

D. C. de Sabbatini, G. N. de Nuñez y A. E. A. Mitta (1)

C. N. E. A. Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
Nº 1	AÑO 1975

preparación de hormona folículoestimulante ¹²⁵I (2, 3)

Resumen

Se describe la marcación con radioiodo, purificación de FSH humana de origen pituitario y la selección de parámetros para la utilización en nuestro medio de la técnica radioinmunológica para dosaje de FSH en suero humano.

Preparation of ¹²⁵I FSH hormone

Summary

Labelling of human FSH of pituitary origin with ¹²⁵I and its purification are described. Suitable parameters are selected for the use of radioimmunologic technique for FSH dosage in human serum.

Introducción

En los últimos años, debido al gran desarrollo de las técnicas in vitro para la valoración de hormonas en líquidos biológicos surgió la necesidad de obtener los reactivos apropiados para dicho ensayo.

Gran número de investigaciones colaboraron en la descripción de la técnica de radioinmunoensayo para FSH (1-7).

Gracias a este ensayo, fue posible la medida de muy pequeñas cantidades de FSH en suero y orina, con sensibilidad y rapidez, pudiéndose establecer correlaciones entre los resultados provenientes del bioensayo y radioinmunoensayo (8) y posibilitando investigaciones en el campo de la endocrinología y ginecología.

(1) Departamento de Radioisótopos, Área de Radioisótopos y Radiaciones. Comisión Nacional de Energía Atómica. Avda. Libertador 8250. Buenos Aires, Argentina.

(2) Recibida Enero 2 de 1975. Aceptada Abril 30, 1975.

(3) Se agradece a los Dres. J. C. Cresto, I. Dujovne y C. F. Kropf del laboratorio de Investigaciones de la Unidad de Endocrinología del Hospital P. Elizalde sus sugerencias y discusión del presente trabajo.

La División Radiofármacos y Productos Especiales del Area de Radioisótopos y Radiaciones ha desarrollado las técnicas de marcación y control de Insulina (9-10), Hormona de Crecimiento Humana (11), Hormona Tiroestimulante (12), Hormona Coriónica Gonadotrófica (13), Hormona Luteinizante (14), Hormona Paratiroidea (15), Hormona Lactogénica Placentaria (16), Angiotensina (17) y ACTH (18).

Continuando con el plan de trabajo previamente trazado por la División, se describe la marcación, control y dosaje de FSH pituitaria en suero humano.

I. — Estudio de las condiciones óptimas de reacción

Con el fin de obtener una hormona marcada con reactividad inmunológica adecuada, se ensayaron diferentes métodos de marcación y purificación de la misma.

El parámetro que se tuvo en cuenta para comparar la calidad de la hormona, fue el porcentaje de captación inmunológica frente a un exceso de antisuero específico.

I-1. — Método de marcación de Greenwood y Hunter (19)

En un tubo cónico siliconado de 3x1 cm, que contiene 5 ug de FSH pituitaria, se introducen 50 ul de solución reguladora de fosfato 0.5M, pH 7.5 aproximadamente

0.5-0.7 mCi de $^{125}\text{I}\text{Na}$ 10 μl (25 μg) de Cloramina T, se agita en vortex 10 segundos, se agregan 50 μl (125 μg) de metabisulfito y finalmente 100 μl de albúmina humana 0.25 %.

Se realizaron las siguientes experiencias, variando la cantidad de $^{125}\text{I}\text{Na}$ y Cloramina T, y fijando como método de purificación la cromatoelectroforesis preparativa que más adelante se detalla.

I-2. — Método de marcación enzimática con lactoperoxidasa (20-21)

En un tubo de reacción, que contiene 5 μg de hormona, se introducen 50 μl de solución reguladora de fosfato 0.05M pH 7.5, 0.5-0.7 mCi de $^{125}\text{I}\text{Na}$, 4 μg (1,5 μl) de lactoperoxidasa y 5 μl de H_2O_2 0.88 mM. Se agita durante 60 seg y se detiene la reacción con el agregado 500 μl de la misma solución reguladora.

Se realizaron las siguientes experiencias usando como método de purificación la cromatografía en columna de 40x1 cm de sephadex G50 fino.

Cálculo de rendimiento de reacción

Se efectúa por cromatoelectroforesis con una alícuota de 5 μl del tubo de reacción, y se le agregan 5 μl de una solución de albúmina humana al 0.25 % en veronal só-

TABLA I

Exp. N°	$^{125}\text{I}\text{Na}$ mCi	Cloramina T ug	Rendimiento %	Actividad Específica mCi/mg	Combinado Total %
1	2.1	50	72	604	17
2	1.7	50	70	238	21
3	1.5	50	75	225	20
4	0.44	50	91	205	30
5	1.0	25	50	100	40
6	0.590	25	91	87	50
7	0.36	25	42	75	50
8	0.320	25	90	90	49

TABLA II

Exp. N°	Rendimiento %	Actividad Específica mCi/mgr	Combinado total %
1	37	84	50
2	54	65	40
3	56	70	48

dico 0.05M, 0.15 M ClNa, pH 8.6, conteniendo una pequeña cantidad de azul de bromofenol y IK. Se siembra sobre papel Whatman N° 3 no cromatográfico, de 50x2 cm y se efectúa la corrida durante dos horas, usando solución reguladora de veronal sódico 0.05 M acetato de sodio 0.15M, pH 8.6.

Seguidamente, se determina el porcentaje de rendimiento de reacción por pesada de los picos obtenidos del radiocromatograma correspondiente.

Con los resultados anteriores (Tabla I y II) se concluye que no ofrece mayor ventaja el método enzimático de marcación para el caso de la FSH (22) ya que la calidad de la hormona, es similar a la marcada por el método de Greenwood y Hunter frente a la desventaja de la corta duración de los reactivos de la marcación enzimática.

II. — Estudio de las condiciones óptimas de purificación

Usando el mismo parámetro de comparación (porcentaje de captación inmunológica en exceso de anticuerpo específico), se trató de mejorar la calidad de la hormona utilizando las siguientes técnicas de purificación.

II-1. — Cromatoelectroforesis preparativa

Una alícuota del tubo de marcación, se siembra en una tira de papel Whatman 3 no cromatográfico de 5x50 cm y se efectúa una cromatoelectroforesis, con un tiempo de corrida de 2 horas, a 1 mA por cm y 300 voltios, usando una solución reguladora de veronal-acetato, pH 8.6. Se cor-

tan los 2 cm siguientes al punto de siembra y se extrae la hormona del papel, sumergiéndolo en una solución de fosfato 0.05M, 0.15M ClNa, albúmina humana 3 %, pH 7.5 y dejándolo en contacto durante 6 horas aproximadamente a 4°C. Se centrifuga durante 10 minutos a 3.000 rpm a temperatura ambiente.

La recuperación de la hormona en el sobrenadante es de alrededor de 60 % de la actividad sembrada.

II-2. — Cromatografía en columna de sephadex G 50 fino

El contenido del tubo de marcación se siembra en el tope de una columna de 40x1 cm empaquetada con sephadex G50 fino previamente equilibrada con solución reguladora de fosfato 0.05M, 0.15 M ClNa, albúmina humana 0.25 % y cuya velocidad de elución es de 3 gotas por minuto. Se eluye con la misma solución reguladora y se recogen alícuotas de 1 ml apareciendo el pico de actividad correspondiente a la hormona marcada a partir del octavo tubo.

II-3. — Repurificación en columna de celulosa CF 11 a partir del material obtenido de la purificación por columna de sephadex G50 fino

Se eligen los eluidos provenientes de la zona descendente del pico de actividad correspondiente a la hormona marcada. Se siembran sobre el tope de una columna de 15x1 cm, empaquetada con celulosa CF 11. A continuación se eluye con 5 ml de solución reguladora de fosfato 0.05M, 0.15M ClNa, pH 7.5, repitiendo esta operación hasta no detectar actividad apreciable en las soluciones de lavado.

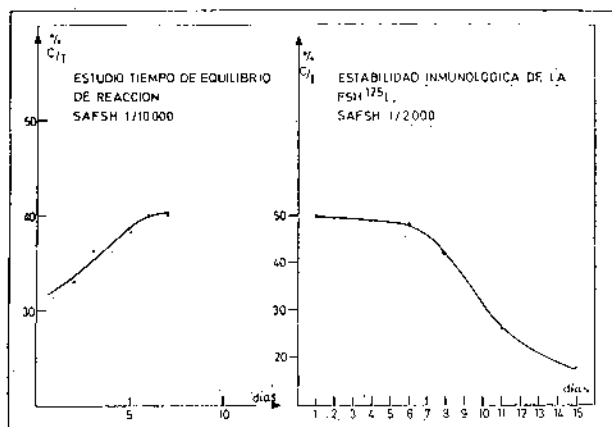


FIGURA 1. — Tiempo de equilibrio de reacción (Ver tecto III)

Se extrae la hormona adsorbida a la celulosa haciendo pasar a través de la columna la misma solución reguladora con el agregado de albúmina humana al 5%.

Se encontró igualdad de calidad inmunológica utilizando los tres métodos descriptos, por lo tanto, se prefirió el uso de la cromatoelectroforesis preparativa para la realización de los ensayos "in vitro" por la sencillez de su metodología.

III.—Estudio de las condiciones óptimas de reacción para los ensayos "in vitro"

III-1.—Tiempo de equilibrio de reacción.

Con el antisuero anti FSH* y el suero de cabra anti gamma globulina de conejo, se buscó el tiempo óptimo de máxima reacción (fig. 1).

Condiciones

S. AFSH 1/10.000 final, 100 uug FSH ¹²⁵I 4 horas después de marcada. A los efectos de conocer el comportamiento inmunológico de la hormona se concluye que con una incubación de 16 horas a 4°C, se obtiene en presencia de exceso de anticuerpo un porcentaje de captación inmunológica aproximadamente del 35%.

III-2.—Degradación inmunológica de la FSH ¹²⁵I

En la Fig. 1 se observa el comportamiento de la FSH ¹²⁵I en un período de 16 días conservada a 4°C en dilución de trabajo.

Condiciones

S. AFSH 1/2.000, FSH ¹²⁵I: 100 uug por tubo.

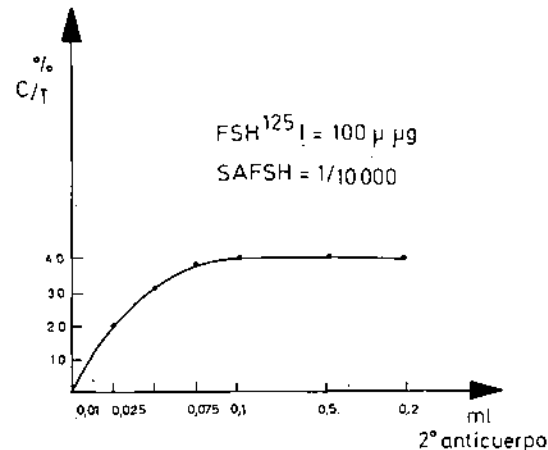


FIGURA 2.—Volumen óptimo de segundo anti-suero.

(*) Ver apéndice.

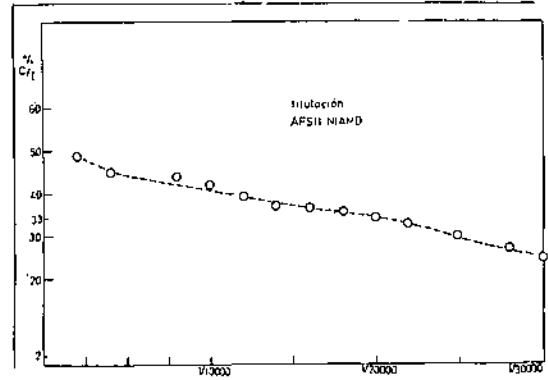


FIGURA 3.—Comportamiento del antisuero.

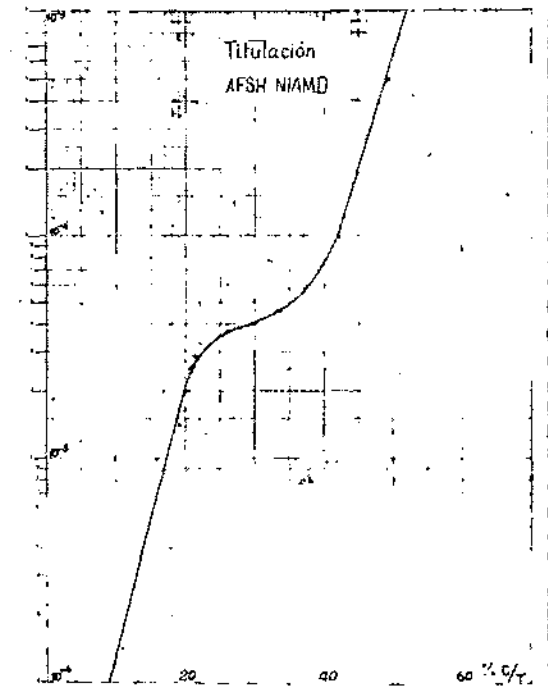


FIGURA 3.—Titulación del suero anti FSH

III-3.—Volumen óptimo del segundo anti-suero

Se buscó aquel volumen que produjo precipitación completa del complejo antígeno anticuerpo (Fig. 2).

III-4.—Comportamiento del antisuero

Se tituló el suero anti FSH con diluciones comprendidas entre 1/2.000 y 1/120.000 (Fig. 3 y 3').

Condiciones

Tiempo de incubación cinco días (1ra. Reacción) temperatura 4°C, tiempo de incubación (2da. Reacción) 48 horas, FSH ¹²⁵I 100 uug por tubo.

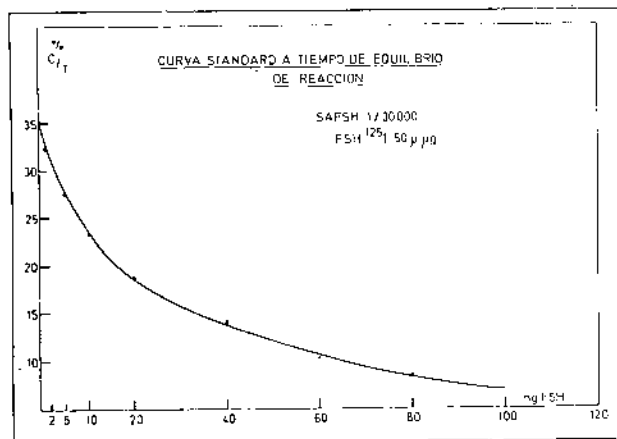


FIGURA 4. — Tiempo de equilibrio - FSH y suero anti FSH.

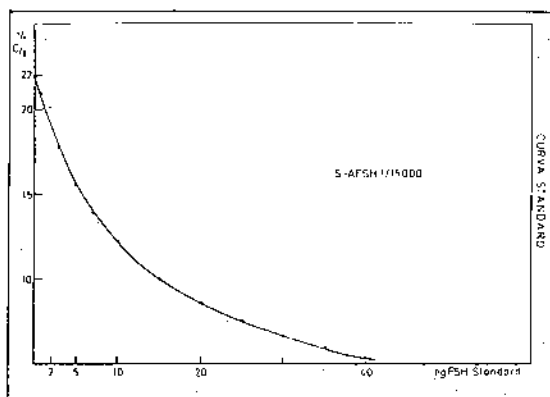


FIGURA 5. — Curva standard pre-incubación.

IV. — Ensayos "in vitro"

IV-1. — Se hizo curva standard a tiempo de equilibrio de reacción.

Condiciones

FSH ^{125}I : 50 uug por tubo S. AFSH 1/30.000 dilución final (Fig. 4).

IV-2. — Se hizo curva standard con pre-incubación. Fig. 5.

Condiciones

FSH ^{125}I : 50 uug, S.AFSH 1/15.000

Se incubó el standard con el primer anticuerpo durante 18 hs., luego se agregó la hormona marcada incubándose durante 3 días, al cabo de los cuales se agregó el segundo anticuerpo y se centrifugó a las 48 hs. Todo el procedimiento se efectuó a 4°C.

Se concluye que las condiciones de pre-incubación aumentan la sensibilidad del método.

IV-3. — Curva de recuperación

En la Figura 6 se observa la recuperación de la FSH (1er. 907)* agregada al plasma humano, siendo la misma próxima al 100%.

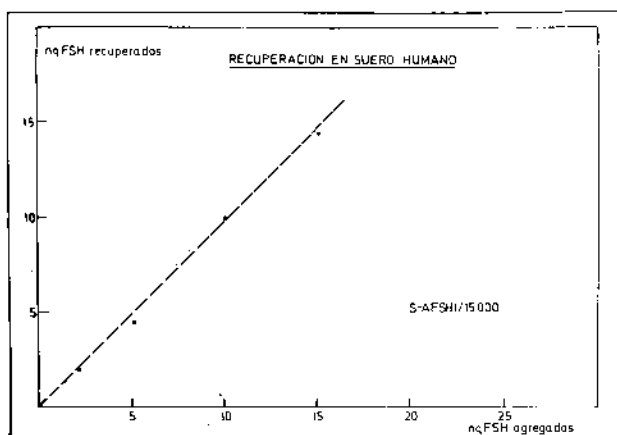


FIGURA 6. — Curva de recuperación de FSH en suero humano.

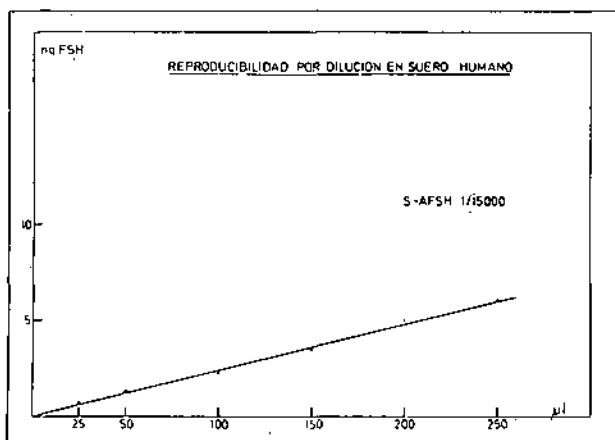


FIGURA 7. — Reproducibilidad del método utilizando distintos volúmenes de suero humano.

IV-4. — Ensayo de reproducibilidad por dilución en suero humano

En la figura 7 se observa la reproducibilidad del método trabajando con distintos volúmenes de suero humano normal.

Se observó para volúmenes inferiores a 100 μ l de sueros provenientes de mujeres climatéricas, una sobre-estimación de los valores de FSH, no respondiendo a la curva regular de dilución. Las distintas causas que podrían producir esta irregularidad están en estudio.

Se dosaron sueros encontrándose los siguientes valores:

mujer	50 años	50 ng/ml
hombre	30 años	26 ng/ml

V. — Tratamiento matemático (23)

V-1 Scatchard Figura 8

V-2 Logit Figura 9

Conclusiones

De los métodos de marcación utilizados se prefirió el tradicional de marcación usando cloramina T como oxidante ya que

el enzimático no aumentó el porcentaje de captación inmunológica empleando el control con exceso de antisuero.

Se prefirió la cromatoelectroforesis preparativa para la purificación debido a que se obtuvo una hormona de similar calidad a la de los otros métodos ensayados y fue más accesible en nuestro laboratorio.

Para la realización de los ensayos "in vitro" se prefirieron las condiciones de pre-incubación debido a que aumentaba la sensibilidad del método.

Se encontró una irregularidad muy interesante en la curva de reproducibilidad por dilución cuando se usó por debajo de 100 μ l de suero de mujeres. Dicha irregularidad se observó solamente en mujeres climatéricas.

Apéndice

Reactivos Empleados

- 1) 125 INa en solución diluida de Na OH, libre de portador, concentración de actividad: 400-5500 mCi proveniente de New England Nuclear.

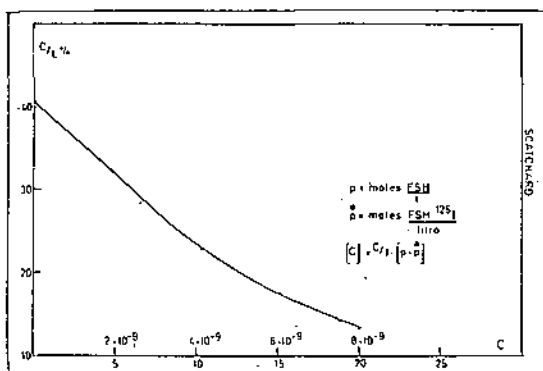


FIGURA 8

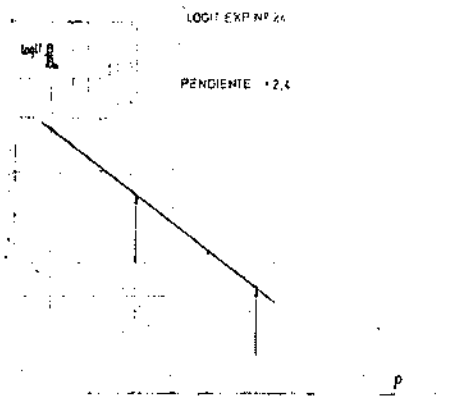


FIGURA 9

- 2) FSH humana de origen pituitario LER 1575-C provista por el NIH.
- 3) Standard de FSH LER 907 que contiene 20 UI FSH y 60 UI LH.
- 4) Solución reguladora de fosfato 0.5 M pH 7.5.
- 5) Solución reguladora de fosfato 0.05 M pH 7.5.
- 6) Cloramina T Mallinckrodt disuelta en la solución N° 5.
- 7) Metabisulfito de sodio Mallinckrodt disuelto en la solución N° 5.
- 8) Solución reguladora de veronal sódico 0.05 M y acetato de sodio 0.15 M.
- 9) Agua oxigenada perhydrol Merck 0.88 mM
- 10) Lactoperoxidasa Sigma disuelta en buffer de fosfato 0.05 M sin Azida sódica.
- 11) Albúmina humana Boeringwerke.
- 12) Suero anti FSH Batch N° 3 cedido por el NIH.
- 13) Buffer de incubación contiene ácido bórico 8.25 g %, NaOH; 2,7 g %, HCl conc. 3 ml; albúmina bovina 5 g/l EDTA 0.022 M pH 8 ± 0.1 .
- 14) Sephadex G 50 fino Pharmacia.
- 15) Suero de cabra anti gamaglobulina de conejo.
- 16) Suero normal de conejo.

Se agradece al Dr. H. Scaliter (Inst. Modelo "Luis Agote" Htal. Rawson la provisión del suero de cabra antigama globulina de conejo.

Bibliografía

1. MIDGLEY, A. R. (Jr.): *J. Clin. End.* 27: 275, 1967.
2. GAIMAN, C. and RYAN, R. J.: *J. Clin. End.* 27: 444, 1967.
3. RAITI, S.; BLIZZARD, M. R.: *J. Clin. End.* 28: 1719, 1968.
4. DONINI, S.; DONINI, P.: *Karolinska Symposia on Res. Met. in Reproductive End.* pp 257, 1968.
5. FRANCHIMONT, P.; DONINI, P.: *J. Clin. End.* 31: 18, 1970.
6. WIDE, L. P.; PORATH, J.: *Bichim. Biophys Acta* 130: 257, 1966.
7. CATT, N. J.; NIALL, H. D.; TREGGAR, G. W. and BURGER, H. G.: *J. Clin. End.* 28: 121, 1968.
8. ALBERT, A. et col.: *J. Clin. End.* 28: 1214, 1968.
9. ALBANI, H.; CRESTO, J.; NUÑEZ, G. N. de y MITTA, A. E. A.: Presentado al II Congreso de ALASBIMN, México, 1970.
10. QUIHILLAT, L. E.; ARCIPRETE, J. A. y MITTA, A. E. A.: Informe CNEA 378.
11. CRESTO, J. C.; ALBANI, H.; DEGROSSI, O. J. y MITTA, A. E. A.: Premio E. J. Varela de la Soc. Arg. de Biol. y Med. Nucl. 1972.
12. BARMACH, M.; NUÑEZ, G. N. de; ALTSCHULER, N. y MITTA, A. E. A.: Informe CNEA 346, 1973.
13. TEMPONE, A.; QUIHILLAT, L. E.; ARRIGHI, L. y MITTA, A. E. A.: Informe CNEA 317, 1972.
14. DUJOVNE, L. I.; ALBANI, H.; NUÑEZ, G. N. de; DEGROSSI, O. J. y MITTA A. E. A.: Presentado al III Congreso de ALASBIMN.
15. ARATA, R. O.; NUÑEZ, G. N. de, MAUTALEN, C. A. y MITTA, A. E. A.: Informe CNEA 332, 1973.
16. SABBATINI, D. C. de, SLIMOVICH, R. y MITTA, A. E. A.: Presentado en el III Congreso Argentino y 1ª Jornada Regional de ALASBIM, 1973.
17. HAUGER KLEVENE, J.; QUIHILLAT, L. E. y MITTA, A. E. A.: *Revista ALASBIM*, 5: 91, 1974.
18. BRUNO, O. D.; QUIHILLAT, L. E. y MITTA, A. E. A.: *Revista ALASBIM* 5, 1974
19. HUNTER, W. M. y GREENWOOD, F. C.: *Nature* 495: 194, 1962.
20. JUKITAKA, MIYACHI; JUDITH, L.; VAITUKAITIS, E.; BREHAD NIESCHLAG and MORTIMER, B.: *Lipsett J. Clin. End Metab.* 35: 23, 1972.
21. THORELL, J. I. and JOHANSSON, B. G.: *Biochim. et Biophysica Acta* 251: 363, 1971
22. JUKITAKA MIYACHI and ANDREAS CHRAMBACH: *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol 46: 3, 1972.
23. ODELL-DAUGHADAY: *Principles of Competitive Protein Binding Assays*, 1972.