó como primer paso de este tipo de cromatografía, para lo cual se utilizó la fracción de la membrana UM-2 del lote quirúrgico. En vista de que el resultado sobre este intercambiador iónico no dió una aceptable separación, todo el trabajo posterior se hizo - en DEAE-C.

Como queda señalado en los esquemas (2 y 3) que corresponden a la técnica total de cada uno de los lotes - (3C y 4Q) los productos de ultrafiltración en cada una de las membranas se llevaron al intercambio iónico.

La figura No. 12 muestra comparativamente el patrón cromatográfico de los productos concentrado sobre UM-2. Puede observarse que aunque tuvieron patrones muy similares, existió una mejor individualización de las proteínas cuando ellas provenían del sobrenadante total (3C-S-UM-2) que no pasó por filtración en sephadex. Esto sugirió que existía un mayor número de fracciones proteicas en el - 3C-S-UM-2, que en el 4Q-S-II-UM-2.

La comparación de los resultados correspondientes a - lo concentrado sobre membrana PM-10 que se presenta en la figura No. 13, demuestra que cuando el material era - quirúrgico y procedía de la fracción II del sephadex se - obtuvieron dos fracciones de escasa retención (Ia y Ib) que no aparecieron cuando el material procedía de cadáver -

## EXTRACCION DE PROTEINAS

MATERIAL	EXTRACCION	PA g	S g	S %	R g	R %
<u>Cadáveres:</u>						
1C-PA-S (Acetona)	Cloruro de Potasio	6.5	750.0*	--	--	--
2C-PA-S (Congelación)	Cloruro de Potasio	4.1	690.0*	--	0.78	19.2
3C-PA-S (Congelación)	Cloruro de Potasio	36.0	24.5	68.0	4.38	12.1
9C-B-PA-S (Congelación)	Butanol	40.0	0.5	1.2	36.00	90.0
<u>Quirúrgicos:</u>						
4Q-PA-S (Congelación)	Cloruro de Potasio	30.7	21.0	67	10.10	32.9

\* - ml.

Rendimientos en polvo de los productos obtenidos por extracción con cloruro de potasio y butanol.

y del sobrenadante total.

Finalmente en la figura No. 14 se presenta el patrón - cromatográfico del producto concentrado de XM-50 que provenía del sobrenadante total y que no puede compararse - con su equivalente en material quirúrgico porque éste no - llegó a realizarse.

La comparación de todos y cada uno de estos productos entre sí señala que el sistema fue capaz de separar hasta cinco grupos de proteínas y que existió una clara diferencia entre los productos que procedían de la membrana PM-10 según provinieran de cadáver o material quirúrgico.

En la tabla No. 16 se observan los rendimientos (peso de los polvos) de las fracciones de ultrafiltración cuando - se llevaron a la cromatografía de intercambio aniónico - - (DEAE-C). Es evidente que el rendimiento de las moléculas pequeñas que se concentraron sobre UM-2 fue el mismo independientemente de su procedencia; esto no sucedió con la fracción que se concentró en PM-10 que fue de - 24% para el material que provenía de cadáveres y de 11% para el quirúrgico. Es claro también que el mayor rendimiento en % lo dió la fracción retenida en XM-50, que en el caso de material de autopsia fue un resultado experimental mientras que en el quirúrgico el cálculo fue teórico, obtenido por diferencia.

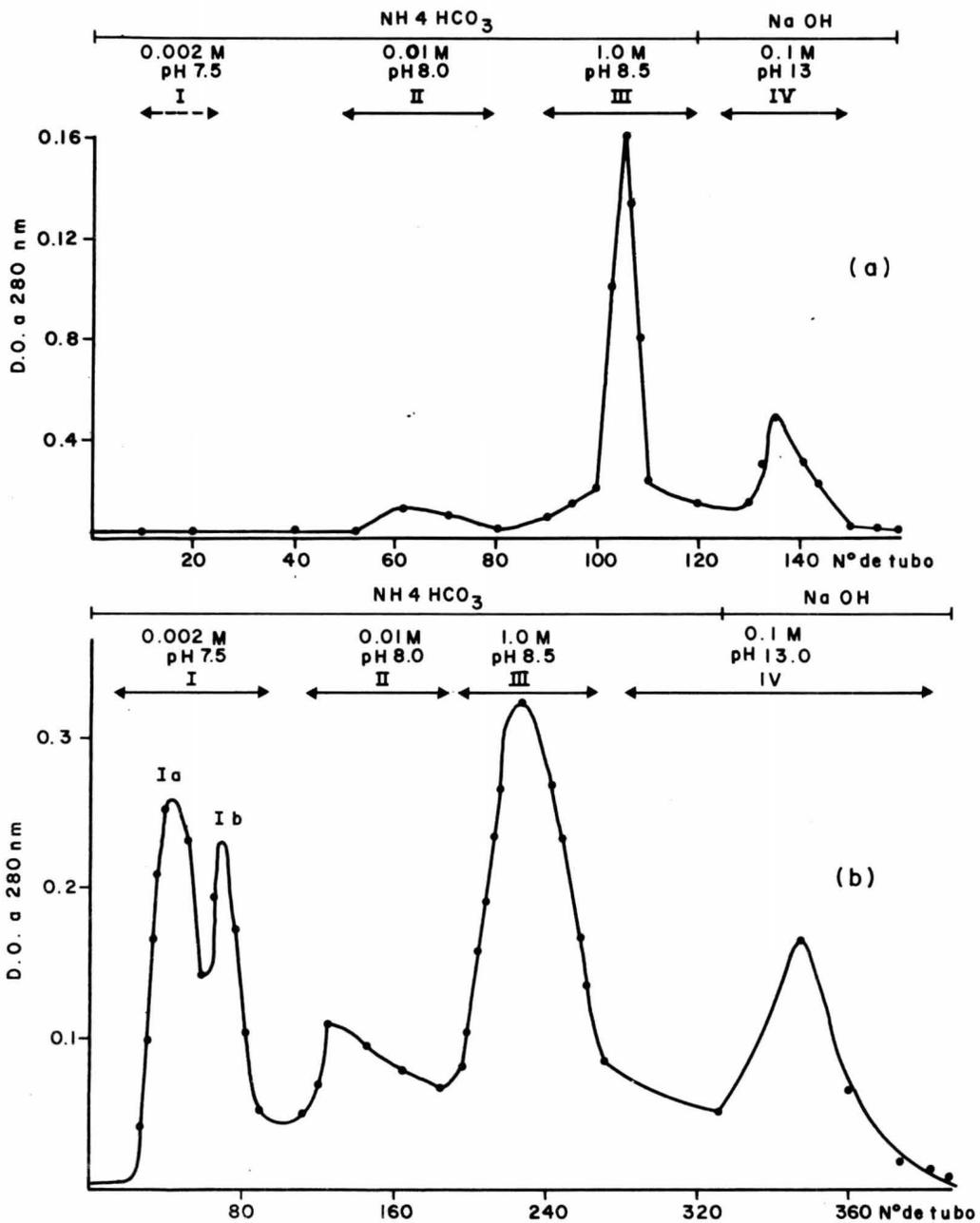


FIGURA NO. 13

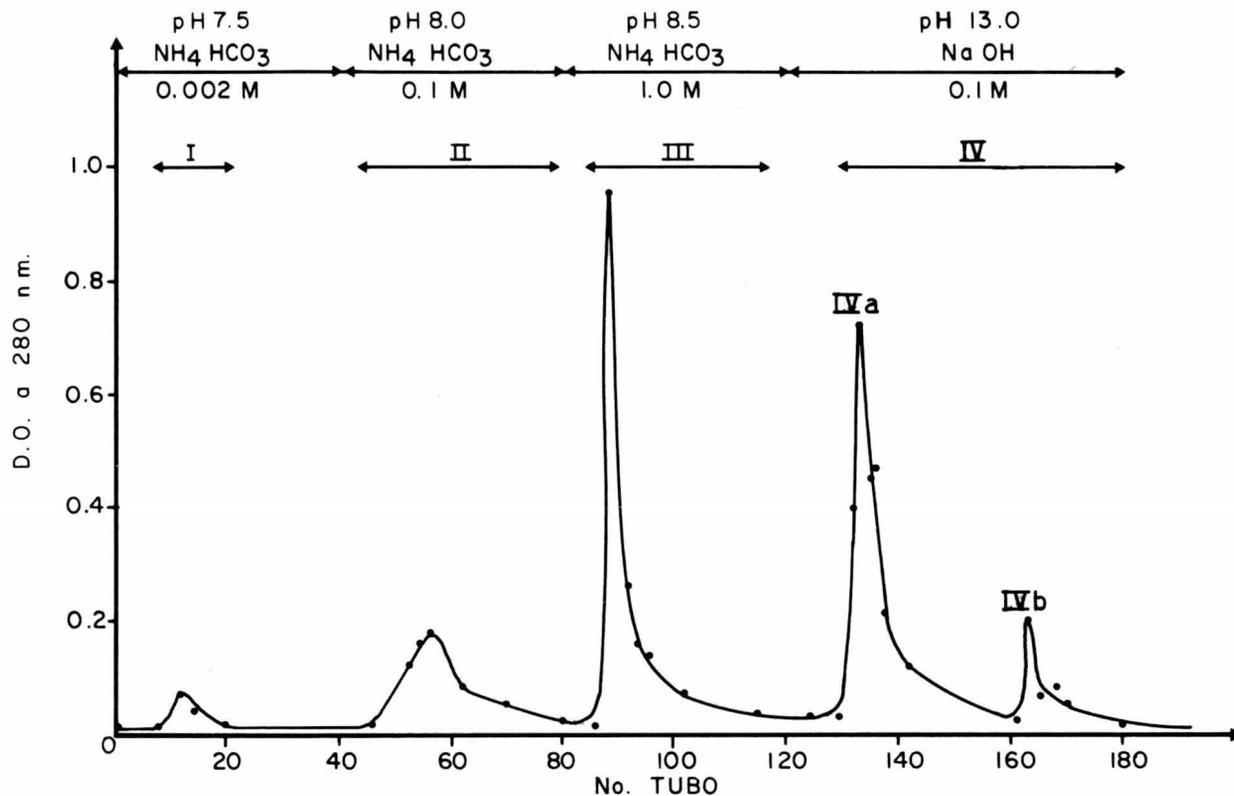


Figura No. 14.- Patrón de elución en DEAE-C de 200 mg del polvo 3C-S-XM-50, en columna de 1.9 x 23 cm con  $V_T = 65.2$  ml, desarrollada con amortiguador de bicarbonato de amonio. Las fracciones recolectadas fueron de 5 ml.

PRODUCTOS DE CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO  
 RENDIMIENTO DE LAS FRACCIONES DE ULTRAFILTRACION  
 PESO DE LOS POLVOS

MATERIAL	PRODUCTO DE UF (mg)	FRACCIONES DE CROMATOGRAFIA				RECUPERACION %
		I	II	III	IV	
<u>Cadáveres</u>						
3C-S--UM-2-DEAE	64	1	1(a) 1(b)	1(a) 1(b)	1	9
3C-S--PM-10-DEAE	655	-	57	90	13	24
3C-S--XM-50-DEAE	<u>16,800</u>	<u>1,750</u>	1,250	6,700	1,600(a) 355(b)	69
<u>Quirúrgicos</u>						
4Q-S-II-UM-2-DEAE	365	1	7	7(a) 7(b)	2	7
4Q-S-II-PM-10-DEAE	1,150	<u>53(a)</u> <u>10(b)</u>	1	41	23	11
*4Q-S-II-XM-50-DEAE	3,200	-	-	-	-	(82)**

\* Este producto no se llevó a cromatografía de intercambio iónico.

\*\* Cálculo teórico

Las cifras subrayadas corresponden a los productos con actividad biológica.

El análisis de la concentración de proteína de los mismos productos muestra (tabla No. 17), que después de la cromatografía, ésta fue menor que el producto de donde procedía y demuestra también que el sistema cromatográfico separó el mismo tipo de moléculas independientemente de la fracción de ultrafiltración de que derivaron.

Hasta ahora se ha informado el rendimiento de cada producto a partir del que le precedió y en las tablas Nos. 18 y 19 se tiene el rendimiento en peso de polvo y proteína para todos los productos, pero en este caso relacionados al polvo de acetona original, que se consideró como el 100%. La tabla No. 18 sugiere que el rendimiento de la fracción activa fue mayor para el material que procedía de autopsia. Sin embargo, debe recordarse que del material quirúrgico sólo se tomó para purificación en intercambio iónico la fracción II de la filtración en sephadex y es probable que si se hubiera procesado la fracción I hubiera aportado un mayor rendimiento de principio activo.

En cambio en la tabla No. 19 puede notarse que la fracción activa en cromatografía de intercambio iónico del material quirúrgico fue más rico en proteínas que el de autopsia, que no fue fraccionado por sephadex.

PRODUCTOS DE CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

M A T E R I A L	PROTEINA EN EL $\mu$ g/mg de polvo	CONCENTRACION DE PROTEINAS EN FRACCIONES DE CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO			
		I	II	III	IV
<u>Cadáveres</u>					
3C-S--UM-2-DEAE	426	108	25(a) 256(b)	376(a) 85(b)	212
3C-S--PM-10-DEAE	590		250	280	400
3C-S--XM-50-DEAE	<u>825</u>	<u>250</u>	720	710	540(a) 560(b)
<u>Quirúrgico</u>					
4Q-S-II-UM-2-DEAE	450	342	214	512(a) 450(b)	430
4Q-S-II-PM-10-DEAE	980	<u>620</u> (a) <u>300</u> (b)	150	500	540

Las cifras subrayadas corresponden a los productos con actividad biológica.

PESO Y RENDIMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE LOS LOTES  
3C Y 4Q

ETAPAS DE PURIFICACION	AUTOPSIA		QUIRURGICO	
	3C ( 171.5 g )		4Q ( 180.0 g )	
	g	%	g	%
Polvo de acetona	36.0	100	30.7	100
Sobrenadante	24.5	68	21.7	67
Residuo	4.4	12	10.1	32
S-I			<u>2.1</u>	7
S-II			9.2	30
S-XM-50	<u>16.8</u>	47		
S-PM-10	0.7	2		
S-UM-2	0.1	0.3		
S-II-XM-50			<u>3.2</u>	11
S-H-PM-10			1.2	4
S-II-UM-2			0.4	1
S-XM-50-DEAE-C-I	<u>1.7</u>	5		
-DEAE-C-II	1.2	3		
-DEAE-C-III	6.7	19		
-DEAE-C-IV(a)	1.6	4		
-DEAE-C-IV(b)	0.4	1		
S-PM-10-DEAE-C-II	0.057	0.16		
-DEAE-C-III	0.090	0.25		
-DEAE-C-IV	0.13	0.36		
S-UM-2 -DEAE-C-I	< 0.001	0.003		
-DEAE-C-II(a)	< 0.001	0.003		
-DEAE-C-II(b)	< 0.001	0.003		
-DEAE-C-III(a)	< 0.001	0.003		
-DEAE-C-III(b)	< 0.001	0.003		
-DEAE-C-IV	< 0.001	0.003		
S-II-PM-10-DEAE-C-I(a)			<u>0.053</u>	0.170
-DEAE-C-I(b)			0.010	0.033
-DEAE-C-II			< 0.001	0.003
-DEAE-C-III			0.091	0.133
-DEAE-C-IV			0.023	0.075
S-II-UM-2-DEAE-C-I			< 0.001	0.003
-DEAE-C-II			0.007	0.023
-DEAE-C-III(a)			0.007	0.023
-DEAE-C-III(b)			0.007	0.023
-DEAE-C-IV			0.002	0.007

Las cifras subrayadas corresponden a las fracciones con actividad biológica. Los rendimientos de los polvos están referidos al polvo de acetona considerado como el 100 %. El rendimiento del polvo de acetona a partir del tejido tiroideo es del 21 % para el lote 3C y del 17 % para el lote 4Q.

CONCENTRACION DE PROTEINA EN LOS PRODUCTOS  
DE LOS LOTES 3C y 4Q

ETAPA DE PURIFICACION	AUTOPSIA	QUIRURGICO
	3C µg/mg polvo	4Q µg/mg polvo
Polvo de acetona	490	540
Sobrenadante	860	674
Residuo	115	90
S-I		<u>880</u>
S-II		<u>720</u>
S--XM-50	<u>825</u>	
S--PM-10	<u>590</u>	
S-UM-2	426	
S--II-XM-50		850
S--II-PM-10		980
S--II-UM-2		450
S-XM-50-DEAE-C-I	<u>250</u>	
DEAE-C-II	<u>720</u>	
DEAE-C-III	710	
DEAE-C-IV (a)	540	
DEAE-C-IV (b)	560	
S-PM-10- DEAE-C-II	250	
DEAE-C-III	280	
DEAE-C-IV	400	
S-UM-2-DEAE-C-I	108	
DEAE-C-II (a)	25	
DEAE-C-II (b)	256	
DEAE-C-III (a)	376	
DEAE-C-III (b)	85	
DEAE-C-IV	212	
S-II-PM-10-DEAE-C-I (a)		<u>620</u>
DEAE-C-II (b)		<u>300</u>
DEAE-C-III		150
DEAE-C-III		500
DEAE-C-IV		540
S-II-UM-2-DEAE-C-I		342
DEAE-C-II		214
DEAE-C-III (a)		512
DEAE-C-III (b)		450
DEAE-C-IV		430

Las cifras subrayadas corresponden a los productos con actividad biológica

## XII.- Actividad de los productos por bioensayo:

Los resultados de la parte experimental para conocer la dosis de los extractos que debieran aplicarse para obtener una respuesta hipocalcémica se presenta en la tabla No. 20 en la cual los decrementos de calcio se expresan tanto en mg/100 ml como en %. Es evidente de estos resultados, que las dosis adecuadas oscilaron entre 14 y 28  $\mu$ g de proteína del producto activo. Los mismos resultados se expresan en la figura No. 15 en la cual se observa la respuesta lineal descendente, desde los 5 a los 20  $\mu$ g de proteína. Además por encima de esa dosis la respuesta fue ascendente hasta alcanzar niveles superiores a los del control.

Los resultados se graficaron en papel semilogarítmico para tener una curva de respuesta-logaritmo de la dosis, que es la forma habitual de expresar los resultados de los bioensayos.

Debido a que la cepa de rata Sprague-Dowley ya no estuvo disponible en el Bioterio y en cambio la cepa Long-Evans existía en abundancia, y era la única disponible para el bioensayo, hubo necesidad de hacer un estudio comparativo de ambas cepas con uno de los productos activos (3C-S-XM-50). Los resultados de este estudio se presentan en la tabla No. 21, la que demuestra que a - -

ESTUDIO DE LA DOSIS

Producto Estudiado	Proteína aplicada μg/0.5 ml.	Concentración de Ca en suero		Decremento de Ca		
		Control mg/100 ml.	Problema mg/100 ml.	mg/100 ml.	%	
		$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	
		9.6 ± 0.45				
4Q - S - I	5			9.8 ± 0.23	+0.2	2
	7			9.5 ± 0.34	-0.1	1
	10			9.6 ± 0.36	0.0	0
	14			8.6 ± 0.50	-1.0	10
	20			7.9 ± 0.60	-1.7	17
	21			8.4 ± 0.30	-1.2	12
	28			8.6 ± 0.30	-1.0	10
	40			9.0 ± 0.60	-0.6	6
			10.4 ± 0.66			
		86			9.8 ± 0.60	-0.6
	171			10.5 ± 0.26	+0.1	1

TABLA NO. 20

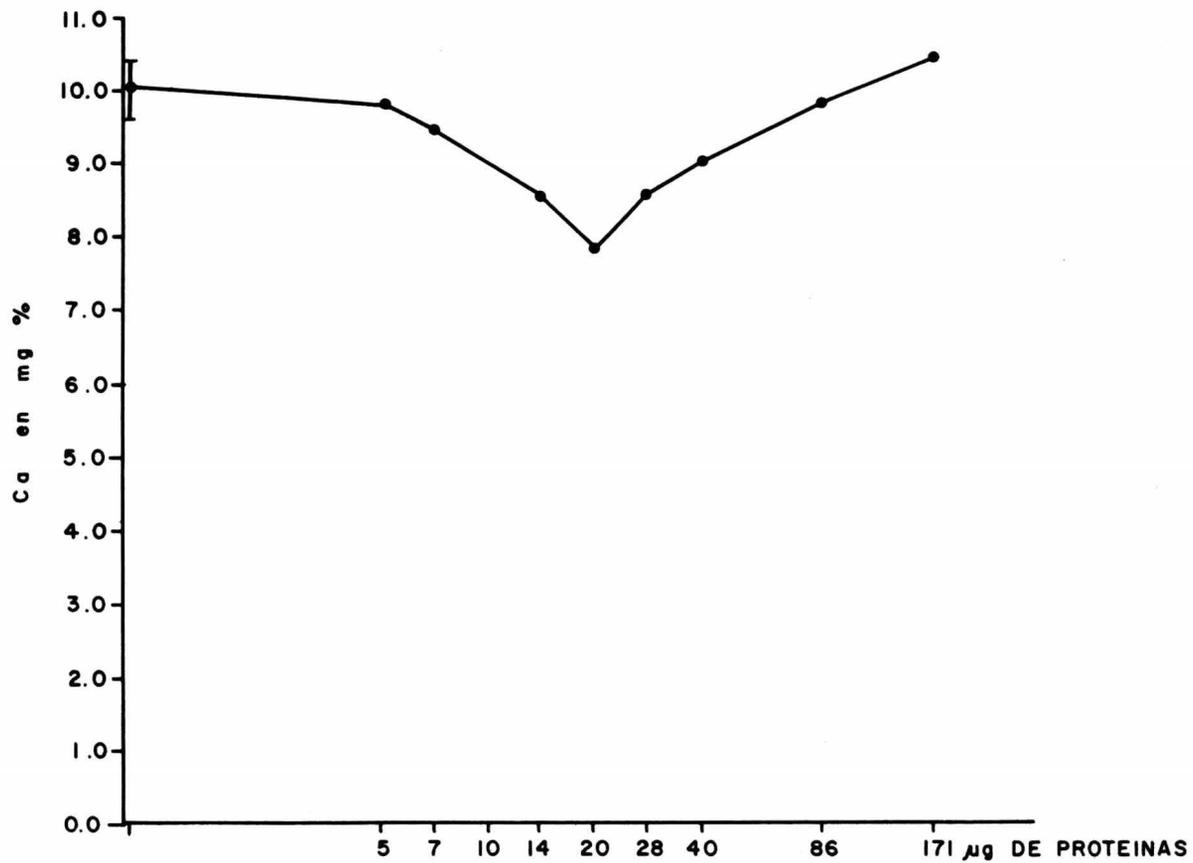


Figura No. 15.- Respuesta hipocalcémica del polvo 40-S-I a las diferentes dosis.

BIOENSAYO DE CALCITONINA

Productos estudiados	Proteína aplicada μg/0.5 ml	Concentración de Ca en suero		Decremento de Ca		
		Control	Problema	mg/100 ml	%	
		X	✓	X	✓	
		9.2 ± 0.36				
3C-S-XM-50 (S D.)	7			8.2 ± 0.80	-1.0	11
	14			7.8 ± 0.30	-1.4	15
	21			8.4 ± 0.75	-0.8	9
	28			9.2 ± 0.71	-0.0	0
		9.9 ± 0.36				
3C-S-XM-50 (L.E.)	7			7.8 ± 0.21	-2.1	21
	14			7.3 ± 0.54	-2.6	26
	21			7.0 ± 0.23	-2.9	29
	28			7.5 ± 0.33	-2.4	24

Comparacion de la respuesta al producto hipocalcemiante de las cepas Sprague-Dawley (S D.) y Long-Evans (L.E.).

igualdad de dosis la respuesta fue más aparente en la rata Long-Evans.

Los resultados que se presentan a continuación se practicaron en esta cepa.

En la tabla No. 22 se presentan los resultados de la actividad biológica de los tres productos de diferentes niveles de pureza del lote 4Q que demuestra que el producto de cromatografía (4Q-S-II-PM-10-DEAE-I), fue el más activo a las dosis progresivamente crecientes.

La actividad biológica de los productos que procedían de autopsia, que no pasaron por sephadex y concentrados sobre membrana XM-50 puede observarse en la tabla No. 23 en la cual la comparación del primero con el tercero (3C-S-XM-50 vs 3C-S-XM-50-DEAE-I), indica que éste último fue más activo que el primero. El producto intermedio (3C-S-XM-50-DEAE-I\*), que es el mismo que el tercero pero cuyo bioensayo se realizó directamente con el producto eluído de la columna y que por lo tanto no pasó por dialisis ni liofilización, mostró una mayor actividad, lo que indica que la actividad disminuyó cuando las proteínas fueron sometidas a esos procedimientos.

Los resultados de estas dos últimas tablas no pueden compararse estrictamente, ya que el lote 4Q solo comprende de la segunda fracción obtenida del sephadex, mientras que el 3C corresponde a todas las moléculas provenientes de la extracción.

BIOENSAYO DE CALCITONINA

Productos estudiados	Proteína aplicada µg/0.5 ml.	Concentración de Ca en suero		Decremento de Ca	
		Control mg/100 ml.	Problema mg/100 ml.	mg/100 ml.	%
		$\bar{x}$	$\bar{r}$	$\bar{x}$	$\bar{r}$
4Q-S-I-	7	9.6 ± 0.45	9.5 ± 0.34	-0.1	1
	14		8.6 ± 0.50	-1.0	10
	21		8.4 ± 0.30	-1.2	12
	28		8.6 ± 0.30	-1.0	10
4Q-S-II-XM-50	7	9.4 ± 0.10	8.7 ± 0.10	-0.7	7
	14		8.8 ± 0.10	-0.6	6
	21		8.5 ± 0.10	-0.9	10
	28		8.4 ± 0.10	-1.0	11
	34	9.0 ± 0.35	8.7 ± 0.32	-0.3	3
4Q-S-II-PM-10- DEAE-I	7	10.5 ± 0.41	9.4 ± 0.70	-0.6	11
	14		9.3 ± 0.60	-0.7	11
	21		8.7 ± 0.14	-1.3	17
	28		8.6 ± 0.01	-1.4	18

Efecto hipocalcemiante de los productos estudiados en el lote 4Q  
en suero de rata.

BIOENSAYO DE CALCITONINA

Productos estudiados	Proteína aplicada µg/0.5 ml.	Concentración de Ca en suero				Decremento de Ca	
		Control		Problema		mg/100ml.	%
		$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$		
		9.1 ± 0.36					
3C-S-XM-50	7			8.2 ± 0.80		-1.0	11
	14			7.8 ± 0.30		-1.4	15
	21			8.4 ± 0.75		-0.8	9
	28			9.2 ± 0.71		-0.0	0
		10.8 ± 0.46					
3C-S-XM-50- DEAE-I*	12			9.5 ± 0.80		-1.3	12
	25			8.9 ± 0.33		-1.9	18
	38			9.6 ± 0.28		-1.2	11
	50			8.1 ± 0.58		-2.7	25
		8.5 ± 0.20					
3C-S-XM-50- DEAE-I	7			8.5 ± 0.30		0.0	0
	14			7.4 ± 0.30		-1.1	13
	21			7.1 ± 0.32		-1.4	17
	28			7.3 ± 0.08		-1.2	14

\*Bioensayo realizado directamente de los tubos 8-22 de la cromatografía de intercambio iónico.

Efecto hipocalcemiante de los productos estudiados en el lote 3C, en suero de rata.

Aunque a todos los productos de los lotes procesados se les practicó bioensayo, sólo se tomaron en cuenta aquellos que produjeron un decremento de calcio mayor de 1 mg en alguna de las dosis y que tuviera un efecto progresivo decreciente. Este criterio se basó en los datos de la literatura y porque 1 mg corresponde a 40% del rango de calcemia (8.5 - 11.0 mg/ml), observado en los controles.

El decremento máximo de la calcemia observado en los productos más puros, tablas 22 y 23 permite calcular que la actividad de los mismos (DEAE-I) fue de 17 mUI en 21  $\mu$ g de proteína según definición de la unidad internacional (UI) de calcitonina ( 10 mU aplicadas a ratas de 150 g de peso corporal producen una hipocalcemia de 10% (57) ).

El rendimiento de las actividades de los productos en unidades internacionales (MRC\*) por mg de polvo se presentan en la tabla No. 24 en la que puede observarse que los productos más crudos tenían una mayor actividad total y menor actividad específica, en tanto que los productos de la cromatografía de intercambio iónico, más puros, tenían, como era de esperarse, una actividad total disminuida pero una mayor actividad específica.

Finalmente en la tabla No. 25 se presentan los datos de aquellos productos que sorpresivamente tuvieron un efec

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA

PRODUCTOS	mUI (MRC) /mg de polvo
4 Q-S-I	500
4 Q-S-II-XM-50	333
4 Q-S-II-PM-10-DEAE-I	400
3 C-S-XM-50	882
3 C-S-XM-50-DEAE-I	202

MRC = Medical Research Council

10 mUI - 10  $\mu$ g de proteína que aplicada a la rata macho, de 150 g de peso corporal, produce una hipocalcemia del 10 % .

TABLA NO. 24

BIOENSAYO DE CALCITONINA

Productos estudiados	Proteína aplicada µg/0.5 ml	Concentración de Ca en suero		Decremento de Ca		
		Control $\bar{X}$	Problema $\bar{X}$	mg/100 ml	%	
IC-S-I	17	9.2 ± 1.0	10.4	0.06	+ 1.2	15
	34		10.6	0.90	+ 1.2	13
IC-S-II-PM-10	17	10.2 ± 1.0	11.2	0.60	+1.0	10
	34		9.8	0.07	- 0.4	--
IC-S-II-UM-2	17	9.2 ± 0.41	10.2 ± 0.60		+1.0	11
	34		9.6 ± 0.70		+0.4	4
	68		11.8 ± 0.33		+2.6	28
3C-S-UM-2	14	11.0 ± 0.41	11.2 ± 0.73		+ 0.1	2
	21		10.8 ± 0.32		- 0.2	--
	28		10.8 ± 0.33		- 0.2	--
	35	9.0 ± 0.57	10.3 ± 0.58		+ 1.3	13
	42		10.1 ± 0.76		+ 1.1	11
3C-S-UM-2-DEAE-IV	7	9.9 ± 0.38	9.7 ± 0.18		- 0.2	
	14		10.0 ± 0.63		+ 0.1	1
	21		10.2 ± 0.52		+ 1.3	3
	28		11.5 ± 0.79		+ 1.6	16

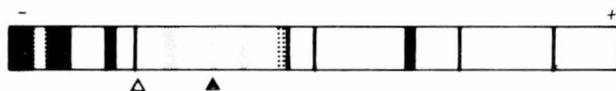
Efecto hipercalcémico de algunos productos

to hipercalcemiente. De todos ellos los de acción más importante son los que corresponden a las moléculas más pequeñas (1C-S-II-UM-2, 3C-S-UM-2) y a la fracción más firmemente unida a la DEAE-C (3C-S-UM-2-DEAE-IV).

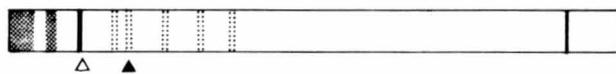
\* (MRC) Medical Research Council. Standards for bioassays and for immunoassay. División of biological standards. National Institute for Medical Research. Mill Hill, London, N.W. 3.

### XIII.- Electroforesis de los productos activos.

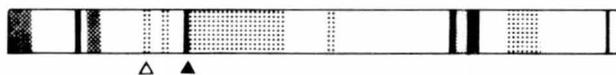
Aunque a todos los productos obtenidos a través del procedimiento, en cada uno de los lotes se les practicó electroforesis, aquí sólo se presentan los patrones correspondientes a los productos activos (3C y 4Q) que se observan en el esquema No. 4 y en el que se señalan para cada uno de ellos las bandas con el mismo Rf ( $\Delta \Delta$ ). La comparación visual de los esquemas no permite la identificación de las bandas con igual comportamiento electroforético, por lo que fue necesario determinar sus Rfs, que se presentan en la tabla No. 26 y en la que se puede observar que las únicas bandas siempre presentes en cada uno de los productos fueron la número 5 (con un Rf de 0.23 a 0.25), y la número 7 (con un Rf de 0.34 a 0.37).



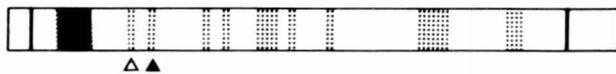
3 C - X M - 50



3 C - X M - 50 - DEAE - I



4 Q - S - I



4 Q - S - II - X M - 50



4 Q - S - II - P M - 10 - DEAE - C - I

**PRODUCTOS CON ACTIVIDAD HIPOCALCEMICA**

**ELECTROFORESIS DISCONTINUA**  
(Ornstein - Davis)

ELECTROFORESIS (Rfs)

---

Bandas	4Q-S-I	4Q-S-II-XM-50	4Q-S-II-PM-10- DEAE-I	3C-XM-50	3C-XM-50- DEAE-I
1			0.03	0.04	
2	0.09				
3	0.12	0.10		0.11	0.11
4				0.17	0.18
5	<u>0.24</u>	<u>0.24</u>	<u>0.24</u>	<u>0.23</u>	<u>0.25</u>
6	<u>0.29</u>		<u>0.27</u>	<u>0.29</u>	<u>0.31</u>
7	<u>0.36</u>	<u>0.34</u>	<u>0.37</u>	<u>0.37</u>	<u>0.34</u>
8		<u>0.44</u>	<u>0.43</u>	<u>0.43</u>	<u>0.40</u>
9		0.49	0.47		
10	0.52		0.53	0.51	0.53
11	0.55	0.56	0.57		
12			0.64		
13	0.75	0.75		0.74	0.75

---

Comparación de los Rfs de los productos con actividad biológica, en electroforesis  
discontinua

TABLA NO. 26

## DISCUSION

Este trabajo experimental ha sido un primer intento - para extraer y purificar calcitonina humana, hormona que se considera de gran interés clínico. Discutiremos separadamente cada uno de los pasos seguidos en el proceso de extracción y purificación de las glándulas.

Recolección:

La recolección de las tiroides fue relativamente fácil, ya que la estructura administrativa y el funcionamiento de los departamentos de Patología de los Hospitales del IMSS y del Departamento de Medicina Forense permiten una segura y eficiente recolección de los órganos y tejidos autorizados por el Código Sanitario. La única relativa limitación fue el tiempo necesario de espera para coleccionar suficiente material quirúrgico y/o de cadáveres.

Conservación:

La conservación de las glándulas por congelación dió - resultados discretamente superiores a las conservadas en acetona, si se valoran por el rendimiento en polvo de acetona (tabla 11) y su concentración en protefna (tabla 12). Ya que su actividad biológica fue negativa, lo que se explica - por ser un producto muy crudo, los resultados de congelación solo se pueden evaluar por el rendimiento en porciento

del peso. Este rendimiento, alrededor del 20%, fue superior al del 15% de Haymovits (24) quien deslipidizó sus -- glándulas con acetona-cloroformo, mientras que nosotros lo hicimos con acetona-éter. Los otros cinco autores (10, 11, 35, 47, 48) que han trabajado tiroides humanas no proporcionan suficientes datos que permitan comparar estos datos adecuadamente.

### Extracción:

La bondad de la técnica de extracción con KCl es aparente en la tabla 13 cuyo rendimiento en porciento del peso del polvo fue similar para el material procedente de cadáveres y quirúrgico y 56 veces mayor que lo que se obtuvo con el butanol que Riniker (35) utilizó por primera vez. No se puede valorar la extracción por su actividad biológica, ya que aunque fue negativa para nuestros productos y Riniker reporta 10 U (MRC)/mg de polvo, debe tomarse en cuenta que él utilizó tejido tiroideo muy rico en calcitonina puesto que procedía de carcinomas medulares. Desafortunadamente la técnica de extracción con butanol no se puede evaluar en pasos posteriores de purificación, por las dificultades técnicas que ya mencionados, se tuvieron en el laboratorio para evaporar el solvente.

Los resultados de la extracción (rendimiento en polvo y concentración de proteínas por miligramo de polvo) tam-

poco pudieron compararse con los de los demás autores (10, 11, 47, 48) porque sus trabajos no aportan suficientes datos para hacer la comparación de la extracción ácida de Milhaud (10) (HCl 0.1 y 0.2 N); la de Aliapoulios (11) (HCl 0.1 N); Haymovits (24) (HCl 0.2 N) y la de Barrett (48) (Urea 18M-HCl 0.1 N-Cisteina 0.1 N) cuyos medios de extracción son más ácidos que el utilizado por Elrick (52). Recientemente Burford (64) introdujo tioetanol en su medio de extracción para calcitonina de la rata, que es un componente también de nuestra mezcla de extracción, pero cuyos resultados no pueden compararse con el nuestro, porque se extrajeron de un tejido de origen animal.

#### Filtración en sephadex:

Los autores que han extraído calcitonina humana han utilizado los procedimientos de purificación (filtración en Sephadex, ultrafiltración y precipitación ácida o salina) en diferente secuencia y ninguno de ellos ha seguido el orden en que se utilizaron la filtración en Sephadex y la ultrafiltración en nuestro procedimiento. Los resultados de Riniker (35), que filtró en BIO-gel P-6 (similar en su límite de exclusión al Sephadex G-50) como primer paso después de la extracción, indican que la fracción activa estaba en la primera parte del filtrado, como sucedió en nuestro caso (4Q-S-I) (Tabla 22); sin embargo, son dife-

rentes porque la segunda fracción de nuestro Sephadex -- (4Q-S-II), aunque no mostró actividad originalmente, ésta se hizo aparente en la fracción al ser llevada a membrana XM-50 (4Q-S-II-XM-50). También se observó actividad en el producto de cromatografía de intercambio iónico (4Q S-II-PM-10-DEAE-1). Barret (47, 48), también encontró - la mayor actividad en la segunda fracción de sephadex, - aunque su recuperación de proteína (20%) fue muy baja en relación con la aquí informada (47%), (tablas 18 y 19). L Del mismo modo, su actividad fue muy escasa (6.9 mU - (MRC/mg polvo) mientras que el 4Q-S-II, que es su equivalente, no mostró actividad, aunque se hizo aparente en sus subproductos (ver tabla 22).

Puesto que la actividad hormonal quedó distribuida en las dos fracciones que separó el Sephadex, se consideró que este paso de purificación era innecesario y se suprimió en el lote de tiroides de cadáveres.

#### Ultrafiltración:

Considerando que el peso molecular de la calcitonina informado en la literatura entre 3000 y 8000, nosotros esperábamos encontrar la actividad en el producto que había pasado a través de PM-10 y se había concentrado sobre - UM-2, que teóricamente correspondía a las moléculas de

1000 a 10000 de peso molecular; sin embargo, no se encontró actividad biológica del producto, ni tampoco en sus subproductos de la cromatografía de intercambio iónico. Esto obligó a buscar la actividad en las proteínas de mayor peso molecular, como las concentradas en PM-10 en el lote quirúrgico, ya que aunque la fracción no fue activa por sí misma, uno de sus subproductos del intercambio iónico dió 18% de decremento de la calcemia (tabla 22 y 24).

Los resultados en el lote de tiroides procedentes de cadáveres (3C) solo tuvieron actividad en la fracción retenida por XM-50 y en su derivado el primer producto de la DEA E-celulosa (tablas 23 y 24). La ausencia de actividad en la fracción retenida en PM-10 sólo puede explicarse por el posible atrapamiento de moléculas pequeñas por las de mayor tamaño que teóricamente retiene la membrana XM-50. Otra posible explicación es que las proteínas tengan una mayor tendencia a polimerizarse en el cadáver que en los tejidos vivos de procedencia quirúrgica.

Estos resultados no tienen equivalente en la literatura porque no se han utilizado la ultrafiltración en las otras técnicas. Así, nuestra conclusión con respecto a este procedimiento es que es útil para separar los grupos moleculares activos.

### Cromatografía de intercambio iónico:

La cromatografía de intercambio iónico que es el último paso de purificación en nuestro procedimiento quedó limitada a la DEAE-celulosa cuyos resultados repitieron los de Barrett (48). La CM-celulosa no fue capaz de separar la calcitonina de las demás proteínas concentradas en UM-2, por lo que se le descartó muy tempranamente y ya no se le utilizó para otras fracciones de ultrafiltración. Sin embargo, no se puede asegurar que no sea útil para separar calcitonina, ya que Brewer (62) pudo separar la bovina en 1970, Bell (65) la porcina en ese mismo año y Nieto (66) purificó la de pollo con un sistema de carboximetilcelulosa.

En cuanto a la DEAE-celulosa (figuras 12, 13 y 14) cualquiera que fuera el producto aplicado, la sustancia activa fue la fracción no retenida, lo que indica que de pH 7.5 a 8 la proteína tuvo un comportamiento básico, como ya fue señalado por Barrett (48), y que estaba todavía contaminada con otras proteínas.

Razonablemente se espera que en cada paso de purificación haya una mayor concentración de proteína por mg de polvo, con la consecuente mayor concentración de la hormona protéica, como sucedió con el sobrenadante que pasó a Sephadex G-50 y membranas de ultrafiltración.

En la cromatografía de intercambio iónico (tabla 19), aunque la concentración de proteína por mg de polvo fue menor, en cada una de las fracciones, la actividad específica fue considerablemente mayor, como era de esperarse. Estos resultados son iguales a los de Nieto (66).

#### Identificación y cuantificación de proteínas:

La identificación y cuantificación de proteínas por el método de Hartree (54) modificación de la técnica de Lowry (67) dió resultados satisfactorios. Tuvo la ventaja sobre la de Lowry de aumentar la intensidad de color producido, lo que mejoró su sensibilidad. Ya que se trata de la técnica más utilizada por los grupos que trabajan proteínas tisulares, permite comparar adecuadamente nuestros resultados aunque sólo sea en la etapa inicial de deslipidización (tabla 12), porque como se explicó anteriormente, no hay una secuencia igual en las técnicas de purificación para los diferentes autores.

La demostración de la interferencia que producen los ácidos nucleicos, el ficoll y el dodecilsulfato como representante de los tres grupos importantes de material orgánico que pueden acompañar a una proteína (tabla 3), da apoyo a lo discutido en el último párrafo de la cromatografía de intercambio iónico.

### Electroforesis:

La sensible técnica de electroforesis discontinua de Ornstein y Davies (55) que permitió saber que el sobrenadante de la extracción utilizada (esquema 1) contenía todas las proteínas ya observadas en el polvo de acetona fue muy útil para localizar la presencia de dos proteínas electroforéticamente básicas (esquema 4) cuyos Rfs fueron similares para cada uno de los diferentes productos activos (tabla 25).

Su comportamiento básico en electroforesis es el mismo informado por Haymovits (24) en gel de acrilamida; por Barrett (48) en gel de almidón y por Neher (68) en placa fina. Los dos primeros autores señalaron la presencia de una sola proteína, mientras que el último informó dos proteínas básicas como en nuestro caso, que él considera son la forma monomérica y dimérica de la calcitonina.

### Determinación de calcio:

La eficiencia de la técnica de absorción atómica (56) para cuantificar calcio se consideró como muy adecuada (en base a los resultados experimentales y de estandarización (tablas 4, 5, 6, 7, 8, 9 y figuras 4 y 5) para conocer las pequeñas variaciones del calcio en el suero de la rata bajo la acción de la hormona.

Aunque las técnicas utilizadas por otros autores (10,11, 24, 35, 47, 48) no señalan la confiabilidad de sus técnicas (titulación con EDTA y fluorescencia y flamometría), los datos que informan en relación con el decremento de la calcemia en las ratas son de magnitud muy similar a los - observados en las ratas Long-Evans aquí utilizadas, lo que sugiere que sus técnicas eran adecuadas.

#### Bioensayo:

Los mejores resultados del bioensayo en la cepa de ratas Long-Evans (que para nuestro conocimiento es la primera vez que se utiliza en el bioensayo de calcitonina humana), demostraron que esta cepa es más sensible a la hormona - que la rata Sprague-Dowley (tabla 21), que también han utilizado Haymovits (24) y Barret (48).

Aunque Schlueter y Caldweel (58) que estudiaron dos cepas de ratas: la CFE y la Holtzman, concluyeron que no había diferencia de sexo en la respuesta a la calcitonina, los resultados obtenidos por nosotros (tabla 10) mostraron que - las hembras daban una respuesta más dispersa y discretamente superior a la de los machos. Es probable que esta - dispersión de la respuesta esté relacionada con las diferentes fases del ciclo sexual de la rata (63) lo que también - explica que la mayor parte de los autores prefieren las ratas machos.

La utilización de ratas en ayuno, con agua, tiene su apoyo en el mismo trabajo (58) que demuestra que las ratas en ayuno tienen una respuesta más aparente que las que mantiene su alimentación normal. Aunque el estudio para seleccionar la alimentación basal fue incompleto porque no se experimentó la respuesta a la hormona en las condiciones señaladas en la tabla 10 sino que se limitó a determinar los niveles de calcio en suero, la selección de ayuno con agua resultó afortunada como se vio de las respuestas aparentes a los productos activos.

La selección de la dosis de los extractos que debería aplicarse fue laboriosa, ya que se carecía del estándar internacional para calificar los productos, fue necesario estudiar un rango de dosis más amplio que el observado en la literatura (24) (57). Cuando se encontró el primer producto activo fue posible explorar las dosis que era necesario aplicar (tabla 20 y figura 15) encontrando que a igualdad de dosis de protefna administrada la respuesta era muy parecida a la que Haymovits (24) obtuvo en rata Sprague-Dowley con la calcitonina purificada en su laboratorio, para la cual no informó actividad porque no trabajó contra un estándar. En cambio, los decrementos de calcemia informados por Kumar (57) en ratas Piebald y con el estándar del Medical Research Council (MRC) que tiene 250 mU/10 mg, son

iguales a los aquí presentados, con dosis menores del producto aquí reportado.

La extracción y purificación de la calcitonina humana, que fue el propósito original del trabajo ha quedado demostrado a lo largo de esta exposición:

- a).- Ya que el material biológico fue de origen humano del que ya se sabe contiene la hormona buscada.
- b).- Porque la técnica de extracción es ácida, medio en que la protefna es soluble.
- c).- Porque los pasos de purificación, parcialmente similares a los de la literatura, pudieron ser adecuadamente evaluados a través de la concentración de protefnas, la electroforesis discontinua y el bioensayo.

Los rendimientos aquí informados (tabla 24) son mejores que los de Barrett (47): 39 mU/mg y (48): 66 mU/mg e iguales que los de Haymovits (24). No se pueden comparar con los de Milhaud (10) y Aliopoulios (11) porque dichos autores no porporcionan datos en sus publicaciones ni con los de Riniker (35) porque él trabajó con carcinomas medulares de la tiroides que se sabe tienen un alto contenido de calcitonina.

Puede concluirse entonces que:

- a).- La técnica de extracción de Elrick (52) que se utili-

za en nuestro laboratorio para la extracción de las hormonas hipofisarias es también para la calcitonina humana.

- b).- Es evidente que el o los productos hasta ahora obtenidos son todavía impuros (datos de concentración de proteínas y electroforesis) y por lo tanto deben someterse a otros pasos de purificación, o cambiar el orden de los hasta ahora utilizados.
- c).- Los resultados de la filtración en Sephadex G-50, la ultrafiltración y la electroforesis sugieren que la calcitonina puede encontrarse tanto en la forma monomérica como la polimérica, lo que ya fue sugerido por Neher (68).
- d).- Finalmente se informa aquí por primera vez la presencia de una sustancia hipercalcemiante en la tiroides humana, que hasta donde sabemos no ha sido informada previamente. La comprobación e identificación de dicha sustancia será tarea del futuro.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Munson, P.L.. Studies on the role of the parathyroide in calcium and phosphorus metabolism. Ann. Acad. - Sci. N. Y., 60:776 (1955).
- 2.- Munson, P.L.. In: The Parathyroids. (Eds. Grep R.O. and Talmage R.V.) pag 94. Thomas, Springfield, - Illinois (1961).
- 3.- Copp, D.H., Cameron, E.C., Cheney, B.A., Davidson, A.G.F. y Henze, K.G.. Evidence for calcitonin a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. Endocrinology, 70:638 (1962).
- 4.- Hirsch, P.F., Gauthier, G.F. y Munson, P.L.. Thyroid hypocalcemic principle and recurrent Laryngeal - nerve enjury as factors affecting the response to para thyroidectomy in rats. Endocrinology, 73:244 (1963).
- 5.- O'Dor, R.K., Parkers, C.O. y Copp, D.H.. Amino - acid composition of salmon calcitonin. Can. J. Biochem, 47:823 (1969).
- 6.- Copp, D.H., Cockcroft, D.W. y Kueh, Y.. Ultimobran- chial origin of calcitonin. Hypocalcemic effect of extracts from chicken glands. Can. J. Physiol. Pharmacol., 45: 1095 (1967).
- 7.- Gittes, R.F., Wills, S.A. y Irvin, G.L.. A new role for the parathyroid glands in calcium homeostasis. J. Urol., 97:1082 (1967).
- 8.- Hirsch, P.F., Voelkel, E.F. y Munson, P.L.. Thyro- calcitonin: hypocalcemic hypophosphatemic principle of the thyroid gland. Science, 146: (1964).



QUIMICA

- 9.- Foster, G.V., Baghdiantz, A., Kumar, M.A., Slack, E., Soliman, H.A. y MacIntyre, I.. Thyroid origin of calcitonin. *Nature* (London), 202:1303 (1964).
- 10.-Milhaud, G., Moukhtar, M.S., Bourichoun, J. y Perault, A.M.. Existence et activité de la thyrocalcitonine chez l-homme. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 261:4513 - (1965).
- 11.- Aliapoulios, M.A., Voelkel, E.F.. y Munson, P.L.. Assay of human thyroid glands for thyrocalcitonin activity. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 26:897 (1966).
- 12.-Foster, G.V., MacIntyre, I. y Pearse, A.G.E.. Calcitonin production and the mitochondrion-rich cells of the dog thyroid. *Nature*, 203:1029 (1964).
- 13.-Pearse, A.G.E.. The cytochemistry of the thyroid - C cells and their relationship to calcitonin. *Proc. - Roy. Soc. Biol.* 164:478 (1966).
- 14.-Pearse, A.G.E. y Carnevalheira, A.F.. Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cells. *Nature* (London), 214:929 (1967).
- 15.-Copp, D.H., Cockcroft, D.W. y Kueh, Y.. Ultimobranchial origin of calcitonin. Hypocalcemic effect - of extracts from chicken glands. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 45:1095 (1967).
- 16.-Galante, L., Gudmundson, T.V., Malthews, E.W., Tse, A., Williams, E.A., Woodhouse, N.J.Y. y MacIntyre, I.. Thymic and parathyroid origin of calcitonin in man. *Lancet*, ii 537 (1968).
- 17.-Hirsch, P.F. y Munson, P.L.. Thyrocalcitonin. *Physiol. Rev.*, 49:548 (1969).

- 18.- Braunstein, H. Stepheus, C.L.. Parafollicular cells of human thyroid. Arch. Path. (Chicago), 86:659 (1968).
- 19.- Aliapoulios, M.A. y Morain, W.D.. Human thyrocalcitonin. Am. J. Surg., 117:554 (1969).
- 20.- MacMillan, P.J., Hooker, W.M. y Deftos, L.S.. - Distribution of calcitonin containing cells in the human thyroid. The Am. J. Ant., 140:73 (1974).
- 21.- Munson, P.L. y Hirsch, P.F.. Discovery and pharmacologic evaluation. Am. J. Med., 43:678 (1967).
- 22.- Milhaud, G. y Moukhtor, M.S.. Antagonistic actions of thyrocalcitonin and parathyroid hormone on the levels of calcium and phosphate in the rat. Nature, 211:1186 (1966).
- 23.- Kenny, A.D. y Heiskell, C.A.. Effect of crude thyrocalcitonin on calcium and phosphate metabolism - in rats. Proc. Soc. Exp. Med. (New York), 120:269 (1965).
- 24.- Haymovits, A. y Rosen, J.F.. Human Thyrocalcitonin. Endocrinology, 81:993 (1967).
- 25.- Friedman, J. y Raisz, L.G.. Thyrocalcitonin: inhibitor of bone resorption in tissue culture. Science, 150:1465 (1965).
- 26.- Aliapoulios, M.A., Goldhaber, P. y Munson, P.L.. Thyrocalcitonin inhibition of bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture. Science, 151:330 (1966).
- 27.- Mayer, G.P.. Calcitonin. Proc. 2nd. Int. Sympos. Pag. 386. London. Heinemann (1970).

- 28.-Lewis, P.. A suggested physiologic role of calcitonin the protection of the skeleton during pregnancy and lactation. *J. Endocr.* 49:9 (1971).
- 29.-Cushard, W.G., Creditor, M.M. y Canterburg, E.R.. Physiologic hyperparathyroidism in pregnancy. *J. Clin. Endocr.*, 34:767 (1972).
- 30.-Staehelein, M.. The calcitonin an example of unusual evolution. *J. Molec. Evol.*, 1:258 (1972).
- 31.-Bijvoet, O.L.M., Van der, S.U.J., Greven, H.M. y Schellekens, A.P.M.. In fluence of calcitonin on renal excretion of sodium and calcium: In *Calcium Parathyroid Hormone and the Calcitonins: Proc. of the fourth parathyroid conference: (Ed: Talmage, R. V. y Munson, P.L.)* pag. 284. *Excerpta Medica - Amsterdam* (1972).
- 32.-Haas, H.G., Dambacher, M.A., Guncaga. J. y Lauffenburger, T.. Effects of calcitonins and parathyroid extract on the kidney. Studies in hpoparathyroid man. In: *Calcium Parathyroid Hormone and the Calcitonins. Proc. of the fourth parathyroid conferences: (Ed. Talmage, R.V. y Munson P.L.)* pag. 299. *Excerpta Medica Amsterdam* (1972).
- 33.-Olson, B.E., Deluca, H.F. JR. y Potts, J.T.. '- Calcitonin inhibition of vitamin D. Induced intestinal calcium absorption. *Endocrinology*, 90:151 (1972).
- 34.-DeLuise, M., Martin, T.J., Grenberg, P.B. y Michelangeli, V.. Metabolism of porcine, human and salmon calcitonin in the rat. *J. Endocr.*, 53: 475 (1972).
- 35.-Riniker, von B., Neher, R., Kahnt, F.W., Byfield, P.G.H., Gudmundsson, T.V., Galante, L. y MacIntyre, I.. Human Calcitonin. I. Isolation and characterization. *Helv. Chim. Acta*, 51:1738 (1968).

- 36.-Neher, von R., Riniker, B., Rittel, W. y Zuber, H.. Human calcitonin. III. Structure of calcitonin M and D. *Helv. Chim. Acta*, 51:1900 (1968).
- 37.-Potts, J.T., Niall, H.D., Keutomann, H.T. y Lequin, R.M.. Chemistry of the calcitonin. In: *Calcium Parathyroid Hormone and the Calcitonins*. Proc. of the - fourth parathyroid conference: (Ed. Talmage, R.V. y Munson, P.L.) pag. 121. *Excerpta Medica Amsterdam* (1972).
- 38.-Baghdiantz, A., Foster, G.V., Edwards, A., Kumar, M.A., Slack, E., Soliman, H.A. y MacIntyre, I.. - Extracction and purification of calcitonin. *Nature*, 203: 1027 (1964).
- 39.-Kutsky, R.. Thyrocalcitonin. *Hand Book of Vitamins and Hormones*. pag. 185. Ed. Van Nostrand Reinhold Co. New York. (1973).
- 40.-Rivaille, P. y Milhaud, G.. Shythése in phase solide de la thyrocalcitonine humaine. *Helv. Chim. Acta*, 55:1617 (1972).
- 41.-Siaber, P., Brugger, M., Kamber, B., Riniker, B. y Rittel, W.. Human calcitonin. I.V. The synthesis of calcitonin M. *Helv. Chim. Acta*, 51:2057 (1969).
- 42.-Milhaud, G., Calmettes, C., Jullienne, D., Tharaud, D., Bloch-Michel, H., Cavailon, J.P., Coli, R. y Moukhtar, M.S.. A new chapter in human pathology. Calcitonin disorders and therapeutic use. In: *Calcium Parathyroid Hormone and the Calcitonins*. Proc. of - the fourth parathyroid conference. (Eds. Talmage, R. V. y Munson P.L.) pag. 56. *Excerpta Medica Amsterdam* (1972).
- 43.-Milhaud, G.. Utilization of thyrocalcitonin in man in normal, and pathological conditions. In: *Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin (Calcitonin)*. (Eds. Talmage, R.V. y Belange, L.F.) pag. 86. *Excerpta Medica Amsterdam* (1967).

- 44.- Milhaud, G. y Job, J.C.. Thyrocalcitonin. Effect on idiopathic hypercalcemic. *Science*, 154:794 (1966).
- 45.- Tashjian, A.H. y Munson, P.L.. Antibodies to porcine thyrocalcitonin. Effect on the hypocalcemic activity of calf, rat and monkey thyroid extracts. *Endocrinology* 77:520 (1965).
- 46.- Potts, Jr. J.T., Keutmann, H.T., Deftos, L. y Sand Niall, H.P.. The chemistry and immunochemistry of calcitonin. In: *Peptides Chemistry and Biochemistry* (Eds. Laude, S. y Weisntein, B.) Gordon and Breach Scientific Publishers, Inc. New York (1971).
- 47.- Barret, R.J. y Bell, N.H.. Partial purification of porcine and human thyrocalcitonin. *Endocrinology*, 84:647 (1969).
- 48.- Barrett, R.J., Bell, N. H., Stern, P.H. y Schlueter, P.J. . Extraction, partial purification and demonstration of biological activity of human thyrocalcitonin. *J. Clin. Endocr.* 28:734 (1968).
- 49.- Tenenhouse, A., Arnaud, C. y Rasmussen, H.. The isolation and characterization of thyrocalcitonin. - *PNAS*, 53:818 (1965).
- 50.- MacIntyre, I.. Calcitonin: a review of its discovery and an account of purification and action. *Proc. Roy. Soc. (London), Biol.*, 170:49 (1968).
- 51.- Rasmussen, H., Sze Yi-Ling, y Youny, R.. Further studies on the isolation and characterization of parathyroid polypeptides. *J. of Biol. Chem.*, 239:2852 (1964).

- 52.- Elrick, H., Yearwood-Drayton, V.D.S., Arai, Y. M. S., Leaver, F. Ph. D. y Morris, H.G.M.D.. Collection, processing and fractionation of human pituitary glands. *J. Clin. Endocr.*, 23:694 (1963).
- 53.- Arnaud, C.D. y Tsao, H.S.. Porcine calcitonin. Simple procedure for isolation in high yield. *Biochemistry*, 8:449 (1969).
- 54.- Hartree, E. F.. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.. *Anal. Biochem.*, 48:422 (1972).
- 55.- Ornstein, L. y Davis, B.J.. Disc Electrophoresis I and to, *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 121:404 (1964).
- 56.- Willis, J.B.. Determination of calcium in blood serum by atomic absorption spectroscopy. *Nature (London)*, 186: 249 (1960).
- 57.- Kumar, M.A., Slack, E., Edwards, H.A., Soliman, H., Baghdiantz, A., Foster, G.V. y MacIntyre, I.. A biological assay for calcitonin. *J. Endocr.*, 33: 469 (1965).
- 58.- Schlueter, R.J. y Caldwell, Jr. A. L.. Thyrocalcitonin: Parameters of bioassay. *Endocrinology*, 81: 854 (1967).
- 59.- Cooper, C.W., Hirsch, P.F., Toverud, S.U. y Munson, P.L.. An improved method for the biological assay of thyrocalcitonin. *Endocrinology*, 81:610 (1967).
- 60.- Fischer, L.. Introducción a la cromatografía en gel. Editorial "El Manual Moderno", S.A., México, (1975)

- 61.- Amicon Ultrafiltration. Concentrating, desalting, separating solutions and suspensions.. - Applications Manual. Publication No. 427.
- 62.- Brewer, Jr. H.B., Schlueter, R.J. y Alfred, J.P.. Isolation and characterization of bovine thyrocalcitonin. J. Biol. Chem., 245:4232 - (1970).
- 63.- Nicholas, J.S.. Experimental method and rat embryos estrous cycle. pag. 53. The Rat in the Laboratory Investigation. Farries and - Griffth. Ed. Hafner Publ. Co. N.Y. (1967).
- 64.- Burford, H.J., Ontjes, D.H., Cooper, C.W., Parlow, A.F., y Hirsch, P.F.. Purification, characterization and radioimmunoassay of thyrocalcitonin from rat thyroid gland. Endocrinology, 96:340 (1975).
- 65.- Bell, P.H., Colucci, D.F., Dziobkowski, C., Snedeker, E.H., Barg, Jr. W.F., y Paul, R.. Isolation, purification, and properties of porcine calcitonin. Biochemistry, 9:1665 (1970).
- 66.- Nieto, A. Moya, F., y Candela, J.L., Isolation and properties of two calcitonin from chicken ultimobranchial glands. Biochim, et Biophys. Acta, 322:383 (1973).
- 67.- Lowry, O.H., Rosebrounch, N.J., Farr, L. y Randall, R.J.. Protein measurement with the Folin Phenal Reagent. J. Biol. Chem., 193:265 (1951).
- 68.- Neher, R., Riniker, B., Maier, R., Byfield, P; G.H., Gudmunsson, T.V. y MacIntyre, I.. Human Calcitonin. Nature, 220:984, (1968).