

Aislamiento y Purificación de Prolactina Humana. I-Extracción a Partir de Hipófisis

Stella Carrasco de Rodríguez*, Myrlam Sánchez de Gómez* y Pablo Aschner Montoya**

* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional.

** Servicio de Endocrinología, Hospital Militar Central.

RESUMEN

En este trabajo se describen tres métodos para extraer la Prolactina Humana (hPRL) a partir de glándulas pituitarias, dentro de un proceso de recuperación global de todas las hormonas adenohipofisarias. El efecto del sistema de conservación de las glándulas se estudió comparando los resultados obtenidos con glándulas conservadas en acetona o congeladas a -20°C . Todo el proceso se efectuó a 4°C , tomándose especiales precauciones para evitar la contaminación bacteriana y por consiguiente la introducción de pirógenos.

Se observó que la recuperación de Prolactina está influenciada tanto por la forma de conservación de las glándulas como por el sistema de extracción del material biológico. Se encontró que las glándulas congeladas dan rendimientos mayores que el polvo de acetona.

La homogenización de las glándulas en buffer Tris-fosfato permitió una buena recuperación de hormona de crecimiento (hGH), pero dió valores bajos en Prolactina; en cambio al utilizar solución salina (NaCl 0.9%) a pH neutro, se solubilizó la mayor parte de la proteína en tanto que la PRL quedó en el residuo, de donde se extrajo mediante condiciones suaves que no afectaban su estabilidad y dando un rendimiento superior. Del sobrenadante se separaron las fracciones crudas de la hormona de crecimiento y glicoproteínas, las cuales presentaron valores iniciales de potencia que las hacen valiosas como material de partida para extraer y purificar las correspondientes hormonas.

ABSTRACT

Three different methods are described for the extraction of human Prolactin (hPRL) from pituitary glands, in an integrated scheme for the extraction of human pituitary hormones. The effect of the storage method used on the extraction procedure was studied using acetone-preserved and frozen glands. All procedures were performed at 4°C and special precautions were taken to avoid the introduction of pyrogens and bacterial contamination during hormone isolation. It was demonstrated that the yields and potencies of the hormone obtained are dependent on the storage method as well as on the extraction procedure employed, the greatest yields were obtained from frozen glands.

When the homogenization of the glands was performed in Trisphosphate buffer, good recoveries in human growth hormone (hGH) were obtained but low values in hPRL were observed.

Instead; by prior extraction of most of the proteins in saline solution and subsequent solubilization in mild conditions of the hPRL present in the residue, it was possible to improve the recovery in hPRL. The supernatant was used as the starting material for the preparation of crude fractions containing hGH and glycoproteins. The preliminary estimation of their respective potencies make them good candidates for the isolation and purification of the mentioned hormones.

INTRODUCCION

La existencia de una hormona con actividad lactogénica (Prolactina - PRL) distinta de la hormona de crecimiento, solo se aceptó hasta 1972, después de aproximadamente 10 años de controversia.

Su extracción a partir de glándulas pituitarias (hipófisis) de varias especies animales, incluyendo la humana, ha sido reportada por varios investigadores.

Aunque la PRL humana (hPRL), no tiene hasta el presente aplicación terapéutica, su dosificación se ha constituido en un instrumento de diagnóstico de invaluable importancia en el estudio del eje hipotálamo-pituitaria. Por ejemplo, un alto porcentaje de adenomas de pituitaria causa hiperprolactinemia y conduce a infertilidad. Es por ésta razón, que se requieren cantidades apreciables de PRL pura como reactivo básico para poder implementar el radioinmunoanálisis de la misma el cual permita seguir el curso de un tratamiento.

El objetivo de este trabajo es el de establecer las mejores condiciones para aislar hPRL, usando glándulas conservadas en acetona y congeladas mediante modificaciones en las condiciones de extracción, seleccionar aquellas que permitan una recuperación alta de la hormona sin afectar su potencia inmunológica.

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico

- a. Polvo de glándulas pituitarias humanas conservadas en acetona preparadas por el Dr. Pablo Aschner en el Laboratorio de la Dra. Hartree (Inglaterra).
- b. Glándulas pituitarias humanas de cadáver durante la autopsia y mantenidas a -20°C hasta su procesamiento.

Radioinmunoanálisis (RIA):

La PRL y hGH fueron determinadas por medio de RIA específico para cada hormona, con reactivos suministrados por el Dr. A.F. Parlow a través del programa de distribución de pituitarias y hormonas de NIADDK (Bethesda Maryland, USA).

Proteína:

La proteína fue determinada por el método de Lowry (2) usando albúmina sérica bovina como estándar.

Extracción de la Fracción de Prolactina

Extracción de la Fracción de PRL a partir del polvo de Pituitarias humanas en acetona

En primer lugar, se utilizó polvo de pituitarias humanas conservadas en acetona, al cual se le había retirado la fracción de glicoproteínas. De éste polvo se tomaron 5.2g provenientes de 100 glándulas y se sometieron al proceso que se indica en la figura 1.

Extracción de la Fracción de PRL a partir de glándulas congeladas.

En un primer experimento se empleó como agente extractante buffer Tris-fosfato pH 8.7 al cual se adicionó Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1mM, EDTA 5mM y Na₃N 10mM.

La PRL se precipitó mediante salinización a pH 7 quedando en el sobrenadante el resto de hormonas hipofisarias. Los detalles del proceso se muestran en la Figura 2.

En un segundo experimento, se empleó solución salina 0.9%, pH 7, utilizando los mismos inhibidores del sistema anterior. En estas condiciones la mayor parte de la PRL permanece en el residuo en tanto que se solubilizan el resto de proteínas contaminantes.

La hormona fue extraída finalmente a pH 10 con acetato de amonio, según se muestra en la Figura 3.

Extracción de las fracciones de Hormonas de Crecimiento y glicoproteínas:

Del sobrenadante así obtenido después de extraer las hipófisis con NaCl (ver Fig. 3) se separó la fracción de hGH mediante precipitación isoelectrica con sulfato de amonio hasta saturación final del 50%. El pH se ajustó primero a 6.2 con HCL. Se centrifugó a 15.000 r.p.m. y el residuo conteniendo hGH se dializó contra agua hasta fin de sulfatos y se liofilizó.

Del sobrenadante que quedó después de separar la hGH se separaron las glicoproteínas por adición de sulfato de amonio (80% concentración final), se centrifugó, el residuo se dializó y liofilizó.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ensayo Preliminar con Glándulas Conservadas en Acetona

Para establecer las mejores condiciones de precipitación de la fracción de Prolactina, se hizo un ensayo inicial, utilizando un polvo de glándulas conservadas en acetona. Las glándulas fueron homogenizadas a pH 5 con acetato de amonio para retirar las glicoproteínas y lipotropinas, quedando un residuo que contenía PRL y hGH.

FIG. 1 1ª EXTRACCION DE HORMONAS HIPOFISIARIAS

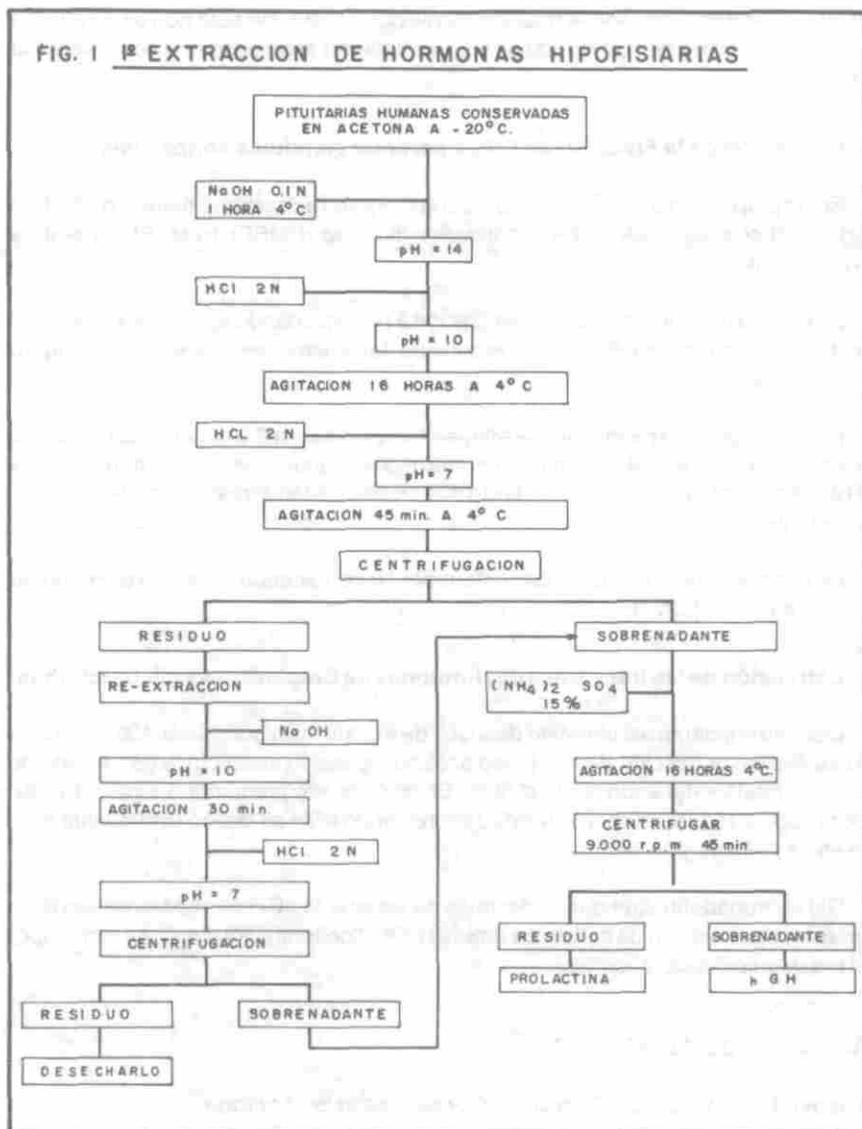


FIG. 2.- 2ª EXTRACCION DE HORMONAS HIPOFISIARIAS

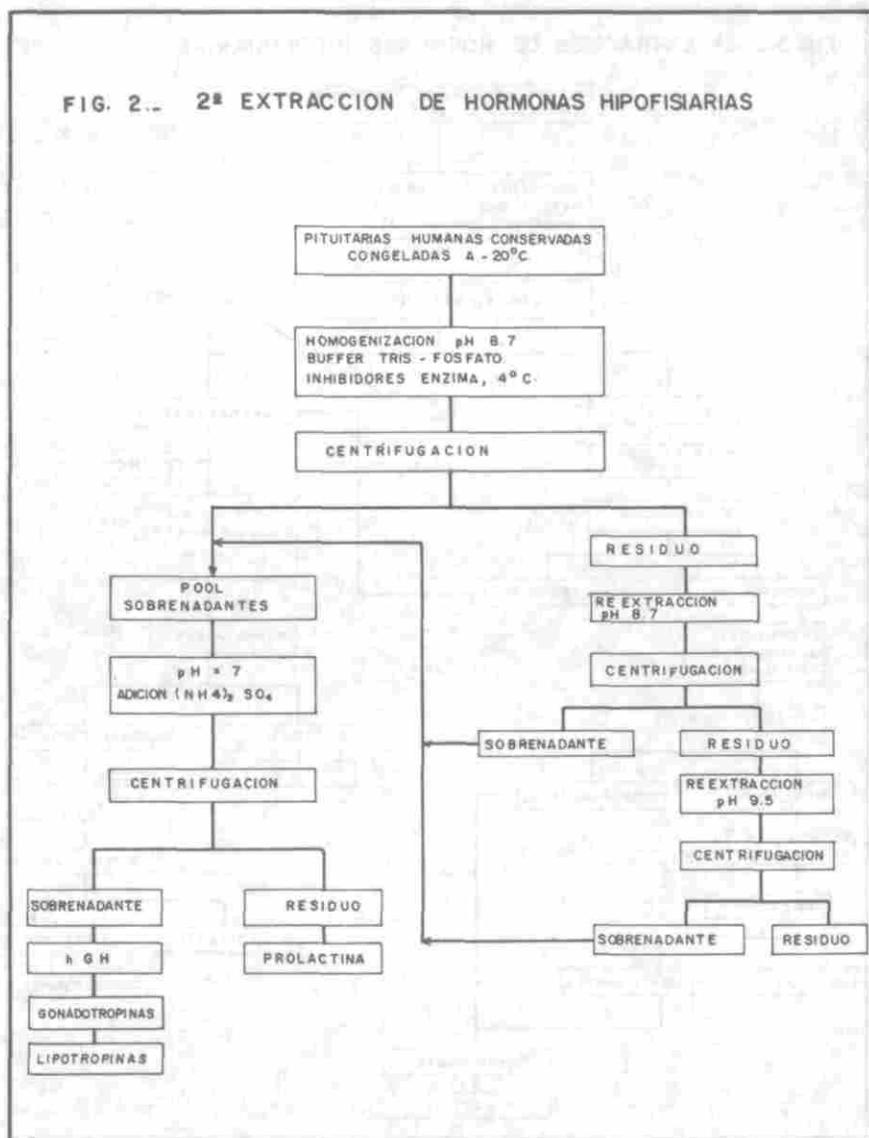
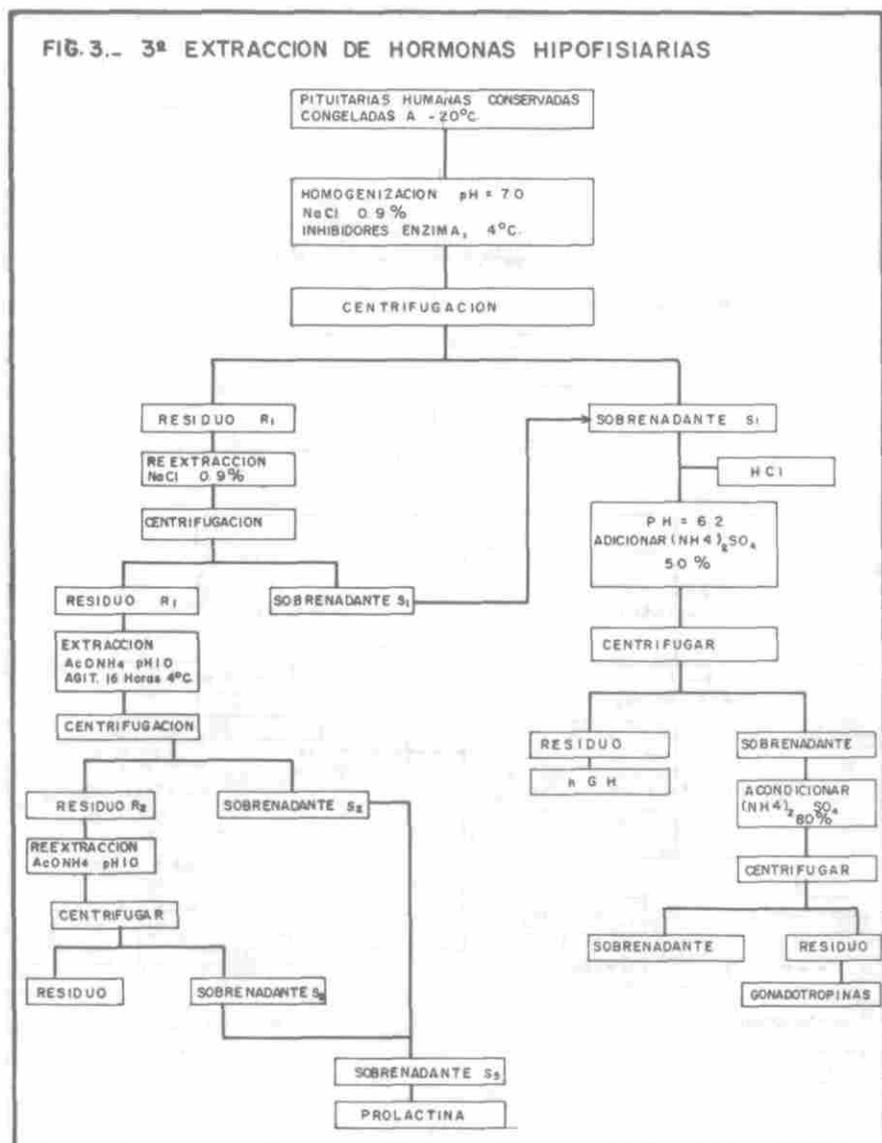


FIG. 3.- 3ª EXTRACCION DE HORMONAS HIPOFISIARIAS



El procedimiento seguido para separar la PRL de la hGH fue reportado previamente (3) y básicamente consistió en la precipitación de la PRL por adición de sulfato de amonio hasta una concentración final de 0.8M a pH 7.0.

El residuo obtenido se suspendió en un volumen mínimo de buffer de acetato de amonio, 5 mM, pH 8.5 y se desalinizó en Sephadex G-25, eluyendo con el mismo buffer.

Las fracciones conteniendo proteína se combinaron y se liofilizó finalmente.

Se obtuvo un peso de 158 mg. En la Tabla 1 se muestran los valores de proteína y prolactina en el producto liofilizado y el contenido de hormona de crecimiento en el sobrenadante que quedó después de retirar la prolactina.

TABLA 1

**OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE PROLACTINA
A PARTIR DE POLVO DE GLÁNDULAS EN ACETONA**

Muestra	a) Proteína Total mg	b) mUI PRL/mg prot	b) UI hGH/mg prot
Residuo (hPRL)	c) 0.26	8.14	—
Sobrenadante (hGH)	11.50	—	0.15

a) Método de Lowry, promedio de 3 determinaciones

b) Método de RIA, promedio de 4 determinaciones

c) Expresado como mg proteína/mg muestra seca

La potencia inmunológica para la prolactina (Residuo), lograda en este ensayo preliminar, lo mismo que la recuperación, que fue de 334 mUI a partir de 100 glándulas, que fueron las empleadas en la obtención del polvo de acetona, fueron muy bajas. Tomando como base la potencia inmunológica del patrón internacional de referencia para RIA distribuido por el Dr. A. F. Parlow, Torrance, California que es de 20 mUI/ug, esta recuperación corresponde a 16.7 ug de PRL en 100 glándulas.

Se estima que la glándula pituitaria humana puede almacenar un promedio de 200 ug de prolactina. Según esto, la recuperación obtenida en este ensayo es alrededor de 0.1%.

Varios factores pueden incidir en la baja recuperación observada. En primer lugar varios estudios (4, 5, 6) muestran claramente que el rendimiento y potencia de las

hormonas obtenidas de pituitarias humanas conservadas en acetona son más bajas, que cuando se parte de glándulas congeladas. Esto obedece a que se necesitan procedimientos más rigurosos para su obtención, lo que generalmente produce alguna desnaturalización de la proteína, incluyendo la formación de agregados inactivos. Por esta razón se usan cada vez más las glándulas congeladas. (7, 8, 9).

Otro factor que pudo haber contribuido a una pérdida de material, es la pobre recuperación de la hormona después de la precipitación salina, empleando un buffer de pH 8.5; se ha encontrado que la solubilización de la PRL se logra mejor a pH alto, aproximadamente de 10 (10).

ENSAYO CON GLANDULAS CONSERVADAS CONGELADAS

Homogenización de las Glándulas:

Un día antes de ser procesadas se sumergieron en nitrógeno líquido, durante 5 minutos y se retornaron a -20°C , puesto que este proceso se ha encontrado que mejora la homogenización posterior (9).

Las glándulas pituitarias fueron maceradas una por una en un mortero con hielo seco, con el objeto de romper el tejido y obtener un polvo fino. El hielo seco además, impidió que se descongelaran, facilitando de esta forma la manipulación y la conservación de las mismas.

Para mejorar el proceso de extracción de las hormonas presentes en el macerado de pituitarias, se homogenizó con un Polytron; de esta forma se rompieron las células y su contenido hormonal fue liberado al buffer de extracción utilizado. Con el objeto de reducir la actividad de las enzimas proteolíticas sobre las diferentes hormonas, se adicionó al buffer de extracción, EDTA para inhibir la actividad de proteínas dependientes de iones divalentes y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) el cual inhibe las serina-peptidasas (8).

Se emplearon dos sistemas de extracción para las glándulas congeladas. En primer lugar se procesó un lote de 61 glándulas (24.8 g) homogenizadas con buffer Tris-fosfato 10 mM, pH 8.7, debido a que a este pH las hormonas hipofisarias se solubilizan bien y además no se exponen a condiciones extremas que pudieran afectar su conformación y por ende su actividad biológica.

Este sistema de homogenización originalmente descrito por (9) fue modificado por (3).

La tabla 2 muestra la recuperación de proteína en cada una de las tres extracciones realizadas.

Los sobrenadantes provenientes de las 3 extracciones se combinaron, y posteriormente se procedió a extraer la prolactina allí presente, como se describe posteriormente.

El segundo agente extractante empleado fue solución salina 0.9% pH 7.0. Su empleo fue originalmente reportado por (11), (12).

En estas condiciones de pH la prolactina presenta una mínima solubilidad, en tanto que el resto de hormonas hipofisarias se solubilizan, lo cual facilita especialmente la separación de la hormona de crecimiento que es la mayor proteína contaminante.

La extracción se realizó empleando 5 ml. de solución salina por gramo de glándula, y para las reextracciones se redujo el volumen del extractante, conservando las demás condiciones iguales.

TABLA 2

RENDIMIENTO DE LA EXTRACCION DE LAS GLANDULAS

Extracción número	Proteína mg/ml a)	Extracción %
1	22.00	92.3
2	1.36	5.7
3	0.46	2.0
R	0.56 (b)	—

a) Método de lowry, promedio de tres determinaciones.

b) Expresado en mg de proteína/mg de muestra seca.

La cantidad de proteína extraída y la potencia inmunológica de la prolactina y la hormona de crecimiento en cada extracción a partir de dos lotes, uno compuesto por 20 glándulas (peso 7.67 g) y otro por 21 glándulas (peso 8.28 g), se muestran en la Tabla 3.

Como se podrá apreciar en la Tabla 3, con la primera extracción se logra un porcentaje bastante alto (90.8 y 91.2% para los dos casos). Sin embargo, si se desea una extracción exhaustiva se debe realizar una segunda extracción, especialmente para lograr una máxima recuperación de hormona de crecimiento y de glicoproteínas.

Se puede observar también que la potencia inmunológica de la PRL en las fracciones extraídas con solución salina es mucho más baja que la encontrada en el Residuo, lo contrario ocurre para la hGH como era de esperarse.

Extracción de la Fracción de Prolactina

Del pool de sobrenadantes obtenido anteriormente, se precipitó la PRL por adición de sulfato de amonio como ya se mencionó, y el residuo fue suspendido en buffer acetato de amonio pH 8.5 pero dada la dificultad para su disolución, se ajustó a pH 10 con NH_4OH .

Se desalinizó mediante una columna de Sephadex G-25, se combinaron las fracciones protéicas y el producto se liofilizó. En la Tabla 4 se muestran los contenidos de proteína total, PRL y hGH.

TABLA 3

**RENDIMIENTO DE LA EXTRACCION DE LAS GLANDULAS
CON SOLUCION SALINA**

Lote	Extracción número	Proteína mg/ml a)	PRL		hGH UI mg.prot b)
			mU mg.prot.	mU glándula	
1	1	5.2	0.54		1.27
	2	2.02	0.64		1.29
	R ₁ c)	193.8 d)	615.9	5968	0.72
2	1	11.5	18.4		0.60
	2	3.7	22.7		0.14
	R ₁ c)	336.0	250.4	4007	0.10

- a) Método de Lowry, promedio de tres determinaciones
 b) Método de Radioinmunoanálisis, promedio de tres determinaciones
 c) Ver figura No. 3
 d) Corresponde al valor de proteína total del residuo soluble a pH 10.

La potencia inmunológica de la PRL, de 10 mU .mg proteína corresponde a una recuperación de 610 mUI para las 61 glándulas procesadas (100 mUI/100 glándulas, equivalentes a 50 ug/100 glándulas, o sea 0.25%). A pesar de que se logró un aumento en recuperación, este valor sigue siendo muy bajo comparado con los encontrados por (13) y (7) entre otros.

A pesar de que con estas condiciones no se logró un resultado aceptable con relación a la prolactina, en este segundo ensayo sí se observó una recuperación muy buena para la hGH (5 mg por glándula).

TABLA 4

**OBTENCION DE LA FRACCION DE PROLACTINA A
PARTIR DE GLANDULAS CONGELADAS**

Muestra	Proteína (mg/ml)	mUI PRL mg prot.	UI hGH mg prot.
Soobrenadante	6.40	—	1.32
Residuo (PRL)	0.26 a) (138.0)	10.0	0.23
Sobrenadante (hGH)	5.20	N.D.	1.75

- a) Expresado en mg proteína/mg de muestra seca. En paréntesis se indica la proteína total.

N.D. No detectable

Por lo tanto, si el objetivo es obtener hGH en particular, estas condiciones de extracción serían las apropiadas. Los resultados hasta aquí obtenidos, parecen indicar que uno de los mayores problemas encontrados es la recuperación de la prolactina, después de su precipitación con sales. Para obviar esto se optó como alternativa, buscar condiciones de extracción en las cuales se pudiera solubilizar la mayor parte de las hormonas y demás proteínas presentes, en tanto que la PRL permaneciera insoluble.

Previamente (14) observaron por electroforesis que solo una pequeña cantidad de PRL, se extraía al homogenizar glándulas frescas con solución salina 0.9%. Ya que el NaCl remueve la mayor parte de la hGH, se escogió este procedimiento como el paso inicial de extracción para estas glándulas.

El material insoluble obtenido al homogenizar las glándulas con solución salina, fue procesado para aislar la PRL allí presente. El residuo se disolvió en el mismo buffer de Acetato de Amonio 50 mM, empleado en el extracto anterior, ajustando el pH a 10 con amoníaco.

Después de dejar el residuo 16 horas en agitación con el buffer se centrifugó y se obtuvo un residuo (R_2 ver fig. 3), el cual se reextrajo en las mismas condiciones, se agitó por 1 hora, se centrifugó, los sobrenadantes provenientes de estas extracciones se combinaron y se determinó su contenido tanto de proteína total como de PRL y hGH. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

El segundo lote de glándulas (21) se procesó de igual manera, excepto que se practicó una extracción adicional al último residuo, buscando una máxima recuperación. (Ver Tabla 5).

Como puede observarse las potencias logradas para la PRL en este sistema, superan ampliamente las encontradas en los dos sistemas anteriores. Igualmente, el contenido de hormona por glándula, 200-300 ug, corresponde a los rangos reportados normalmente.

TABLA 5
OBTENCION DE LA FRACCION DE PROLACTINA A
PARTIR DE GLANDULAS CONGELADAS

Lote	Muestra	Proteína		Prolactina		hGH
		mg/ml	Total (mg)	mUI/mg prot.	ug/gland	UI/mg prot.
1	S ₂	1.9	180.5	673.2	303.8	0.72
	S ₃	0.12	11.4	161.4	4.6	0.91
	S ₅	1.02	193.8	615.9	298.4	0.69
2	S ₂	3.4	295.8	258.8	182.3	0.06
	S ₃	0.66	55.4	133.5	17.6	0.03
	S ₄	0.28	13.2	66.7	2.1	N.D.
	S ₅	1.57	336.0	250.4	200.3	0.07

Al observar estos resultados se puede apreciar como el sistema de extracción empleando solución salina y glándulas conservadas congeladas, reduce apreciablemente las pérdidas de prolactina, obteniendo una preparación cruda de la hormona con una potencia alta, lo que facilita su posterior purificación, cuando este paso sea deseable.

Obtención de la Fracción de Hormona de Crecimiento y de Glicoproteínas:

Del sobrenadante S₁ (ver fig. 3) se separó la hGH mediante adición de sulfato de amonio hasta 50% de saturación final, a pH 6.2. El precipitado obtenido se dializó contra agua y se liofilizó lográndose 4.4 g de muestra/100g de tejido inicial. El contenido de hormona se indica en la Tabla 6.

El sobrenadante último se usó para precipitar las glicoproteínas, por medio de sulfato de amonio a 80% de concentración final. El residuo se dializó y se liofilizó obteniéndose un peso total de 225 mg correspondientes a 2.7 g/100 tejido inicial. En la Tabla 6 se indican los valores de potencia hormonal para LH, FSH y TSH.

Estas fracciones serán el material de partida para aislar y purificar las hormonas allí presentes, en trabajos posteriores.

TABLA 6

FRACCIONES CRUDAS DE hGH y GLICOPROTEINAS

Fracción cruda	UI/mg proteína a)
hGH	1.6
LH	35.2
FSH	81.9
TSH b)	62.2 x 10 ⁻⁶

a) RIA específico, promedio de 4 determinaciones

b) IRMA, promedio de 4 determinaciones

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados indican que con el empleo de glándulas conservadas congeladas, se logra extraer prolactina con una potencia más alta y un rendimiento mayor, que el polvo en acetona. El procedimiento empleado permite recuperar también otras hormonas importantes: hormona de crecimiento, gonadotropinas y tirotrópina.

El estudio comparativo de los dos sistemas de extracción del material biológico, mostraron que es mejor el empleo de solución salina para remover la mayoría de las proteínas y extraer la prolactina con acetato de amonio a pH 10, obteniéndose entre 200 y 300 ug de la hormona por glándula, lo que es comparable a los mejores valores reportados por otros investigadores.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el CINDEC y el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Contó con la colaboración del Servicio de Endocrinología del Hospital Militar Central y de la Sección de Bioquímica del Instituto Nacional de Salud.

BIBLIOGRAFIA

1. W.H. Hunter, *British Medical Bulletin*, **3** 18, (1974)
2. O.H. Lowry et al. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
3. A. Vargas y C. Velásquez. "Aislamiento y Purificación de hormona de crecimiento humana a partir de glándulas pituitarias congeladas". Tesis Farmacia, Universidad Nacional (1984).
4. B. Holmstrom and K. Flolenhag. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **40**, 856 (1975)
5. J.M. Tanner. *Health trends*, **7**, 61 (1975)
6. R.D. Milner et al. *Clin. Endoc.* **11**, 15 (1979)
7. P. Roos, F. Nyberg and L. Wide, *Biochem et Biophys Acta*, **588**, 368 (1979).
8. J. Lumley et al. *J. Endocr.* **82**, 77 (1979)
9. G. Chapman, A.C. Remwick and J.H. Livesey, *J. Clin. Endocr. Met.* **53**, 1008 (1981)
10. S.C. Hodgkinson and P.J. Lowry. *Bioch. J.* **199**, 619 (1981)
11. U. J. Lewis et al. *Jour. Clin. Endocr.* **33**, 153 (1971)
12. U.J. Lewis. *Ann. Rev. Physiol.* **46**, 33 (1984)
13. P. Rathnam and B. Saxena. *Endocrinology* **100**, 1403 (1977)
14. U.J. Lewis and R.N. Sing, *Proc. Int. Symp. on Human Prolactin, Brussels, Am. Els. Publ. Comp., New York, 1973, P.1.*