

3/98

FACULTAD DE CIENCIAS

Zoilo González Lama

ESTUDIO DE FACTORES CON ACTIVIDAD DE TOXOHORMONA (TH) OBTENIDOS DE MUTANTES "PETITE" DEFICIENTES RESPIRATORIAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

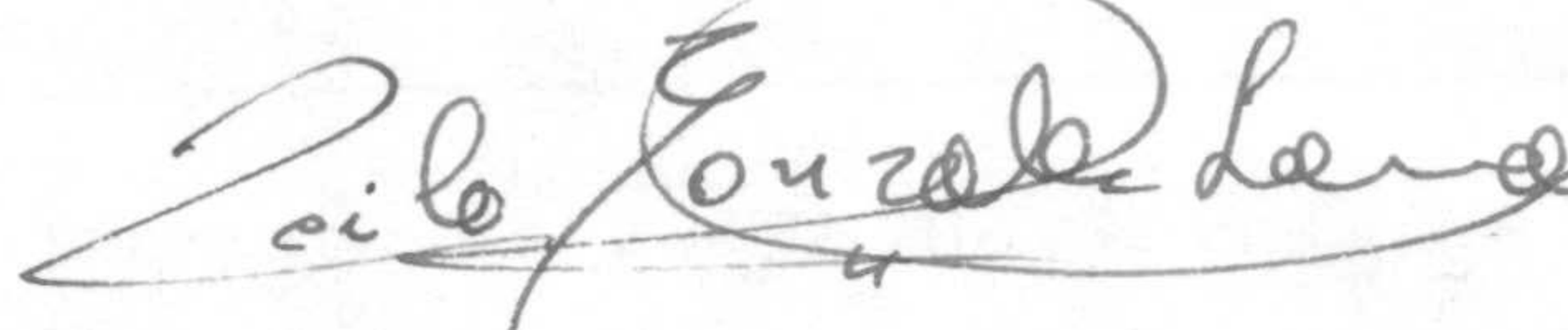
1 975

R. 24669

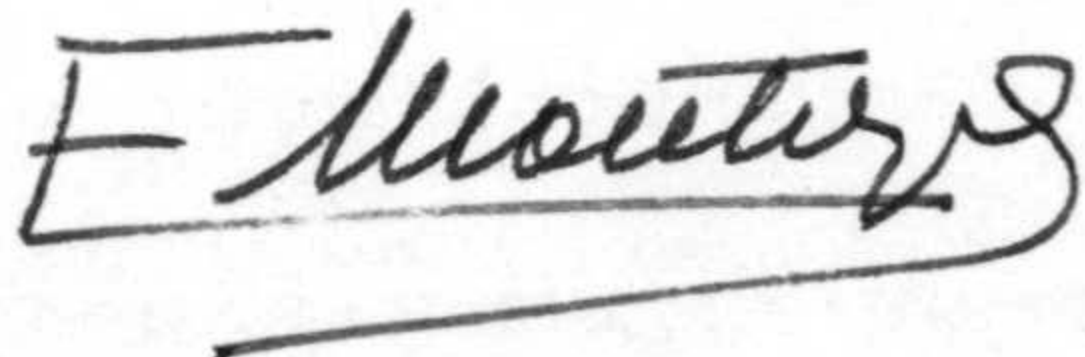
"ESTUDIO DE FACTORES CON ACTIVIDAD DE TOXOHORMONA (TH) OBTENIDOS DE MUTANTES "PETITE" DEFICIENTES RESPIRATORIAS - DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE".

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias por el Licenciado D. Zoilo González Lama.

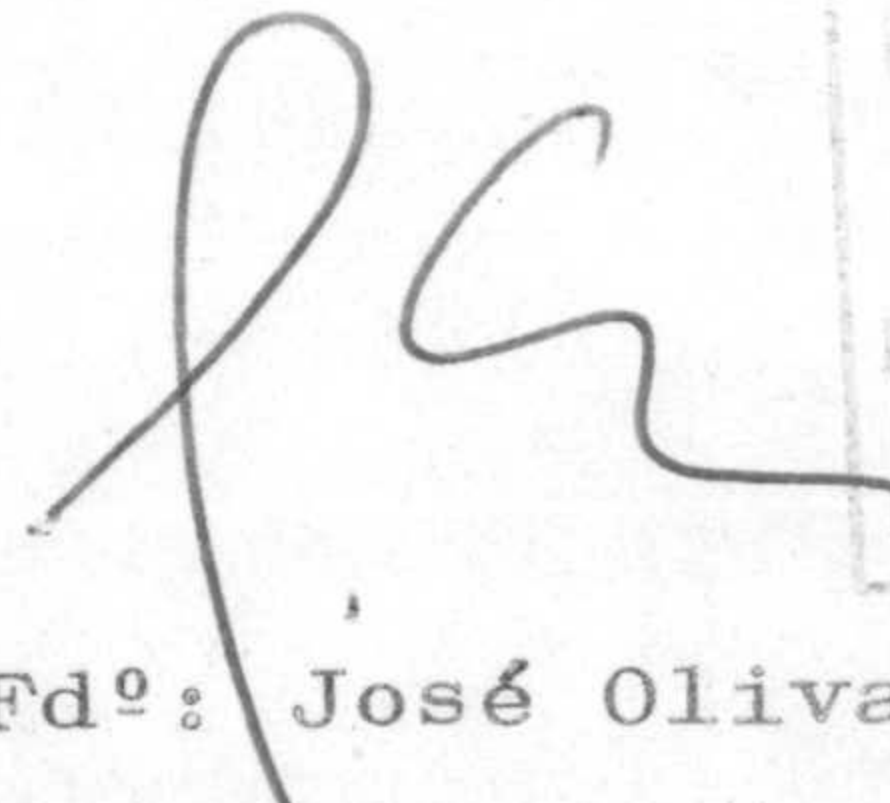
Granada, 25 de Junio de 1975



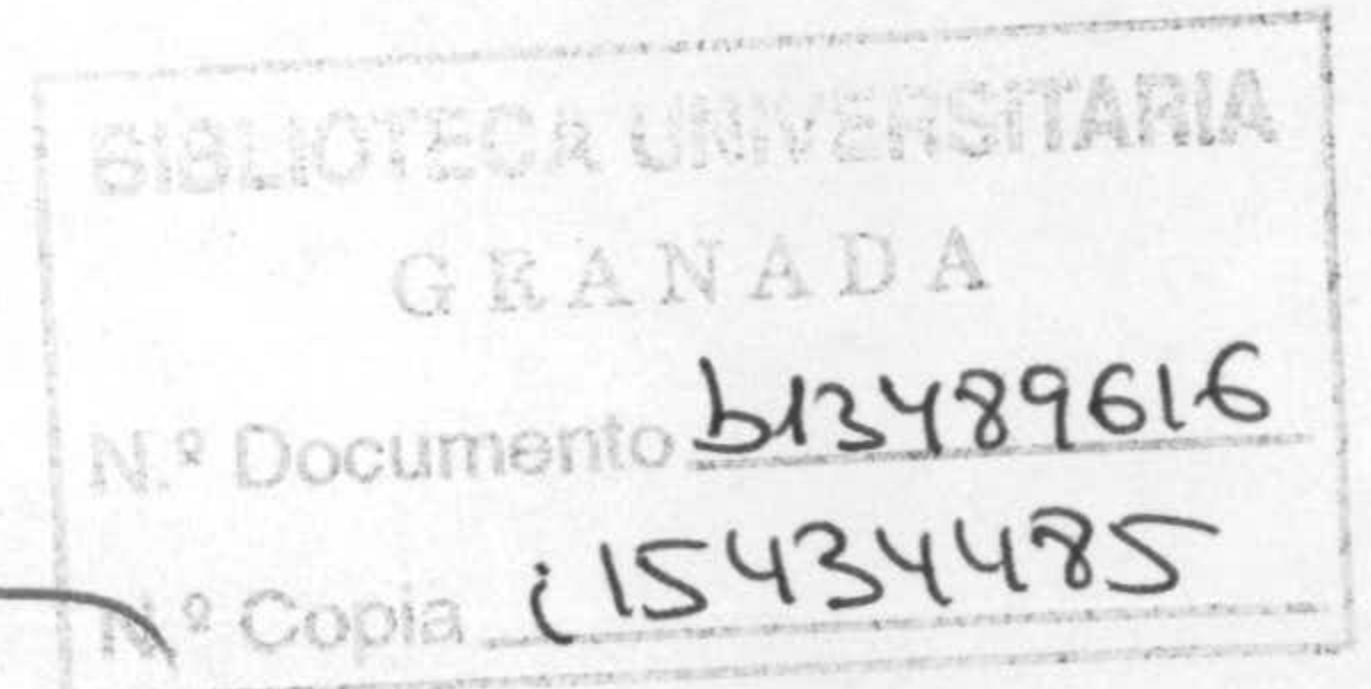
Fdº: Zoilo González Lama. Licenciado en Ciencias,  
Visado en Granada, 25 de Junio de 1975  
con el Vº Bº de los DIRECTORES



Fdº: Enrique Montoya Gómez.  
Doctor en Farmacia  
Catedrático y Jefe del Departamento de Microbiología.



Fdº: José Olivares Pascual.  
Doctor en Farmacia  
Profesor de Investigación del C.S.I.C. Jefe de la Sección de Microbiología de la Est. Exp. del Zaidin.



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 15 JUL. 1975  
ENTRADA NUM. 2947

ESTUDIO El presente trabajo ha sido realizado en el LABO  
RATORIO DE LA SECCION DE MICROBIOLOGIA DE LA ESTACION EX-  
PERIMENTAL DEL ZAIDIN, C.S.I.C., durante los cursos acadé-  
micos 1972-73, 1973-74, y 1974-75.

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor en  
Ciencias por el Licenciado D. Zeilo González Lama.

La realización del trabajo  
experimental ha sido sufragada  
por una Beca del Plan de Forma-  
ción del Personal Docente e In-  
vestigador.

Fdº: Zeilo González Lama. Licenciado en Ciencias.

Visado en Granada, 25 de Junio de 1975.

Con el Vº Bº de los DIRECTORES

Fdº: Enrique Montoya

Gómez.

Doctor en Farmacia

Catedrático y Jefe del

Departamento de Micro-

biología.

Fdº: José Obispo

Parte de los resultados de  
ésta Tesis, han sido presenta-  
dos en el IV Congreso Nacional  
de Microbiología, Granada, 1973,  
y en el VI Congreso Nacional -  
de Bioquímica, Sevilla, 1975.

Mi agradecimiento:

A los Directores de esta Tesis Doctoral: Prof. Dr. Montoya Gómez, Director del Departamento Interfacultativo de Microbiología de la Universidad de Granada y Prof. Dr. Olivares Pascual, Director de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, por su constante orientación y ayuda en la realización de este trabajo pues con su ejemplo y dedicación han sido para mi Profesión y Maestro en todo momento.

Al Prof. Dr. Cecilio Martínez, Director de la Estación Experimental del Zaidín, por la favorable acogida dispensada.

A la Sección de Bioquímica de la Estación Experimental del Zaidín y en especial al Director de la misma, Dr. López Gorgo por sus consejos en temas de su especialidad a lo largo de todo este trabajo.

Igualmente, quiero dar las gracias a mis compañeros y especialmente a D. Víctor Costa Borona, por su valiosa ayuda, personal Técnico y Auxiliar de la Estación Experimental del Zaidín y particularmente a las señoritas Teresa María Vivaldi y Mariño Galindo así como también a D. Juan Rodríguez, por su ayuda prestada.

**A mis padres  
y hermanos**

Mi agradecimiento; este trabajo ha sido realizado en el LABORATORIO DE LA SECCION DE MICROBIOLOGIA DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN, C.S.I.C., -  
A los Directores de ésta Tesis Doctoral; Prof. -  
Dr. Montoya Gómez, Director del Departamento Interfacultativo de Microbiología de la Universidad de Granada y Prof. Dr. Olivares Pascual, Director de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidin, C.S.I.C., -  
por su constante orientación y ayuda en la realización de éste trabajo; pues con su ejemplo y dedicación han sido -  
para mi Profesores y Maestros al mismo tiempo.

Al Prof. Dr. Recalde Martínez, Director de la Estación Experimental del Zaidin, C.S.I.C., por la favorable acogida dispensada.

A la Sección de Bioquímica de la Estación Experimental del Zaidin y en especial al Director de la misma, Dr. López Gorgé por sus consejos en temas de su especialidad a lo largo de todo éste trabajo.

Igualmente, quiero dar las gracias a mis compañeros y especialmente a D. Víctor Costa Boronat, por su valiosa ayuda, personal Técnico y Auxiliar de la Estación Experimental del Zaidin y particularmente a las señoritas M<sup>as</sup> Teresa Martín-Vivaldi y Matilde Garrido así como también a D. Juan Rodríguez, por su ayuda prestada.

## I N D I C E

I) INTRODUCCION.....	12
II) OBJETO DEL TRABAJO.....	45
III) MATERIAL Y METODOS.....	49
<u>Microorganismos utilizados</u> .....	50
<u>Medios de cultivo utilizados</u> .....	51
<u>Obtención de TH a partir de mutantes de</u> <u>levadura con deficiencia respiratoria</u> .....	52
a) Método de YUNOKI y GRIFFIN.....	52
b) Método de NAKAGAWA.....	54
<u>Determinación del contenido proteico</u> .....	56
a) Método de LOWRY.....	56
a.1) Curva patrón de Albúmina.....	56
a.2) Metodica.....	57
a.3) Cálculos.....	58
a.4) Reactivos.....	58
b) Absorción en el ultravioleta a 280 nm.	59
c) Modificación del método de LOWRY.....	60

<u>Determinación de la actividad de TH.....</u>	60
a) Determinación de la actividad de catalasa hepática.....	60
b) Determinación del hierro plasmático.....	63
b.1) Reactivos utilizados.....	63
b.2) Mezcla de reactivos.....	64
b.3) Solución para obtener la curva patrón.....	64
b.4) Procedimiento.....	65
<u>Técnicas de purificación de TH.....</u>	67
a) Fraccionamiento por filtración en Gel. Utilización de Sephadex G-25.....	67
a.1) Preparación del Gel.....	67
a.2) Montaje de la columna.....	68
a.3) Aplicación y elución de la muestra.....	68
b) Cromatografía por columna de DEAE-cel.	69
c) Electroenfoque en gradiente de densidad.....	71
c.1) Soluciones de los electrodos.....	71
c.2) Solución de Anfolinás y gradiente de Sacarosa.....	73

c.3) Llenado de la columna.....	74
c.4) Condiciones de la operación.....	74
c.5) Elución de la columna.....	75
d) Diálisis.....	75
<u>Análisis químico de la TH.....</u>	76
Composición de aminoácidos.....	76
<u>Mecanismo de acción de la TH.....</u>	79
Isoenzimas de la catalasa de ratón.....	79
a) Extracción del hígado.....	80
b) Sonicación.....	80
c) Centrifugación.....	80
d) Isoelectroenfoque.....	80
e) Valoración de los isoenzimas de la catalasa.....	81
IV) RESULTADOS.....	82
Extracción y determinación de la actividad de los factores TH obtenidos de mutantes - rho <sup>-</sup> de levadura sobre la catalasa hepática e hierro plasmático.....	83
Purificación de factores con actividad de TH obtenidos de mutantes de levadura.....	88



Composición química de factores con actividad de TH obtenidos de mutantes de levadura.....	103
Mecanismo de acción de los factores - con actividad TH, obtenidos de mutantes de levadura.....	110
.....	
V) DISCUSION.....	122
.....	
VI) CONCLUSIONES.....	134
.....	
VII) BIBLIOGRAFIA.....	137

IV) RESULTADOS.....

Extracción y determinación de la actividad de los factores TH obtenidos de mutantes de levadura sobre el sustrato de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Participación de factores de levadura en la síntesis de TH obtenidos de mutantes de levadura.

I N T R O D U C C I O N

## I N T R O D U C C I O N

Los animales portadores de tumores malignos en crecimiento presentan, al lado de los trastornos patológicos derivados de la destrucción de los tejidos invadidos, una serie de alteraciones metabólicas generalizadas que, desde hace tiempo, se ha pensado que podían depender de la destrucción de sustancias tóxicas producidas por las células malignas.

Entre las citadas alteraciones, destacan por la constancia con que acompaña a las enfermedades neoplásicas en hombre y animales, una anemia insidiosa precedida y acompañada por una disminución en el nivel de hierro plasmático, y relacionada probablemente con una alteración general del metabolismo del hierro; la alteración en el peso de varios órganos -timo y glándulas suprarrenales- y; finalmente, una disminución en el nivel de la catalasa hepática.

Esta última alteración es especialmente constante

y ha sido la más estudiada. Efectivamente, ya en 1910 BLUMENTHAL y BRAHN, al observar la baja actividad de catalasa hepática en hombres muertos de cáncer, relacionaron dicho bajo nivel con el desarrollo del tumor maligno.

En 1912, ROSENTHAL demostró que los ratones portadores de tumores presentan un nivel de catalasa hepática inferior al de los ratones normales empleados como testigos; igualmente pudo provocar este mismo efecto por inyección intraperitoneal a ratones normales de homogeneizados de tumores malignos.

A partir de 1941 GREENSTEIN et al. (1941, 1942, 1943, 1952, 1954, 1955) llevaron a cabo un estudio sistemático de éste fenómeno llegando a las siguientes conclusiones:

- a) La actividad catalásica del hígado en animales con tumores, es inferior a la de testigos sanos.
- b) La actividad catalásica del hígado decae progresivamente conforme crece el tumor.
- c) La disminución de la catalasa hepática es un fenómeno reversible: al extirpar totalmente el tumor se produce una vuelta a la nor-

malidad.

- d) La actividad catalásica disminuye al máximo en el hígado, ligeramente en el riñón, y no se altera en los eritrocitos.

Finalmente, en 1948 pudo ser establecida de forma directa la relación de causa a efecto entre la existencia de un tumor en crecimiento y la disminución de la catalasa hepática. Efectivamente, en este año NAKAHARA y FUKUOKA -- consiguieron aislar a partir de tejidos neoplásicos una -- sustancia que era capaz de disminuir el nivel de catalasa hepática de ratones normales, cuando se administraba a éstos por vía intraperitoneal en dosis razonablemente pequeñas.

Esta sustancia recibió el nombre de TOXOHORMONA -- (TH) debido a que produciéndose en los tejidos neoplásicos era capaz de ejercer su acción tóxica a distancia.

El modo empleado para la preparación de ésta sustancia, como luego se expondrá ampliamente, consistió en -- una extracción acuosa al baño maría de tejido canceroso -- fresco, concentración del extracto obtenido y precipita--- ción con alcohol absoluto; es muy interesante hacer constar que mediante éste procedimiento la TH fué obtenida a partir de una gran variedad de tumores, pero no de los tejidos pró

ximos al tumor o de tejidos tumorales necrosados.

Este descubrimiento de NAKAHARA y FUKUOKA fué rápidamente confirmado por una diversidad de autores (GREENFIELD y MEISTER, 1951) y ampliado en el sentido de que, como a continuación se expondrá, la TH, aislada por el procedimiento indicado, afectaba, igualmente, cuando era inyectada a animales normales, a la concentración de hierro plasmático, la involución del timo y glándulas suprarrenales, el contenido de ferritina del hígado, etc. En definitiva, la TH puesta de manifiesto por NAKAHARA y FUKUOKA parece ser un factor ó más probablemente un conjunto de factores tóxicos que, producidos por las células tumorales, dan lugar a las alteraciones antes citadas al difundir por el organismo.

Desde 1948 hasta la fecha, los estudios sobre TH han tenido un gran desarrollo, por los conocimientos sobre dicha sustancia se han ampliado enormemente.

En ésta introducción, se tratará de resumir dichos conocimientos en los apartados que siguen y que hacen referencia a las actividades biológicas de la TH, a los métodos empleados en aislamiento, purificación y valoración de la misma, así como, a su composición química.

## Actividades biológicas de la TH.

### Efecto sobre la catalasa hepática.

Como ya se ha indicado, uno de los factores más característicos de la TH es su capacidad de disminuir los niveles de catalasa hepática; efecto que se puede comprobar fácilmente en ratones normales. Efectivamente la inyección intraperitoneal de una dosis adecuada de TH, origina en los animales citados un descenso notable de la actividad de la catalasa hepática de los mismos, detectable a las 20-24 horas después de practicada la inyección y que se prolonga durante otras 24 horas más, aproximadamente. Realmente éste efecto de la TH no es exclusivo de la misma, ya que tratamientos con diversos agentes disminuyen los niveles de catalasa hepática; tal es el caso de la irradiación total de los ratones con rayos X (FEINSTEIN, 1950) así como la administración a los mismos de 3-amino-1, 2, 4-triazol (FEINSTEIN et al. 1958-59), de una serie de derivados de la cisteína (ADAMS, 1960) y de numerosos hidrocarburos carcinogénicos (ADAMS 1953, 1960) y otras sustancias más (Tabla 3, OHNUMA y HOLLAND, págs. 174-176 del libro "Chemical tumor problems", W. NAKAHARA.). Todos estos agen

tes sin embargo, parecen ejercer su acción por una interacción directa con el enzima que lleva consigo la inactivación de la misma, como se deduce del hecho que son activos tanto "in vivo" como "in vitro", es decir, tanto cuando se administra a ratones normales o como cuando se añade a homogeneizados de hígado de ratones no tratados.

La TH, por el contrario, tiene la particularidad de ser activa sólo "in vivo". Son numerosos los trabajos que confirman este hecho, entre los que caben destacar los de GREENSTEIN (1943) que demostró que los extractos de tumores activos cuando inyectados a ratones, carecen de acción sobre la catalasa hepática cuando se añaden a homogeneizados de hígado de ratones normales. Igualmente, ENDO et al. (1955), llevaron a cabo un extenso estudio sobre el efecto "in vitro" de TH sobre catalasa hepática cristalizada, encontrando que la actividad de la misma no se afectaba en presencia de TH, incluso cuando ésta se añadió en altas concentraciones al preparado enzimático.

De otra parte PRICE et al (1961), pudieron comprobar que cuando se administraban inyecciones repetidas de TH a ratones normales, con intervalos de 24 horas, la actividad catalásica del hígado no va decreciendo progresivamente, como sería de esperar si la TH interaccionara directamente --



con la catalasa, sino, que alcanzaba un mínimo a las 24 -- horas de practicada la primera inyección manteniéndose después constante.

Por último, HOZUMI y SUGIMURA (1962), mediante la administración de TH a ratones tratados previamente con potentes inhibidores de la catalasa -alilisopropil acetamida, 3-amino-1, 2, 4-triazol, etc-, mostraron de una manera concluyente que la TH no actúa directamente sobre la catalasa inhibiendo su acción, sino sobre la biosíntesis reprimiendola.

La TH, por tanto, actúa como una verdadera hormona, - ejerciendo un control negativo sobre la síntesis de la catalasa.

#### Efecto de la TH sobre el hierro plasmático.

ONO et al. (1960) y URUSHIZAKI et al. (1964), mostraron que una disminución del hierro plasmático ocurre después de la inyección de TH. FUKUDA et al. (1966), obtuvieron seis fracciones purificadas de TH cruda por cromatografía en columna de DEAE-Sephadex y observaron que la concentración del hierro plasmático de ratas mostraba una marcada reducción por las inyecciones de la fracción 1, moderada depresión por las inyecciones de las fracciones 2, 3 y 4,

mientras que no se manifestaba ésta actividad en las fracciones 5 y 6. De estos resultados experimentales puede deducirse la posible existencia de una multiplicidad de la TH<sub>2</sub> o del complejo TH<sub>2</sub>, aunque una satisfactoria separación de los componentes químicos del complejo no ha sido realizada todavía.

KAMPSCHMIDT et al. (1965), y FUKUDA et al. (1966), observaron también un decrecimiento marcado de la concentración de hierro plasmático en las ratas que recibieron múltiples inyecciones subcutáneas de TH<sub>2</sub>,

KAMPSCHMIDT et al. (1959), señalan una disminución espectacular del hierro plasmático. Estos autores, observaron que el efecto sobre la concentración de hierro plasmático era aproximadamente 100 veces más sensible que el de la TH sobre la catalasa hepática. La preparación de TH por precipitación alcohólica a partir del carcinoma Walker 256, inyectada en ratas normales, hacía descender el hierro plasmático alrededor de 50 microgramos/% 24 horas después de una inyección simple de 50 a 100 mg. Las ratas no tratadas tenían un nivel de 283 microgramos/%. En el mismo grupo de animales inyectados con TH<sub>2</sub>, la actividad de catalasa hepática era de 3000-3500 unidades frente a las 5400 de los animales testigo.

## Efecto de la TH sobre la ferritina del hígado.

En las enfermedades neoplásicas tanto en el hombre como en los animales aparece una alteración en el mecanismo sintetizador de ferritinas y ferroproteínas específicas.

La primera indicación de que la TH puede alterar el contenido de ferritina del hígado, es dada por IJIMA et al. (1956), quienes estudiaron los cambios acaecidos en el hierro que no forma complejos hemáticos en ratones normales e inyectados con TH, y los compararon con los cambios ocurridos en el hígado de pacientes con cáncer gástrico. Estos autores, usando TH preparada por precipitación alcohólica de tejido gástrico canceroso humano, observaron que una inyección simple en dosis de 60 mg. era suficiente para inducir, 24 horas más tarde, un decrecimiento en la fracción ferritina en un 30% del nivel normal. Los cambios que ellos encontraron en el hígado de pacientes con cáncer gástrico fueron comparables a los de los ratones inyectados.

Estos resultados fueron confirmados por HOSHIZIMA (1957) en sus estudios de almacenamiento de hierro y de actividad de catalasa en el hígado de ratones inyectados con TH.

En contraste a la ferritina otros compuestos de -- hierro no mostraron ésta actividad. La disminución de la - ferritina del hígado iba cuantitativamente casi paralela - a la depresión de la actividad de catalasa hepática, y los ratones con más baja cantidad de ferritina del hígado, mos

La ferritina del hígado determinada por método inmunoquímico, era remarcadamente decrecida por la inyección de TH. FUKUDA et al. (1966), obteniendo TH a partir de carcinoma gástrico humano y tejidos de sarcoma Yoshida, la separó en seis fracciones por cromatografía en columna de -- DEAE-Sephadex. El contenido de ferritina del hígado de ratas, mostró un marcado decrecimiento por la inyección de - las fracciones 2 y 3, pero no un efecto significativo por la inyección de las fracciones 5 y 6.

SUGII (1963), deduce de sus estudios sobre metabolismo del hierro en ratas portadoras de sarcoma Yoshida, - que el hierro plasmático, la actividad de catalasa hepática y la hemoglobina decrecían en el transcurso del tiempo siguiente a la inoculación del tumor, mientras que el contenido total de hierro no hemático se incrementaba al co--mienzo mostrando un decrecimiento gradual hacia el final.

FUKUDA et al. (1966), claramente demostraron un --  
decrecimiento en la ferritina que llegaba aproximadamente  
al 25% de los valores del control, cuando las ratas habian  
recibido las fracciones 1, 2 y 3 de un fraccionado de TH -  
por columna de DEAE-Sephadex. La inyección de las fraccio-  
nes 4 y 5, no mostraron su influencia en el contenido de -  
la ferritina hepática. Usando la técnica de isoelectroenfo-  
que, fué investigada la microheterogeneidad de la ferriti-  
na hepática de ratas por URUSHIZAKI et al. (1968). Observau  
ron estos autores que la ferritina hepática de ratas normau  
les mostraba varias formas con puntos isoeléctricos distinu  
tos en un rango de pH 4.7 a 5.3, observaron tambien, que -  
multiples inyecciones subcutáneas de TH pueden producir el  
mismo efecto sobre la ferritina hepática que los componen-  
tes que se encuantran en ratas portadoras de tumor.

Efecto de la TH sobre la triptofanopirrolasa del higado.

FUJII et al. (1960), aislaron una fracción protei-  
ca básica de tejidos tumorales que no solamente mostraba -  
actividad frente a la catalasa del higado, sino tambien, -  
sobre la triptofanopirrolasa hepática.

Efecto de la TH sobre la síntesis de la difosfopiridin nucleotido (DPN).

ONO y TOMARU (1959), demostraron la capacidad de la TH para deprimir la síntesis de DPN en el hígado, el cual actúa como co-enzima de varias deshidrogenasas. Anteriormente WARAVDEKAR y POWERS (1957), habían observado -- que la síntesis de DPN en el hígado de animales portadores de tumores era más baja que la de los animales normales. La determinación de DPN fué llevada a cabo, en ambos casos, siguiendo el método de JEDIKIN y WEINHOUSE (pág. 55, libro "Toxohormone", W. NAKAHARA y F. FUKUOKA).

Influencia de la TH sobre el timo.

Hay un grupo de cambios sistemáticos en el cáncer que se manifiesta en la alteración del peso de varios órganos, especialmente glándulas suprarrenales y timo. El gran desarrollo de las glándulas suprarrenales va acompañado con una marcada reducción en el contenido de ácido ascórbico y lípidos y fué interpretado como representación de una reducción de la actividad cortical.

En los primeros estudios sobre TH, FUKUOKA y NAKAHARA (1952), hicieron experiencias para determinar si el

desarrollo de las glándulas suprarrenales y el timo pueden estar relacionados con la acción de ésta tóxina cancerosa, descubriendo sin embargo que en estos casos las alteraciones de las glándulas suprarrenales y timo eran más o menos independientes entre sí, con respecto a la TH. Se encontró que una inyección simple de TH inducía una atrofia del timo sin efecto significativo en el peso de las glándulas suprarrenales.

En estos experimentos la fracción TH usada fué obtenida de sarcoma de ratón de NAKAHARA y FUKUOKA por medio de precipitación alcohólica seguida por reprecipitación con sulfato de cobre. Esta fracción fué capaz de disminuir la actividad de la catalasa hepática de ratones normales en dosis de 10 mg. A los ratones normales les fué dada una inyección simple intraperitoneal de 10 a 20 mg de ésta fracción, y los pesos del timo y glándulas suprarrenales fueron determinados 24 horas, 48 horas y 3 días después de la inyección. Comparando el peso del timo normal de 130 mg (por 100 g de peso del cuerpo) el timo en ratones inyectados con 10 mg de TH pesaba 72 mg 48 horas después y 87-107 mg 3 días después de la inyección. Con dosis de 20 mg de TH, el peso del timo era de 28-51 mg a las 24 horas, 16 a 26 mg a las 48 horas y 29 mg a los 3 días.

Efectos de la TH sobre la protoporfirina del hígado.

La catalasa, así como la hemoglobina y citocromos, son hemoproteínas compuestas de un grupo porfirina, hierro y proteínas. Desde el punto de vista, de la hipótesis, de que la TH puede interferir con la síntesis de catalasa en el hígado es importante considerar la posibilidad de una dificultad en la utilización del hierro para formar el enlace hierro-porfirina.

ONO et al. (1956, 1959, 1960), estudiando el problema del metabolismo de las porfirinas en animales portadores de tumor, demostraron que había un incremento de protoporfirina en hígado, que correspondía con la disminución de la actividad de catalasa, y unos hechos similares en animales normales cuando eran inyectados con TH.

Este marcado incremento en la protoporfirina hepática, que ocurre paralelo a la disminución de la actividad de catalasa del hígado, indica que el efecto de la TH puede ser: dejar mucha protoporfirina inutilizada para la síntesis de catalasa por inhibición del proceso enzimático de la inserción del hierro en la porfirina.



Efecto de la TH sobre la absorción de hierro.

URUSHIZAKI y WATANABE (1964), observaron que algunas fracciones de TH obtenidas por cromatografía en columna mostraban una marcada bajada en la absorción intestinal del hierro cuando eran inyectadas a ratas normales.

#### Preparación y purificación de TH cancerosa.

Como ya ha quedado expuesto en otra parte de ésta introducción, el primer aislamiento de TH fué realizado en 1948 por NAKAHARA y FUKUOKA sometiendo tejido fresco tumoral a una extracción acuosa al baño maría; los residuos insolubles se eliminan por filtración y al sobrenadante, previamente concentrado a 1/10 de su volumen primitivo, se le añade el doble de su volumen de alcohol etílico absoluto. El precipitado que se produce es recogido por las técnicas apropiadas y constituye lo que podemos llamar TH bruta o -cruda, cuyos efectos pueden ponerse de manifiesto cuando -se inyecta a ratones en cantidades de 25 a 30 mg por ani--mal. Normalmente, mediante éste procedimiento, se obtienen de 2.5 a 4 g de TH por cada 100 g de tumor fresco.

Como puede imaginarse la TH obtenida por éste pro-

cedimiento además de contener el principio o principios --  
activos, está constituida en su gran parte por impurezas --  
sin ninguna actividad de tipo TH. Es por ello que el primi  
tivo método de NAKAHARA y FUKUOKA, ha sido objeto por parte  
de varios autores de diversas modificaciones tendentes, --  
tanto, a la obtención de mayores rendimientos como de pre-  
paraciones más purificadas.

Independientemente de que en el capítulo de mate---  
rial y métodos se describan más detalladamente, los proce  
dimientos más utilizados, para la obtención de preparacio-  
nes de TH, son: los de GREENFIELD y MEISTER, el de YUNOKI  
y GRIFFIN y el de FUJII et al.

El primero de ellos es una simple modificación del  
método de NAKAHARA y FUKUOKA, consistente en utilizar como  
material de partida polvos cetónicos de tejidos tumorales,  
en lugar de tejido fresco, y llevar a cabo una precipita--  
ción fraccionada con alcohol etílico de los extractos acu  
os obtenidos; al objeto de eliminar aquellas fracciones --  
carentes de actividad que precipitan en presencia de bajas  
concentraciones de alcohol etílico. Este método, sin embaro  
go, no ha sido muy utilizado; ya que las preparaciones de  
TH obtenidas no muestran un incremento notable de su acti--  
vidad en relación con los anteriormente descritos.

YUNOKI y GRIFFIN (1960), llevaron a cabo la extracción de TH por un procedimiento totalmente distinto, consistente en la extracción de polvos cetónicos obtenidos de tejidos tumorales con ácido acético glacial y precipitación posterior, del extracto obtenido, con éter. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado en razón de su simplicidad, obteniéndose rendimientos adecuados y preparaciones con una actividad similar a la TH de NAKAHARA y FUKUOKA. Presenta, no obstante, el inconveniente de que la extracción con ácido acético, es un procedimiento demasiado drástico, en el transcurso del cual probablemente se fraccionan las moléculas de los principios activos.

Finalmente, el método de FUJII et al. (1960), se basa en el aislamiento de la TH aprovechando el carácter básico, que como se describirá más adelante, presenta esta sustancia. Como en los casos anteriores, el material de partida son polvos cetónicos obtenidos a partir de tejidos tumorales. La extracción se lleva a cabo con ClH 0.1 N durante 2 días a la temperatura ambiente, y una vez obtenido el sobrenadante correspondiente, la TH se separa mediante precipitación por adición de NaOH 2 N hasta alcanzar un pH 7.0. La preparación obtenida, que representa el 4.1-4.5% del material de partida, posee una actividad

similar a la TH de NAKAHARA y FUKUOKA.

Aún cuando existen una serie más de procedimientos de extracción, los ejemplos citados, bastan para mostrar que todos ellos llevan a la obtención de unas preparaciones de TH de actividad similar a la primitiva obtenida de NAKAHARA y FUKUOKA y por tanto con el mismo grado, aproximadamente de pureza que aquella. Es por ello, que cualquiera que sea el método utilizado, a la hora de tratar de estudiar la naturaleza química de la TH, ha sido necesario desarrollar una serie de técnicas de purificación de estas preparaciones crudas, cuyos principios básicos, se describen a continuación.

La primitiva sustancia activa con actividad de TH descubierta por NAKAHARA y FUKUOKA era una sustancia no dializable. En experimentos posteriores, estos mismos autores (1954) observaron que los extractos de tejido tumoral contenían una pequeña cantidad de sustancia dializable con actividad TH; más tarde determinaron la conexión entre la forma dializable de TH y la forma no dializable, mostrando que la forma dializable puede ser derivada de la forma no dializable por simples procesos.

En 1957, ONO et al. obtuvieron, utilizando como ma

terial de partida TH cruda de NAKAHARA y FUKUOKA, un picra--  
crato cristalino con una potente actividad TH. Este picra  
to presentaba actividad de TH en dosis de 0.1 a 0.2 mg.

En 1959 OHASHI y ONO purificaron TH cruda utilizando  
columna cromatográfica DEAE-celulosa. Esta técnica se  
basa en la distinta fuerza con que se absorben las proteínas,  
dependiendo de su carga, a la DEAE-celulosa y la --  
posterior elución de las mismas con tampones de diferente  
fuerza iónica. La fracción con actividad de TH fué activa  
a dosis de 0.5 mg; como eluyente se utilizó tampón fosfá-  
tos de pH 6.5.

YUNOKI y GRIFFIN (1961), tomando como material de  
partida la TH obtenida por el procedimiento de estos mis-  
mos autores, purificaron la TH cruda utilizando columnas  
de Amberlita XE-64. Obteniendo una fracción con actividad  
de TH en dosis de 10 mg.

Más tarde, FUKUDA et al. (1966), desarrollaron un  
método para la preparación de TH de alta actividad a par-  
tir de la TH cruda de NAKAHARA y FUKUOKA; utilizando columna  
cromatográfica DEAE-Sephadex. Usando DEAE-Sephadex A-50  
como material de intercambio iónico obtiene 3 fracciones  
no dializables y con actividades de TH a dosis de 1 mg.

Finalmente, en 1972 OKUDA et al., utilizando una combinación de técnicas de extracción acuosa, diálisis, - cromatografía sobre columnas de Amberlita XE-64 y Ecteoló-celulosa y finalmente filtración en gel sobre columna cro-matográfica de Sephadex G-200, obtienen una sustancia con posible actividad TH, ya que causa una reducción del ni--vel del hierro plasmático en dosis de 2.5 microgramos, pe-ro no afecta a la actividad de la catalasa hepática de ra-tón.

#### Naturaleza química de la TH.

Se han realizado muchos estudios bioquímicos (ENDO, H. 1954, MASAMME, et al. 1957, 1958, 1962) y químicos --- (OKUSHIMA, D., 1952, MASAMME, H. et al. 1958, 1959) sobre la naturaleza de la TH.

Aunque en los tempranos trabajos de NAKAHARA y FU-KUOKA (1953, 1954), indicaron que la TH probablemente es un péptido que se manifestaba en forma dializable y no -- dializable la estructura de la sustancia permanece actual-mente desconocida, también la posibilidad de que la TH es-té ligada a los ácidos nucleicos no ha sido desechada. La TH ha sido separada en una proteína y una fracción de áci-dos nucleicos por tratamiento en caliente con ácido tri--

cloroacético (NAKAGAWA et al. 1955) y la fracción ácido nucleico se ha encontrado más activa en la depresión de la catalasa del hígado que la fracción proteínica. Una fracción activa de TH ha sido aislada de un carcinoma gástrico humano, el cual muestra un máximo de absorción a 260 milimicras y no contiene grupos aminos libres (KUZIN et al. 1955). Ácido úrico y otras purinas ha sido demostrado que deprime la actividad de catalasa hepática por extractos de tumor (HARGREAVES et al. 1959).

En contraste con estos resultados, un polipéptido básico ha sido aislado de tejido tumoral, el cual estaba libre de ácidos nucleicos, y deprimía la actividad de catalasa hepática en dosis tan bajas como 10 mg (ONO et al. 1955, 1957). Cuando ésta fracción libre de ácidos nucleicos fué hidrolizada con pepsina y el picrato fué preparado, los cristales fueron activos en dosis de 0.2 mg. La muestra dá una prueba de color positiva con ninhidrina. Cromatografía en papel, reveló la presencia de la mayoría de los aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, prolina, hidroxiprolina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, licina, glicocola y arginina; solamente cisteína, metionina, tirosina, y triptofano, estaban ausentes en los hidrolizados de éstos péptidos.

Una fracción de TH libre de ácidos nucleicos ha sido obtenida de líquido ascítico canceroso del producto con etanol al 40%; un producto similar fué obtenido de la orina de pacientes con enfermedades neoplásicas (MASAMME et al, 1958). Ambas preparaciones mostraron homogeneidad en electroforesis y ultracentrifugación. El espectro de absorción mostró un pico entre 275 y 280 nm pero no mostró ninguno a 260 nm. En total contenían 14 aminoácidos, además galactosamina, glucosamina, galactosa, manosa, glucosa, L-fucosa, y ácido siálico. Esta preparación de TH, no solamente, difería en muestras de tumores primarios de estómago y ovario con respecto a movilidad electroforética, precipitación con sulfato amónico, depresión de la actividad de catalasa hepática, y solubilidad en agua (MASAMME et al. 1959), sino que fué encontrada también en tejidos no tumorales (MASAMME et al. 1958).

GREENFIELD y MEISTER (1951), detectaron en los hidrolizados de TH por precipitación alcohólica los siguientes 16 aminoácidos: alanina, glicina, serina, prolina, ácido aspártico, arginina, valina, treonina, fenilalanina, hidroxiprolina, ácido alfaaminobutírico, isoleucina, triptofano, lisina, leucina, y ácido glutámico. La ausencia de metionina, cisteína, tirosina e histidina, fué manifiesta



ta. OKUSHIMA (1952), independientemente encontró: alanina, glicina, serina, prolina, ácido aspártico, arginina, valina, treonina, lisina, leucina, y ácido glutámico en los hidrolizados de una fracción de TH similar aislada de cáncer gástrico humano.

Usando una dieta basal, relativamente deficiente en proteínas, FUKUOKA y NAKAHARA (1953), primero mostraron que el contenido de TH del tumor puede ser marcadamente incrementado por inyección, en el animal portador, de una solución de hidrolizado de proteínas. El tumor usado fué el sarcoma de ratón cepa NAKAHARA-FUKUOKA. Cuando el hidrolizado preparado de proteína purificada de pescado o sangre era inyectado en ratones portadores de dos o tres semanas de edad, habia un marcado incremento en el contenido de TH del tejido tumoral. El hidrolizado de proteínas fué inyectado en 5 dosis diarias de 50 mg cada una, totalizando 250 mg por ratón. El incremento del contenido de TH del tejido tumoral, fué evidente por el hecho de que se tomaron solamente 200-400 mg de éste homogenado para producir el mismo grado de decrecimiento de la catalasa hepática en ratones normales, los cuales necesitaban 800 mg de tejido tumoral que fué usado como grupo control.

Similares experimentos fueron llevados a cabo usando mezclas de aminoácidos cristalinos. Los aminoácidos -- que se incluyeron en la mezcla fueron seleccionados de la lista de GREENFIELD y MEISTER antes mencionada, excluyendo solamente triptofano. La cantidad de cada aminoácido -- en la mezcla completa, fué como sigue: 20 mg de: treonina, serina, valina, glicina, alanina, prolina, ácido aspártico, arginina y fenilalanina, 40 mg de lisina y leucina, y 70 mg de ácido glutámico.

330 mg de ésta mezcla, fueron disueltos en 5 cc. de agua destilada por calentamiento, neutralizada a pH 7.0 -- con NaOH, e inyectada intraperitonealmente en ratones, -- portadores del sarcoma NAKAHARA-FUKUOKA de tamaños apropiados, en 5 dosis diarias de 0.5 cc cada una. Los homogenizados de los tumores de estos ratones, mostraron una definitiva depresión de la catalasa hepática en dosis de 400 mg cuando eran probados sobre ratones normales, mostrando que ésta mezcla de aminoácidos cristalinos era tan activa como el hidrolizado de proteínas totales en el incremento del contenido de TH de tejido tumoral.

Resultados experimentales revelaron que de los 12 aminoácidos, la treonina, serina, valina, y glicocola, podrían ser completamente innecesarios. Por otro lado, los



por lo que, las reacciones deben llevarse a cabo a muy bajas concentraciones del sustrato.

d) Hay posibilidad de que otros enzimas o isoenzimas posean actividad catalásica en el hígado.

Se ha valorado siempre la catalasa como "cantidad de producto formado por la de sustrato consumido durante un periodo específico de tiempo" (BLUMENTHAL, 1910) ó  $k_1$  (KATALASENFAHIGKEIT) de VON EULER 1927 a la constante cinética de primer orden (tambien BONNISCHEN 1947). Bien -- fuese en relación al peso seco, húmedo, de nitrógeno, de proteína, etc., y por segundo, minuto u otra unidad o múltiplo de tiempo.

En algunos casos se expresa solo como porcentaje de inhibición.

La mayor parte de la confusión procede del hecho de que las preparaciones de tejido se realizaran inadecuadamente: recientes estudios demuestran la existencia en el hígado de urato-oxidasa, catalasa, y D-aminoácido-oxidasa. Las oxidasas, forman el agua oxigenada mientras que la catalasa la destruye, bien peroxidasicamente o catalíticamente.

A alta concentración de sacarosa se liberan la catalasa y la D-aminoácido-oxidasa y no la urato-oxidasa. - En hígado de rata, se obtiene aproximadamente un 57% de - catalasa de ésta fracción y la fracción sobrante contenía tan solo un 17.8% de la actividad enzimática total. Las - partículas se han identificado con los peroxisomas y se - les atribuye el metabolismo del agua oxigenada.

La compartimentación de la catalasa es tal que la homogenización debe ser total.

NAKAHARA ha propuesto un método standard: homogeni- zación vigorosa en 99 partes de agua destilada a 0° C du- rante 2 minutos en un Waring blender.

Trás la dilución exacta requerida se introduce la solución enzimática en agua oxigenada tamponada a pH 7.0 durante 1 minuto a 0° C, con fuerte agitación; una parte alícuota de ésta mezcla se tiñe con sulfato de titanilo. - El cambio de color va dando una cinética de primer orden - de la reacción.

NAKAHARA también propone: 10 a 15 mg de tejido he- pático suspendidos en tampón fosfato 0.05 M pH 7.0 a con- centración final de 2.8 mg/ml a 4° C. 0.2 mg del homogenei- zado se echan rápidamente en la cubeta de reacción con 1.8 ml de tampón fosfatos 0.01 M a pH 7.0 y 1 ml de agua oxige

nada 0.05 M.

Se mide a 240 nm el cambio de concentración de agua oxigenada cada 10 segundos. Se representa graficamente el logaritmo de la densidad óptica (D.O). Dá una recta inicial, de pendiente, la constante de velocidad de primer orden K.

El método es tan válido como la homogenización durante 5 minutos en Omnimix con 1% de triton en el medio.

La comisión para enzimas (1961) ha recomendado la siguiente unidad: "La cantidad de enzimas que catalizan la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo determinadas condiciones (preferiblemente 25° C)", también ha sugerido que para determinados enzimas para los que se puede usar la  $k_s$  es factible expresar la constante de MICHAELIS para la saturación del enzima con sustratos.

VON EULER (1927) y STERN (1932) hallaron una constante de MICHAELIS entre 0.025 M y 0.033 M, pero BONNICHEN et al. demostraron que ello se debía a la inactivación progresiva de la catalasa por la alta concentración del sustrato.

OGURA (1955), consiguió calcular una  $k_m$  de 1.1 M a 30° C y pH 7.0 usando muy altas concentraciones de sustrato y muy cortos periodos de reacción.

SIGMA CHEMICAL COMPANY, St. Louis, standarizó: 0.1 ml de agua oxigenada al 30% (comercial) llevados a 50 ml - con tampón fosfatos 0.05 M a pH 7.0 para dar a 240 nm entre 0.550 y 0.520 de absorción. 0.1 ml de la solución enzimática se añade a 2.9 ml de sustrato en solución en cubeta de cuarzo a 25° C. y se mide el tiempo invertido en disminuir la absorbancia de 0.450 a 0.400. Esto se corresponde a 3.45 micromoles de agua oxigenada en los 3 ml de solución. Así se puede expresar en micromoles de agua oxigenada descompuesta por minuto a pH 7.0 y 25° C al caer la mezcla de 10.3 a 9.2 micromoles/ml de mezcla.

Sustancias de origen no canceroso con actividad de TH.

NAKAHARA y FUKUOKA, consideraron que la TH es un producto común y específico de todas las células cancerosas; las cuales producen ésta sustancia en gran cantidad durante su crecimiento. Así mismo, estos autores, llegaron a la conclusión de que las producen las células malignas vivas ya que pudieron demostrar que la necrosis de los tejidos cancerosos no aumenta ni la cantidad ni la actividad de la TH.

Fueron GREENFIELD y MEISTER (1951), los primeros investigadores que lograron obtener TH a partir de tejidos normales, aunque el contenido de ésta sustancia en ellos era muchísimo menor que en los tejidos cancerosos. Este hecho fué explicado por GREENSTEIN (1954), suponiendo que la TH se encuentra normalmente en todos los tejidos donde su papel, es reprimir la síntesis de ciertas enzimas; según éste autor el papel de la TH en el organismo normal sería el de un regulador de los productos enzimáticos, y solamente actúa como tóxico cuando se produce en cantidades anormalmente altas, como ocurre en el caso de tejidos cancerosos.

NAKAHARA y FUKUOKA (1959), aún cuando siguieron considerando la TH como un producto específico de la célula cancerosa cuya presencia en el organismo es responsable de los efectos tóxicos que afectan a los seres que albergan tumores malignos, encontraron igualmente, que la TH existe en los tejidos normales, pero en una proporción tan pequeña que no puede considerarse como una entidad dentro de ellos; también ellos consideraron que actúa manteniendo el nivel normal de catalasa hepática en aquellos lugares en que dicha sustancia ejerce su acción.



Esta teoría de que la producción de TH en cantidades apreciables era una propiedad exclusiva de la célula cancerosa, se sostuvo durante mucho tiempo; incluso cuando DOUNCE y SHANEWISE (1950), demostraron que las ratas leprosas tenían un nivel de catalasa hepática más bajo - que el nivel normal de éste enzima.

Tampoco hizo cambiar de idea el hecho de que KATA et al. (1950) lograran hacer disminuir el nivel de catalasa hepática en ratones mediante una inyección de la raza virulenta del bacilo tuberculoso, ya que incluso los mismos autores, atribuyeron éste hecho, a una reacción alérgica del tejido.

A partir, sin embargo, de 1960, una serie de nuevos descubrimientos, han demostrado que la TH no puede - seguir siendo considerada como un producto específico de las células cancerosas. En 1961, CALLAO y MONTTOYA, demostraron que podían aislarse de levaduras y de bacterias - con deficiencia respiratoria (razas DR) sustancias con - la misma actividad biológica que la TH, resultados que - fueron confirmados por MIFUCHI et al (1963).

Posteriormente, KAMPSCHMIDT et al. (1963), obtuvieron, a partir de diferentes tipos de bacterias (E. coli, - Shigella flexneri y St. aureus, etc), preparados que presen

taban granactividad TH. Estos autores, defendieron la hipótesis de que la TH no era un producto específico de la célula cancerosa, sino que es producida en los tumores -- por las bacterias que los contaminan. Como confirmación, los citados autores (1963) afirmaron no haber encontrado TH en ningún tumor que estuviera exento de contaminación.

Esta última afirmación, sin embargo, ha sido rebatida por MATSHUOKA et al. (1964) y más tarde por NIXON y ZINMAN (1966), que confirmaron la producción de TH en tumores exentos de contaminaciones bacterianas, si bien tuvieron que reconocer la validez de los resultados de KAMPS CHMIDT et al. en relación con la producción de TH por una serie de bacterias que normalmente se encuentran contaminando los tumores.

Finalmente, CALLAO et al. (1966 y 1967), han podido demostrar el aislamiento de sustancias con actividad de TH a partir, tanto de autolisados de levadura, como de tejidos musculares esqueléticos normales, habiéndose intentado posteriormente (OLIVARES, 1970) un estudio comparativo entre las características químicas y fisicoquímicas de la TH de diversos orígenes.

O B J E T O D E L T R A B A J O

## O B J E T O D E L T R A B A J O

A lo largo de ésta introducción se ha intentado recoger los conocimientos principales existentes sobre la TH cancerosa. Aún cuando, evidentemente tienen todavía muchos puntos por aclarar en relación con ésta sustancia, sobre todo, en lo referente a su posible diversidad, mecanismo de acción, y los procesos que controlan su biosíntesis, es evidente que la TH desempeña un importante papel en los síntomas que presentan los animales con tumores en crecimiento.

De otra parte, ha sido expuesto, cómo a raíz de los trabajos de CALLAO et al. es posible aislar sustancias con actividad biológica similar a la de la TH cancerosa, a partir, de mutaciones de microorganismos con deficiencias respiratorias, y más concretamente de mutantes de levaduras con éstas características.

Dado que desde el punto de vista experimental, los estudios sobre biosíntesis y mecanismo de acción de cualquier sustancia son mucho más fáciles de realizar en microorganismos que en animales superiores, la utilización de -

los citados mutantes de levaduras como modelos, por lo -- que respecta a la TH, de células cancerosas facilitaría -- enormemente el estudio de todos aquellos puntos que como ha sido citado, permanecen todavía sin descifrar. No obs-- tante, para que los resultados que pudieran exponerse en éste tipo de estudios puedan ser extrapolados a las célu-- las cancerosas con un cierto margen de fiabilidad, sería -- necesario primero, demostrar no sólo, que las sustancias de tipo TH, aisladas de mutantes rho<sup>-</sup> de levadura, poseen idénticas propiedades biológicas que la TH cancerosa, si-- no también, verificar que las citadas sustancias tienen -- también una composición química y propiedades fisicoquími-- cas igualmente idénticas o similares.

En ésta Tesis Doctoral, se ha tratado precisamen-- te de comprobar éste extremo a cuyo fin se han realizado una serie de experiencias en las que se ha aplicado a la extracción y a la purificación de las sustancias de tipo TH, procedentes de mutantes rho<sup>-</sup> de levadura, las mismas o similares técnicas empleadas en el caso de la TH cance-- rosa, a fin de observar si el comportamiento y por tanto las propiedades fisicoquímicas son semejantes. De otra par-- te, con las fracciones de mayor grado de pureza se han -- efectuado estudios en relación con su composición química,

al objeto tambien de comprobar o no su coincidencia con -  
la TH cancerosa.

Por último, y teniendo en cuenta la falta de activi  
dad "in vitro" de la TH, tanto de uno como de otro origen,  
se ha intentado conocer, aplicando las últimas técnicas y  
utilizando muestras de alto grado de purificación, el meca  
nismo de acción de las preparaciones obtenidas de células  
"petite", mecanismo que la bibliografía establece para la  
TH cancerosa a nivel de la síntesis enzimática.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

### Microorganismos utilizados

Se han empleado las siguientes razas de *Saccharomyces cerevisiae*:

S18: Raza rho<sup>+</sup> aislada a partir de levadura comercial de panadería.

T27: Raza rho<sup>-</sup> (deficiente respiratoria) obtenida a partir de la anterior por tratamiento con tripaflavina.

Axa: Raza rho<sup>-</sup> (deficiente respiratoria) obtenida por tratamiento con acriflavina, a partir de la cepa X3 normal.



Medios de cultivo utilizados.

Para el mantenimiento de éstas razas de levadura, hemos utilizado el medio semisintético de LINDEGREEN et al. de la siguiente composición:

Sulfato amónico	3 g.
Sulfato magnésico	1 g.
Fosfato monopotásico	2 g.
Peptona	5 g.
Extracto de levadura	4 g.
Glucosa	10 g.
Agar	25 g.
Agua destilada	1000 cc.
pH de 4 a 4.5	

Este medio ha sido utilizado para la conservación de las razas, normales y deficientes respiratorias, mediante resiembras periódicas e incubación a 28° C durante 24 a 48 horas y posterior conservación en tubos sembrados en picadura en el frigorífico.

Para la producción de grandes masas de células, como material de partida para la obtención de sustancias con

actividad de TH, se ha utilizado el medio de LINDEGREEN - NAGAI y NAGAI (1958), de semejante composición al anteriormente expuesto, pero sin agar.

Obtención de TH a partir de levadura con deficiencia respiratoria.

Para la obtención de factores con actividad de TH a partir de mutantes "petite" (levaduras deficientes respiratorias) se han empleado dos métodos diferentes:

a) Método de YUNOKI y GRIFFIN (1960).

Para la obtención de TH, fué requerida una gran masa de levaduras deficientes respiratorias, para la cual éste mutante se cultivó en el medio anteriormente mencionado. La obtención de ésta masa de levadura se llevó a cabo en matraces de 10 litros, conteniendo 9 litros de medio. Los matraces, una vez esterilizados, se inocularon con una suspensión de levadura procedente de un cultivo de 24 horas y fueron incubados a 28° C durante 48 horas, con agitación y aireación contínua.

Transcurrido éste tiempo, las células fueron recogidas por centrifugación continua, a una ultracentrifuga - continua Sharples, fueron suspendidas en una pequeña cantidad de agua, y la suspensión fué adicionada poco a poco 10 veces su volumen de acetona, con agitación continua; la mezcla se dejó reposar, se decantó y el residuo se filtró al vacío, lavando varias veces con acetona; finalmente se dejó evaporar la acetona al aire y se completó la desecación de las células al vacío, obteniendo polvos cetónicos.

El procedimiento de YUNOKI y GRIFFIN (1960) para la extracción de TH, tiene como punto de partida estos polvos cetónicos. Las células (polvos cetónicos) se pesaron y se suspendieron en una mezcla de 35 veces su peso de ácido acético glacial y 2 veces su peso de acetona.

La suspensión fué calentada en baño maría con agitación a 80° C durante 1 hora, al cabo de la cual se dejó enfriar decantando para suprimir las impurezas o filtrando - por papel.

Este filtrado se dejó en la nevera reposar durante 24 horas, al cabo de las cuales se separaron las impurezas precipitadas mediante una filtración.

A éste filtrado se le añade éter etílico, con agitación continua, en el mismo volumen (proporción 1:1). El

precipitado es recuperado por decantación y centrifugación, se lavó el precipitado varias veces con una mezcla (a partes iguales) de alcohol absoluto y éter sulfúrico concluyendo la operación con una desecación al vacío.

A éste procedimiento modificado, se le llama extracción acética.

b) Método de NAKAGAWA et al . (1955).

Este método modificado, se le llama extracción acuosa.

La masa de levadura fué obtenida y recuperada por el mismo procedimiento descrito anteriormente (polvos cetónicos).

Una vez recogidas las células y secadas (polvos cetónicos) se suspenden en cuatro volúmenes de agua destilada y se rompen en un molino de perlas de vidrio; colocando doble volumen, que la suspensión, de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro; el molino es refrigerado con agua fría (2° C) durante los 10 minutos en que se realiza la operación.

Una vez rotas las células en el molino, fué filtrada la mezcla a través de un filtro de vidrio de poros inferiores a 0.5 mm de diámetro, con el fin de separar las

perlas de la suspensión, a continuación se lavan las perlas con doble volumen de agua destilada, que también es recuperada junto con la suspensión.

La mezcla obtenida es colocada en un vaso de precipitados y se pone al baño maría durante 1 hora a 80° C con agitación continua.

Se deja enfriar y se centrifuga a 4500 rpm (3000 - gess), el sobrenadante es recogido y concentrado en un rotavapor a 45° C 1/10 de su volumen. A éste concentrado se le añade doble volumen de alcohol absoluto, el precipitado es recogido por decantación y posterior centrifugación y lavado varias veces con alcohol absoluto, finalmente es desecado al vacío y guardado en las mismas condiciones.

La TH obtenida por éstos dos métodos la designamos con el nombre de TH cruda.

## Determinación del contenido proteico.

A lo largo de todo el proceso de purificación se ha llevado un control del contenido proteico del preparado, empleando diversos métodos.

### a) Método de LOWRY.

Este método es la combinación de las reacciones de Biuret y de Folin, la primera es característica del enlace peptídico y la segunda del grupo fenólico de los restos de tirosina.

#### a.1) Curva patrón de albúmina.

Se ha usado una curva patrón de albúmina bovina a concentraciones entre 10 y 70 microgramos/ml.

La solución standard se prepara con agua destilada y albúmina bovina con un contenido de 100 microgramos/ml (10 mg/100 ml). A partir de ésta se prepararon soluciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 microgramos/ml de la forma siguiente:

<u>Tubos</u>	<u>ml sol. stand.</u>	<u>ml agua</u>	<u>microg/ml.</u>
1	-	1	-
2	0.1	0.9	10

3	0.2	0.8	20
4	0.3	0.7	30
5	0.4	0.6	40
6	0.5	0.5	50
7	0.6	0.4	60
8	0.7	0.3	70

a.2) Metódica.

En un tubo de ensayo se coloca 1 ml de agua - destilada y se toma como blanco. A continuación se dispone de 7 tubos de ensayo en los cuales se colocan las soluciones anteriores (del tubo nº 2 al 8) correspondientes a la curva patrón. Por último, se colocan, los tubos de ensayo que sean necesarios, dependiendo de la cantidad de muestras que se deseen medir, 1 ml de cada solución problema a medir, una vez hecha la dilución conveniente para que la concentración proteica quede dentro del margen marcado por la curva patrón.

Se agregan a tiempo cero 5 ml de la solución alcalina de cobre, agitando bien. Al cabo de 10 minutos se añaden 0.5 ml del reactivo de Folin, y se mezclan agitando bien. 25 minutos después de ésta última adición se hace la lectura a 630 nm (espectrofotometro Perkin-Elmer 124).

### a.3) Cálculos.

Con los resultados suministrados por las distintas concentraciones de la solución standard, se construye una curva patrón de albúmina, representando en ordenadas las densidades ópticas y en abscisas las concentraciones proteicas (microgramos/ml) correspondientes. Sobre ella, llevamos los valores de la densidad óptica de los problemas, deduciéndose por interpolación, y una vez tenidas en cuenta las diluciones previas, la concentración proteica final.

### a.4) Reactivos.

1) Albúmina bovina (Calbiochem).

2) Solución alcalina de cobre. Es de preparación extemporánea. Se mezcla 50 ml de solución al 2% de carbonato sódico en NaOH 0.1N con 1 ml de solución al 0.5%  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en tartrato sódico al 1%.

3) Reactivo diluido de Folin. Se utilizó reactivo de fenol según FOLIN-CIOCALTEAU (Análisis de cobre, analítico). Al cabo de 10 minutos se agregan 0.5 ml del reactivo de Folin y se mezclan agitadamente. 25 minutos después de esta última adición se hace la lectura a 630 nm (espectrofotómetro Perkin-Elmer 424).



b) Absorción en el ultravioleta a 280 nm.

Este procedimiento se emplea con criterio cuantitativo relativo, determinando la absorción a 280 nm de cada una de las fracciones eluidas de los distintos procesos cromatográficos en columna a lo largo de la purificación.

Se han utilizado dos sistemas:

- 1) Lectura espectrofotométrica secuencial (Perkin-Elmer 124), de la absorción al ultravioleta de cada una de las fracciones eluidas, frente a un blanco constituido por el tampón de elución. Para hacer la representación gráfica se ha usado un sistema de coordenadas, representando en abscisas el número de la fracción y en ordenadas las densidades ópticas correspondientes.
- 2) Lectura continua a 280 nm en célula de flujo continuo de 2 mm de paso óptico, del eluido de la columna cromatográfica, mediante una unidad de medida de transmitancias (LKB; Uvicord II). Estos valores van siendo continuamente monitorizados en transmisiones en un registrador acoplado. El ajuste del

b) Absorbancia 100 de transmisión se hace antes de comenzar la elución con el tampón de base usado en el proceso.

c) Modificación del método de LOWRY por BLATTNY et al. (1969).

Esta modificación consiste en medir la densidad óptica a 720 nm, las diferencias encontradas no difieren -- muy significativamente del método primero.

#### Determinación de la actividad de TH.

Los métodos usados para la medida de la actividad de factores TH, se basan en la valoración de las actividades biológicas de la TH. Se han utilizado dos métodos:

a) Determinación de la actividad de catalasa hepática de ratón.

Tanto los extractos crudos como en las fracciones procedentes de los distintos procesos de purificación, se ha realizado midiendo la actividad de catalasa hepática, siguiendo la técnica de BONNICHSEN et al. (1947) y expresando ésta en términos de la velocidad de reacción por mi-

nuto y por gramo de peso seco del hígado analizado (EULER et al. 1923).

La valoración en los ratones, se realiza inyectando intraperitonealmente un lote de 5 ó 6 ratones de 2 meses de edad, con 0,25 cc de una solución de TH disuelta en agua destilada (0.18 g de TH cruda en 1.5 cc de agua destilada). Utilizando como testigos 5 ó 6 ratones de la misma edad y peso inyectados con 0.25 cc de agua destilada por cada ratón.

24 horas antes de realizar la determinación enzimática fueron inoculados intraperitonealmente con el correspondiente problema a ensayar, manteniéndolos en ayunas durante éste tiempo. Los testigos recibieron en todas las experiencias agua destilada en igual volumen que el problema.

En todas las experiencias, los ratones sacrificados por decapitación y lo más rápidamente posible, se extrajeron trozos de hígado, que, una vez lavados con tampón fosfatos (0.01 M, pH 7.0) se homogeneizaron en 0.8 cc del mismo tampón, utilizando un homogenizador de vidrio. La operación se realiza en frío. En éstos homogeneizados se determinan los niveles de catalasa de acuerdo con la técnica de BONNICHSEN (1947). A 50 cc. de tampón fosfatos 0.01 M, pH 7.0, colocamos en un Erlenmeyer de 250 cc. en baño de --

hielo, se le añade 2 cc. de agua oxigenada 0.005 M. Se agita ésta mezcla y se toman 2 cc. que se llevan a un tubo -- que contiene 2 cc. de ácido sulfúrico 2 N. Esta toma co--- rresponde a un tiempo cero. A continuación, se depositan -- 0.05 cc. de homogeneizado en una pequeña cápsula que se de-- ja caer en el matraz anterior dónde se va a realizar la -- reacción, a la vez se pone en marcha un cronómetro y se -- agita bien la mezcla. Con una pipeta de descarga rápida se toman muestras de 2cc. a los 15, 30 y 45 segundos, las cua-- les se vierten en tubos que contenían 2 cc. de ácido sulfú-- rico 2 N, con objeto de interrumpir la reacción, por inac-- tivación de la catalasa. El contenido en agua oxigenada de las cuatro muestras se valora por yodometría con tiosulfa-- to sódico. A los tubos que contienen agua oxigenada y sul-- fúrico se le añade, antes de valorar con tiosulfato, (0.005 M) 0.5 cc. de yoduro potásico al 10% utilizando como cata-- lizador molibdato amónico al 1% (se añade una gota por tu-- trajeron trozos de hígado que, una vez lavados con tampón-- fosfatos (0.01 M, pH 7.0) se homogeneizaron en 0.8 cc del mismo tampón, utilizando un homogenizador de vidrio. La -- operación se realiza en frío. En estos homogeneizados se -- determinan los niveles de catalasa de acuerdo con la téc-- nica de BONNICHSEN (1947). A 50 cc. de tampón fosfatos 0.01 M, pH 7.0, colocamos en un Erlenmeyer de 250 cc. en baño de --

De cada homogeneizado, colocamos en un crisol de -- vidrio 0.5 cc. que se desecan en una estufa a 110° C. Pos-- teriormente se pesan los crisoles para determinar el peso -- seco del homogeneizado.

Los resultados se expresan como "Kat. f." (Katalase-fähigkeit) actividad de catalasa (VON EULER y JOSEPHSON 1923) y se calculan según la ecuación:

$$\text{Kat. f.} = \frac{K}{W} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

siendo W el peso seco de la muestra empleada expresada en gramos, y K la constante de la pseudoreacción de primer orden producida por la catalasa.

$$K = \frac{\lg (X_0/X)}{t}$$

dónde  $X_0$  es la concentración inicial del sustrato expresada en  $\text{cm}^3$  de tiosulfato sódico 0.005 M y X la concentración del sustrato a tiempo t expresado en minutos.

En cada caso los resultados obtenidos han sido sometidos a análisis estadístico.

#### b) Determinación de hierro plasmático.

Se ha seguido la técnica de SCHADE y OYAMA.

##### b.1) Reactivos utilizados:

Tampón fosfato/ácido ascórbico (se prepara este tampón usando ácido fosfórico 1 M y fosfato disódico 1 M, obteniendo un tampón fosfato sódico 1 M a pH 5.3. A 100 cc. de este tampón se le añade 1 g de ácido ascórbico. el pH final de esta solución era de 5.0. Esta solución es

guardada en el frigorífico y puede usarse durante una semana).

2, 2', 2"-terpiridina (se prepara 100 mg de terpiridina en 4 cc. de alcohol absoluto y se diluye aproximadamente hasta 40 cc. con agua destilada. Esta suspensión es aclarada goteando ácido clorhídrico 0.2 N y llevando a un volumen de 100 cc. El pH final fué de 4.3).

b.2) Mezcla de reactivos.

El reactivo A se prepara mezclando 4 partes de tampón fosfato/ácido ascórbico con 6 partes de agua destilada, se usa en la muestra del suero control.

El reactivo B se prepara mezclando 4 partes del tampón fosfato/ácido ascórbico con 2 partes del reactivo terpiridina y 4 partes de agua destilada, se emplea en las muestras del suero que se desea analizar.

b.3) Soluciones para obtener la curva patrón de hierro.

b.1) Reactivos utilizados:  
Se utilizó una solución patrón que contenía 1 mg/cc. de hierro. A partir de ésta solución se obtiene una curva patrón hierro-terpiridina bajo las mismas condiciones de la prueba con el suero.

El agua destilada utilizada para la preparación de los reactivos, estaba libre de hierro. Todo el material de

vidrio utilizado en la preparación de reactivos, así como, en la reacción propiamente dicha se mantiene una noche en tera en ácido nítrico diluido 1:1 con agua libre de hierro, y después lo lavamos varias veces con agua destilada libre de hierro.

b.4) Procedimiento:

0.5 cc. de plasma con heparina es pipeteado en dos tubos de hemólisis. A un tubo añadimos 0.5 cc. de mezcla del reactivo A y el otro 0.5 cc. de mezcla del reactivo B. El pH final en ambos tubos es aproximadamente 6.0. Ambos tubos se colocan en un baño de agua termostaticada a 45° C durante 20 minutos. Después de éste periodo medimos la densidad óptica en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer) -- 124 a 552 nm utilizando cubetas de cuarzo de capacidad de 1 cc. Como blancos, utilizamos:

- a) 0.5 cc. de agua destilada más 0.5 cc. del reactivo A.
- b) 0.5 cc. de agua destilada más 0.5 cc. del reactivo B.

Los valores se calculan restando a la densidad óptica medida en el tubo que contiene el reactivo B la densidad óptica del tubo que contiene el reactivo A. Y éste re-

sultado se lleva a la curva patrón. En cada prueba se han utilizado 5 ratones inyectados con fracción de TH cruda y 5 ratones testigos inyectados con el mismo volumen de agua destilada. Toda la sangre de los ratones testigos se mezcla (0.5 cc. de sangre por ratón) junto con una solución de heparina (0.5 cc. de solución de heparina). Lo mismo se hizo con los ratones inyectados con TH cruda. Después se centrifuga ésta sangre con heparina y con una pipeta pasteur se toma el plasma con sumo cuidado. A partir de aquí se realiza la prueba como se ha indicado anteriormente.

Los resultados se expresan en mcg de hierro por 100 cc. de plasma.

a) 0.5 cc. de agua destilada más 0.5 cc. del reactivo A.

b) 0.5 cc. de agua destilada más 0.5 cc. del reactivo B.

Los valores se calculan restando a la densidad óptica medida en el tubo que contiene el reactivo B la densidad óptica del tubo que contiene el reactivo A. Y éste re-



## Técnicas de purificación de TH.

a) Fraccionamiento por filtración en gel. Utilización de Sephadex.

Se ha utilizado Sephadex G-25 medium (diámetro de partícula 50-150 micras) suministrado por Pharmacia - Fine Chemicals (Uppsala, Suecia).

### a.1) Preparación del gel.

El Sephadex es suministrado en forma de polvo seco, y antes de empaquetarlo hay que proceder a su hinchamiento con la solución que se va a utilizar como eluyente (en éste caso agua destilada). Para ello, a la cantidad adecuada (1 g. de Sephadex G-25 medium tiene un volumen de cama de 5 ml), se le agrega un exceso de agua destilada, y se mantiene a temperatura ambiente durante el tiempo necesario. El proceso de hinchamiento es acelerado calentando al baño maría, variando los tiempos con el tipo de Sephadex utilizado. En el caso del Sephadex G-25 medium se necesitan 3 horas a temperatura ambiente, y 1 hora al baño maría.

Durante la preparación suelen quedar atrapadas algunas burbujas de aire en la matriz del gel, que pueden ocasionar empaquetamiento y flujos desiguales. Este problema

ma se evita eliminando el gas en una bomba de vacío conectada al matraz que alberga el gel.

a.2) Montaje de la columna.

Se ha utilizado una columna de 30 cm. de altura y 2.5 cm de diámetro. Para montar ésta columna se ha pesado 32.3 g. de Sephadex seco, el cual una vez hinchado en agua equivale al volumen de la columna. El hinchamiento se ha realizado con agua destilada y al baño maría, con agitación y durante 1 hora. Una vez frío, se le quita el aire en una bomba de vacío conectada al matraz que contiene el gel durante 30 minutos aproximadamente, después con una varilla de vidrio larga se va vertiendo sobre ella en la columna la mezcla del agua y Sephadex, tratando de que el Sephadex no tome burbujas de aire; el tubito de teflón que dá salida a la columna, durante el llenado de la misma, debe colocarse a unos 20 ó 30 cm. por encima de la parte inferior de la columna.

a.3) Aplicación y elución de la mezcla.

La cantidad de muestra que se desea pasar, se deposita con una pipeta de punta curva en la parte superior de la columna. Con la bomba peristáltica a un flujo de 0.5 ml por minuto, se comienza la elución de la columna. La --

muestra es eluída con agua destilada.

Las distintas fracciones eluídas de la columna, han sido recogidas utilizando un colector de fracciones (LKB, ultrorac). El sistema empleado para la recogida de fracciones es el de volumen fijo por contaje del número de gotas. Bajo éstas condiciones, se han recogido fracciones de 5 ml a un flujo de 0.5 ml por minuto.

La TH cruda, obtenida por precipitación alcohólica, es disuelta en agua destilada en la proporción de 50 mg por ml de agua destilada. Después se centrifuga a 4500 rpm, (3000 gess) durante 10 minutos, para eliminar el material insoluble. El sobrenadante se filtra por un embudo de vidrio con un papel de filtro. El filtrado resultante, que no es superior a 10 ml, es utilizado como muestra en cada pase por la columna. Las condiciones de pase por la columna son las anteriormente expuestas; todas éstas operaciones son realizadas a temperatura ambiente.

b) Cromatografía por columna de DEAE-celulosa.

Se ha seguido la técnica descrita por NIXON y ZINMAN (1966) y OLIVARES (1970), si bien, éstos autores partían de extractos acéticos en vez de acuosos como nosotros, por lo que, como se verá en el capítulo de resulta-

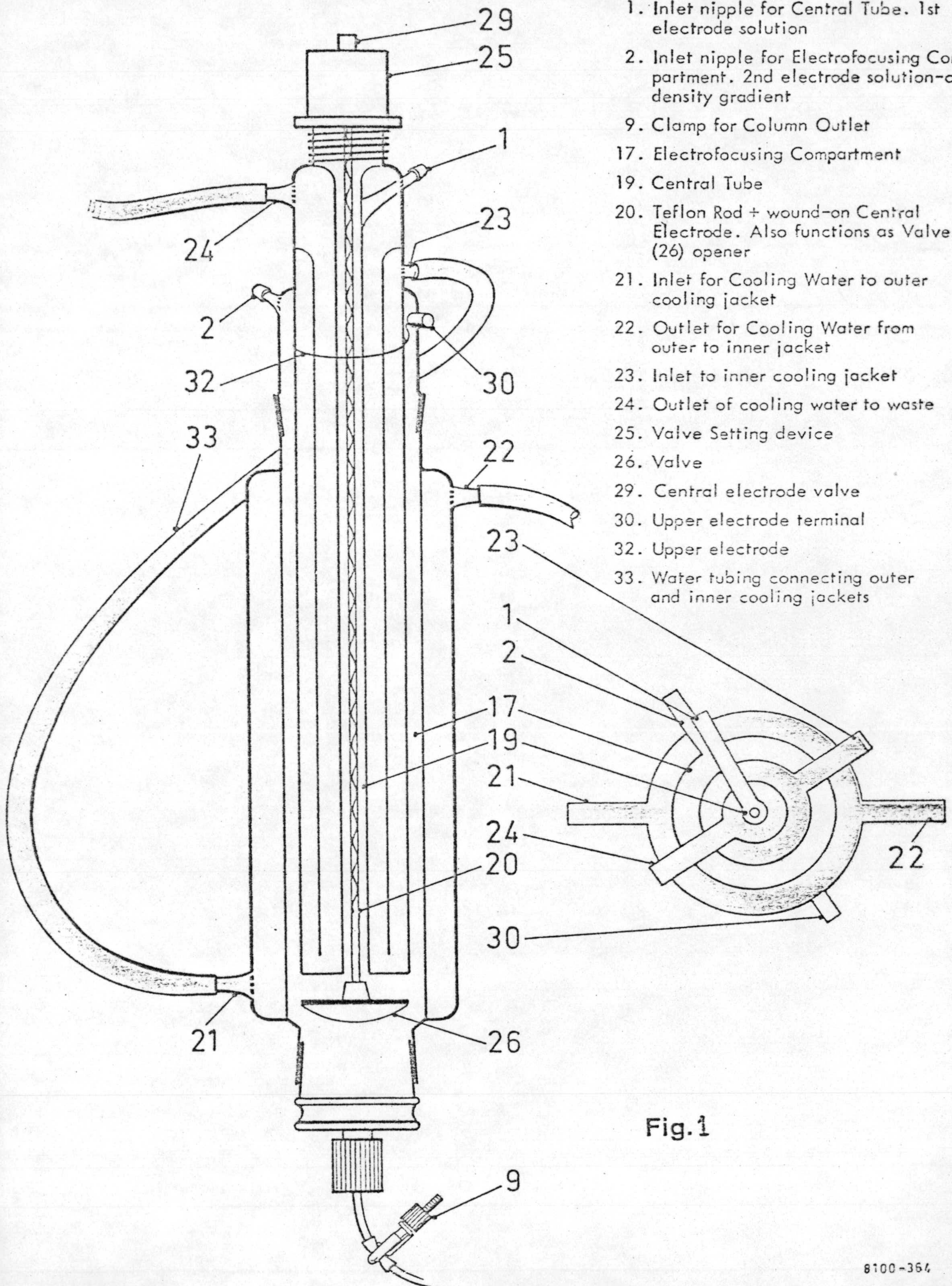
dos se eluye la actividad en otro lugar.

Ha sido usada una columna de 30 cm. de altura por 3 cm. de diámetro. Se pesan 34 g. de DEAE-celulosa DE22, se suspendieron en 15 volúmenes de ácido clorhídrico 0.5 N durante 30 minutos con agitación. Después mediante centrifugación se lava con agua destilada hasta que el sobrenadante alcance un pH: 4.0.

Se resuspende la DEAE-celulosa en 15 volúmenes de hidróxido sódico 0.5 N con agitación durante 30 minutos, pasados los cuales por centrifugación se lava con agua destilada hasta alcanzar un pH cercano a la neutralidad (pH 7.0). Con éstos dos tratamientos tenemos recuperada la DEAE-celulosa, para poderla usar en columna cromatográfica.

A continuación se procede a la desgasificación durante 30 minutos con la bomba de vacío. Por último, se equilibra con tampón acético/acetato 0.005 M. Con esta misma concentración de éste tampón se monta la columna.

A continuación se coloca 1 g. de TH cruda, disuelta en 10 cc. de agua destilada, sobre la columna cromatográfica y se establece un gradiente de concentración de tampón acético/acetato desde 0.005 M hasta 1 M, a lo largo de la elución. Las fracciones son recogidas por el mismo procedimiento usado para el Sephadex.



- 1. Inlet nipple for Central Tube. 1st electrode solution
- 2. Inlet nipple for Electrofocusing Compartment. 2nd electrode solution-cum-density gradient
- 9. Clamp for Column Outlet
- 17. Electrofocusing Compartment
- 19. Central Tube
- 20. Teflon Rod + wound-on Central Electrode. Also functions as Valve (26) opener
- 21. Inlet for Cooling Water to outer cooling jacket
- 22. Outlet for Cooling Water from outer to inner jacket
- 23. Inlet to inner cooling jacket
- 24. Outlet of cooling water to waste
- 25. Valve Setting device
- 26. Valve
- 29. Central electrode valve
- 30. Upper electrode terminal
- 32. Upper electrode
- 33. Water tubing connecting outer and inner cooling jackets

Fig. 1

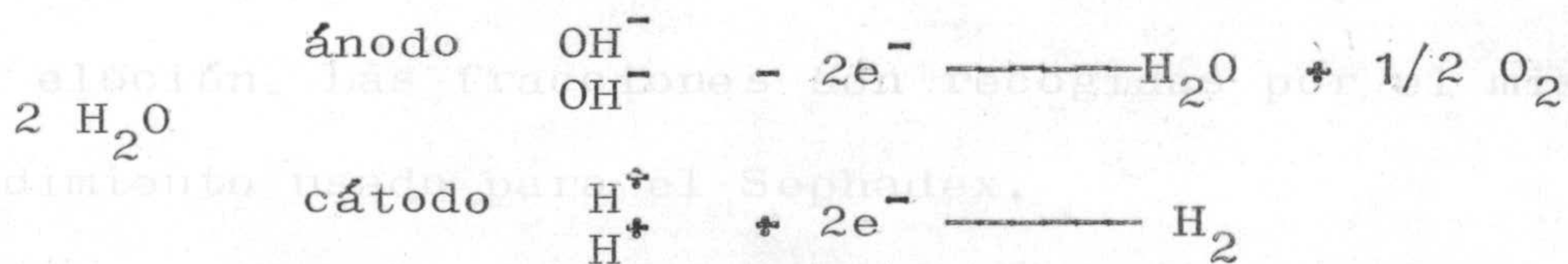
c) Electroenfoque en gradiente de densidad.

Electroenfoque es el proceso que tiene lugar -- cuando una anfolina se somete a un campo eléctrico en un -- medio en que existe un gradiente de pH, de tal forma que -- cuando una mezcla de proteínas con pI comprendidos dentro del gradiente usado, se introducen en el sistema, cada una de ellas adquirirá una carga que provocará su emigración y focalización final en la zona de su pH isoeléctrico.

Se empleó una columna LKB de 110 ml de capacidad - (fig. 1), con anfollinas creadoras de un gradiente de pH 3-10 (LKB). Dicha columna va provista de camisas de refrigeración, realizándose la operación a 4° C. La estabiliza---ción anticonvectiva del medio líquido en que se realiza la operación se consigue estableciendo un gradiente de sacaro--sa de concentración creciente desde el extremo superior al inferior de la columna electroforética.

c, 1) Soluciones de los electrodos.

Las anfollinas y la muestra necesitan protegerse del contacto directo con los electrodos, que puede producir una oxidación en el ánodo y una reducción en el cátodo:   
 tampón acético/acetato, desde 0,005 N hasta 1 N, a lo largo



Esto se consigue usando las llamadas soluciones de electrodos que actúan de barrera entre éstos y el contenido de la columna.

Referente a la posición de los electrodos conviene disponerla de forma tal que la fracción a aislar se focalice lo más cerca posible del extremo inferior de la columna, por donde se drena una vez acabado el proceso. Experiencias previas nos indicaron que ello tenía lugar colocando el cátodo en la parte superior y el ánodo en el inferior, de acuerdo pues, con ello, las soluciones de electrodos se prepararon de la siguiente forma:

Para el cátodo:

NaOH..... 0.1 g.

Agua destilada..... 10 ml.

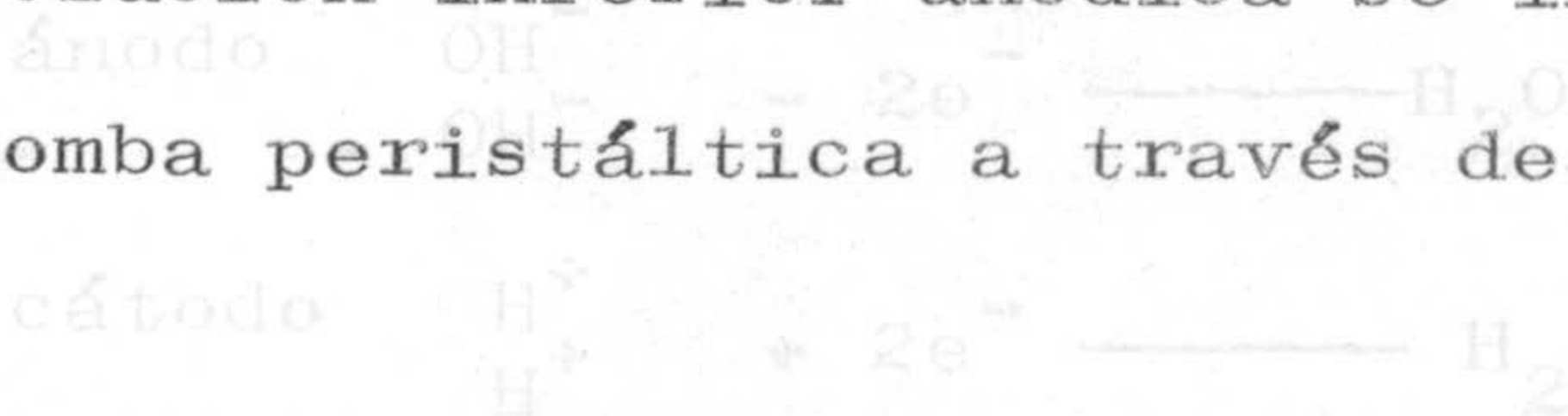
Para el ánodo:

Acido fosfórico..... 0.2 ml.

Agua destilada..... 14 ml.

Sacarosa..... 12 g.

El llenado de los electrodos se hizo de la siguiente forma: la solución inferior anódica se introduce con ayuda de una bomba peristáltica a través de la espita co-



correspondiente 1, estando abierta la válvula inferior 26, - pero cerrada la salida de drenado 9, hasta que el menisco llegue a unos 16 mm por encima del borde inferior del tubo central 21 (aproximadamente 18 ml). La solución superior - se introduce, cargada ya la columna, a través de la espita correspondiente 2, hasta que el menisco quede 1 cm por encima del electrodo superior 32.

c.2) Solución de anfolinas y gradiente de sacarosa.

La solución de anfolinas, se puede usar en un intervalo de concentración del 1 al 10%. Dadas las características de solubilidad de la sustancia a aislar, conocidas por experiencias previas, se ha utilizado una concentración del 1%, lo que en función de la capacidad útil de la columna (100ml), representa 2.5 ml del preparado comercial al 40 %.

El gradiente anticonvectivo de sacarosa se prepara entre 0 y 50 % de concentración de la misma. Para ello, se prepara una solución densa tomando las 3/4 partes del volumen a usar de anfolinas (1.9 ml) que se diluyen hasta 42 ml de agua destilada, disolviendo además 28 g. de sacarosa. - La solución ligera se prepara tomando la cuarta parte restante del volumen de anfolinas (0.6 ml) y se diluye junto - con la muestra a introducir en la columna hasta 60 ml con -



agua destilada.

c.3) Llenado de la columna.

Se utiliza un mezclador constituido por dos recipientes de vidrio, cilíndricos e iguales, conectados por su parte inferior. A uno de ellos, el de salida de la solución, se le adapta por su parte superior un agitador, una vez que se ha dispuesto en él la solución densa (55 ml). Al otro, que alberga igual volumen de solución ligera, se le adapta un compensador de la diferente densidad de ambas soluciones.

Una vez abierta la comunicación entre ambos y con el agitador en marcha, se hace pasar mediante una bomba peristáltica el contenido de ambos recipientes a la cámara electroforética 17 de la columna, a través de la espita 2, haciendo resbalar la solución por las paredes de la cámara, a un flujo que no exceda de 4 ml/minuto.

La muestra problema se introduce en la columna en la preparación de la solución ligera de anfolinas. Se ha utilizado un volumen de muestra de 5 a 6 ml, con una concentración proteica alrededor de 5 mg/ml.

c.4) Condiciones de la operación.

Se utilizó un voltaje de 320 voltios durante

70 horas para anfolinas con un gradiente de pH 3-10 y 500 voltios durante 48 horas para anfolinas con un gradiente de pH 5.0-8.0. En ambos casos la refrigeración se realizó a 4° C.

c.5) Elución de la columna.

Terminado el desarrollo se cierra la válvula inferior 26, y se drena la solución del electrodo inferior a través de la espita correspondiente 1.

La elución de la columna, se realizó por la salida 9, con bomba peristáltica y a un flujo de 1 ml/minuto, siguiendo la marcha del fraccionado por un registro continuo a 280 nm. Las fracciones recogidas fueron de 1 ml, cuyo pH se determinó por lectura de un pHmetro a la misma temperatura a la que se efectuó la focalización electroforética. Como punto isoeléctrico de los picos activos, se tomó el correspondiente a la fracción de máxima actividad específica.

d) Diálisis.

La diálisis se ha usado en varias de las técnicas de purificación expuestas para eliminar eluyentes, anfolinas, sacarosa, etc. Previamente, se realizó una prueba de la actividad de la preparación de TH para ensayar si era o no dializable.

## Análisis químico de la TH.

### Composición de aminoácidos.

Se ha utilizado un autoanalizador de aminoácidos - JEOL, modelo JLC 6AH, provisto de sistema de doble columna: una corta para aminoácidos básicos, estabilizada y -- eluída con tampón cítrico-citrato sódico  $\text{Na}^+$  0.2 N pH 5.30, y una larga para aminoácidos ácidos y neutros, estabilizada y eluída con tampón cítrico-citrato sódico  $\text{Na}^+$  0.2 N - pH 3.28, primero, y cítrico-citrato sódico  $\text{Na}^+$  0.2 N pH - 4.30, después. El aparato está ocupado con inyección automática de muestras, pudiendose programar todo el proceso - hasta un total de 6 muestras mediante un sistema de cintas perforadas.

El desarrollo del proceso cromatográfico queda registrado en un registrador de 3 canales, por impresión de las lecturas a 570 nm (sensibilidad x 1 x 3) y a 440 nm (sensibilidad x 3) que el doble detector efectúa de los -- compuestos coloreados que producen con la ninhidrina los aminoácidos separados. Las áreas de los picos así registrados son cuantificadas por un integrador de doble canal, - provisto de discriminadores de picos espúreos, e impresos en un impresor de datos junto con el tiempo de retención

del aminoácido en cuestión.

La determinación cuantitativa de cada aminoácido se efectúa por la comparación de dichas áreas con las dadas por una solución standard de aminoácidos (0.1 microM/ml de cada uno de ellos), fraccionada de una manera similar y paralela a las muestras problemas.

#### Características del proceso cromatográfica.

##### Columna corta (básicos)

Resina: JEOL LC-R-1.

Dimensiones: 0.8 x 15 cm.

Temperatura de Columna: 52°C.

Tampón de elución:

Cítrico-citrato sódico Na<sup>+</sup>  
0.2N pH=5.30 (1 hora 50 minutos).

Regeneración: NaOH 0.2 N (10 minutos).

Flujo de columna: 1.15 ml/min.

##### Columna larga (ácidos y neutros).

Resina: JEOL LC-R-1

Dimensiones: 0.8 x 50 cm.

Temperatura de Columna: 52°C.

Tampón de elución:

1º Cítrico-citrato Na<sup>+</sup>  
0.2N pH 3.28 (1 hora 45 minutos).

2º Cítrico-citrato Na<sup>+</sup>  
0.2N pH 4.30 (1 hora 30 minutos)

Regeneración: NaOH 0.2N (20 minutos).

Flujo de columna: 1.15 ml/min.

Flujo de detector: 0.42 ml/minuto.

Flujo de ninhidrina: 0.21 ml/minuto.

Temperatura de baño de ninhidrina: 95° C.

Tiempo de reacción: 7 minutos.

Camino óptico de las células del detector: 2 mm.

Sensibilidad del detector:

a 570 nm: x 1 (0-100% T).

x 3 (70-100% T).

a 440 nm: x 3 (70-100% T).

Velocidad de carta del registrador: 12 cm/hora.

Volumen de muestra: 1 ml por columna.

Concentración del standard: 0.1 microM/ml de:

lisina, Histidina, amonio, arginina, serina,  
ácido glutámico, prolina, cisteína, glicocola,  
alanina, cistina, valina, metionina, iso  
leucina, leucina, tirosina y fenilalanina.

Las muestras se hidrolizan en tubos apropiados provistos de un estrechamiento en su parte media. Los volúmenes a hidrolizar variaron según la concentración proteica, oscilando entre los dos y los seis ml. Llenados los tubos, se les adicionó a cada uno ClH 12 N en igual volumen al de la muestra, de tal forma que la solución final quedara a una concentración 6 N en dicho ácido. El contenido de los

tubos se congeló en mezcla acetona-nieve carbónica, se hizo un vacío de unos 20 micrones y se cerraron a la llama en la zona estrechada.

La hidrólisis, se llevó a cabo a 105° C durante 22 horas. El hidrolizado se centrifugó para eliminar el material insoluble, pasandose el sobrenadante y las aguas de lavado del sedimento a un matraz de rotavapor. Se procedió a eliminar el ClH a una temperatura de 40° C y a presión reducida (rotavapor Buchi), haciendo un par de lavados y evaporaciones sucesivas con agua destilada. Finalmente, se llevó a sequedad. El hidrolizado fué disuelto en un volumen conveniente de tampón cítrico-citrato 0.2 N en Na<sup>+</sup> pH 2.2, de tal forma que la concentración final en aminoácidos sea la equivalente a unos 0.2-0.4 mg/ml de proteína original.

#### Mecanismo de acción de la TH.

Isoenzimas de la catalasa de hígado de ratón:

Para analizar los isoenzimas de la catalasa de hígado de ratón, la influencia de la TH sobre los mismos, se emplearon las siguientes técnicas:

a) Extracción del hígado: los ratones son matados por decapitación, e inmediatamente después se toman 0.5 g de hígado que es homogeneizado en un homogenizador de vidrio con 2.5 cc. de agua destilada (siempre se han utilizado un lote de 5 ratones de 2 meses de edad del mismo sexo y 20 g. de peso aproximadamente por ratón, los ratones cuando se matan llevan 24 horas sin comer).

b) Sonicación: el homogenizado anterior (mezcla de los homogeneizados de los 5 ratones que componen el lote), lo sonicamos, para liberar bien la catalasa, durante 5 minutos en un baño de órganos termostaticado a 0° C.

c) Centrifugación: después de la sonicación, se centrifuga a 40.000 gess durante 30 minutos, al final de los cuales con una pipeta pasteur se toma el sobrenadante libre de partículas, y se le hace una prueba de LOWRY para determinar la cantidad de proteínas del sobrenadante.

d) Isoelectroenfoque: de acuerdo con la técnica descrita anteriormente de isoelectroenfoque, se monta una columna empleando anfollinas en un gradiente de pH 3-10, 320 voltios de diferencia de potencial, durante 60 horas. La cantidad de muestra introducida, oscila entre 25 y 30 mg de proteína en total. Las fracciones son recogidas como an.

teriormente se ha indicado.

e) Valoración de los isoenzimas de la catalasa: se ha empleado el método yodimétrico de valoración de la catalasa hepática anteriormente descrito.

Como punto isoeléctrico de los picos con actividad catalásica, se tomó el correspondiente a la fracción de máxima actividad específica.



R E S U L T A D O S

Extracción y determinación de la actividad de los factores TH obtenidos de mutantes rho<sup>-</sup> de levadura sobre la catalasa hepática e hierro plasmático de ratón.

Los rendimientos obtenidos con los dos métodos de extracción empleados han sido los siguientes:

2 matraces de 10 l. de capacidad y 9 l. de medio, sembrados con Axa (raza deficiente respiratoria) dan un rendimiento bruto de 14.6 g. de polvos cetónicos.

7.3 g. de polvos cetónicos dan un rendimiento bruto de TH cruda (dependiendo del método de extracción empleado):

- a) Extracción acética: 340 mg de TH cruda, -- equivalente a 4.65 g/%.
- b) Extracción acuosa o alcohólica: 320 mg de TH cruda, equivalente a 4.38 g/%.

En la Tabla nº 1, se expone el resultado obtenido en la valoración de catalasa hepática de ratones inyectados con una de las preparaciones activas de TH cruda, obtenidas por extracción acuosa y precipitación alcohólica a partir de mutantes rho<sup>-</sup> de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizados en éste estudio.

T A B L A N° 1

Actividad de TH de una preparación obtenida por extracción acuosa y precipitación alcohólica. Valoración de catalasa hepática en ratones machos de 2 meses de edad y 20 gramos de peso.

Producto inoculado	Nº de ratones	Dosis(mg/ratón)	Kat.f.
Agua destilada	6	-	144.6 ± 9.6
TH cruda	5	30	81.6 ± 4.1*

\* probabilidad menor de  $10^{-3}$ . Resultado muy significativo.

Como puede apreciarse la disminución de la actividad de la catalasa hepática en los ratones inyectados con TH cruda es considerable y tiene una significación muy marcada.

El contenido de hierro plasmático en ratones inyectados con TH cruda y en testigos se exponen en la Tabla nº 2, expresado en microgramos de hierro/100 ml. de plasma.

T A B L A    N°   2

Contenido en hierro plasmático de ratones inoculados con TH cruda.

Producto inoculado	Nº de ratones	Dosis(mg/ratón)	mcg Fe por 100 ml de plasma
Agua destilada	5	-	69.0
TH cruda	5	30	18.7

Estos resultados estan de acuerdo con lo expuesto en la introducción de ésta Memoria. La actividad de las preparaciones de TH sobre hierro plasmático es extremadamente grande, sin embargo, a pesar de que éste procedimiento de valoración sería el ideal, no ha podido ser utilizado por dificultades inherentes a la técnica: la utilización de ratones como animales de prueba.

En la tabla nº 3, se compara una muestra de éste tipo con una obtenida por extracción acética de la misma raza de levadura.

T A B L A    N° 3

Actividad de catalasa hepática en ratones machos de 2 meses de edad de 20 g. de peso, inoculados con preparaciones de TH obtenidas mediante extracción acética y extracción acuosa.

Producto inoculado	Nº de ratones	Dosis(mg/ratón)	Kat.f.
Agua destilada	6	-	161.0 ± 14.4
TH (extr. acética)	5	30	96.7 ± 13.1*
TH (extr. acuosa)	5	30	58.9 ± 5.6*

\*probabilidad menor de  $10^{-3}$ . Valores muy significativos.

La extracción acuosa manifiesta una alta actividad inhibidora de la catalasa hepática, mayor que la TH obtenida por extracción acética, posiblemente a causa de su menor degradación por la suavidad del proceso.

Purificación de factores con actividad de TH obtenidos de mutantes de levaduras.

Los resultados obtenidos cuando las preparaciones de TH, obtenidas por extracción acuosa, se someten a diálisis, se exponen en la Tabla nº 4. Estos resultados son interesantes ya que en los procedimientos de purificación posterior ha de ser separada la TH de otras sustancias que le acompañan por éste medio.

T A B L A N º 4

Actividad de la catalasa hepática en ratones inyectados con TH (extr. acuosa) dializada y no dializada. Ratones machos de 2 meses de edad y de 20 g. de peso aproximadamente.

Producto inoculado	Nº de ratones	Dosis (mg/ratón)	Kat. f.
Agua destilada	6	-	118.0 ± 3.4
TH dializada	5	30	62.6 ± 5.0*
TH sin dializar	5	30	69.9 ± 6.1*

\* probabilidad menor de  $10^{-3}$ . Valores muy significativos.

Claramente se aprecia que las preparaciones de TH obtenidas por extracción acuosa, tienen un tamaño molecular suficientemente grande para no dializar.



En la Fig. 2 se muestra la gráfica correspondiente al fraccionamiento de TH cruda, obtenida por extracción acuosa y precipitación alcohólica, por filtración en columna de Sephadex G-25 medio. Como eluyente se ha utilizado agua destilada, las fracciones (5 ml cada una) han sido recogidas por un colector de fracciones y medida su densidad óptica a 280 nm. Se han obtenido 2 picos que se han denominado pico 1 y pico 2.

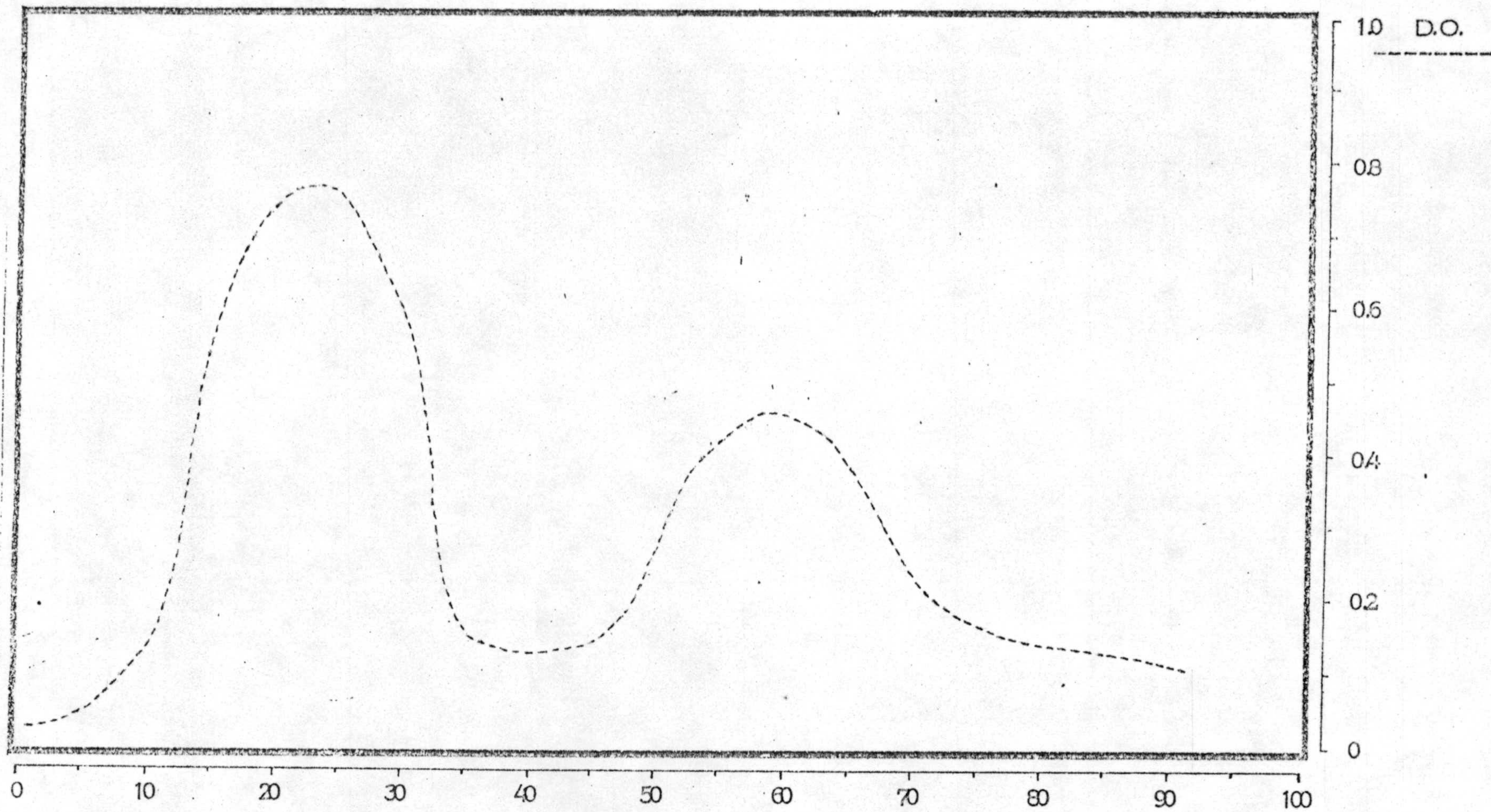


Figura nº 2

Fraccionamiento de TH cruda por filtración en gel en columna de Sephadex G-25 medio.

La Tabla nº 5, muestra los resultados obtenidos -- cuando las fracciones recogidas, utilizando Sephadex G-25 medio, son inyectados a ratones.

T A B L A    N° 5

Actividad de la catalasa hepática de ratones inocu- lados con fracciones correspondientes a picos de proteínas que aparecen en la purificación de extractos crudos, con actividad de TH, obtenidas por pasos a través de una colum- na de Sephadex G-25 medio.

Producto inoculado	Nº de ratones	Dosis (mg/ratón)*	Kat. f.
Agua destilada	6	-	110.5 ± 1.6
F 1 (pico 1)	5	30	65.2 ± 8.7**
F 2 (pico 2)	5	30	109.1 ± 2.02

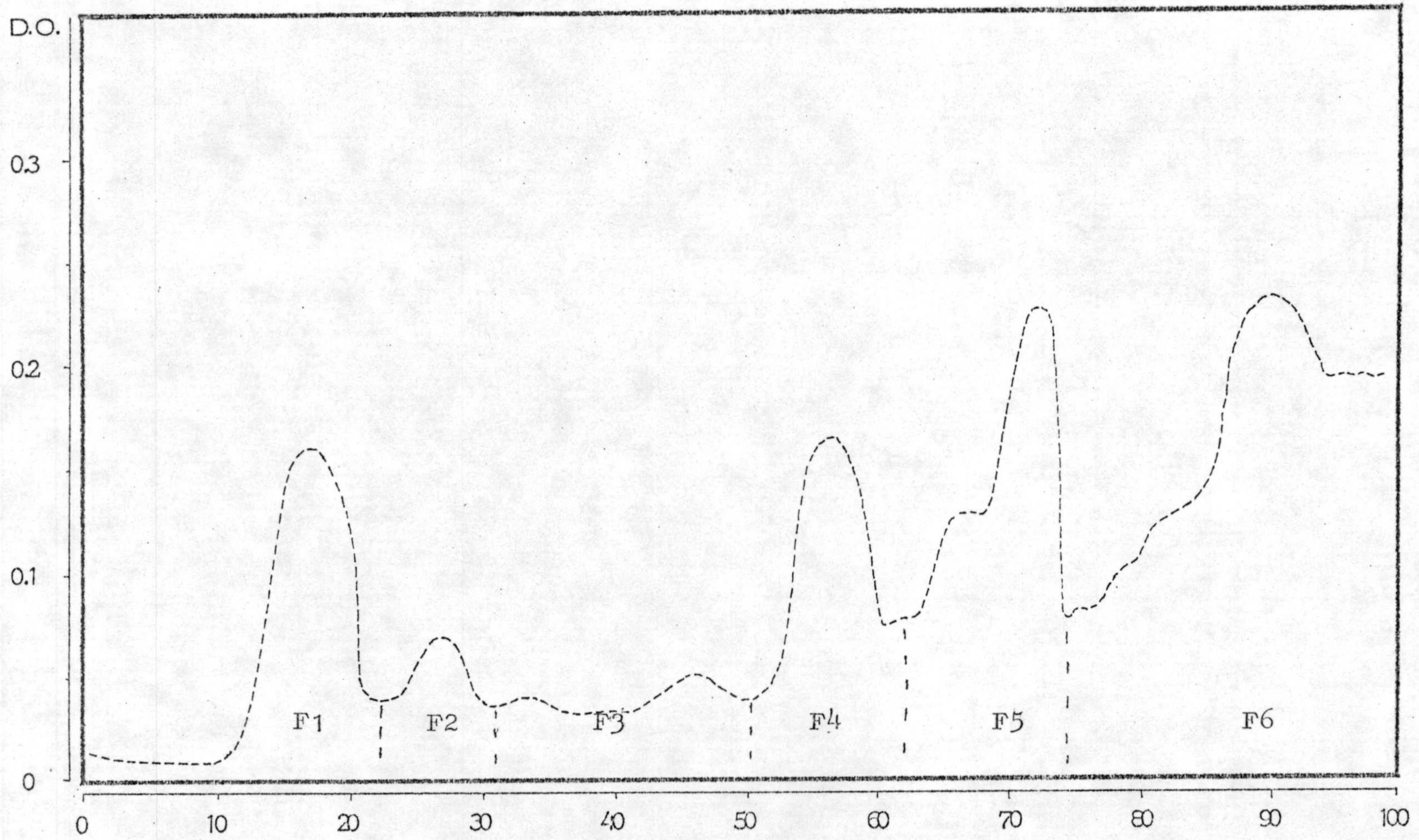
\* considerando un rendimiento del 50%.

\*\* probabilidad menor de  $10^{-3}$ . Valores muy significativos.

La actividad se encuentra en el pico 1, que aparece cuando se determina el contenido en proteínas en las distin- tas fracciones o se realiza una lectura de densidad óptica a 280 nm.

La Fig. 3 muestra la gráfica correspondiente a las fracciones eluidas de una columna de DEAE-celulosa utilizada para la purificación de una preparación de TH cruda, obtenida por extracción acuosa y precipitación alcohólica. - Las fracciones (5 ml cada una) son recogidas por un colector de fracciones y medida su densidad óptica a 280 nm. Los picos de proteínas mostrados en la gráfica, han sido reunidos en una serie de grupos que se han denominado: F 1, F 2, F 3, F 4, F 5, y F 6. Como eluyente se ha utilizado un gradiente de tampón acético/acetato 0.005 M-1 M.

FIGURA Nº 3



Las fracciones eluidas de una columna de DEAE-celulosa utilizada para la purificación de una preparación de TH cruda, obtenida por extracción acuosa, e inyectadas en ratones, manifiestan la actividad sobre la catalasa hepática del ratón que se muestra en la Tabla nº 6.

Las fracciones han sido separadas de acuerdo con la absorción a 280 nm y su concentración en proteínas ha sido determinada por LOWRY. En todos los ratones se ha inyectado la misma cantidad de proteína para realizar el estudio comparativo de purificación.

T A B L A N° 6

Actividad de catalasa hepática en ratones machos de 2 meses de edad, de 20 g. de peso, inoculados con fracciones correspondientes a picos de proteínas (graf. fig. 3), separados en el fraccionamiento de extractos crudos con actividad de TH por paso a través de una columna de DEAE-celulosa.

Producto inoculado	N° de ratones	Dosis(mg prot./ratón)	Kat. f.
Agua destilada	6	-	124.7 ± 12.1
F 1 (Fig. 3)	5	1.375	119.3 ± 10.2
F 2 (Fig. 3)	5	1.375	122.3 ± 9.5
F 3 (Fig. 3)	5	1.375	121.4 ± 11.4
F 4 (Fig. 3)	5	1.375	91.6 ± 16.7*
F 5 (Fig. 3)	5	1.375	85.9 ± 15.8*
F 6 (Fig. 3)	5	1.375	120.2 ± 11.5

\* probabilidad de  $10^{-3}$ . Valores muy significativos.

Los resultados muestran que la actividad se encuentra repartida entre las fracciones 4 y 5, que son las que posteriormente van a ser repurificadas por isoelectroenfoque.

La Fig. nº 4, muestra la gráfica correspondiente - a un isoelectroenfoque de TH en gradiente de anfolinas 3-10.

Las fracciones recogidas (1 ml cada una) se les ha medido su pH y su densidad óptica a 280 nm.

Estas fracciones se han reunido en tres grupos, dependiendo de su pH:

- 1) pH 3-6.
- 2) pH 6-8.
- 3) pH 8-10.

Posteriormente han sido dializadas y concentradas (mediante el rotavapor) antes de probar su actividad TH.



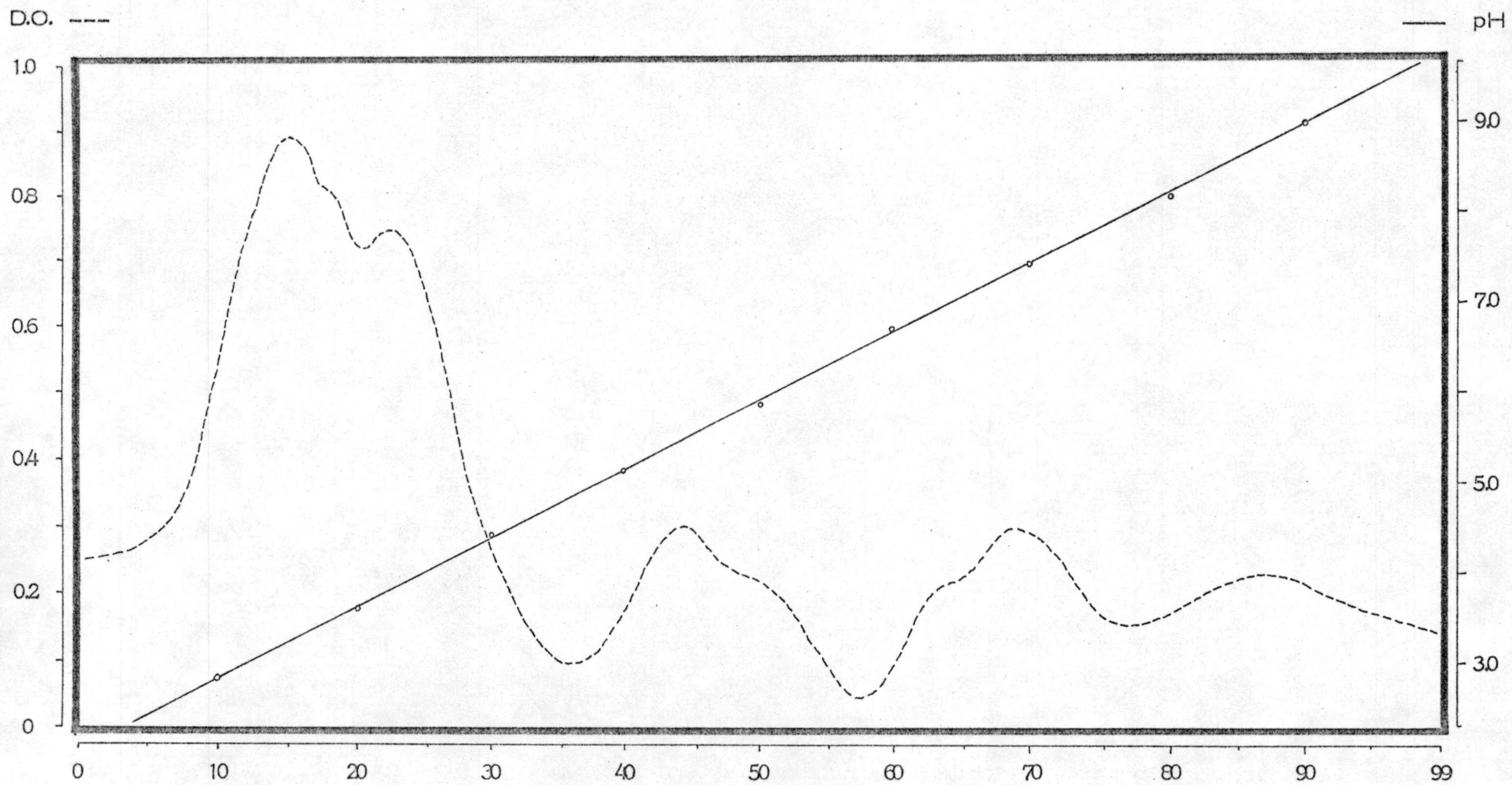


FIGURA nº 4

En la Tabla nº 7, se muestran los resultados obtenidos al inyectar a ratones las fracciones procedentes de una columna donde se ha realizado un isoelectroenfoque de TH en un gradiente de pH 3-10.

T A B L A N° 7

Actividad de la catalasa hepática en ratones normales, machos de 2 meses de edad y de 20 gramos de peso, aproximadamente, inoculados con fracciones procedentes de una columna donde se ha realizado un isoelectroenfoque de TH - en un gradiente de pH 3-10.

Producto inoculado	Nº de ratones	Dosis (mg/ratón considerando un 50% de rend.)	Kat. f.
Agua destilada	5	-	159.4 ± 12
TH cruda	5	30	97.5 ± 10.2*
Fracción pH 3-6	5	30	104.5 ± 11.3*
Fracción pH 6-8	5	30	152.3 ± 13.4
Fracción pH 8-10	5	30	151.5 ± 14.2

\* probabilidad menor de  $10^{-3}$ . Valores muy significativos.

La Fig. nº 5, nos muestra la gráfica correspondiente a un isoelectroenfoque en gradiente de anfolinas 3-7 de TH purificada, anteriormente, por DEAE-celulosa y diálisis posterior.

Las fracciones recogidas (1 ml cada una) se les ha medido su pH y su densidad óptica a 280 nm.

Estas fracciones se reunieron, teniendo en cuenta su pH, en tres grupos:

- 1) pH 2.8-4.0;
- 2) pH 4.0-5.0.
- 3) pH 5.0-7.4.

Posteriormente fueron dializadas y concentradas -- (mediante rotavapor) antes de probar su actividad TH.

D. O. - - - -

— pH

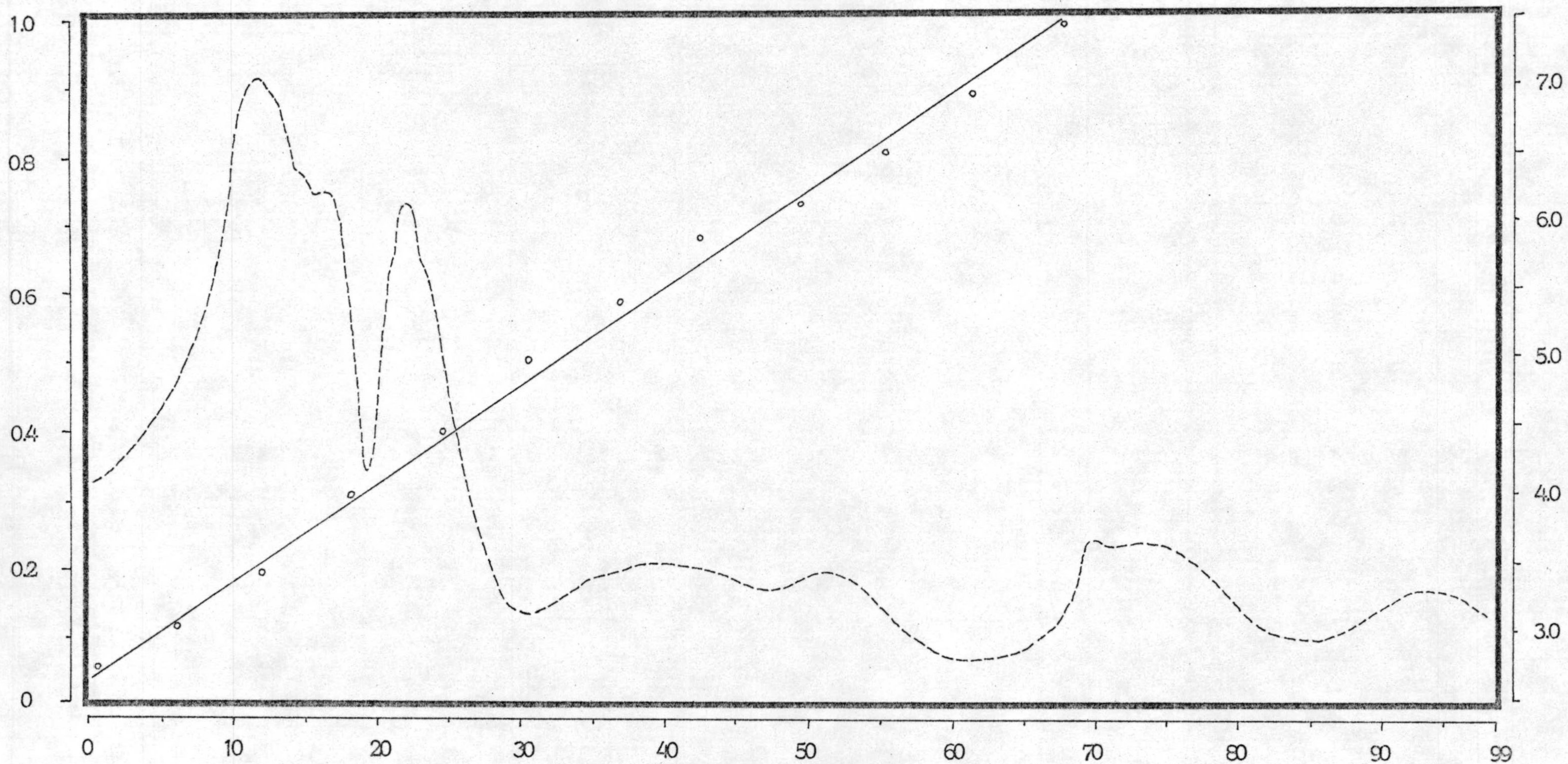


FIGURA nº 5

En la Tabla nº 8, se muestra la actividad de la catalasa hepática en ratones inoculados con las fracciones obtenidas al paso por una columna de isoelectroenfoque con un gradiente de pH 3-7, de TH previamente purificada por DEAE-celulosa.

T A B L A N° 8

Actividad de catalasa hepática en ratones normales machos de 2 meses de edad y de 20 g. de peso, aproximadamente, inoculados con fracciones procedentes de una columna donde se ha realizado un electroenfoque de TH, purificada anteriormente por DEAE-celulosa, en un gradiente de pH 3-7.

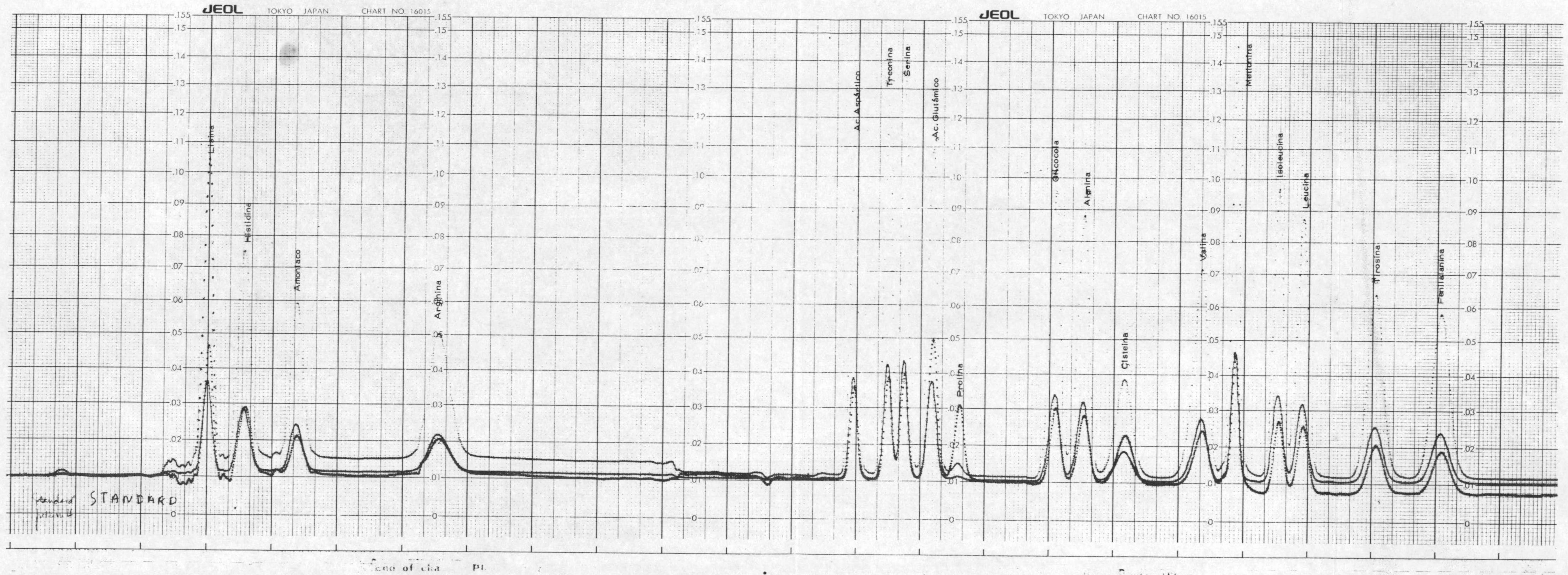
Producto inoculado	Nº de ratones	Dosis(mg prot/ratón)	Kat. f.
Agua destilada	5	-	178.6 ± 31.8
F 1 (pH 2.8-4.0)	5	1.14	103.8 ± 4.46*
F 2 (pH 4.0-5.0)	5	0.525	109.7 ± 16.8*
F 3 (pH 5.0-7.4)	5	1.3	130.6 ± 38.5

\* probabilidad menor de  $10^{-3}$ . Valores muy significativos.

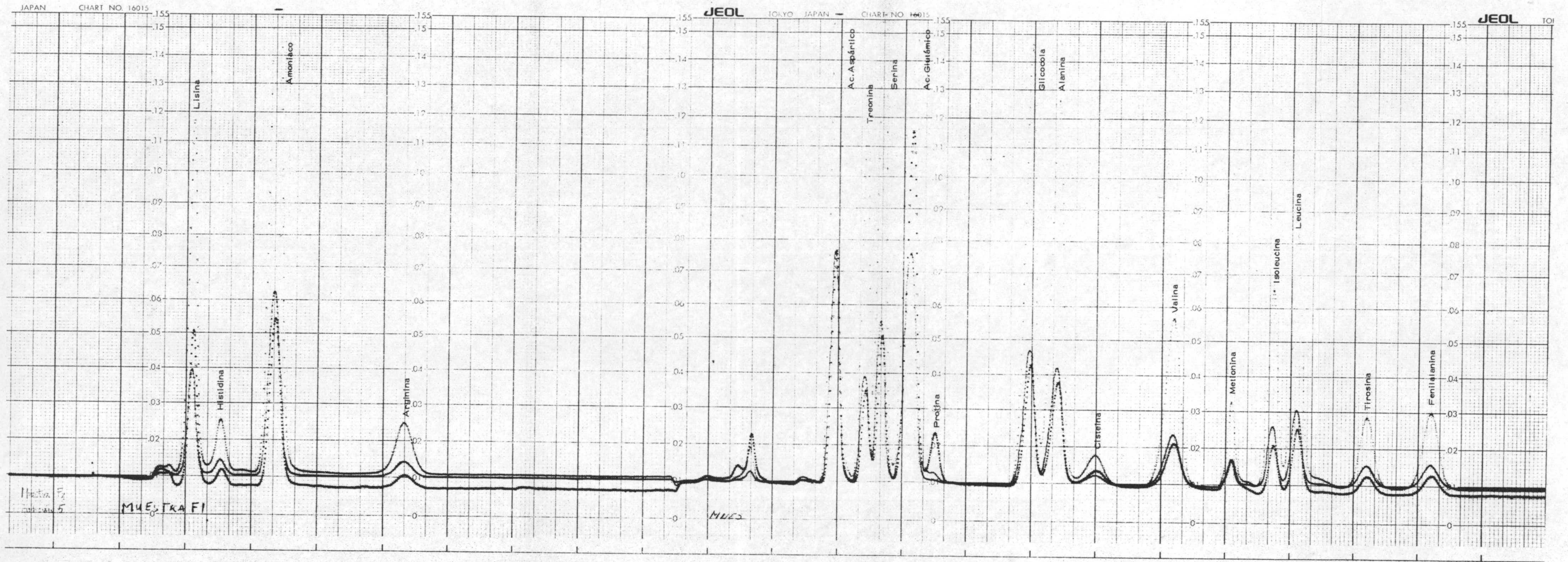
Composición química de factores con actividad de  
TH obtenidos de mutantes rho<sup>-</sup> de levaduras.

En las dos Tablas y gráficas que a continuación se exponen muestran el contenido de aminoácidos de éstas sustancias con actividad de TH, obtenidas a partir de mutantes rho<sup>-</sup> de levadura por extracción acuosa y precipitación alcohólica.

Este análisis de aminoácidos ha sido realizado a dos fracciones purificadas por DEAE-celulosa e isoelectroenfoque 3-7 y posterior diálisis.







JAPAN CHART NO. 16015

JEOL TOKYO JAPAN

CHART NO. 16015

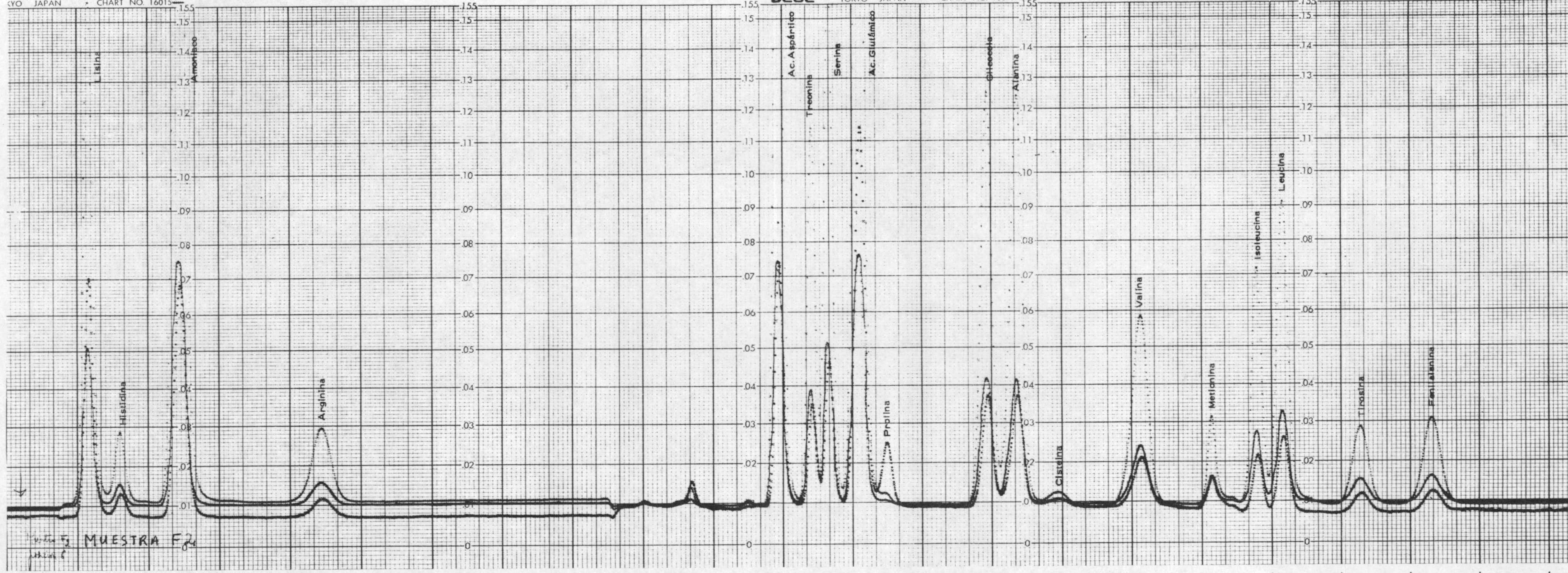
JEOL TOKYO

MUE, TRAFI

MUE, TRAFI

MUE

Printed on Demand - Please recycle



End of chart - Please replace

End of chart - Please replace

T A B L A N° 9

Contenido de aminoácidos de la fracción F 1 (isoelectroenfoque, pH 2.8-4.0).

<u>Nombre del aminoácido</u>	<u>% relativo</u>
Alanina	6.4
Amoniaco	*
Arginina	2.4
Acido Aspartico	18.5
Cistina	*
Acido glutámico	20.8
Glicocola	5.7
Isoleucina	4.0
Leucina	6.2
Lisina	6.5
Metionina	1.5
Fenilalanina	3.2
Prolina	2.9
Serina	7.3
Treonina	5.1
Tirosina	3.2
Valina	4.6
Histidina	1.6

T A B L A N° 10

Contenido de aminoácidos de la fracción F 2 (isoelectroenfoque, pH 4.0-5.0).

<u>Nombre del aminoácido</u>	<u>% relativo</u>
Alanina	6.0
Amoniaco	+ *
Arginina	3.5
Acido Aspartico	16.6
Cistina	*
Acido Glutámico	19.6
Glicocola	4.5
Isoleucina	4.4
Leucina	6.6
Lisina	9.1
Metionina	1.5
Fenilalanina	3.4
Prolina	4.4
Serina	6.2
Treonina	4.9
Tirosina	2.9
Valina	4.7
Histidina	1.5

Mecanismo de acción de los factores con actividad TH, obtenidos de mutantes "petite" rho<sup>-</sup> de Saccharomyces cerevisiae.

La Tabla nº 11, nos muestra la actividad relativa de catalasa en ratones machos y hembras de la misma edad, inyectados con TH. Se observa una clara influencia en la respuesta a la TH dependiente del sexo de los animales.

T A B L A    N°    11

Actividad relativa de catalasa en hígado de ratones machos y hembras, testigos e inyectados con 30 mg de TH cruda/ratón. (Testigos con 0.25 ml de agua destilada).

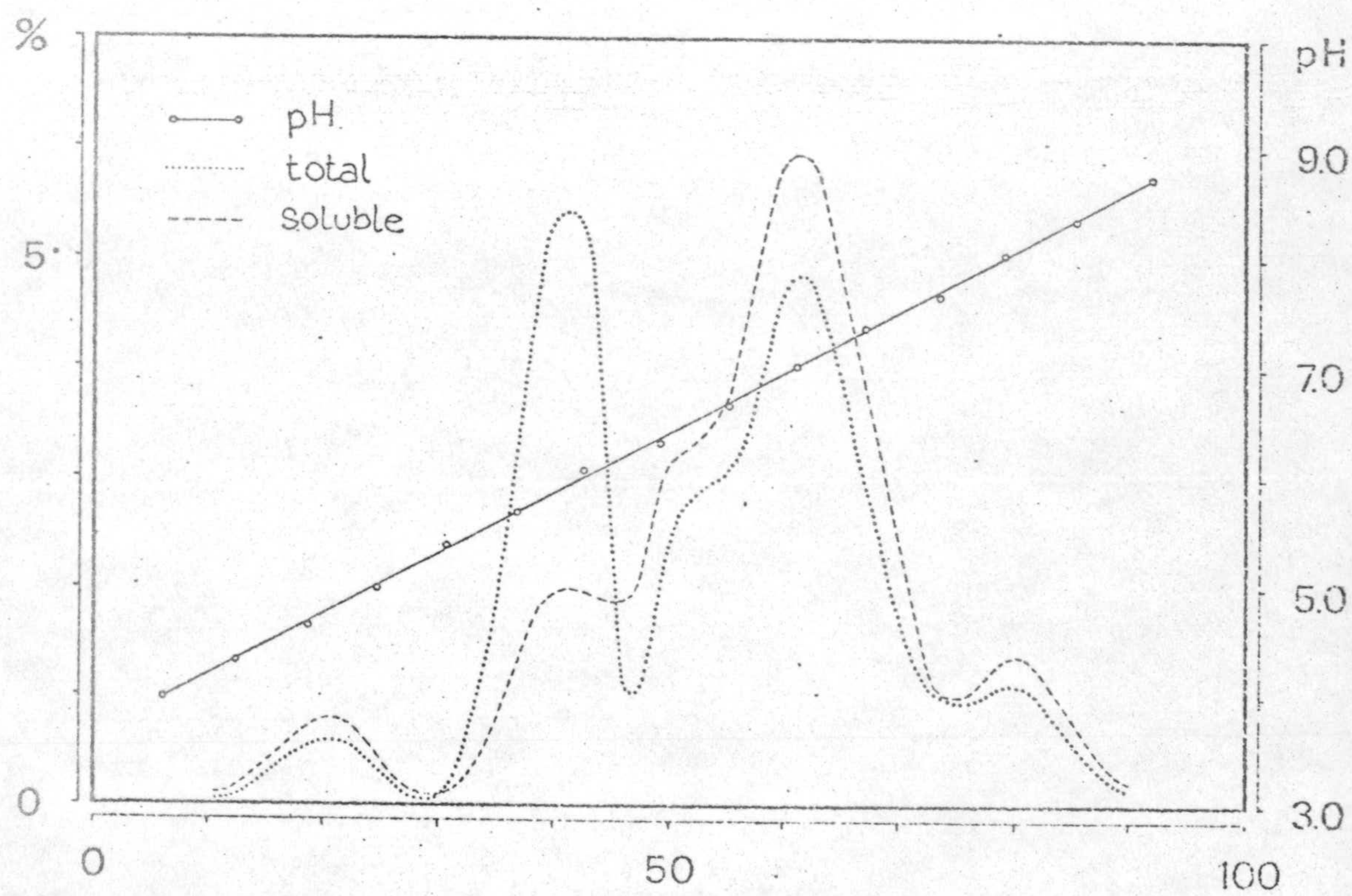
Sexo	Tratamiento	Actividad relativa*
M	-	100
M	TH	57
H	-	100
H	TH	73

\* Valores medios de 5 experiencias (cada experiencia constaba de 5 ratones testigos y 5 ratones inyectados con TH).

La fig. 9, muestra la actividad de catalasa hepática total y soluble de ratones machos normales, expresada como % de la actividad total recuperada de la columna. En ésta, como en todas las figuras similares que siguen, se ha representado el gradiente de pH conseguido en cada separación.

Esta separación indica que existen 5 fracciones en la catalasa hepática de ratones machos, que corresponden a los puntos isoeléctricos 5.0, 6.2, 6.7, 7.2 y 8.0, aunque la distribución cuantitativa es distinta según se trate la actividad total o soluble.

F I G U R A N º 9



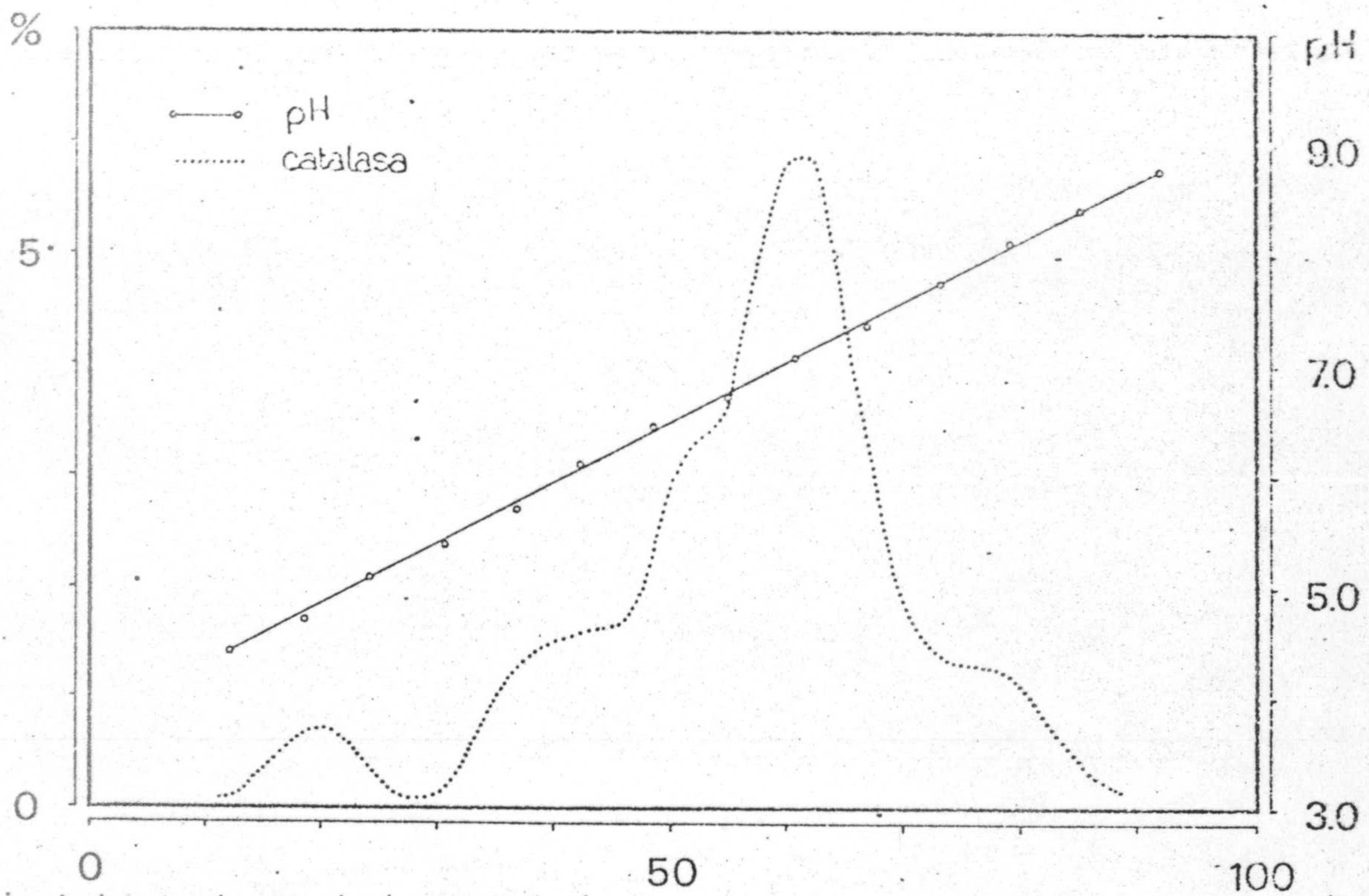
Actividad de catalasa total y soluble de ratones macho no inyectados  
(% de la actividad total recuperable de la columna)



La Fig. 10, muestra la actividad de catalasa hepática total en ratones macho inyectados con preparaciones de TH y representada como porcentaje de actividad total recuperada de la columna.

Aparecen las formas enzimáticas a los mismos puntos isoeléctricos que en hígado de ratones normales, aunque con diferencias cuantitativas, concretamente la forma correspondiente a punto isoeléctrico 6.2 se encuentra muy disminuída.

F. I G U R A N º 10

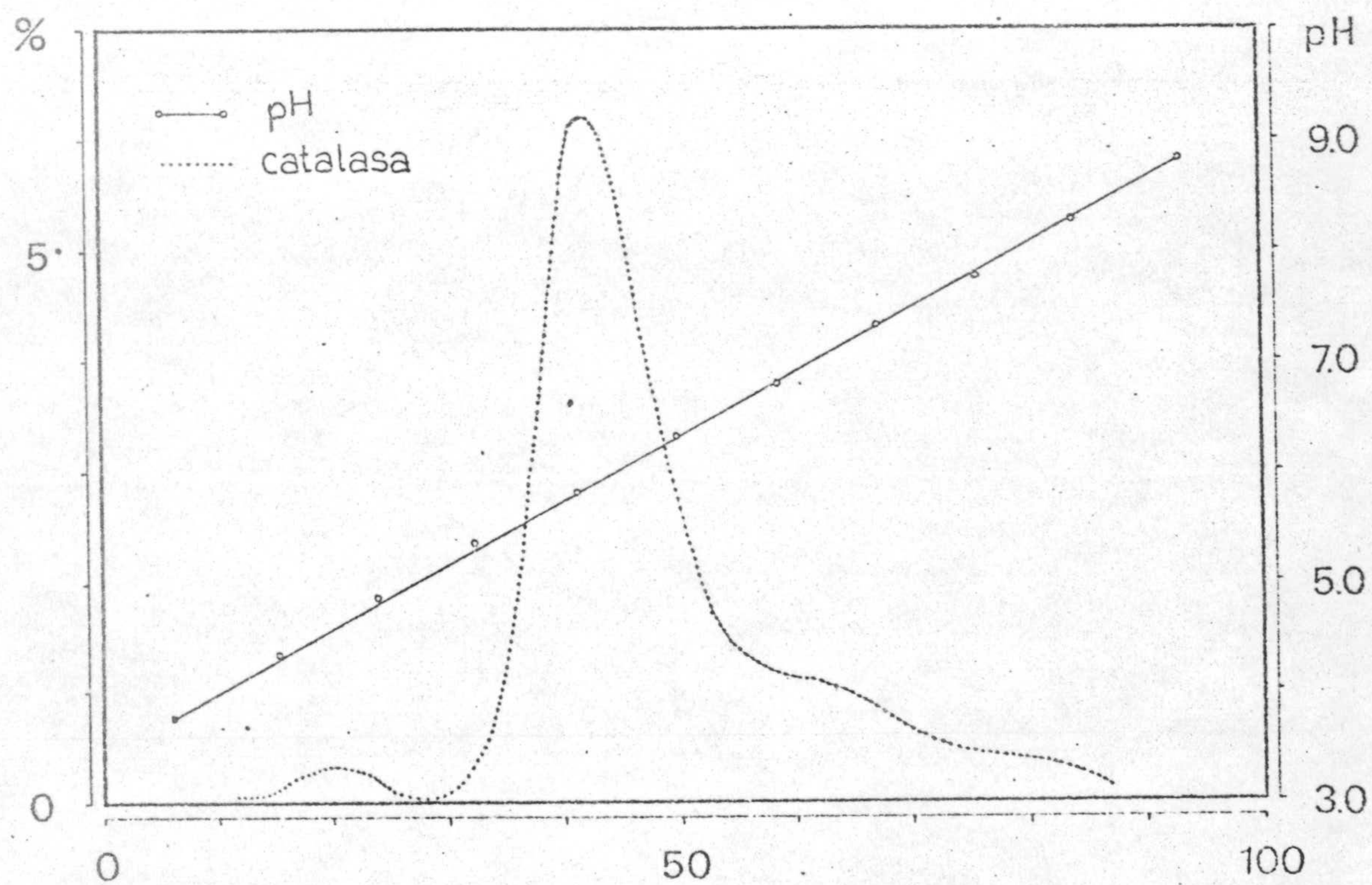


Actividad de catalasa total de ratones macho inyectados con TH (% de la actividad total recuperada de la columna)

La Fig. 11, muestra la actividad de catalasa mitocondrial en hígado de ratones macho normales expresada como % de la actividad total recuperada de la columna.

Se aprecia claramente, que la forma correspondiente al pI 6.2 es la única prácticamente que se encuentra presente en la fracción mitocondrial.

FIGURA N° 11

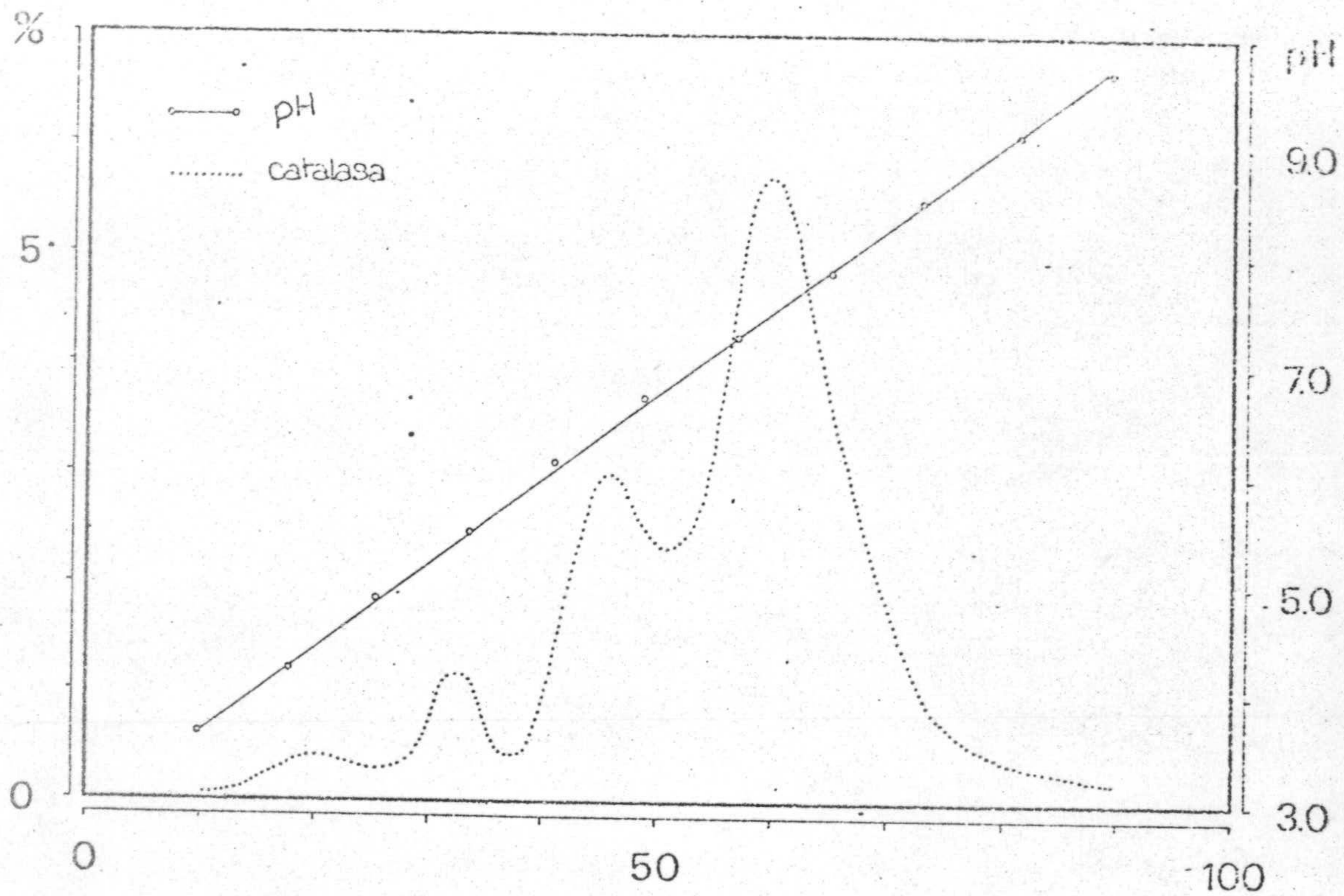


Actividad de catalasa mitocondrial (particulada) de ratones macho  
(% de la actividad total recuperada de la columna).

En la Fig. 12, se muestra la actividad de catalasa hepática total de ratones hembra normales expresada como % de la actividad total recuperada de la columna.

Se pueden apreciar, con diferencias cuantitativas, las mismas fracciones aparecidas en la separación isoelectroforética de la catalasa hepática de los animales machos.

F I G U R A N º 12

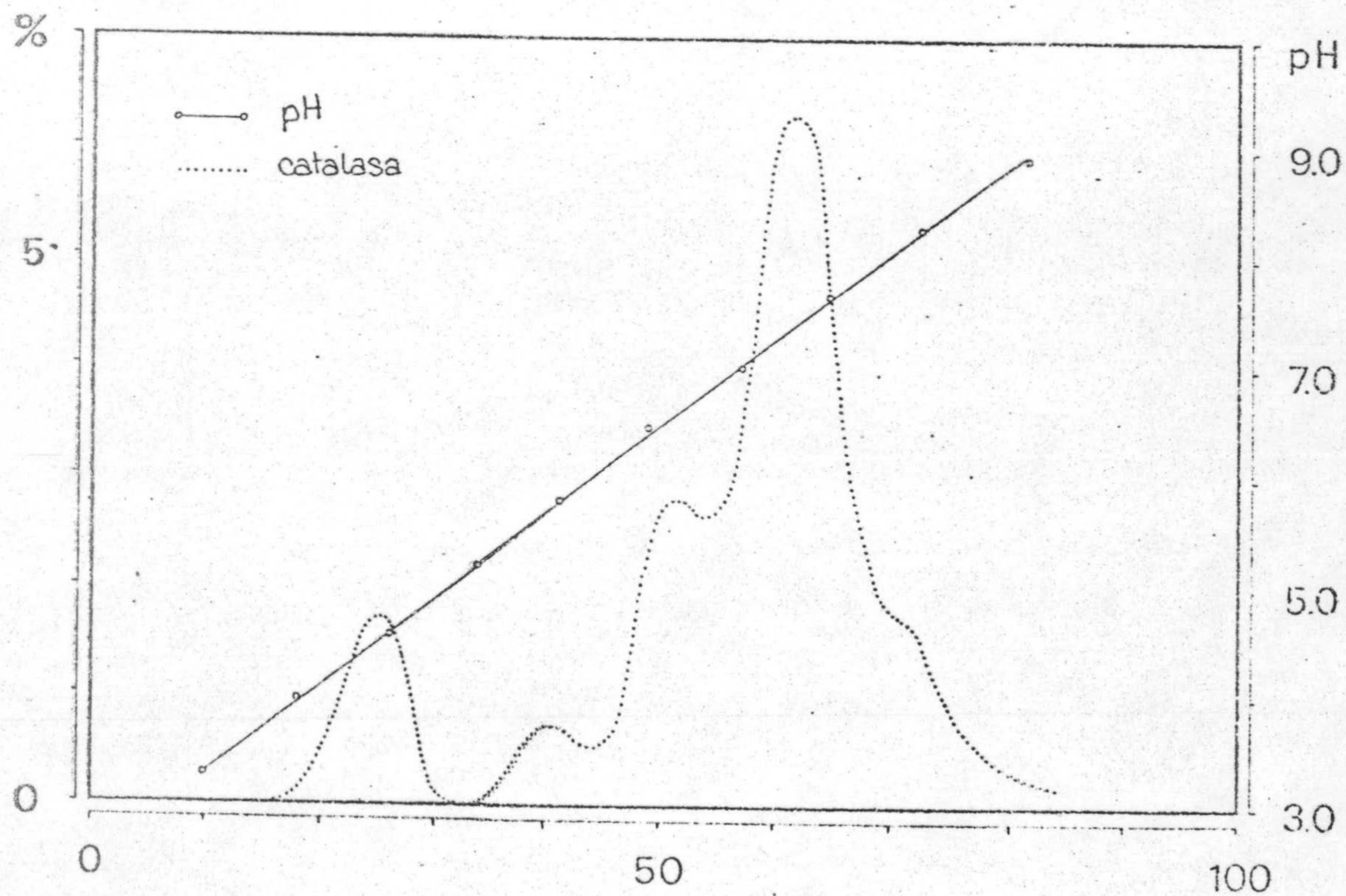


Actividad de catalasa total de ratones hembra no inyectados  
(% de la actividad total recuperada de la columna)

La Fig. 13, muestra la misma separación indicada en la figura 12, pero correspondiente a animales inyectados con preparaciones con actividad de TH.

Se aprecia claramente la menor cantidad relativa de la forma correspondiente a punto isoeléctrico (pI) 6.2.

FIGURA N° 13



Actividad de catalasa total de ratones hembra inyectados con TH  
(% de la actividad total recuperada de la columna)



D I S C U S S I O N

## D I S C U S I O N

Como se indicó en la introducción, el objeto de éste trabajo era abordar el estudio de los factores de tipo TH producidos por mutaciones " de S. cerevisiae con miras a establecer los métodos más adecuados para su extracción y purificación a fin de disponer de preparaciones lo suficientemente purificadas para llevar a cabo un estudio de su composición química, que permitiera establecer una comparación con los datos existentes en la bibliografía en relación con la TH cancerosa. Igualmente se pretendía establecer, si la identidad de acción biológica entre la TH -- cancerosa y las sustancias de éste tipo objeto de estudio se extendía más allá de su ya conocido efecto sobre la catalasa hepática del ratón.

En relación con los métodos de extracción, se ha puesto a punto un método, modificación del de NAKAGAWA (1952) para la extracción de la TH cancerosa, que ha demostrado ser más eficaz que el que se venía utilizando hasta el momento de YUNOKI y GRIFFIN (1960), consistente en una extracción acética.

Los rendimientos de ambos métodos son practicamen-

te los mismos, pero sin embargo la TH cruda obtenida por el método de extracción acuosa y precipitación alcohólica presenta a igualdad de dosis una mayor actividad biológica, ya que como se muestra en la Tabla nº 3, el descenso en el nivel de catalasa hepática que provoca en ratones es mucho mayor que el que se obtiene en el caso de TH preparada por extracción acética.

De otra parte la TH obtenida por el procedimiento - indicado no es dializable, como puede ser comprobado en la Tabla nº 4. Esto, de una parte, concuerda con los caracteres descritos para la TH cancerosa por diversos autores (NAKAHARA y FUKUOKA 1948, FUKUDA et al. 1966, OKUDA, 1972, etc) y, de otra parte, representa una gran ventaja a la hora de la purificación, ya que permite eliminar mediante diálisis una serie de impurezas y sustancias de bajo peso molecular empleadas en los procesos de purificación: sales inorgánicas, anfolinas, sacarosa, etc.

En relación por tanto con los métodos de extracción ensayados, las sustancias de tipo TH objeto del estudio parecen comportarse de manera idéntica a la TH cancerosa.

En cuanto a sus actividades biológicas, solamente se ha ensayado la acción sobre la biosíntesis de la catalasa hepática y sobre el nivel de hierro plasmático; activida-

des que son las más características de la TH cancerosa. Se ha podido confirmar la ya conocida acción sobre la catalasa hepática: la inyección intraperitoneal a ratones de una dosis adecuada de TH procedente de levaduras, que oscila entre 3.2 mg de proteína por ratón en el caso de preparaciones crudas y 0.5 mg de proteínas en las preparaciones más purificadas, provoca en los animales inyectados, al igual que en la TH cancerosa, un notable descenso de la catalasa hepática, detectable a las 20-24 horas después de la inyección.

Este efecto era ya perfectamente conocido puesto - que fué utilizado por CALLAO y MONTROYA (1961), para ponerla de manifiesto en mutaciones de microorganismos con deficiencia respiratoria. Sin embargo, la acción sobre el nivel de hierro plasmático no había sido estudiada hasta el momento; a pesar de que según KAMPSCHMIDT (1959) la TH cancerosa ejerce un efecto mucho más acentuado sobre la concentración de hierro plasmático que sobre los niveles de catalasa hepática. A la hora por tanto, de comparar los dos tipos de sustancias, era necesario verificar si también en éste aspecto era idéntica o similar su acción.

Los resultados que se exponen en la tabla nº 2, demuestran que la TH de levaduras se comporta de manera simi

lar a la TH cancerosa; por lo que respecta a su efecto so  
bre el nivel de hierro plasmático.

Hay que reconocer antes de seguir adelante que qui  
zás el n<sup>o</sup> de experiencias de purificación realizadas no ha  
sido lo suficientemente grande que fuera de desear; ello --  
ha sido debido a lo engorroso que resulta el seguir los ---  
procesos de purificación mediante los procedimientos de va  
loración "in vivo" que es necesario utilizar en el caso de  
la TH. Tengase en cuenta que para controlar la actividad --  
de las fracciones obtenidas, en cada etapa de los procesos  
de purificación es necesario sacrificar del orden de 10 a  
15 ratones y emplear un tiempo mínimo de 48 horas. Esto ha  
limitado bastante, como queda dicho, el n<sup>o</sup> y diversidad de  
los procedimientos de purificación ensayados; pero no obs--  
tante, como se decía anteriormente los resultados obteni--  
dos concuerdan sustancialmente con los existentes en la bi  
liografía sobre purificación de TH cancerosa (NIXON y ZIN  
MAN, 1966).

Efectivamente, en la cromatografía por DEAE-celuloo  
sa la TH cruda, obtenida por el método empleado, dá lugar a  
una numerosa serie de fracciones proteínicas de las cuales  
como se muestra en la Tabla n<sup>o</sup> 6 solamente dos de ellas muess  
tran la actividad de TH. El espectro de fracciones proteí-

nicas obtenidas, así como, la localización de las fracciones activas es semejante al que se obtiene con TH cancerosa cuando se emplea el mismo tampón y el mismo gradiente de fuerza iónica <sup>que</sup> en el presente trabajo.

Igualmente son semejantes estos resultados a los obtenidos por OLIVARES (1970) con TH de levaduras extraída por el método de YUNOKI y GRIFFIN (1960) lo que nos indica que independientemente, de que existan, como veremos otras diferencias, el producto extraído por uno u otro -- procedimiento tiene básicamente la misma composición química. Probablemente, la única diferencia en relación con la TH obtenida por uno u otro procedimiento es el tamaño molecular, cosa lógica, ya que al ser mucho más drástico el procedimiento de extracción de YUNOKI y GRIFFIN (1960), extracción acética, la molécula original debe fraccionarse como confirma el hecho, de que, en contra de lo que se -- muestra en la Figura nº 2 y la Tabla nº 5 en la que se exponen los resultados obtenidos en experiencias por filtración en Sephadex G-25, cuando éste mismo método se aplica a TH obtenida por extracción acética (BLESA, 1968) el pico que muestra actividad de TH se eluye en último lugar -- y no en el primero como ocurre en nuestro caso.

La aplicación de la técnica de isoelectroenfoque - a la purificación de las preparaciones con actividad de TH, ha sido una novedad, ya que, éste método no se encuentra - descrito en la bibliografía para el estudio de la TH cancerosa. El poder de resolución de éste sistema en la separación de proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI) permite, tanto analítica como preparativamente, fraccionar con gran rendimiento una mezcla tan compleja como las mencionadas preparaciones.

Los resultados obtenidos, cuando se ha utilizado - un gradiente de pH entre 3-10, mostraron que la actividad de TH correspondía a la fracción correspondiente a un pH - entre 3 y 6 (Tabla nº 7).

El fraccionamiento ideal, o mejor dicho, el vaciado de la columna, donde se ha realizado el electroenfoque, debe de realizarse recogiendo fracciones de como máximo 1 ml cada una. Sin embargo, ésta minimización de la muestra sólo es aplicable cuando se dispone de un método de valoración suficientemente sensible, desgraciadamente como se ha tenido ocasión de apreciar a lo largo de ésta Memoria, se está todavía lejos de conseguir para la determinación de la actividad de TH. Es por ello estrictamente necesario reunir las fracciones recogidas de la columna en lotes para que -

cada uno cuenta con sustancia activa suficiente para dar -  
unos ensayos positivos con la suficiente significación. El  
criterio seguido para la recogida de fracciones ha sido, -  
bien repartir la columna, unos 120 ml, en tres partes (pH  
3-6, 6-8, y 8-10), caso de preparaciones poco purificadas,  
o bien, si la muestra colocada presenta un grado de purifica  
ción relativamente alto, recoger las fracciones de acuer  
do con el registro paralelo que se realiza a 280 nm.

Conocido el pI aproximado de la, o las, sustancias  
activas, la realización de un segundo electroenfoque entre  
un gradiente de pH más reducido, 3-7, permite una separación  
más eficaz de las proteínas existentes y como resultado se  
han obtenido 2 fracciones activas que corresponden a los -  
puntos isoeléctricos 3.4 y 4.5 aproximadamente (Figura nº5,  
Tabla nº 8).

Después del paso por Sephadex G-25, DEAE-celulosa  
y aplicación del electroenfoque en dos etapas, se cuenta -  
con dos muestras activas que se han considerado de suficiente  
pureza para someterlas al estudio de su composición quími  
ca.

La composición cualitativa y cuantitativa de aminoá  
cidos, es prácticamente semejante según se deduce de la -  
observación de las tablas nº 9 y 10. Sin embargo, el conteni



nido de ácido aspártico y ácido glutámico es ligeramente más alto en la fracción primera, Figura nº 7, muestra que el contenido en amoniaco es algo más alto en la fracción segunda, de punto isoeléctrico más alto, Figura nº 8, como corresponde a la presencia de parte de éstos aminoácidos en forma de asparragina y glutamina, que por acción de la hidrólisis pasan a ácido aspártico y ácido glutámico respectivamente.

Al comparar éstos resultados con los obtenidos por YUNOKI y GRIFFIN (1961) para la TH cancerosa, (Tabla nº 6: III, página 249 del libro "Biochemistry of the Cancer Cell". Harris Busch, Academic Press, New York, London, 1962), se aprecia que cualitativamente, la composición de aminoácidos de la TH cancerosa y de las dos fracciones correspondientes a las preparaciones de levadura, es igual salvo la excepción de la pequeña cantidad de histidina presente en las procedentes de levaduras. Como dato curioso en ningún caso se observa la presencia de hidroxiprolina.

Cuantitativamente, sólo cabe hablar de semejanza aproximada o de coincidencia en algunos aspectos: elevada cantidad de ácido aspártico y ácido glutámico, niveles intermedios de alanina, glicocola, prolina, treonina, etc., y un bajo contenido en metionina.

Posiblemente, un grado de purificación mayor, difícil de conseguir sin pérdida de actividad, permita disminuir las diferencias encontradas entre las TH de ambos orígenes. Sin embargo, no es el primer caso en la Ciencia de que dos proteínas de la misma acción biológica se manifieste cuali y cuantitativamente diferentes en cuanto a su composición química se refiere.

De lo expuesto, claramente se deduce la existencia en las preparaciones con actividad de TH aisladas por extracción acuosa y precipitación alcohólica de levaduras "petite", de dos fracciones activas, hecho no referido para la TH cancerosa.

La ausencia de actividad "in vitro", o sea, la incapacidad de éstos factores de inhibir la actividad catalásica de homogeneizados de hígado de ratón, es índice de que la acción biológica de los preparados con actividad de TH estriba en un mecanismo más complicado que pudiera localizarse a nivel de la síntesis del enzima.

TANFORD y LOVRIEN (1962), FEINSTEIN y PERAINO (1970), HOLMES y MASTERS (1970), HOLMES (1972), JONES y MASTERS (1972), ponen de manifiesto una gran heterogeneidad de la catalasa en hígado de ratas y ratones por separación cromatográfica o electroforéticas sobre distintos soportes.

OLIVARES et al., aplicando la técnica de electroenfoque, previamente utilizada por FEINSTEIN y PERAINO (1970), encuentran cinco formas enzimáticas en hígado de ratones macho correspondientes a los puntos isoeléctricos 5.0, 6.2, 6.7, 7.2 y 8.0 (Figura nº 9), así como la distinta presencia de cada una de ellas en diferentes preparaciones subcelulares. Concretamente la forma correspondiente a pI 6.2 se encuentra exclusivamente en mitocondrias (Figura nº 11), mientras que las otras son mayoritarias en el sobrenadante libre de tales organulos. Según HOLMES et al. (1970), no se puede hablar de isoenzimas, enzimas con distinto origen cromosómico, sino de formas enzimáticas derivadas por modificación epigénica de la primera forma existente que podría ser la correspondiente al pI 6.2.

En hembras, con una actividad absoluta menor de catalasa hepática (Tabla nº 11), se observa un menor contenido en la forma correspondiente a pI 6.2, mientras que se conserva prácticamente la misma diversidad cualitativa, esto es, hay una distribución de las formas de éste enzima propia de cada sexo, confirmandose en forma más amplia la indicación de HOLMES (1971).

Se ha observado que cuando se inyectan preparaciones de TH, la depresión de la catalasa hepática se manifiesta

ta por una desaparición en los isoelectroforegramas de parte de la forma de pI 6.2, hecho que ocurre tanto en machos como en hembras (Figura nº 10 y Figura nº 13).

Se deduce claramente que la actividad de los factores con actividad de TH<sub>2</sub> se dirige directamente, por mecanismo aún desconocido sobre la síntesis de catalasa y no sobre la expresión de su actividad y ni siquiera sobre la transformación epigénica indicada por HOLMES (1970) pues se encuentran las demás formas enzimáticas a su nivel normal.

C O N C L U S I O N E S

## C O N C L U S I O N E S

- 1º) Las preparaciones con actividad de TH aislada de levadura con deficiencia respiratoria actúan de modo similar a la TH cancerosa sobre el hierro plasmático en ratones.
- 2º) El comportamiento de la TH de levaduras en los procesos de purificación empleados es idéntico al descrito para la TH cancerosa.
- 3º) Han sido encontradas en los factores aislados de levadura dos fracciones activas diferenciadas por su punto isoeléctrico. En la bibliografía no aparece mención alguna de éste tipo referente a TH cancerosa.
- 4º) El estudio químico comparativo, cuali y cuantitativo, entre las dos fracciones encontradas, muestra sólo ligeras diferencias que explican su comportamiento en gradiente de punto isoeléctrico.

- 5º) La composición química de la TH de levaduras es muy similar, aunque no idéntica a la TH cancerosa, destacando como puntos de coincidencia la ausencia en ambas de hidroxiprolina, el alto contenido en ácido glutámico y ácido aspártico y el bajo contenido en metionina.
- 6º) La TH de levaduras inhibe selectivamente la biosíntesis de la catalasa de pI 6.2; correspondiente a la componente mitocondrial de la catalasa.
- 7º) El efecto de la TH de levadura es menor sobre ratones hembras, debido a que en éstas la componente de la catalasa de pI 6.2 se encuentra en menor proporción que en ratones machos.

B I B L I O G R A F I A



B I B L I O G R A F I A

- AKIKAWA, K., 1967.- "Fractionation of toxohormone-like -- principle in urine extract from patients with carcinoma". *Sap. Med. J.* 32, 160-173.
- APPLEMAN, D., SKAVINSKI, E.R., STEIN, A.M., 1950.- "Catalase studies on normal and cancerous rats". *Cancer Res.* 10, 498-505.
- BABIN, R., BIRABEN, J., DELMON, G., 1960.- "The precipitation of some cations by tumoral toxohormones". *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 99, 10-12.
- BEGG, R.W., DICKINSON, T.E., MILLER, J., 1953.- "The effect of benign and malignant tumors on liver catalase activity". *Can. J. Med. Scien.* 31, 315-319.
- BEGG, R.W., DICKINSON, T.E., WHITE, A., 1953.- "The influence of some hormonal, dietary, and tumor factors on liver catalase activity in rats". *Can. J. Med. Scien.* 31, 307-314.
- BEGG, R.W., REYNOLDS, E.F., 1950.- "Effect of adrenalectomy on liver catalase activity in the rat.". *Science* 111, 721-722.

- BERGEL, F., 1961.- "Chemistry of enzymes in cancer". Charles C. Thomas. Publisher.
- BIRABEN, J., DELMON, G., 1957.- "Action of toxohormone on hepatic arginase of the mouse"; Compt. Rend. Soc. Biol. 151, 1875-76.
- BIRABEN, J., DELMON, G. 1960.- "Experimental anatomic-pathologic study of toxohormone extracted from the myelosarcoma T58 of Oberling and Guerin on the lymphoid ganglions of the rat". Compt. Rend. Soc. Biol. 154, 594-6.
- BLATTNY, C., BLATTNA, J., MILLIKAN, D.F.- 1969.- "Modification in the LOWRY protein test for greater accuracy in estimating plant leaf proteins". Tran, Missouri Ac. Scien. 3, 59-61.
- BLESA, M.C., 1968.- "Neutralización de Toxohormona por extractos de levadura de panadería". Tesis Doctoral. Farm. Univ. Granada.
- BLUMENTHAL, F., BRAHN, B., 1910.- "Die katalasewirkung in normaler und in carcimatoser Leber". Z. Krebsforsch. 8, 436-440.
- BONNICHSEN, R.K., CHANCE, B., THEORELL, H., 1947.- "Catalase activity". Acta Chem. Scan. 1, 685-709.

- BROWN, E., 1959.- "The "in vitro" inhibition of hepatic catalase by boiled aqueous extracts from a human carcinoma of the stomach and from human non malignant stomach epithelium". Arch. Biochem. Biophys. 82, - 335-339.
- BUSCH, H., 1962.- "An introduction to the Biochemistry of the cancer cell". Academic Press. New York-London.
- BYON HO CHIN, KIM JUNG YOUN., 1962.- "Influence of toxohorumone on gastric secretion". J. Korea Surg. Soc. 4, 449.
- CALLAO, V., MONTOYA, E., 1960.- "Actividad catalásica de -mutantes de S. cerevisiae con deficiencia respiratoria". Laboratorio 31, 101.
- CALLAO, V., MONTOYA, E., 1961.- "Toxohormone-like factor from microorganism with impaired respiration". -- Science 134, 2041-42.
- CALLAO, V., OLIVARES, J., MONTOYA, E., 1963.- "Toxohormone inhibitory effect on the growth of an unstable strain of yeast". Science 142, 1668-69.
- CALLAO, V., OLIVARES, J., MONTOYA, E., 1963.- "Factores -- que afectan a la producción de TH por microorganismos". Microb. Esp. 16, 92-95.

- CERIOTTI, G., SPANDRIO, L., 1955.- "On the "in vitro" antitatalase activity of tumor extracts". Biochem. - Biophys. 18, 303-304.
- CERIOTTI, G., SPANDRIO, L., BERTI, E., 1957.- "On the "in vitro inhibition of catalase by aminoacids". Biochem of Biophys. 23, 362-366.
- COSTA, V., BLESA, M.C., OLIVARES, J., MONTOYA, E., 1971.- "Efectos del bromuro de ethidio sobre la producción de factores con actividad de TH por S. cerevisiae". Cuad. C. Biol. 2, 59-61.
- DADIDOVA, S., SHAPOT, V.S., DROZDOVA, G.A., 1970.- "On the heterogeneity on catalase in rat liver and experimental hepatomas of rats and mice". Biochem. Biophys. 220, 206-212.
- DAY, E., GABRIELSON, E.C., LIPKIND, J.B., 1954.- "Depressions in the activity of liver catalase in mice - injected with homogenates of normal spleen". J.Nat. Cancer Inst. 15, 239-252.
- DEUTSCH, H.F., GUSTAFSON, T., 1952.- "The changes in catalase and cytochrome oxidase activity in developing sea urching eggs". Arkiv. Kemi. 4, 221-231.

- DI RE, F., MASCITELLI-CORIANCOLLI, E., 1961.- "Anemia-inducing action of toxohormone". Atti. Accad. Med. Lombarda 16, 359-61.
- DI RE, F., MASTICELLI-CORIANCOLLI, E., 1962.- "Effect of toxohormone on cytochrome c in rat tissues". Atti. Accad. Med. Lombarda 17, 453-56.
- DI RE, F., MASTICELLI-CORIANCOLLI, E., 1962.- "Mitochondrial localization of toxohormone activity". Atti. Accad. Med. Lombarda 17, 275-78.
- DOUNCE, A.L., SHARWISSE, R.P., 1950.- "Liver catalase of - tumor-bearing and leprous rats". Cancer 10, 103-107.
- ENDO, H., 1954.- "Studies on nucleic acid in the TH concentrates". Gann. 45, 124.
- ENDO, H., SUGIMURA, T., ONO, T., KONNO, K., 1955.- "Catalase-depressing factors: TH and kochsaft factor". - Gann. 46, 51-56.
- FEINSTEIN, R.N., BERLINER, S., GREEN, F.O., 1958.- "Mechanism of inhibitions of catalase by 3-amino-1, 2, 4-triazole". Arch. Biochem. Biophys. 76, 32-44.
- FEINSTEIN, R.N., BUTLER, C.L., HENDLEY, D., 1950.- "Effect of Whole body X-radiation and of intraperitoneal -- hydrogen peroxide on mouse liver catalase". Science 111, 149-150.

- FEINSTEIN, R.N., PERAINO, C., 1970.- "Separation of soluble and particulate mouse liver catalase by isoelectric focusing". Biochim. Biophys. Acta, 214, 230-232.
- FUJII, S., and MIZUNO, T., 1954.- "The effect of ferritin on rat-liver catalase activity in the course of experimental protection of liver cancer". J. Vac. Scien. Univ. Tokyo, 7, 41-44.
- FUJII, S., KAWACHI, T., OKUDA, H., HAGA, B., YAMAMURA, Y. 1960.- "The isolation of a basic protein having TH activity from tumor tissues". Gann, 51, 223.
- FUJITA, K., 1954.- "Properties of a polysaccharide in chicken sarcoma". Nagoya J. Med. Scien. 17, 98-101.
- FUKUDA, M., OKADA, K., AKIKAWA, K., MATSUDA, M., URUSHIZAKI, I., 1966.- "Comparative studies on the biological effect of TH and bacterial lipopolysaccharide". Gann, 57, 27-36.
- FUKUOKA, F., NAKAHARA, W., 1951.- "Mode of action of TH.- A third study of TH; a characteristic toxic substance produced by cancer tissue". Gann, 42, 55-67.

- FUKUOKA, F., NAKAHARA, W., 1953.- " V. Amino acid and toxo  
hormone synthesis". Gann, 44, 1-11.
- FUKUOKA, F., NAKAHARA, W., 1952.- " TH, a characteristic -  
toxic substance produced by cancer tissue. IV. TH  
and thymus involution in tumor-bearing animals".  
Gann, 43, 55-63.
- GAUSE, G.F., 1967.- " Microbial models of cancer cells". -  
North-Holland Publishers. I.
- GILLETTE, R.W., FINDLEY, A., CONWAY, H., 1963.- " Effect -  
on tumor homografts of treating hosts with antipro  
teolytic enzyme compounds". Proc. Soc. Exptl. Biol.  
Med. 112, 964-66.
- GOODLAD, G.A., RAIMOD, M.J., 1973.- "Action of the walker  
256 carcinoma and toxohormone on aminoacid incor-  
poration into diaphragm protein". Eur. J. Cancer.  
9, 139-45.
- GREENFIELD, R.E., GODREY, J.E., PRICE, V.E., 1958.- "Stu--  
dies on the anemia of tumor-bearing animals. I. -  
Distribution of radioiron following the injection  
of labeled erythrocytes". J. Nat. Cancer Inst. 21,  
641.

- GREENFIELD, R.E., MEISTER, A., 1950-51.- "Effect of injections of tumor fraction on liver catalase activity of mice". J. Nat. Cancer Inst., 11, 997-1005.
- GREENSTEIN, J.P., 1942-43.- "Further studies of the liver catalase activity of tumor bearing animals". J. Nat. Cancer Inst., 3, 397-404.
- GREENSTEIN, J.P., 1952.- "Effect of cancer on liver enzymes". J. A. M. A. 148, 697.
- GREENSTEIN, J.P., 1954.- "Biochemistry of cancer". New York Academic Press. Pág. 316-366.
- GREENSTEIN, J.P., 1955.- "The "in vivo" effect on liver catalase by a tumor". J. Nat. Cancer Inst. 15, 1603-1605.
- GREENSTEIN, J.P., ANDERVONT, H.B., 1941-42.- "The liver catalase activity of tumor-bearing mice and the effect of spontaneous repression and of removal of certain tumors". J. Nat. Cancer Inst. 2, 345-355.
- GREENSTEIN, J.P., ANDERVONT, H.B., 1943.- "Notes on the liver catalase activity of pregnant mice and of mice bearing growing embryonic implants". J. Nat. Cancer Inst. 4, 283-284.
- GREENSTEIN, J.P., ANDERVONT, H.B., THOPSON, J.W., 1942-43.- "Kidney and blood catalase activity of tumor-bearing animals". J. Nat. Cancer Inst. 2, 589-594.
- GREENSTEIN, J.P., JENRETTE, W.V., WHITE, J., 1941-42.- "The liver catalase activity of tumor-bearing rats and the effect of extirpation of the tumors". J. Nat. Cancer Inst. 2, 283-291.



- GREENSTEIN, J.P., JENRETTE, W.V., WHITE, J., 1941-42.- --  
"The relative activity of xanthine deshydrogenase, catalase, and amylase in normal and cancerous hepatic tissues of the rat". J. Nat. Cancer Inst. 2, 345-355.
- HANAOKA, A., 1959.- "Anemia in rabbits produced by toxohormone". Okayama Igakkai Zasshi, 71, 3197-3207.
- HARGREAVES, A.B., DEUTSCH, H.F., 1952.- "The "in vitro" inhibition of catalase by a tumor factor". Cancer Research, 12, 720-726.
- HARGREAVES, A.B., LOBO, L.C.G., LEMME, C.C., HASSON, A., - 1959.- "In vitro and "in vivo" inhibition of catalase by uric acid and other nucleic acid catabolites". Cancer Research, 19, 468-471.
- HEIM, W.G., APPLEMAN, D., PYFROM, H.P., 1955.- "Production of catalase changes in animals with 3-amino-1,2,4-triazole". Science, 122, 693.
- HIRAI, H., DEUTSCH, H.F., 1958.- "The effect of some cystine derivatives on catalase activity". Cancer Research, 18, 283-288.

- HOGEBROOM, G.W., 1955.- "Fractionation of cell components of animal tissues". Methods in Enzymology. Colowick and Kaplan, Academic Press Publishers. Vol. I. Pág. 16.
- HOLMES, R.S., 1971.- "Ontogeny of mouse liver peroxisomes and catalase isozymes". Nature, 232, 218-219.
- HOLMES, R.S., 1972.- "Catalase multiplicity in normal and acatalasemic mice". Febs Letters, 24, 2.
- HOLMES, R.S., MASTERS, C., 1970.- "Epigenetic interconverters of multiple forms of mouse liver catalase". Febs Letters, 11, 1, 45-48.
- HOSHIZIMA, H., 1957.- "Studies on the mechanism of TH function". Gann, 48; 239-242.
- HOZUMI, M., MATSUOKA, K., SUGIMURA, T., 1967.- "Immunochemical studies on the liver catalase depression by TH". Gann, 58, 555-563.
- HOZUMI, M., SUGIMURA, T., FUKUOKA, F., NAKAHARA, W., 1963.- "Quantitative studies on the fractionation of carcinostatic liver factor". Gann, 54, 281-288.
- HOZUMI, M., OASHI, M., 1961.- "Effect of TH on iron-protoporphyrin chelating enzyme of liver". Gann, 52, 327-335.

- IIJIMA, N., 1957.- "Cancer and trace metals". Sôgô Rinshô.  
6, 1484-1496.
- IIJIMA, N., MATSUURA, K., FUJITA, Y., 1956.- "Iron metabolism in gastric cancer". Japan J. Cancer Clinics.  
2, 113.
- JONES, G.L., MASTERS, C.J., 1972.- "On the differential inhibition of the multiple forms of catalase in mouse tissue". Febs Letters, 21, n° 2.
- KAMPSCHMIDT, R.F., 1965.- "Mechanism of liver catalase depression in tumor-bearing animals: a review". Cancer Research, 25, 34-35.
- KAMPSCHMIDT, R.F., 1970.- "Biochemical effect of tumor growth on the host toxohormone". Oncol. Proc. Int. Cancer Congr. 10th. 3, 164-170.
- KAMPSCHMIDT, R.F., ADAMS, M.E., McCOY, T.A., 1959.- "Some systemic effects of TH". Cancer Research, 19, 236-239.
- KAMPSCHMIDT, R.F., SCHULTZ, C.L.A., 1961.- "Hypoferrenia - in rats following injection of bacterial endotoxin". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106, 870-871.

- KAMPSCHMIDT, R.F., SCHULTZ, C.L.A., MCKINZIE, P., 1962.- -'  
"Effect of lipopolysaccharides derived from bacteria on tumor tissues on liver catalase activity, plasma iron concentration, and organ weights". J. Nat. Cancer Insts. 28, 845-851.
- KAMPSCHMIDT, R.F., SCHULTZ, C.L.A., 1963.- "Absence of TH in rat tumors free of bacterial contamination". - Cancer Research. 23, 751-755.
- KAMPSCHMIDT, R.F., SCHULTZ, C.L.A., 1968.- "Toxohormone". - P.S.E.B.M., 127, 632-635.
- KAMPSCHMIDT, R.F., MCCOY, T.A., 1960.- "Effect of tumor cell fractions upon plasma iron, liver catalase and organ weights of rats". P.S.E.B.M., 103, 869-871.
- KAMPSCHMIDT, R.F., UPCHURCH, H.F., 1962.- "Effects of bacteria endotoxin on plasma iron". P.S.E.B.M., 110, 191-193.
- KAMPSCHMIDT, R.F., UPCHURCH, H.F., 1963.- "Effect of bacterial contamination of the tumor on tumor-host relationship". Cancer Research 23, 756-761.
- KAWADA, N., HOSOYA, N., 1959.- "Influence of estradiol and toxohormone on the oxidation of fatty acids". Sei kagaku. 31, 734-738.

- KAWASAKI, H., 1958.- "Biochemical studies on carbohydrates. CCXV. Chemical nature of toxohormone (Nakahara) I y II". Tohoku J. Exp. Med. 68, 119-132.
- KIYOTA, O.U., KUNIHIRO, M., JUNZO, I., YASUMAS, A., TOSHIO, K., 1958.- "Liver catalase activity of patients - with gastric cancer". Tohoku J. Exp. Med. 67, 159-161.
- LINDEGREN, C.C., OGUR, N., PITTMAN, D., LINDEGREN, D., -- 1957.- "Respiratory competence in the diagnosis - of gene-controlled phenotypes in Saccharomyces". - Science, 126, 398-399.
- LINDEGREN, C.C., NAGAI, S., NAGAI, H., 1958.- "Induction - of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel". Nature, 182, 446.
- LINDEGREN, C.C., 1956.- "Mutations and other variations in microorganisms". Compt. Rend. Trav. Lab. Carls--- berg., 26, 256-271.
- LOWRY, O.H., ROSEMBROUGH, N.H., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951.- "Protein measurement with de Folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193, 225-272.

LUCKE, D., BERWICK, H., 1954.- "Catalase activity of liver and kidney in frogs with spontaneous carcinoma". J. Exp. Med., 100, 125-133.

MASAMME, H., ABE, S., HAKOMORI, S., et al., 1958.- "Toxohormones without KIK-potency from urines, cancerous and normal". Tohoku J. Exp. Med., 67, 334.

MASAMME, H., HAKOMORI, S., KAKETA, H., SINOHARA, H., ABE, S., 1958.- "Chemical nature of toxohormone (Nakahara). KIK in active toxohormones from urines, cancerous and normal". Tohoku J. Exp. Med., 68, 63-73.

MASAMME, H., KAKETA, H., ABE, S., 1957.- "KIK factor from cancerous urine and the corresponding fraction of normal urine as Nakahara toxohormones-preliminary note". Tohoku J. Exp. Med., 67, 42.

MASAMME, H., KAKETA, H., ABE, S., 1958.- "Chemical nature of TH. (Nakahara) KIK factor (V) from cancerous urine and the corresponding component of normal urine which acts as a TH". Tohoku J. Exp. Med., 67, 329-333.

MASAMME, H., KAKETA, H., ABE, S., 1958.- "Chemical nature of TH. (Nakahara) KIK in active toxohormones from urine of cancer patients with original tumor in different organs". Tohoku J. Exp. Med., 68, 321-324.

- MASAMME, H., KAMIYAMA, S., ABE, S., 1959.- "Chemical nature of Toxohormone (Nakahara). Toxohormones APII<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>, III<sub>3</sub> and IV<sub>3</sub> from cancerous ascitic fluids". Tohoku J. Exp. Med., 69, 257-263.
- MASAMME, H., SINOHARA, H., ABE, S., KAKETA, H., 1958.- "Chemical nature of toxohormone (Nakahara). The group mucopolysaccharide from pig stomach mucus acts as a weak toxohormone". Tohoku J. Exp. Med. 69, 53-57.
- MASAMME, H., TSUIKI, S., 1957.- "Biochemistry of toxohormone". Sôgô Rinshô., 6, 1166.
- MASAMME, H., TSUIKI, S., KAMIYAMA, S., et al., 1957.- "Toxohormone from cancerous ascitic fluid-preliminary note". Tohoku J. Exp. Med., 67, 10.
- MASAMME, H., TSUIKI, S., KAMIYAMA, S., et al., 1958.- "Chemical nature of TH. (Nakahara). A globulin-like - TH from cancerous ascitic fluid (A.P.I.)". Tohoku J. Exp. Med., 67, 309-318.
- MASAMME, H., TSUIKI, S., HAGA, M., et al., 1958.- "Chemical nature of toxohormone. (Nakahara). Globulin-like toxohormone from cancerous ascitic fluid". Tohoku J. Exp. Med., 67, 319-328.

- MASTICELLI-CORIANCOLLI, E., DI RE, F., 1961.- "Effect of -  
toxohormone on the biosynthesis of adrenal corti-  
costeroids". Atti. Accad. Med. Lombarda. 16, 355-  
359.
- MASON, E.E., CHIN, T., LI, Y. W., ZIFFREN, S.E., 1960.- -  
"Cancer and human liver catalase". Cancer Research  
20, 1474-1481.
- MATSUMOTO, G., 1958.- "Influence of cancer toxin on succi-  
nic dehydrogenase activity of rat tissue. I, II y  
III". Okayama Igakki Zasshi, 60, 1693-1700.
- MATSUOKA, K., HOZUMI, M., et al., 1964.- "Tumor toxohormone  
unrelated to bacterial contamination". Gann, 55,  
411-421.
- MIFUCHI, I., HOSOI, M., YANAGIHARA, Y., NISHIDA, M., 1963.-  
"Studies on toxohormone-like substances in the res-  
piration-deficient mutant of Saccharomyces cerevi-  
siae". Gann, 54, 205-211.
- MIFUCHI, I., MORITA, T., YANOHIRA, Y., HOSOI, M., NISHIDA,  
M., 1963.- "Induction of respiration-deficient mu-  
tant of Saccharomyces cerevisiae by carcinogenic  
agents, 4-nitroquinoline-N-oxide, and the existen-  
ce of TH-like factor in the mutant". J. Microbiol.  
7, 69-79.



- MONTOYA, E., 1961.- "Actividad catalásica de mutantes de -  
E. coli, staphylococcus aureus con deficiencia res-  
piratoria". Microbiol. Españ., 14, 65.
- NAKAGAWA, S., 1952.- "Liver catalase reducing substance in  
the urine of cancer patients". Proc. Japan Acad. -  
28, 305-310.
- NAKAGAWA, S., KOSIGE, T., TOKUNAKA, H., 1955.- "Purifica--  
tion of the liver catalase-reducing substance occu-  
rring in cancer tissues with special reference to  
its activity". Gann, 46, 585-596.
- NAKAHARA, W., 1960.- "A chemical basis for tumor-host rela-  
tions"; J. Natl. Cancer Inst., 24, 77-86.
- NAKAHARA, W., 1968.- "Some reflection on toxohormone stu--  
dies". Nucleic Acids, Proteins and Cancer. 77-84.
- NAKAHARA, W., 1970.- "Chemical tumor problem". Japanese So-  
ciety for promotion of Science, Published.
- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1948.- "A toxic cancer tissue -  
constituent as evidenced by its effect on liver ca-  
talase activity". Japan Med. J., 1, 271-277.
- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1949.- "Toxohormone. A characte-  
ristic toxic substance produced by cancer tissue".  
Gann, 40, 45-69.

- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1950.- "Purification of toxic hormone. A second study on TH, a characteristic toxic substance produced by cancer tissues". Gann, 41, 47-55.
- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1954.- "Dialyzable form of TH. A sixth study of toxohormone, a characteristic toxic substance produced by cancer tissue". Gann, 45, 67-75.
- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1954.- "Biosynthesis of toxormone. A seventh study on toxohormone". Gann, 45, 77-85.
- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1954.- "Progress in the study of toxohormone". Sôgô Igaku. 11, 289-294.
- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1958.- "TH, a toxic humoral factor originating from cancer tissue". 7<sup>o</sup> Congr. Int. Cancer London. 15, 858.
- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1958.- "The newer concept of cancer toxin". Advances in Cancer Research. 5, 157-177.
- NAKAHARA, W., FUKUOKA, F., 1961.- "Chemistry of cancer toxin: toxohormone". Charles C. Thomas. Publisher. -- Springfield. Illinois. USA.

- NAKAHARA, W., HOZUMI, M., POLLARD, M., 1966.- "Isolation of TH from tumor tissues of germ-free mice". Society for Exp. Biol. Med. 123, 124-125.
- NAKAHARA, W., TANAKA, T., TOKUZEN, R., FUKUOKA, F., 1966.- "Toxohormone studies in autochthonous tumor-host system". Gann, 57, 621-626.
- NIXON, J.C., ZINMAN, B., 1966.- "Toxohormone in bacteria-free tumors". Can. J. Biochem. 44, 1069-1087.
- NOGUCHI, S., 1963.- "Nicotinamide methyltransferase activity in tumor-bearing rat liver". Osaka Daigaku Igaku Zasshi. 15, 307-310.
- NOGUCHI, S., NAKATA, Y., et al., 1964.- "Nicotinamide methyltransferase activity in the liver of tumor-bearing rat". Gann, 55, 387-396.
- OBARA, K., ONO, S., 1965.- "Effects of the toxohormone on the protein metabolims in the eye tissue". Yokohama Med. Bull. 16, 232-242.
- OHASHI, M., ONO, T., 1959.- "Purification of toxohormone by DEAE-cellulose column chromatography". Gann, 50, 347-357.

- OKAMURA, Y., 1962.- "Biochemical studies on the liver catalase-depressing factor of toxohormone". Kyushu J. Med. Scien. 13, 299-311.
- OKAMURA, Y., FUJII, S., KAWACHI, T., et al., 1962.- "Effect of enzymatic hidrolysis on TH activities". - Gann, 53, 365-370.
- OKUDA, H., HAGA, B., et al., 1963.- "Improved method for the estimation of catalase activity and its application to the study of toxohormone". Gann, 54, 85-92.
- OKUDA, H., IKEGAMI, H., FUJII, S., 1972.- "Purification of toxohormone". Gann, 63, 605-613.
- OKUSHIMA, D., 1952.- "Aminoacid composition of TH and non-heat coagulable serum fraction". Mitt. Med. Ges. Okayama. 56, 674.
- OLIVARES, J., CALLAO, V., MONTOYA, E., 1967.- "Toxohormone from normal tissue". Science, 157, 327-328.
- OLIVARES, J., COSTA, V., MONTOYA, E., 1973.- "Selective inhibitory effect of TH on mice hepatic catalase forms". Febs Letters, 36, 3.

- OLIVARES, J., 1970.- "Toxohormone problem". Oncol. Proc. Int. Cancer Congr. 10th. 3, 158-163.
- ONO, T., OHASHI, M., YAGO, N., 1960.- "The effect of TH - on iron metabolism". Gann, 51, 213.
- ONO, T., SUGIMURA, T., OHASHI, M., 1959.- "Effect of iron administration on free protoporphyrin levels in erythrocyte and liver of tumor bearing rats". Gann, 50, 185.
- ONO, T., SUGIMURA, T., UMEDA, M., 1955.- "Preparation of potent concentrates of toxohormone free from nucleic acid". Gann, 46, 617-630.
- ONO, T., UMEDA, M., SUGIMURA, T., 1957.- "Purification of toxohormone". Gann, 48, 91-100.
- PRICE, V.E., GREENFIELD, R.E., 1954.- "Liver catalase. II. Catalase fractions from normal and tumor bearing rats". J. Biol. Chem. 209, 363-376.
- PRICE, F.W., MIRAND, E.A., 1971.- "Further characterization of liver catalase-depressing factor from spleens of friend virus injected germ-free and conventional mice". J. Surgical Oncology. 3, n° 1.

- RALPH, F.K., THOMAS, A.M., 1960.- "Effect of tumor cell -  
fraction upon plasma iron, liver catalase and or-  
gan weights of rats". Proc. Soc. Exp. Biol. and -  
Med. 103, 869.
- ROSENTHAL, E., 1912.- "Untersuchungen über fermente in der  
leber und des blutes bei krebmäusen". Deut. Med.  
Wochemschr. 38, 2276.
- SATO, H., YUNOKI, K., 1951.- "Effect of cancer tissue ex-  
tracts on liver and spleen catalase". J. Kagoshi-  
ma Med. College. 3, 114.
- SATO, H., YUNOKI, K., HIGASHI, T., ARIMURO, C., 1965.- -  
"Biochemical changes peculiar to the gastric jui-  
ce of gastric cancer". Acta Med. Univ. Kagoshima.  
7, 63-71.
- SATO, H., YUNOKI, K., KAMIMURA, M., 1958.- "Studies on -  
the purification of cancer toxin". Acta Med. Univ.  
Kagoshima. 1, 60-71.
- SATO, H., et al., 1965.- "Effects of toxohormone on por--  
phyrin metabolism". Acta Med. Univ. Kagoshima. 7,  
73-82.

- SCHADE, A.L., OYAMA, J., REINHART, R.W., MILLER, J.R., --  
1954.- "Bound iron and unsaturated iron-binding  
capacity of serum; rapid and reliable quantitative  
determination". Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.  
87, 443.
- SHIBA, S., MATSUYOSHI, H., MIYATAKE, M., 1965.- "Tryptophan pyrrolase in the isolated perfused liver of a tumor bearing animal". Gann, 56, 121-126.
- SHIBA, S., TERAWAKI, A., TOMIYAMA, Y., 1963.- "Liver kynureninase activity of tumor-bearing animals". Biokin J. 6, 17-20.
- SKAVINSKI, E.R., STEIN, A.M., 1951.- "The effect of tumor implants on chick embryo liver catalase activity". Cancer Research, 11, 768-771.
- SUGIMURA, T., UMEDA, M., ONO, T., 1956.- "Erythrocyte porphyrin in blood of tumor-bearing animals". Gann, 47, 87-90.
- SUGIMURA, T., ONO, T., 1957.- "On the bacteriostatic action of some basic protein fraction obtained from neoplastic tissues". Gann, 48, 81.

- SUGIMURA, T., ONO, T., UMEDA, M., 1957.- "Distribution of radioactive, iron injected into tumor-bearing animals". Gann, 48, 159-168.
- SUGIMURA, T., HOZUMI, M., 1964.- "Toxohormone and its mode of action". Taisha, 1, 333-338.
- SUGIMURA, T., HOZUMI, M., MATSUOKA, K., 1968.- "Effect of toxohormone on synthesis of liver catalase". Symposium: Proteins and Protein Synthesis in Cancer Cells, págs. 85-91.
- TAKAHASHI, R., 1957.- "Biological activity of cancerous human urinary mucoid. Relation to toxohormone-like action of mucoid substances in cancer". Sapporo - Igaku Zasshi, 11, 373-384.
- TAMB, J., DELMON, G., BIRABEN, J., 1963.- "Induced hepatomas and toxohormone in the rat". Compt. Rend. Soc. Biol. 157, 1268-1269.
- TANFORD, C., LOVRIEN, R., 1962.- "Disociation of catalase into subunits". J. Amer. Chem. Soc. 84, 1892.
- UENOYAMA, K., ONO, T., 1973.- "Post-transcriptional regulation of catalase synthesis in rat liver and hepatoma : factors activating and inhibiting catalase synthesis". J. Mol. Biol. 74, 439-451.



- UENOYAMA, K., ONO, T., 1973.- "Post-transcriptional regulations of catalase synthesis in rat liver and hepatoma: binding of inhibiting factor (s) with polyribosomes synthesizing catalase". J. Mol. Biol. 74, 453-466.
- URUSHIZAKI, I., FUKUDA, M., et al., 1966.- "Studies on ferrokinetics in tumor-bearers". Tumor Res. 3, 203-216.
- URUSHIZAKI, I., MATSUDA, M., et al., 1967.- "Studies on hepatic ferritin in tumor-bearing rats". Tumor Res. 2, 211-227.
- URUSHIZAKI, I., FUKUDA, M., IBAYASHI, J., et al., 1967.- "Studies on ferrokinetics in tumor-bearers. 3. Effect of toxohormone upon ferrokinetics in rats". Tumor Res. 2, 91-106.
- URUSHIZAKI, I., FUKUDA, M., WATANABE, N., 1967.- "Studies on iron absorption in tumor-bearers". Recent Advances in Gastroenterology. 2, 405-408.
- URUSHIZAKI, I., 1970.- "Biochemical effect of tumor growth on the host. Tumor cell products causing systemic effects on the host". Onc. Proc. Int. Cancer Congr. 10th. 3, 170-175.

UTSUGI, K., 1960.- "Influence of hypophyseal factor on liver catalase in normal and tumor-bearing rats". - Gann, 51, 17.

VON EULER, H., JOSEPHSON, K., 1927.- "Catalase I". Ann. - Chem. 452, 158-181.

VON EULER, H., HELLER, L., 1949.- "Katalaseaktivität in leber-fraktionen normaler und sarcomtragender raten". Z. Krebsforsch. 56, 393.

VON EULER, H., 1952.- "Resistenz und immunität gegen tumoren". Arkiv. Kemi. 4, 298.

WARAVDEKAR, V.S., POWERS, O.H., 1957.- "Reduction on synthesis of DPN in tissues from mice bearing transplanted tumors". J. Nat. Cancer Inst. 18, 145-152.

WARBURG, O., 1956.- "On the origin of cancer cells". Science, 123, 309.

WATANABE, N., 1967.- "Studies on the anemia in tumor-bearers. 4. Iron absorption in rats bearing Yoshida sarcoma and treated by toxohormone". Sapporo Med. J. 31, - 79-96.

WATANABE, T., 1969.- "The antitumor action of bacterial extract". Jap. J. Exp. Med. 39, 631-647.

WEIL-MALHERBE, W., SCHADE, R., 1948.- "Studies on the liver catalase of normal and cancerous rats". Biochem. J. 43, 118-125.

YAMAMURA, Y., KAWACHI, T., FUJII, S., 1965.- "Liver tryptophan pyrrolase in tumor-bearing animals". Act. Un. Inter. contra Cancer. 20, 958-960.

YAMAMURA, Y., 1964.- "Cachexia due to cancer". Taisha, 1, 328-332.

YUNOKI, K., GRIFFIN, A.C., 1960.- "Purification of toxohormone by column chromatography". Cancer Research. 20, 533-540.

YUNOKI, K., GRIFFIN, A.C., 1961.- "Composition and properties of a highly purified TH preparation". Cancer Research, 21, 537-544.

> DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de  
fecha, constituido por:

- D. Ruiz de Montoya J. J.
- D. Luis Rueda Martínez
- D. José María Macarrulla Crespo
- D. José Olayo Páez
- D. Fernán Sánchez de Medina Corberán

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don  
Sebastián González Lama  
de acuerdo por unánime otorgar la califica-  
ción de abysaliente Cum Laude  
y para que conste, se extiende firmada por los  
componentes del Tribunal, la presente diligen-  
cia.

Granada, 15 de Ago de 1977  
El Secretario,

El Presidente,  
F. Montoya

El Vocal,  
J. Macarrulla

El Vocal,  
J. Olayo

El Vocal,  
F. Sánchez

