

Adrenocorticotrofina

Contenido de cistina y tirosina

Por J. R. MENDIVE — Y. SALUM

Varios son los métodos que se han utilizado en la purificación de esta hormona, obteniéndose preparados que poseen otras actividades del lóbulo anterior de la hipófisis, especialmente la lactogénica. Lyons ⁽¹⁾ describió un método de obtención de prolactina en el que se separa una fracción con actividad de adrenocorticotrofina (Moon ⁽²⁾).

Esta fracción sirvió como punto de partida para varias tentativas de purificación de esta hormona (Mendive ⁽³⁾).

Se encontró más tarde que la actividad mayor estaba en el sobrenadante de la fracción de Lyons, aislando la hormona al estado puro dos grupos de investigadores: Li, Simpson y Evans ⁽⁴⁻⁵⁾ que utilizaron hipófisis ovinas como materia prima y Sayers White y Long ⁽⁶⁻⁷⁾ que emplearon glándulas porcinas.

Algunas hormonas hipofisarias aisladas de glándulas porcinas, ovinas y vacunas presentan diferencias de comportamiento físico, químico e inmunológico, como ocurre, por ejemplo, con las prolactinas de origen vacuno y ovino, que si bien tienen un punto isoeléctrico y peso molecular igual y no se distinguen desde el punto de vista inmunológico, tienen una marcada diferencia en la solubilidad en medio ácido y en el contenido de tirosina, lo mismo sucede con las hormonas luteinizantes que poseen diferente punto isoeléctrico, peso molecular, porcentaje de triptofano y propiedades inmunológicas.

Por ello hemos creído conveniente preparar la adrenocorticotrofina partiendo de hipófisis vacunas para estudiar las propiedades y compararlas con las de los preparados por Li y colaboradores y Sayers y colaboradores.

Cuando se estaba efectuando este trabajo, llegó a nuestro conocimiento el de Neufeld ⁽⁸⁾ quien preparó la hormona, utilizando glándulas de vacunos, por una técnica que emplea etapas de las de Li ⁽⁵⁾ y Sayers ⁽⁷⁾. Nosotros utilizamos un procedimiento similar al de Sayers tanto para la medición de actividad como para la obtención de la adrenocorticotrofina.

Al mismo tiempo utilizamos la fracción que precipita a pH 5,4 para preparar, simultáneamente, prolactina.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 23 de diciembre de 1947.

Algunas de las etapas del proceso debieron ser algo modificadas pues el comportamiento de la mezcla de proteínas era diferente del descrito por Sayers y colaboradores.

Se utilizaron solamente los lóbulos anteriores, en lugar de la glándula entera como lo hacen los demás autores, con el objeto de tener una menor contaminación con los principios del lóbulo posterior. Esto permite, por otra parte, la obtención y utilización de los mismos cuando se los elabora por métodos especiales.

PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODO: 1.800 gr. de lóbulos anteriores de hipófisis se muelen finamente por máquina de picar carne y se extrae en cuatro veces con una mezcla de siete litros de acetona con 157 ml. de HCl. con (D. 1,19) decantando cada vez el líquido de extracción de las glándulas. Se reúnen los cuatro extractos y se precipita por agregado de diez litros de acetona a -5° .

Se deja una noche a -5° (tanto estas extracciones como las operaciones que siguen se hacen a temperaturas inferiores a 5°). Si no se indica otra cosa.

El precipitado se centrifuga, lava con acetona y seca (peso 35 gr.).

El polvo obtenido se extrae con agua alcalinizada a pH 9. Son necesarios 400 ml. en tres extracciones (200, 100 y 100). Se centrifuga dando poco residuo y un sobrenadante opalescente. Se obtienen 425 ml. que se vierten sobre cuatro litros de acetona enfriada a -5° , se decanta, centrifuga, lava con acetona y seca. El producto corresponde a la "prolactina cruda" de Sayers, peso 20 gr.

Los 20 gr. se disuelven en 200 ml. de agua a pH 8 — 8,5. Se centrifuga el insoluble y el residuo se extrae cuatro veces con porciones de 20 ml. a pH 8, hasta que los sobrenadantes queden poco coloreados. Los líquidos reunidos (250 ml.) se llevan a pH 6,5 y se deja una noche a -1° . El precipitado relativamente abundante se centrifuga y el residuo se lava con HCl O. I. N. a pH 5,4 y se deja una noche a -1° . El precipitado blanco abundante se centrifuga y se lava con 10 ml. de agua y el precipitado se reserva para obtener prolactina.

El sobrenadante (278 ml.) se le añade 22 ml. de sulfato de amonio saturado (S. A. S.) y se deja una noche a -5° . Da un precipitado que se vierte sobre 1.300 ml. de acetona a -5° formándose un precipitado abundante (fracción M) que luego de una noche a -5° se decanta, centrifuga, lava con acetona fría y seca. Peso 14 gr.

Los 14 gr. se disuelven en agua pH 7,5 con Na OH. El residuo insoluble a ese pH se extrae 2 a 3 veces con pequeñas cantidades de agua alcalina a pH 7,5. Volumen total 180 ml., a ellos se les añade 90 ml., de amoníaco concentrado (25 %) y se deja a temperatura

ambiente durante 9 horas. (Este tratamiento se efectuó para eliminar las pequeñas cantidades de los principios activos de lóbulo posterior que eventualmente pudieran estar presentes ya que dichos lóbulos no fueron extraídos. Sin embargo existía la posibilidad que una pequeñísima parte de los mismos pudieran haber quedado adheridos a los anteriores por defectos en la disección).

Al cabo de las 9 horas se vierte sobre 2400 ml. de acetona enfriada a -5° . Se forma un precipitado blanco, que se deja una hora a -5° . Se decanta, centrifuga y seca. Peso 10 gr. (Algunas veces sólo forma una opalescencia que por agitación enérgica da el precipitado. En el caso que ni aún así se formara éste, como nos sucedió una sola vez, basta la adición de 1 ó 2 ml., de HCl conc. seguido de agitación, para que se forme el precipitado).

Este precipitado se disuelve en 150 ml., de agua a pH 7,5 y se dializa con agua corriente primero y destilada después, cambiándose esta última al menos tres veces. Se forma, en algunas partidas, una muy pequeña cantidad de precipitado que se elimina por centrifugación.

El sobrenadante se lleva a pH 5,4 primero y si no se precipita nada (como nos ocurrió en todas las operaciones) se lleva a pH 4,7. Precipita allí la corticotrofina. (Si precipita a pH 5,4 se debe eliminar este precipitado).

El precipitado de corticotrofina se centrifuga, lava con muy poca agua helada y seca con acetona en tubo de centrifuga. Constituye la fracción A. Al sobrenadante de esta fracción, se le añade acetona hasta una concentración de 40-50 %. Se obtiene un nuevo precipitado B de gran actividad como adrenocorticotrofina, que se centrifuga, lava con muy poca agua helada y seca con acetona.

El rendimiento de A fué variable de una partida a otra: entre 150 y 400 mg. por cada 1.800 gr. de lóbulos.

Esta variación se debe al volumen en que se disuelven los precipitados M,N y principalmente en el que se encuentra disuelta la fracción final.

En una operación en que el volumen final fué muy grande (280 ml. en vez de 120-150) no se obtuvo precipitado alguno y sólo la adición de 25 a 30 % de acetona lo produjo.

DOSAJE DE CORTICOTROFINA

Se empleó el método empleado por Sayers que utiliza ratas machos normales de 21 días.

Administrándose dos niveles de hormona (5 y 10 mgs.) a dos lotes de animales y a un tercer lote, que servía de testigo, se le inyecta agua.

Las inyecciones, intraperitoneales, se hacían tres veces diarias durante tres días. Se trató de obtener siempre animales del mismo peso o lo más aproximado posible.

Los pesos de las suprarrenales se refirieron a 100 gr. de animal y se calculó el porciento de aumento de peso comparado con el peso de los testigos.

En el cuadro siguiente se pueden observar los resultados:

DOSIS TOTAL en mg.	Peso supra- renal por 100 g. animal	Aumento %	Peso timo por 100 g. animal	Disminución %
0 (Testigos)	33,7	—	298	—
5	53,8	59,6	125,3	58
10	60,2	78,6	102,3	65,5

Las experiencias se efectuaron con 19 animales en cada lote. Las cifras obtenidas concuerdan con las dadas por Sayers y col., para su preparación de glándulas de oveja y la obtenida de cerdo por Li y col.

Como se ve en el cuadro, se produce una disminución en el peso de timo. Esta disminución ya ha sido notada por otros autores, y, como encontráramos nosotros anteriormente, aún en el caso que la cantidad de hormona sea tan pequeña que no llegue a producir un aumento en el peso de las suprarrenales, se obtiene una reducción en el peso del timo. La acción de la hormona no es directa sobre dicha glándula, sino que se efectúa por intermedio de las suprarrenales. Una disminución en el peso del timo indica una excitación de las adrenales.

Determinación de cistina y tirosina en la adrenocorticotrofina:
Se siguió la técnica de Folin y Marenzi ⁽¹⁰⁾ con la modificación de Tompsett ⁽¹¹⁾ en la determinación de cistina.

Debido a la pequeña cantidad de proteína de que disponíamos se efectuaron ensayos con una proteína de composición conocida a fin de adaptar el método y las cantidades de los distintos reactivos a usar, para 50-100 mg. de sustancia. La proteína utilizada fué una insulina recristalizada por nosotros.

Se siguieron además, las recomendaciones que hacen Block y Bolling ⁽¹²⁾.

Para efectuar las lecturas en el fotómetro de Pulfrich, se utilizó el filtro S 53. Se hicieron tres hidrolisis ácidas (sulfúrico 6 N) a 130°-135° durante 6-8 horas. El valor promedio fué de 6.43 % de cistina (6,11-6,20-6,98).

En la determinación de tirosina se empleó el método de Folin y Marenzi ⁽¹³⁾ hidrolisis alcalina a 115°-125° (durante 18-20 horas).

Aquí también se utilizó el filtro S. 53 en lugar del S. 50 como se indica, porque permite efectuar mejor las lecturas. En dos hidrólisis efectuadas se obtuvo 1,45 % y 1,46 % de tirosina.

Li ⁽⁹⁾ ha encontrado 7,19 % de cistina en su preparación de adrenocorticotrofina de oveja, valor superior al hallado por nosotros.

RESUMEN

Se ha obtenido, a partir de glándulas de animales vacunos, una proteína de gran actividad, corticotropa.

La actividad, comparada con un método utilizado por otros autores, es equiparable a la obtenida por ellos para la hormona pura preparada con glándulas de animales ovinos y porcinos.

Se determinó la cantidad de cistina y tirosina en la hormona adrenocorticotropa obteniéndose los valores siguientes: 6,43 % y 1,45 % respectivamente.

El rendimiento obtenido es mayor que el que se obtiene de glándulas ovinas y mucho menor del de glándulas porcinas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LYONS W. R. ; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 35, 645, 1936-37.
- (2) MOON H. D.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 35, 649, 1936-37.
- (3) MENDIVE J. R.; *Rev. del Inst. Bact. C. G. Malbrán*, 12, 265, 1944.
- (4) LI C. H., SIMPSON M. E., EVANS H. M.; *Science*, 96, 450, 1942.
- (5) LI C. H., EVANS H. M., SIMPSON M. E.; *J. Biol. Chem.*, 149, 413, 1943.
- (6) SAYERS G., WHITE A., LONG C. N. H.; a) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 52, 199, 1943.
- (7) SAYERS G., WHITE A., LONG C. N. H.; a) *J. Biol. Chem.*, 149, 425, 1943.
- (8) NEUFELD A. H.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Chem.*, 83, 103, 1943.
- (9) LI C. H.; *Federation Proc.*, 5, 144, 1946. (Tomado del *Ann. Rev. Biochem.*, 16, 291, 1947).
- (10) FOLIN O., MARENZI A. D.; *J. Biol. Chem.*, 83, 103, 1929.
- (11) TOMPSETT S. L.; *Biochem. J.*, 25, 2014, 1931.
- (12) BLOCK R. J., BOLLING D.; *The Determination of Amino Acids*. 1940.
- (13) FOLIN O., MARENZI A. D.; *J. Biol. Chem.*, 83, 89, 1929.