

# **AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE PROLACTINA HUMANA. II. PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL**

**STELLA CARRASCO DE RODRIGUEZ\***  
**MYRIAM SANCHEZ DE GOMEZ\***  
**PABLO ASCHNER MONTOYA\*\***

\* Departamento de Química, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

\*\* Servicio de Endocrinología, Hospital Militar Central, Bogotá.

Key words: Pituitaria humana, Radioinmunoanálisis, Isohormonas.

## **RESUMEN**

En este trabajo se describe un sistema cromatográfico en dos etapas que permite la purificación de prolactina humana (hPRL), a partir del residuo obtenido después de la extracción con solución salina de hipófisis conservadas congeladas.

La PRL se solubilizó en acetato de amonio 50 mM, pH 10 y se purificó por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica, sobre el soporte Fenil-Sepharosa en presencia de un gradiente lineal de acetonitrilo (0-40%). La fracción con actividad de PRL se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa en presencia de acetonitrilo (20%) y se eluyó con un gradiente salino.

El rendimiento del proceso fue de 7.75 mg PRL por 100 glándulas, lo que corresponde a una recuperación global de 33%. Por radioinmunoanálisis específico (RIA) se encontró una potencia de 10.6 UI/mg de proteína en la preparación final.

El análisis electroforético mostró dos componentes principales de pesos 27.000 Daltons, que corresponde al monómero principal y 64.000 Daltons, que sugiere una forma agregada o glicosilada, cuya existencia ha sido reportada en el suero. La presencia de isohormonas también fue detectada por el análisis de electroenfoque, encontrándose un valor de punto isoeléctrico (PI) de 5.7 para la especie principal. Este comportamiento también se observó con la preparación internacional de referencia usada en este trabajo.

## **ABSTRACT**

It is described a two-chromatographic step technique for the purification of human Prolactin (hPRL), from the residue which remains after the extraction of frozen glands with saline solution.

The Prolactin was solubilised at pH 10 in 50 mM ammonium acetate and was purified by hydrophobic interaction chromatography on the mildly adsorbant Phenyl-Sepharose in the presence of a linear gradient of acetonitrile (0-40%). The PRL fraction was applied to a DEAE-Celulose column in the presence of acetonitrile (20%) and elution was carried out using a saline gradient.

The yield was 7.75 mg/100 glands which corresponds to an overall recovery of 33%. A potency of 10.6 IU/mg protein in the final preparation was established by radioimmunoassay (RIA).

The electrophoretic pattern showed two components with molecular weights of 27.000 daltons, which presumably corresponds to the monomeric form and 64.000 daltons which suggests an aggregate or glycosilated form, previously described in human serum. The existence of isohormones was shown by electrofocusing analysis with a PI value of 5.7 for the main species. The same pattern was obtained with the international reference preparation used in this study.

## INTRODUCCION

Durante mucho tiempo se aceptó que la actividad de prolactina (PRL) detectada en la glándula pituitaria era una propiedad intrínseca de la hormona de crecimiento (hGH). Sin embargo, un cúmulo de evidencias experimentales permite afirmar en la actualidad que la PRL existe como una entidad química independiente.

Los intentos hechos por separar prolactina humana han conducido en la mayoría de los casos a valores de recuperación muy bajos, del orden del 10 al 20% del total de la hormona presente en la pituitaria, que por RIA se ha estimado entre 200 y 300 ug por glándula (1).

Una de las razones para esta baja recuperación es la posible destrucción de la hormona durante el almacenamiento de las glándulas a -20° C. Con el fin de controlar la actividad proteolítica se ha ensayado la conservación de las glándulas en acetona, pero la extracción de la prolactina y demás hormonas en este medio, da rendimientos aún más bajos por las condiciones energéticas que se requieren (2, 3).

Por otra parte, debido a su gran parecido con la hormona de crecimiento humana (hGH) y teniendo en cuenta que en la pituitaria normal hay aproximadamente 100 veces más hGH que PRL, se comprende por qué la purificación de esta última resulta difícil mediante los métodos fisicoquímicos corrientes (4).

En este trabajo se describe un sistema para purificar PRL utilizando su marcado carácter hidrofóbico en comparación con las demás hormonas hipofisarias, logrando un alto rendimiento pero preservando su actividad biológica.

## MATERIALES Y METODOS

### Material Biológico:

Todos los procedimientos se realizaron a 4° C. El material de partida fue el residuo obtenido después de la extracción de hGH, LH (hormona luteinizante), FSH (hormona folículo estimulante) y TSH (hormona tirotrópica), a partir de glándulas conservadas congeladas. La PRL se solubilizó a pH 10 según el procedimiento descrito por Rodríguez et al. (5). Las muestras se concentraron por ultrafiltración previo ajuste del pH a 8.5.

### **Cromatografía de Interacción Hidrofóbica-**

Se empleó como soporte Fenil-Sepharosa CL-4B en proporción de 10 mg de proteína /g de gel. La muestra cruda de PRL se aplicó a la columna equilibrada con acetato de amonio 50 mM, pH 8.5 y se eluyó con el mismo buffer hasta fin de proteína. La velocidad de elución fue 20 ml/h y se recogieron fracciones de 5 ml. En seguida se aplicó acetato de amonio 5 mM, pH 8.5 hasta fin de proteína y el material adsorbido se separó con un gradiente de acetonitrilo (0-40%, v/v) en el buffer anterior. (Volumen total del gradiente 300 ml). El contenido de PRL y hGH de las fracciones eluidas se estableció por medio de RIA específico (4, 6) y se midió el contenido de proteína total según el método de Lowry (7).

### **Cromatografía de Intercambio Iónico:**

La PRL proveniente del paso anterior fue sometida a una segunda purificación mediante cromatografía con DEAE-Celulosa. El material se aplicó a una columna (1 x 21 cm) equilibrada con acetato de amonio 20 mM conteniendo 20% de acetonitrilo (v/v) pH 8.5. Se lavó con este buffer a una velocidad de 16 ml/h y se recogieron fracciones de 3 ml. Para la elución se utilizó un gradiente de acetato de amonio (0.02 - 0.25 M) en presencia de acetonitrilo al 20% (Volumen total del gradiente 200 ml).

### **Radioinmunoanálisis:**

Para verificar el curso de la purificación se determinó la actividad inmunológica de la PRL y otras hormonas presentes por medio radioinmunoanálisis de acuerdo al procedimiento descrito por Villamil (6).

### **Electroforesis Analítica:**

Se empleó el método descrito por Davis (8), utilizando un gel de concentración ( $T = 5.1 C = 2.4$ ) en buffer Tris-ClH 0,5 M, pH 6.9 y un gel de separación ( $T = 7.7 C = 2.4$ ) en buffer Tris-HCl 1.5 M, pH = 8.9. El buffer de los tanques fue Tris-Gly pH 8.3 (0.025 M Tris, 0.192 M Gly) con una conductividad de 0.4 mS. La electroforesis se realizó a 40 mA (20 V) y se elevó a 80 mA (400 V) al entrar la muestra al gel de separación. Las proteínas fueron fijadas y teñidas con solución de agua: isopropanol:acético (8:1:1) con 0.03% de azul de Coomassie durante toda la noche y se decoloró con solución de agua: isopropanol:acético (8:1:1).

### **Determinación del Peso Molecular:**

Se empleó electroforesis en dodecil sulfato de sodio (SDS) según el método de Laemmli (9). Las muestras fueron preparadas en buffer Tris-HCl 0.0625 M, pH 6.9, con 5.9% de 2-mercaptoetanol, 2% SDS, 10% glicerina y 0.001% azul de bromofenol. Para establecer los valores de peso molecular se corrió simultáneamente una mezcla de patrones de bajo peso molecular (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia).

### **Determinación del Punto Isoeléctrico:**

El electroenfoque se hizo en placa de poliacrilamida ( $T = 5 C = 3$ ) con anfolito de rango 3.5 - 10 (LKB).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Cromatografía de Interacción hidrofóbica:

En la Fig. 1 se muestra el perfil de elución obtenido con el lote de 21 glándulas. En los picos de proteína denominados A y B no se encontró cantidad apreciable de PRL. Esta última se separó en el pico obtenido al aplicar el gradiente de acetonitrilo, según se estableció por RIA. Es interesante observar que la elución de hGH comienza antes de concluir la de la PRL a pesar de su menor carácter hidrofóbico. Este mismo comportamiento también fue encontrado en un trabajo previo (10), lo que sugiere que se trata de una especie fuertemente hidrofóbica de hGH.

Este paso cromatográfico permitió separar un alto porcentaje de proteína contaminante y aún cuando la separación de PRL y hGH no fue completa, se consiguió un pico agudo de PRL inmunorreactiva cuando el porcentaje de acetonitrilo fue de 15%. En la Tabla 1 se muestran los valores de proteína y actividad hormonal durante esta etapa, observándose una recuperación de PRL del 56.7% y un incremento en la actividad específica de 10 veces.

### Cromatografía del Intercambio Iónico:

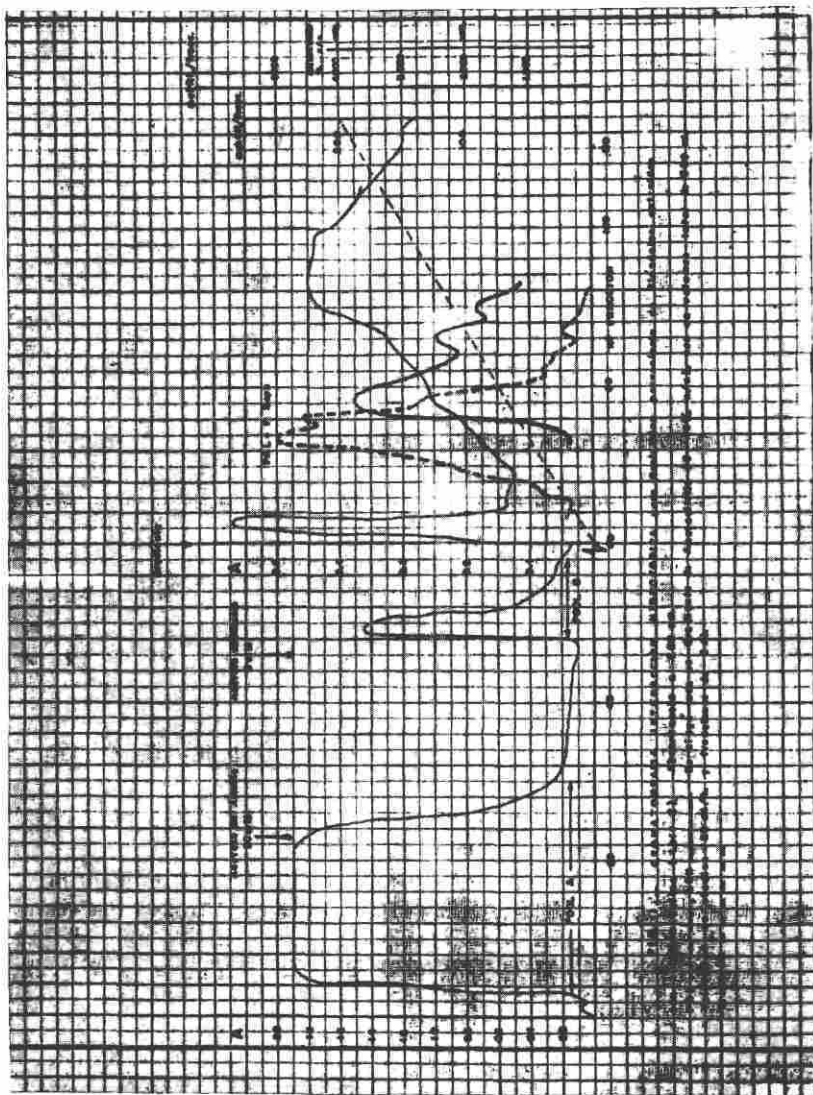
El cromatograma obtenido muestra que con una concentración 0.12 M (conductividad 5 mS) de acetato de amonio se logra la desorción de un pico inmunorreactivo de PRL, en tanto que la hGH aún presente se separa con una concentración del gradiente de 0.19 M (conductividad 7.5 mS) (Fig. 2).

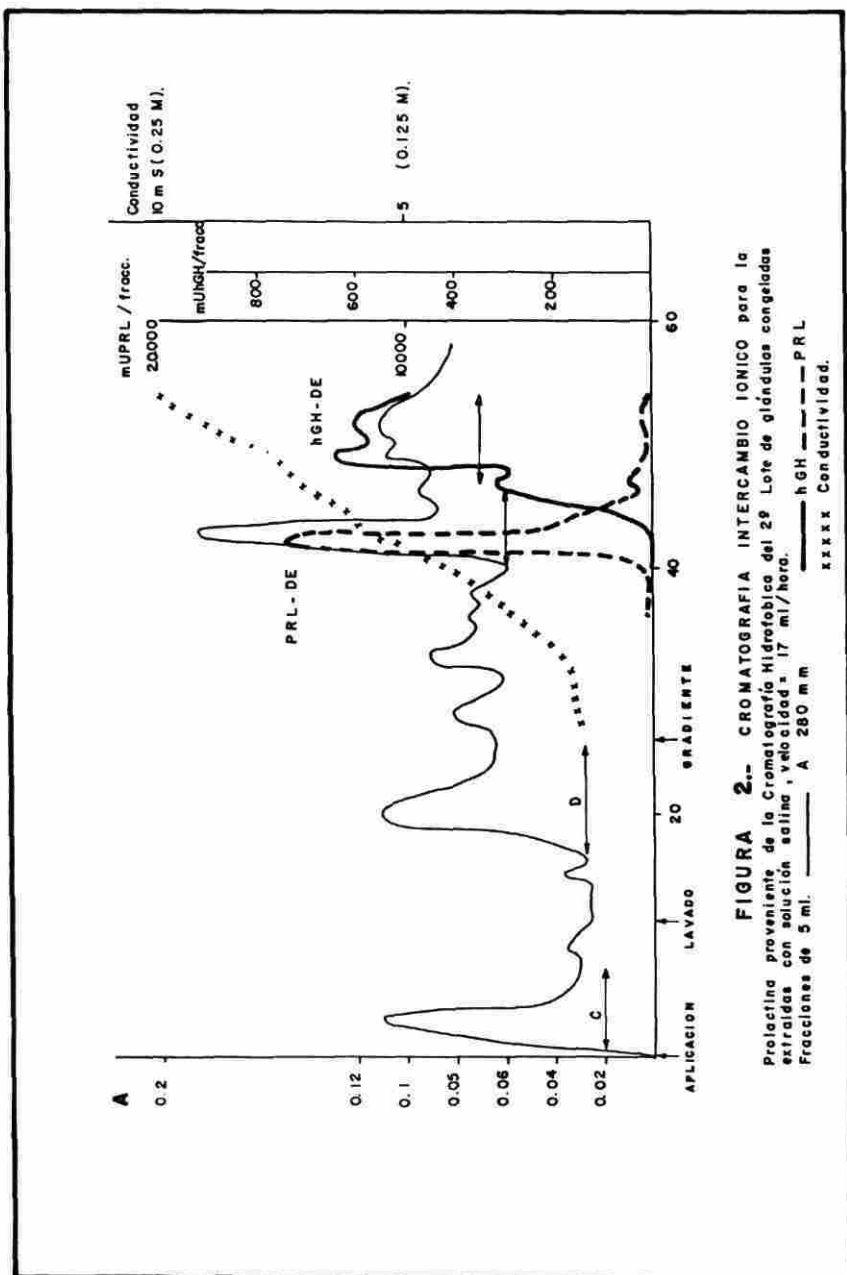
La efectividad de esta cromatografía se puede constatar en la resolución de dos picos agudos, identificados como PRL y hGH por RIA específico y en el incremento de los valores finales de actividad específica (Tabla 2). La recuperación de PRL fue de 69.7% y la contaminación con hGH despreciable. La posible pérdida de hormona en los dos picos precedentes al principal no arrojó valores significativos y no se descarta el hecho de que existan formas modificadas de carácter fuertemente aniónico que serían eluidas posteriormente. Esto está de acuerdo con lo reportado por Nyberg et al. (11) donde se evidencia por electroforesis la naturaleza heterogénea de la proteína.

La recuperación global del proceso dió un resultado de 37.6% que en términos del patrón de referencia corresponde a 7.5 mg de PRL por 100 glándulas. Los valores encontrados por otros investigadores van desde 0.013 mg/100 glándulas (12), hasta 3.1 mg/ 100 glándulas (13) y 8.6 mg/ 100 glándulas (10), que es hasta el momento el valor más alto reportado. El resultado encontrado en este trabajo puede incluirse dentro de los mejores.

### Caracterización:

La presencia de otras hormonas hipofisarias en la preparación final purificada de PRL dió para hGH 0.11 UI/mg de proteína o sea 5%, LH 24 mUI/mg proteína y FSH 2.6 mUI/mg proteína. Estos valores son similares a los reportados por Rathman y Saxena (3) quienes encontraron un contenido de 0.06 UI hGH/mg en su preparación pura de PRL, o al hallado por Roos et al. (13) que fue de 2% para hGH. La contaminación con gonadotropinas fue menor de 0.01% lo cual es despreciable.





**FIGURA 2.** CROMATOGRFIA INTERCAMBIO IONICO para la Prolactina proveniente de la Cromatografía Hidrofobica del 2º Lote de glándulas congeladas extraídas con solución salina, velocidad a 17 ml/hora. Fracciones de 5 ml. — A 280 nm

En la Fig. 3 se observa el resultado del análisis electroforético para las distintas fracciones obtenidas durante la purificación y la preparación final liofilizada. La movilidad electroforética se estableció por comparación con prolactina radioactiva ( $^{125}\text{I}$ -PRL). La hormona purificada mostró 4 bandas cuyas movilidades en conjunto fueron menores que las observadas en la hGH patrón. Este comportamiento es el esperado a pH 8.5 de acuerdo con los valores de PI reportados para estas dos hormonas.

El pleomorfismo de la PRL encontrado en este trabajo, parece ser una característica común a las hormonas peptídicas puesto que se observó también en un trabajo previo con hGH (4). Esta heterogeneidad a pH alcalino se considera que ocurre por diferencias en carga y no en conformación de las moléculas.

La electroforesis con SDS puso también de manifiesto la presencia de varios componentes electroforéticos, tanto en la forma purificada en este estudio, como también en los patrones de hGH y PRL utilizados (Fig. 4). Se identificaron por lo menos dos bandas, una con peso 27.000 daltons y otra de 64.000 daltons. La primera de ellas puede corresponder a la forma monomérica y aunque su peso es un poco mayor al esperado (10), la diferencia se puede atribuir al hecho de que el rompimiento de la estructura terciaria de la hormona, asociado con la reducción de los puentes bisulfuro, puede ocasionar un incremento en el radio de Stoke de la molécula.

Recientemente se han encontrado otras formas adicionales de prolactina humana (29K, 45K y 16K) en homogenizados de pituitaria (14). Además se ha demostrado que existe una PRL "grande" (60K) (15) que podría ser el resultado de la inclusión de carbohidrato en la molécula.

Como se observa por electroenfoque (Fig. 5) la PRL aquí obtenida se pudo resolver en 4 especies con puntos isoeléctricos en el rango 4.1 - 5.7. La banda de PI 5.7 puede corresponder al monómero y las restantes formas ácidas pueden tener su origen en la misma pituitaria por acción de proteinasas durante el almacenamiento de las glándulas, o por cambios ocasionados durante la extracción y purificación de la hormona.

## CONCLUSIONES

El procedimiento descrito en este trabajo permite obtener una preparación de prolactina humana de pureza y actividad inmunológica altas. El empleo de la cromatografía hidrofóbica es un enfoque reciente en la purificación de proteínas y se pudo establecer que permite incrementar la actividad específica de la prolactina en un factor de 10, sin alterar la actividad. La purificación ulterior mediante cromatografía de intercambio iónico separó la hormona de crecimiento en forma efectiva.

Se comprobó la existencia de varias especies moleculares con diferencias de carga y tamaño, con un comportamiento similar al encontrado en el patrón internacional de referencia usado.

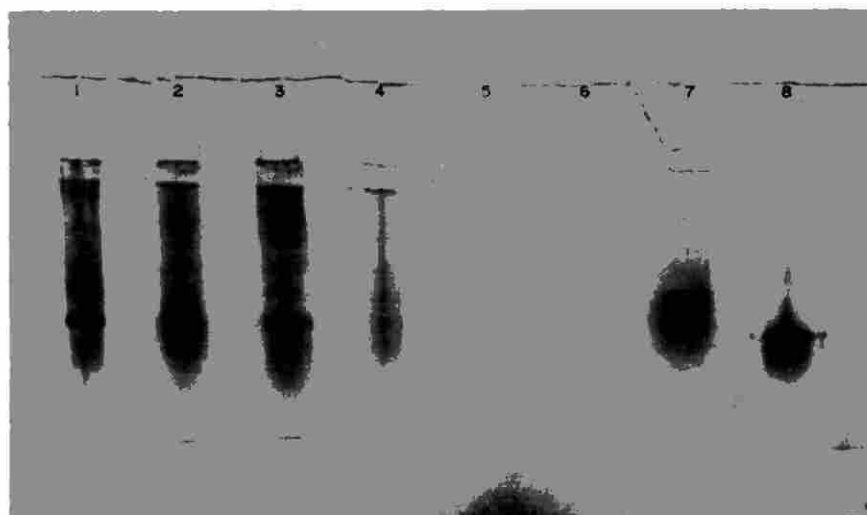


FIGURA 3. ELECTROFORESIS ANALITICA

Columna	Muestra	Concentración mg/ml	Volumen ul
1	Extracto salino hipofisis	11.0	25
2	PRL cruda	1.57	100
3	PRL cruda concentrada	3.6	80
4	PRL post-Fenil-sepharosa	0.19	200
5	PRL post-DEAE-Celulosa	0.09	100
6	PRL post-DEAE-Celulosa	0.09	200
7	PRL final liofilizada	1.0	100
8	hGH Patrón	1.0	100



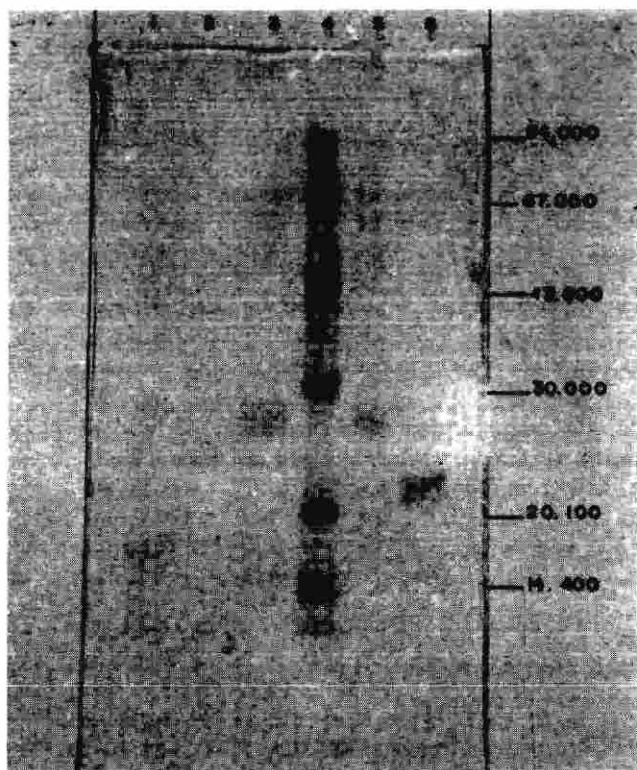


FIGURA 4. ELECTROFORESIS EN SDS DE FRACCIONES DE PROLACTINA

Columna	Muestra	Concentración mg/ml	Volumen ul
1	Post-Fenil-sepharosa	0.19	200
2	Post-DEAE-Celulosa	0.09	200
3	PRL final liofilizada	1.0	100
4	Patrón Pesos Moleculares	1.0	10
5	PRL Patrón	1.0	100
6	hGH Patrón	1.0	100

**TABLA 1**  
**CROMATOGRAFIA DE INTERACCION HIDROFOBICA**

Fracción	Proteína (mg) a)	mUI PRL/mg prot b)	UI hGH/mg prot b)	Rendimiento % c)
PRL cruda	331.2	249.0	0.05	100
Pico A	177.8	15.0	N.D.	53.6 d)
Pico B	46.5	44.0	N.D.	14.0 d)
PRL	13.6	3274.0	0.43	4.1 d)

- a) Método de Lowry, promedio de 3 determinaciones  
 b) Método de RIA, promedio de 4 determinaciones  
 c) Porcentaje de rendimiento de proteína con respecto al total aplicado  
 d) Proteína total recuperada 71.2%

**TABLA 2**  
**PROCESO DE PURIFICACION DE PROLACTINA**

Fracción	Proteína mg	Prolactina mUI mg prot	hGH ug gland	hGH UI mg prot	Recuperación %
PRL cruda	336.0	250.4	200.3	0.07	
Aplicado a Fenil-Sep.	331.2	249.0	187.0	0.05	
Obtenido de Fenil-Sep.	13.6	3274.0	106	0.43	56.7
Aplicado a DEAE-Cel.	12.6	3274.0	98.2	0.43	
Obtenido de DEAE-Cel.	2.7	10637.0	68.4	0.11	69.7
				<b>GLOBAL</b>	<b>37.6</b>

## BIBLIOGRAFIA

1. W. Daughaday. "The Adenohypophysis". Textbook of Endocrinology Sexta Ed., Cap. 3, p. 85. Robert H. Williams Ed. Filadelpia, W.H. Saunders (1981).
2. P. Hwang. et al. *Methods in Enzymology*, **37**, 389- 402 (1975).
3. P. Rathnam y B. Saxena. *Endocrinology*, **100**, 1403- 1408 (1977).
4. A. Vargas y C. Velásquez. "Aislamiento y purificación de hormona de crecimiento humana a partir de glándulas congeladas", Tesis Farmacia, Universidad Nacional (1984).
5. S. C. Rodríguez, M.S. Gómez y Aschner, P., *Rev. Col. Química*, **16** (1987).
6. W. Villamil. "Marcación con 125I, radioinmunoanálisis y su aplicación al estudio de la ginecomastia", Tesis Química, Universidad Nacional (1982).
7. O.H. Lowry et al., *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
8. B.J. Davis, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404- 427 (1964).
9. U.K. Laemli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
10. S.C. Hodgkinson y P.J. Lowry, *Biochem. J.* **199**, 619-627 (1981).
11. F. Nyberg, P. Roos y U. Wide, *Bioch. Biophys. Acta*, **285**, 255-265 (1980).
12. P. Hwang et al., *J. Biol. Chem.* **247**, 1955-1958 (1972).
13. P. Roos et al., *Bioch. Biophys. Acta*, **588**, 368- 379 (1979).
14. U.J. Lewis, *Ann. Rev. Physiol.*, **46**, 33-42 (1984).
15. D. Shoupe et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **147**, 482-487 (1983).