

---

MINISTERIO DEL INTERIOR  
DIRECCION NACIONAL DE SALUD PUBLICA

---

REVISTA  
DEL  
INSTITUTO BACTERIOLOGICO  
"DR. CARLOS G. MALBRAN"

---

Estudio sobre la preparación y propiedades  
de la hormona corticotropa del lóbulo  
anterior de hipófisis

Por JORGE R. MENDIVE

---

La hormona corticotropa o corticotropina fué encontrada por vez primera por Collip (<sup>5</sup>) y por Collip, Anderson y Thomson (<sup>7</sup>) al preparar hormona de crecimiento. Algunas fracciones tenían actividad tirotrópica y adrenotropa que no siempre presentaban un valor paralelo, de donde concluyeron que se trataba de dos factores distintos.

Lyons (<sup>12</sup>) describió un método de preparación de prolactina a partir de hipófisis de oveja, en el cual separó una fracción proteica de gran actividad corticotropa, como etapa previa a la obtención de la primera. Esa fracción fué ensayada por Moon (<sup>13</sup>) quien encontró que no poseía acción sobre crecimiento, tiroides, o las gonadas y sólo débil acción como prolactina. El método Lyons consiste en extracción con acetona 80 % en medio ácido, seguido de un fraccionamiento con acetona y tratamiento con amoníaco. El producto así obtenido se disuelve a pH 9-10 y trata con ácido clorhídrico que precipita la hormona corticotropa.

Bates y Riddle (<sup>1</sup>) obtienen una mezcla de hormonas de hipófisis entre las que se encuentra la corticotropa pero no prolactina, y los mismos autores conjuntamente con Miller (<sup>2</sup>) describen la separación de unas fracciones que contienen corticotropina, aplicando algunas variantes al método descrito por ellos para la preparación de prolactina (<sup>3</sup>). Consiste en la extracción de la hipófisis con alcohol a 65° en medio alcalino (pH 9,5) y eliminación de las sustancias que precipitan a pH 6. El sobrenadante da un nuevo precipitado por añadido de 2 volúmenes de alcohol y consiste en una mezcla de las hormonas lactogénica y corticotropa. Por disolución en medio ácido, (pH 3,5), seguida de diálisis, se obtiene un precipitado que posee mayor concentración en corticotropina y que casi no contiene las otras hormonas tirotrópica, prolactina y gonadotróficas). Fevold, Lee, Hisaw y Cohn (<sup>4</sup>) intentan efectuar una separación de hormonas de hipófisis utilizando sólo iones amonio y sulfato en su fraccionamiento, el que consiste en extracción acuosa en medio alcalino a pH 8 (amoníaco) y al líquido de extracción se lo lleva a pH 5,4 con ácido sulfúrico precipitando así una fracción proteica que contiene corticotropa y prolactina.

Bonsnes y White (<sup>4</sup>) fraccionan extractos alcalinos (pH 7,4 - 7,8) (hidrato de sodio) y salinos (cloruro de sodio 2 %) de hipófisis a diferentes pH y por adición de disolventes orgánicos (acetona). Encuentran que la fracción que precipita a pH 6,4 es la que contiene mayor actividad como corticotropina, pero su pureza no es mayor que la del extracto bruto de donde parten, poseyendo además, acción diabética y de prolactina.

Collip (<sup>2</sup>) para separarla de las otras hormonas describe la preparación de extractos de corticotropina valiéndose de su termoestabilidad en medio ácido. Las hipófisis, deshidratadas con alcohol, se extraen con ácido acético 0,25 %. A los extractos concentrados se les agrega ácido clorhídrico hasta 0,25 %, se calientan en baño maría durante 12 horas y luego se someten a una diálisis corta. Esa misma propiedad se utiliza en un método patentado por la casa Organon (<sup>13</sup>) cuya preparación está basada en una extracción a alta temperatura con el fin de destruir las hormonas termolábiles a pH 6-6,6. El extracto es purificado por adsorción de la hormona sobre carbón activo y elución posterior con agua.

Jensen y Grattan (<sup>10</sup>) preparan corticotropa siguiendo el método de Lyons y según dichos autores, estas preparaciones poseen efecto glicotrófico. Además en una preparación de hormona tirotrópica, separan ésta de la corticotropa aprovechando la insolubili-

dad de la última en medio acuoso a pH 6,5 y con sulfato de amonio a 0,2 de saturación.

MÉTODOS DE DOSAJE

Varios son los métodos descriptos para medir la actividad de los preparados corticotropos.

El método de Collip (5) consiste en inyectar el extracto a ratas hipofisoprivas, a las cuales un mes después de la operación se les extirpa una suprarrenal que se pesa y fija, sirviendo como control. Las inyecciones se hacen durante seis días dos veces diarias. Al cabo de dicho tiempo se extrae la otra suprarrenal, se pesa y se examina histológicamente. Se considera como una unidad la cantidad de sustancia que produce un aumento de 50 % en el peso de la glándula, además de la prueba histológica de reparación de la corteza.

Moon utiliza ratas normales de 21 días a las cuales se les inyecta el extracto durante tres días consecutivos, dejando un lote de ratas como testigo. Según este método, una unidad es la cantidad de sustancia capaz de producir un aumento de 50 % en el peso de las suprarrenales comparadas con el testigo. En la preparación descrita por dicho autor alrededor de 20 mg corresponden a una unidad.

CUADRO I

1	2	3	4	5
Unidades	mg (1 Unidad = 20 mg)	Peso suprarrenal	%	Peso timo
0,05	1	3,7	54	10,5
0,1	2	4	66	9,5
0,15	3	4,3	78	5,1
0,25	5	4,4	83	5,3
0,50	10	6,1	154	2,5
—	—	2,4	—	20,9

Posteriormente el mismo autor (14) utiliza ratas normales de 4 días, inyectando el extracto en tres días consecutivos y sacrificando los animales 24 horas después de la última inyección extrayendo y pesando las suprarrenales. La cantidad de sustancia necesaria para provocar aumento en el peso de las glándulas es muy inferior a la que se debe emplear con ratas de 21 días como puede verse en el cuadro I, tomado de dicho autor y completado con la columna 2 en la que se calcula el peso haciendo una unidad igual a 20 mg (según Moon) y la 4 en que se dan los porcentos de los aumentos.

En el método empleado por Bates, Riddle y Miller (<sup>3</sup>) se utilizan pollos de 2 días a los que se les inyecta el producto durante cinco días consecutivos, tres veces diarias, tomando como unidad la cantidad que produce un aumento de 25 % sobre el peso de las supra-renales testigos (o la mitad de esta cantidad si se hace una sola inyección diaria).

El método de dosaje utilizado como control de pureza de las fracciones obtenidas fué el de Moon (<sup>14</sup>) por ser el que requiere menor cantidad de sustancia para el ensayo y por utilizar animales que no necesitan ser hipofisectomizados.

Nos hemos interesado en la purificación de esta hormona con el fin de poder realizar sobre ella estudios químicos.

Hemos partido del producto preparado por Lyons (<sup>12</sup>) porque al parecer, presenta la mayor pureza de los obtenidos.

Hemos sometido dicho producto a un fraccionamiento con sales y precipitación en diversos pH. También hemos tratado de fraccionarlo utilizando solventes orgánicos y mediante precipitación con sales de metales pesados.

Además se empleó un método de adsorción en un gel de alúmina seguido de elución.

#### PARTE EXPERIMENTAL

*Preparación de la corticotropina.* — 1 kg de lóbulos anteriores de hipófisis de bovino, luego de molerse finamente en la máquina de picar carne, se extrae cuatro veces con acetona que contiene 25 ml de ácido clorhídrico concentrado por litro y empleando un litro cada vez. La extracción se realiza agitando continuamente y separando el líquido del resto de las hipófisis por medio de una gasa. Se reúnen los líquidos de extracción y se filtran por papel de filtro común, obteniéndose un líquido de color rojizo, oscuro pero límpido. Se le añaden 5 litros de acetona, se agita enérgicamente y se deja reposar una noche a 0°-2°C.

Se decanta el sobrenadante y el precipitado es centrifugado y luego disuelto en 200 ml de acetona al 50 %. Se centrifuga y al sobrenadante se lo precipita con 800 ml de acetona. El precipitado así obtenido se disuelve en 200 ml de agua y se añade con agitación 100 ml de amoníaco 28-30 %, dejándose la mezcla en reposo durante 3-4 horas, a la temperatura ambiente. Se añade entonces 600 ml de acetona y el precipitado se centrifuga.

El sobrenadante se coloca en un matraz de 2 litros, se añade un volumen de acetona (900 ml) y con agitación enérgica, 10 ml de

ácido clorhídrico concentrado. Se deja una noche a 0-2° y se decanta el sobrenadante. El precipitado, centrifugado se seca a vacío con el fin de eliminar el amoníaco y la acetona.

Es un polvo blanco que pesa entre 2 y 3,5 g, formado por una mezcla de corticotropina y prolactina.

Para la separación de las hormonas se disuelve el polvo obtenido en agua (concentración 1-1,5 %) alcalinizando con hidrato de sodio N/1. Por adición de ácido clorhídrico N/1 gota a gota se lleva el pH a 6,6 donde precipita la fracción corticotropa. Se deja una noche a 0-2°, se centrifuga y el precipitado se seca con acetona. Se obtiene un polvo blanco que pesa de 1 a 1,5 g.

El sobrenadante se lava a pH 5,4 por añadido de HCl N/1 gota a gota. El precipitado se deja una noche a 0-2°, se centrifuga y seca como el anterior. Esta fracción es la prolactina que se presenta como un polvo blanco y su peso oscila entre 0,7 g y 1,5 g.

CUADRO II

Nº animales	Dosis mg	Pesos suprarrenal mg	%	Timo mg
7	Test-	1,8	—	28,7
7	9	4,85	169	12,6
5	Test-	1,9	—	26,8
5	9	5,2	173	11,7
5	4,5	3,75	97,4	10,3

El preparado (S1) así obtenido se tituló primero con el método señalado obteniéndose los valores indicados en el cuadro II. Como puede apreciarse el aumento de peso de las suprarrenales es semejante al obtenido por Moon con cantidades iguales.

Para 9 mg se obtiene un aumento de 170 % comparable al de 154 % que obtiene dicho autor con alrededor de 10 mg. Inyectando 4,5 mg se obtiene 97 % de aumento contra 83 % que obtiene Moon. A preparados obtenidos por este método y con una actividad similar le llamaremos en el curso de este trabajo producto crudo.

ENSAYOS DE PURIFICACIÓN POR MEDIO DE ALCOHOL, CLOROFORMO  
Y SALES DE PLOMO

Este producto se trató con alcohol y cloroformo con objeto de eliminar proteínas que sufren desnaturalización con dicho tratamiento. Es un método que ha sido utilizado en la purificación de

enzimas (catalasa, anhidrasa carbónica), y metal proteínas como la hemocupreína.

*Empleo de sales de metales pesados.*—Bates y Riddle<sup>(1)</sup> han empleado sales de cobre en el fraccionamiento de hormonas de hipófisis, logrando una relativa separación de ellas. Las sales de plomo se han utilizado también con enzimas, para eliminar proteínas inactivas que dan compuestos insolubles o para precipitar las proteínas activas. Nosotros hemos empleado solamente sales de plomo en nuestras experiencias.

*Tratamiento con alcohol y cloroformo.*—500 mg de hormona se disuelven en 10 ml de agua con ayuda de hidrato de sodio y se dializa 24 horas. Volumen 23 ml pH 8. Solución opalescente pero sin precipitado.

A 12,5 ml de dicha solución se le añade 27,5 ml de agua y se enfría a 0-2°, se le agrega 3,25 ml de alcohol absoluto (previamente enfriado a 0-2°) y luego de agitar enérgicamente se adicionan 7 ml de cloroformo también a 2°. Se agita nuevamente y se deja una noche a 0-2°. Se centrifuga. La solución se divide en 2 partes iguales. Una se dializa 24 horas (pH 6,5) se precipita con acetona y seca. Peso = 100 mg. (Producto 1).

*Tratamiento con sales de plomo.*—A la otra mitad de la solución se la trata con solución saturada de acetato de plomo (0,2 ml) que da un pequeño precipitado que se desecha. A la solución se le añade fosfato bisódico obteniéndose por centrifugación una solución límpida e incolora (pH 7,9) que después de dializar se precipita y seca con acetona (Producto 2. Peso 9 mg) y un precipitado de fosfato de plomo que es suspendido en agua con hidrato de sodio n/1 a pH 11. El precipitado se centrifuga y desecha. El sobrenadante se dializa dando una solución incolora a pH 8,1, con precipitado en suspensión.

Se centrifuga éste y la solución se precipita con acetona y seca. Rinde 45 mg (Producto 3). El precipitado de la diálisis pesa una vez seco 15 mg (Producto 4).

Todos los productos obtenidos por la técnica descripta (1, 2, 3 y 4) tienen una actividad inferior al producto crudo del que se partió indicando que por el tratamiento se produce una inactivación de la corticotropina. Por esta razón se abandonaron estos métodos de purificación.

*Fraccionamiento con sales.*—Se ha intentado fraccionar el producto crudo por precipitación a distinto pH o por adición de sul-

fato de amonio y de cloruro de sodio. Estas técnicas han sido utilizadas en el fraccionamiento de muchas proteínas activas, enzimas, hormonas, antitoxinas, etc. En estas experiencias se ha utilizado la serie cruda 25-26 (S 25-26) y los resultados con las fracciones obtenidas están expresadas en el cuadro III.

*Técnica.* — 1 g del producto crudo (S 25-26) se disuelve en 100 ml de agua añadiendo ácido clorhídrico n/10 hasta pH 3 en que se obtiene una solución límpida. Se lleva a pH 5-5,2 con hidrato de sodio. El precipitado obtenido se centrifuga y seca con acetona (se designa como pp (pH5). El sobrenadante, ligeramente opalescente, se lleva a pH 4,3 con ácido clorhídrico n/10 dando una solución límpida y a 75 ml se le añade 0,5 ml de sulfato de amonio saturado obteniéndose un precipitado abundante que se centrifuga y seca con acetona (se designa como pp S. A. S. pH 4,3). El sobrenadante no precipita por ulterior añadido de sulfato de amonio pero sí por neutralización a pH 6,5 con hidrato de sodio n/10.

El precipitado se centrifuga y seca con acetona (se designa como sobrenadante S. A. S. pH 6,5). El nuevo sobrenadante no precipita por añadido de sulfato de amonio, por variación de pH o por calentamiento.

Se efectúa una experiencia similar a la descripta pero en lugar de usar sulfato de amonio como precipitante se utiliza solución saturada de cloruro de sodio.

Se obtiene así un precipitado por adición de 4 ml de solución salina saturada a 7 ml de solución de la hormona a pH 4 y se designa como pp cloruro de sodio pH 4,5.

*Purificación por adsorción.* — La adsorción como método de purificación de proteínas ha sido utilizada extensamente en el campo de las enzimas y también con las antitoxinas. En el terreno de las hormonas el procedimiento se ha aplicado a la insulina. En nuestro caso hemos utilizado el gel de alúmina con la serie 25-26 (S 25-26). Los resultados obtenidos figuran en el cuadro III.

*Adsorción en alúmina  $C_{\gamma}$ .* — Un gramo de hormona (S 25-26) se disuelve en 100 ml de agua, añadiéndose hidróxido de sodio de forma que el pH esté entre 8-8,2. Una pequeña parte queda sin disolver y se elimina por centrifugación. Al sobrenadante límpido se le añade 10 ml de una suspensión de hidróxido de aluminio  $C_{\gamma}$  (10 mg de sólidos por ml) en porciones de 2 ml cada una, agitándose fuertemente después de cada adición. Se ajusta el pH a 7,5-8 y se deja una noche a 0-2°.

Se añade entonces, 5 ml más de alúmina, se agita y se vuelve a dejar a 0-2° una noche. Se repite esta adición 2 veces más en días consecutivos, cuidando siempre que el pH esté entre 7,5-8. Se centrifuga la suspensión y el sobrenadante límpido no precipita a pH 6,5 ni por adición de sulfato de amonio, con el que da solamente

CUADRO III

Producto	N° de ratas	Dosis mg	Peso supra-renal mg	%	Peso timo mg
Crudo original S. 25-26	20	0	1,42	—	22,3
	8	3	2,75	93	8,7
	8	2	2,64	85	10,8
	8	1	2,50	76	10,3
	8	0,75	2,02 (1)	52	7,5
	12	0,50	1,92	35	9,6
	4	0,25	1,70	6	9,9
	4	0,10	1,50	—	7,4
S. 25-26 Ppdo. pH 5 ..	12	0	1,7	—	15
	8	3	2,85 (2)	78	7,9
	12	2	2,81	65	9,9
	12	1	2,61	53,5	10,1
S. 25-26 S. A. S. 4,3.	8	0	1,5	—	20,1
	8	3	2,45	63,3	7,7
	8	2	2,37	58	10,4
	8	1	2,25	50	10,7
S. 25-26. Sobre S. A. S. pH 6,5 .....	4	0	1,7	—	20,1
	4	3	2,3	34	9,4
	4	2	2	17	12,3
	4	1	2,1	24	13,4
S. 25-26 NaCl pH 4,5 .	8	0	1,42	—	17
	4	3	2,4 (3)	77	10
	8	2	2,03	34	11,5
	8	1	1,79	24	14,5
Alúmina C <sub>7</sub> .....	12	0	1,66	—	20
	8	3	3,03 (4)	116	10,5
	8	2	3,11	87	5,6
	12	1	2,86	72	12
	4	0,75	3,3	50	11,8

(1) El testigo de esta experiencia pesaba 1,33 mg.

(.) » » » » » » 1,66 »

(3) » » » » » » 1,35 »

(4) » » » » » » 1,40 »



una opalescencia. Lo mismo sucede por agregado de ácido tricloracético y por ebullición de la solución.

El precipitado se suspende en 50 ml de agua y se añade solución de hidróxido de sodio hasta pH 9,5-10. Se agita durante 15 minutos al cabo de los cuales se centrifuga.

El sobrenadante, ligeramente amarillento, se dializa durante 24 horas. Una película blanca, transparente, queda adherida a la pared del saco dializador. El líquido, límpido, se lleva a pH 6,5 con ácido clorhídrico n/1 dando un precipitado y un líquido opalescente. Al añadir 1 ml de sulfato de amonio saturado se obtiene un precipitado que se separa bien por centrifugación y se seca con acetona.

El sobrenadante no precipita más por ulterior adición de sulfato de amonio, pero sí al llevarlo a pH 4,5. No es utilizado ulteriormente.

#### CONSIDERACIONES

Si se examinan las propiedades de las corticotrofinas obtenidas por diferentes investigadores, se observa que según Lyons y también según Bonsnes y White esta proteína tiene un punto isoeléctrico donde es casi insoluble a pH 6,5, pero según Fevold y col. a pH 5,4. Empleando el método antes indicado hemos confirmado que se obtienen precipitados muy ricos en corticotrofina a pH 6,5, lo que ha sido también aprovechado por otros autores (Jensen y Grat-tan) para intentar su purificación.

Si se ensaya el precipitado que se obtiene a un pH más bajo (pH 5) se encuentra que es un producto menos puro que el original, que resulta de una precipitación a pH 6,5, indicando que no se logra la separación de fracciones más activas por este método.

Si no se produjera desnaturalización por este proceso, la fracción sobrenadante debería concentrarse en corticotrofina, puesto que el precipitado es más pobre en ella que el original. Por este motivo se intentó la precipitación del líquido sobrenadante por sales.

Se observó que muy pequeñas cantidades de sales bastaban para obtener precipitados que no aumentaban por ulterior adición, pero no tenían una pureza mayor al original.

En especial el precipitado por cloruro de sodio tenía una actividad bastante menor.

Basta llevar el líquido a pH 4-4,5 a 0,66% de saturación con sulfato de amonio y a 5 % de saturación con cloruro de sodio para obtener estos precipitados.

No debe tampoco pensarse que el líquido sobrenadante contiene una proteína con mayor actividad, pues el residuo precipitado a pH 6,5 dió menor actividad que cualquiera de las fracciones anteriores.

Debe concluirse que a pesar de las suaves condiciones empleadas ocurre una destrucción parcial del principio activo, única forma de explicar que todas las fracciones sean menos activas que la original.

La potencia de la fracción obtenida en la experiencia de adsorción con el gel de alúmina es mayor que la de las demás.

La pureza de nuestros productos es menor que la señalada por Frenkel Conrat. Frenkel Conrat H., Simpson y Evans<sup>(9)</sup>, quienes obtienen un aumento de 50 % en la suprarrenales de ratas de 4 días con 0,25 mg de una substancia cuyo método de preparación no indican.

No es posible compararla, por el momento con la descrita por Sayers, White y Long (17)<sup>(1)</sup> que es una proteína que se comporta como homogénea en el aparato de Tiselius y en la ultracentrífuga, pues dichos autores se refieren a su pureza diciendo que es análoga a la obtenida por Li Simpson y Evans<sup>(11)</sup> sin dar otro detalle. No hemos podido consultar en este último trabajo por no haberse recibido el ejemplar de la publicación donde apareciera.

Observando la columna correspondiente al peso del timo en el cuadro III vemos que cuando se inyectan dosis pequeñas de 0,1 mg, que no producen un aumento en el peso de las suprarrenales, el del timo disminuye en forma apreciable.

No se produce pues para dosis muy bajas una demostración de actividad por el peso de las suprarrenales, pero evidente por la disminución que sufre el peso del timo.

Moon ha demostrado que la acción de la corticotrofina sobre el timo se ejerce a través de las suprarrenales, de manera que los resultados obtenidos por nosotros indicarían que las dosis usadas han producido una excitación de la corteza suprarrenal que se ha reflejado en su acción sobre el timo, y que podría revelarse histológicamente. Desgraciadamente el peso de los timos no puede utilizarse como test, pues las disminuciones no son siempre proporcionales a las cantidades de hormona inyectada.

(1) Este trabajo llegó a nuestro conocimiento una vez finalizadas nuestras experiencias y cuando se comenzaba a redactar la presente comunicación.

## CONCLUSIONES

1º No se ha podido purificar la fracción corticotropa de Lyons por fraccionamiento con sales a diferentes pH.

2º En dichos fraccionamientos se produce una pérdida de actividad, lo que sólo se puede explicar como inactivación de la hormona con esos tratamientos suaves.

3º La inyección de pequeñas cantidades de hormona que no llegaran a producir aumento de peso de las suprarrenales, provocan una disminución del peso del timo, lo que indica una excitación de las suprarrenales.

4º La variación del peso del timo no puede tomarse como test para medir actividades, pues ellas no son siempre proporcionales a la cantidad de hormona inyectada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BATES, R. W., y RIDDLE, O. — *J. Biol. Chem.*, 1938-123-v.
2. BATES, R. W.; RIDDLE, O., y MILLER, R. A. — *Endocrinology*, 1940-27-781.
3. BATES, R. W.; RIDDLE, O., y MILLER, R. A. — *J. Pharm. Exp. Therap*-1935-55-365.
4. BONSNES, R. W., y WHITE, A. — *Endocrinology*, 1940-26-990.
5. COLLIP, J. B. — *Lancet*, 1933-1-1208.
6. COLLIP, J. B. — *Jour. Am. Med. Assoc.*, 1940-115-2073.
7. COLLIP, J. B.; ANDERSON, E. M., y THOMSON, D. L. — *Lancet*, 1933-2-347.
8. FEVOLD, H. L.; LEE, M.; HISAW, F. L., y COHN, E. J. — *Endocrinology*, 1940-26-999.
9. FRENKEL, CONRAT L.; FRENKEL, CONRAT; SIMPSON, M. E., y EVANS, H. M. — *J. Biol. Chem.*, 1940-135-199.
10. JENSEN, H., y GRATTAN, J. F. — *J. Physiol.*, 1940-128-270.
11. LI, C. H.; SIMPSON, M. E., y EVANS, H. M. — *Science*, 1942-96-450.
12. LYONS, W. R. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1936-37-35-645.
13. MOON, H. D. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1936-37-35-649.
14. MOON, H. D. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1940-43-42.
15. ORGANON. — (*Chem. Abst.*, 1940-34-8184). Pat. Holandesa 48.118.
16. PERLA. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1936-34-751.
17. SAYERS, G.; WHITE, A., y LONG, C. N. H. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1943-52-199.
18. WHITE, A.; BONSNES, R. W., y LONG, C. N. H. — *J. Biol.-Chem.*, 1942-142-447.