

OBTENCION DE HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES (hTSH) DE HIPOFISIS HUMANA

Jorge H. Ayala V., Claudia Carvajal G., Cecilia Anzola V.*, Myriam S. De Gómez.
*Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

Keywords: Thyrotropin, pituitary gland, immunoradiometric assay, IRMA.

ABSTRACT

Thyroid-stimulating Hormone (TSH) was extracted from human frozen pituitary glands using a method for the integral extraction of most hormones present in the gland.

A specific immunoradiometric method (IRMA) was standardized and used for the analysis of TSH content. The immunologic potency of the final TSH preparation was 1365 mUI/mg by IRMA. Characterization by SDS-PAGE demonstrated the multicomponent nature of the hormone.

RESUMEN

En este trabajo se describe un método para extraer y purificar la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) a partir de glándulas pituitarias humanas congeladas, dentro de un esquema integral de extracción de la mayoría de las hormonas de la hipófisis anterior. El contenido hormonal de TSH se determinó mediante el análisis inmunoradiométrico específico (IRMA), estandarizado en este trabajo. La potencia inmunológica de la preparación final dio un valor de 1365 mUI/mg. Mediante electroforesis analítica en SDS se comprobó la naturaleza multicomponente de la hormona.

INTRODUCCION

La hormona estimulante de la Tiroides (TSH) o Tirotrópina es una glicoproteína (16% de carbohidratos) con peso molecular aproximado de 33000 Da, sintetizada por las células basófilas de la glándula pituitaria (1). Está constituida por dos subunidades

α y β al igual que otras hormonas (Luteinizante LH, Folículo estimulante FSH). La subunidad β es diferente en cada una y es la que confiere especificidad biológica e inmunológica a cada hormona (2). Su síntesis es estimulada por el tripéptido hipotalámico (TRH) que se produce como respuesta a niveles bajos de hormonas tiroideas circulantes (3).

Los niveles de TSH en suero son útiles para el diagnóstico y tratamiento de diversos trastornos de la tiroides. Sin embargo, la sensibilidad restringida de la mayor parte de los ensayos existentes para su determinación, han dificultado su aplicación como test tiroideo de primera línea.

Dentro de los métodos más confiables figura el análisis inmunorradiométrico (IRMA), el cual requiere para su implementación de cantidades apreciables de hormona pura para ser usada como estándar y para la obtención de anticuerpos específicos (4).

El objetivo de este trabajo es lograr el aislamiento de TSH de hipófisis humanas congeladas, en un proceso compatible con la separación de la mayoría de las hormonas contenidas en la glándula.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. Glándulas pituitarias colectadas en el Departamento de Patología del Instituto de Medicina Legal, en Santafé de Bogotá.
2. Estándares hormonales - NIDDK cuya potencia para RIA es 1.5 UI/mg.
3. Anticuerpo monoclonal - NETRIA
4. Fase sólida - Celulosa microcristalina acoplada a Anti-TSH monoclonal-NETRIA.
5. NaI¹²⁵ Amersham

METODOS

1. Determinación de la actividad hormonal por IRMA.

a. Marcación del anticuerpo.

El anticuerpo monoclonal se marcó siguiendo el método de Cloramina-T (5) y fue purificado por cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-300, Pharmacia) en

FIGURA 1
EXTRACCION HORMONAS HIPOFICIARIAS

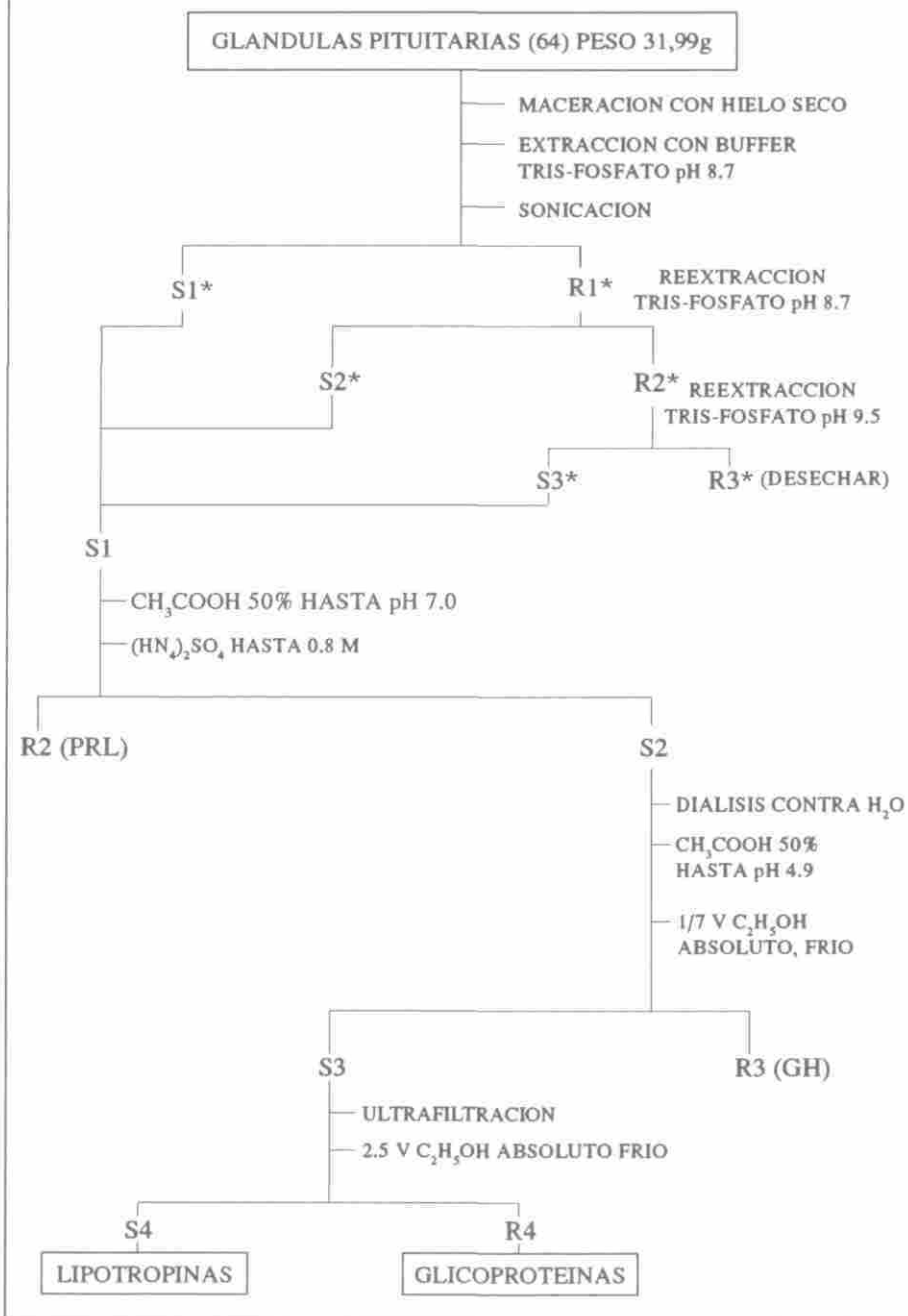
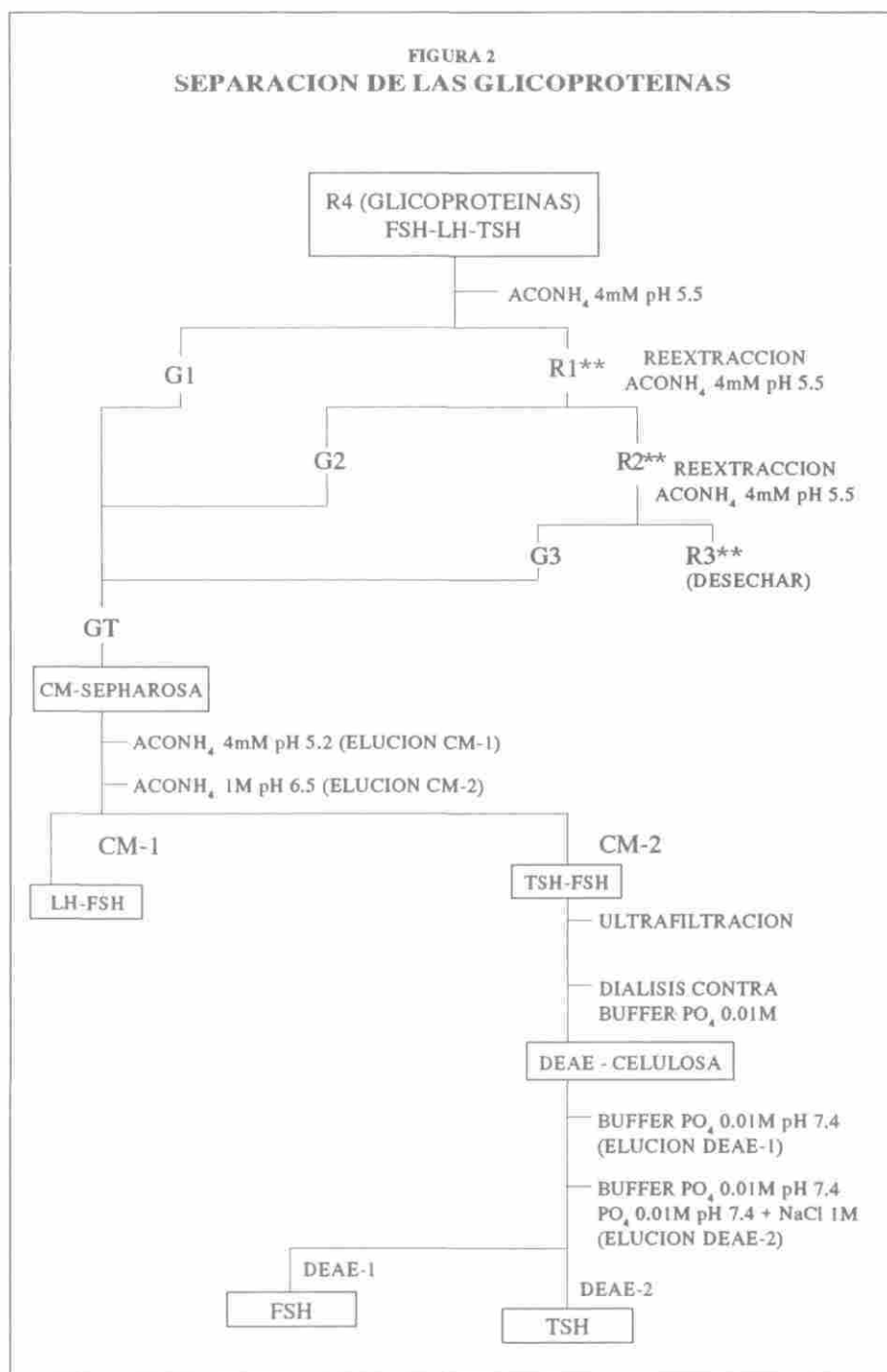


FIGURA 2
SEPARACION DE LAS GLICOPROTEINAS



columna (1x44 cm), equilibrada con buffer fosfato 50 mM pH 7.4, evaluando la elución por lecturas de radioactividad en contador gamma (miniassay Type 6-20 Iodine 125).

b. Estandarización del IRMA

Se siguió la metodología desarrollada en NETRIA (6) variando los siguientes parámetros: Tiempo de incubación (4-16 horas), Número de lavados (2-3), velocidad de centrifugación (1000-4000 g), tiempo de centrifugación (5 y 30 min) y adición de polietilenglicol (PEG 6000) (0-6%).

2. Extracción y purificación de TSH.

Se siguió el método descrito por Vargas y Velásquez (7) con algunas modificaciones (figuras 1 y 2). Al polvo homogéneo, se le adicionó buffer Tris-fosfato 0.1M, pH 8.7, se sonicó (sonicador Heat Systems Ultrasonics, Inc. Cell Disruptor Model W-220F)(20 pulsos x 20 seg), se agitó por 2 horas y se centrifugó (1000 g x 2h). Después de 3 re-extracciones se reunieron los sobrenadantes (S1), se ajustó el pH a 7.0 y se adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta concentración 0.8M; después de reposo (16h) se centrifugó (1000 g x 1h), obteniéndose el residuo R2 correspondiente a Prolactina (PRL) cruda. El sobrenadante S2 se ajustó a pH 4.9 y se precipitó la Hormona de Crecimiento (hGH) cruda por adición de 1/7 de volumen de etanol absoluto. El sobrenadante S3 se concentró por ultrafiltración (Sartorius, membrana 10k, 30 Lbs, 1500 psi) precipitándose las glicoproteínas (R4) con 2.5 vol. de etanol absoluto. El sobrenadante S4 contiene las lipotropinas. El residuo R4 se extrajo por 3 veces consecutivas con AcONH_4 4mM, pH 5.5, centrifugando a 1000g x 30 min. Los sobrenadantes se reunieron (GT) y se pasaron a través de una columna de CM-sepharosa (1 cm x 37 cm), equilibrada con AcONH_4 4mM, pH 5.2, eluyendo con el mismo buffer (2.5 ml por fracción) hasta fin de proteína (fracción CM-1 con actividad para LH y FSH). La proteína retenida se eluyó con AcONH_4 1M, pH 6.5 (fracción CM-2 con actividad para FSH y TSH). La fracción CM-2 se pasó a través de una columna de DEAE-celulosa (1 cm x 37 cm) equilibrada con buffer fosfato 0.01M, pH 7.4, eluyendo con el mismo buffer (3 ml por fracción) hasta fin de proteína (fracción DEAE-1 con actividad para FSH). La proteína retenida se eluyó con un gradiente continuo de fuerza iónica (buffer fosfato 0.01M, pH 7.4 - NaCl 0-1M) (fracción DEAE-2 con actividad para TSH). El contenido proteico de las fracciones a lo largo del proceso se determinó por el método de Lowry et. al (8) y la actividad hormonal mediante el protocolo estandarizado para IRMA.

3. Caracterización parcial de las fracciones de la extracción.

Se empleó electroforesis analítica discontinua en SDS (9) (Phast-System, Pharmacia) usando marcadores de PM (14400-94000 Da) como patrones de referencia. Las condiciones de la electroforesis fueron:

gel de concentración: T 6% C 3%; gel de separación: T 12.5% C 2%; buffer del gel: Tris 0.112M, acetato 0.112M pH 6.5 buffer de corrida: Tricina 0.2M, Tris 0.2M, SDS 0.55M pH 8.1; tiempo de corrida: 39 min, 150 volt-10 mA.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Determinación de la actividad hormonal por IRMA

a. Marcación y purificación del anticuerpo monoclonal.

La actividad específica calculada para el anticuerpo monoclonal marcado fue de 19.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, presentándose una incorporación del 95.5% del yodo radioactivo.

b. Estandarización del IRMA

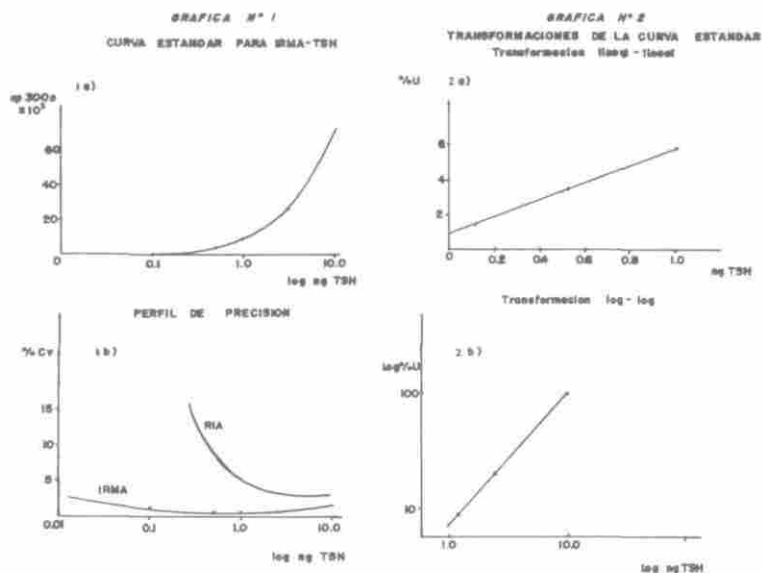
Para establecer las mejores condiciones a nivel de laboratorio se consideró:

1. Mayor porcentaje de enlace antígeno-anticuerpo-fase sólida, evaluado por la radioactividad leída y corroborado por la cinética de reacción para IRMA-TSH.
2. Mayor poder de discriminación en la zona de baja concentración de la curva estándar.
3. Bajo porcentaje de enlace no específico.
4. Formación de un precipitado estable
5. Precisión en las determinaciones

Las mejores condiciones establecidas fueron:

- Tiempo de incubación: 16h
- Número de lavados: 3
- Velocidad de centrifugación: 1000g
- Tiempo de centrifugación: 5 minutos
- Adición de PEG 6%, dejando en reposo 30 minutos.

Bajo estas condiciones se elaboró la curva estándar en un rango de concentración de 0.01 a 10 ng de TSH (gráfica 1a). Para facilitar la interpolación se linealizó la curva estándar mediante las transformaciones lineal-lineal que cubre el rango de 0 a 1 ng de TSH (gráfica 2a) (coeficiente de correlación = 0.9998) y log-log del % unión vs



ng TSH que cubre el rango de 1 a 10 ng de TSH (gráfica 2b) (coeficiente de correlación = 0.9997) ya que no fue posible establecer un modelo de regresión único adecuado en el rango útil de la curva (10). El límite de detección del IRMA estandarizado dió un valor de 0.034 mUI/l (51 ng/l), comparable con la sensibilidad de los ensayos IRMA usados en laboratorios clínicos (10,11,12) haciéndolo un test de "screening" de primera línea en el diagnóstico clínico. Teniendo en cuenta que el perfil de precisión permite conocer el rango de concentración donde la precisión es aceptable (4), al comparar las gráficas para el IRMA y RIA (6) (gráfica 1b) puede observarse que nuestro método presenta un rango útil de la curva más amplio hacia la zona de baja concentración, es más preciso y es de anotar que requiere menor tiempo para su realización.

2. Extracción y purificación

La tabla 1 muestra el contenido protéico y la actividad hormonal de TSH en las diferentes fracciones de la extracción. Al someter la fracción cruda de glicoproteínas (GT 191,9 mg) a cromatografía de intercambio iónico (CM-Sepharosa), se obtuvo la fracción CM-1 con actividad para LH, la fracción CM-2 con actividad para FSH y TSH y otras fracciones protéicas sin actividad hormonal.

La elución de LH en la fracción CM-1 es debida a su carácter multicomponente con variantes de carga, hecho ya evidenciado en trabajo paralelo realizado en este grupo de investigación (13).

La elución de la FSH en la fracción CM-2 es debida a la presencia de formas moleculares de punto isoeléctrico bajo, con respecto a otras especies hormonales, resultado que concuerda con otros investigadores (14). La TSH es obtenida en esta fracción ya que por su carácter debilmente ácido (PI 6.0) es retenida en esta resina de intercambio iónico y solo se libera cuando el pH del eluyente es mayor que su PI; en esta fracción la actividad de la TSH fue incrementada con respecto a la fracción GT. La cromatografía sobre DEAE-celulosa de la fracción CM-2 (20.1 mg) permitió separar la fracción DEAE-1 con actividad para FSH y posteriormente al aplicar un gradiente continuo de fuerza iónica se obtuvo la fracción DEAE-2 enriquecida con TSH en la cual su potencia aumentó 15 veces (1365 mUI/mg). Al aumentar la fuerza iónica (1M) se separó un tercer pico (DEAE-3), el cual no mostró actividad para la TSH, por tanto se descartó. Es de anotar que la TSH por encontrarse en muy pequeñas cantidades en la hipófisis presentó dificultad para su purificación; sin embargo, la cantidad que logró ser aislada mostró un alto grado de pureza. El valor obtenido (1.37 UI/mg) es superior a los reportados en la literatura (15) y muy semejante al valor estándar NIDDK (1.5 UI/mg), usado en el IRMA-TSH, lo que demuestra la importancia de incluir esta etapa en la purificación de la hormona.

Tabla 1. Contenido protéico y actividad hormonal de la TSH en las diferentes fracciones de extracción

FRACCION	PROTEINA TOTAL (mg)	ACTIV. HORMONAL TSH (mUI/mg) (a)
S1	2744	6.94
S2	2178	9.24
S3	888	11.35
S4	183.4	0.08
GT	191.9	19.62
CM-1	5.89	0.43
CM-2	20.1	89.6
DEAE-1	0.03	0.9
DEAE-2	0.14	1365

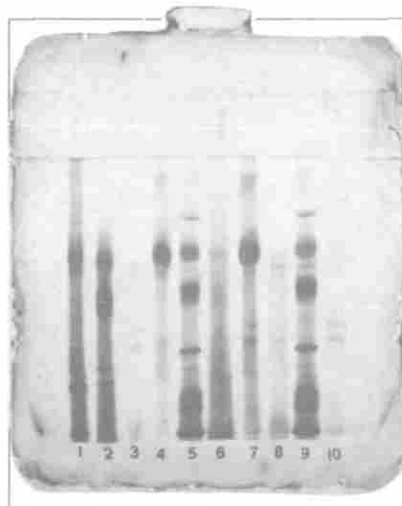
(a) Estándar con potencia de 1.5 UI/mg de proteína.

3. Caracterización parcial de las fracciones de la extracción.

La figura 3 muestra el resultado de la electroforesis en SDS, visualizando las bandas por tinción con plata.

A medida que transcurrió la extracción, las fracciones fueron concentrándose haciéndose evidentes bandas que no habían sido resueltas y desapareciendo otras. La fracción enriquecida en TSH (carril 8) muestra la presencia de varias bandas indicando su naturaleza multicomponente. Las dos primeras bandas que correspon-

FIGURA 3
ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS



CARRIL	CONCENTRACION (ng/μl)	VOLUMEN (μl)	
1.	S1	16	0.3
2.	GT	16	0.3
3.	TSH (DEAE-2) sin Liofilizar	8	0.3
4.	TSH estándar RIA	4	0.3
5.	Patrón de PM	25	0.3
6.	TSH (DEAE-2) Liofilizado	20	0.3
7.	TSH Estándar RIA	8	0.3
8.	TSH (DEAE-2) sin Liofilizar	16	0.3
9.	Patrón de PM	25	0.3
10.	TSH para yodar	16	0.3

den a pesos moleculares entre 58000 y 65000 Da posiblemente pueden ser formas agregadas de la hormona; otras dos bandas con peso molecular entre 30000 y 35000 Da corresponden posiblemente a la TSH, y una banda con peso molecular aproximado de 14000 Da correspondería a una de las subunidades constituyentes de la TSH, coincidiendo estos resultados con reportes bibliográficos previos (1,16,17). Esta fracción enriquecida en TSH presentó un comportamiento muy similar al del patrón de TSH para yodar (carril 10), el cual es de alta pureza. Esto demuestra la importancia de incluir estas técnicas de purificación para la obtención de la hormona en alto grado de pureza, la cual podrá ser utilizada posteriormente como patrón de yodación y de referencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), al programa IPICS, Universidad de Uppsala, Suecia y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

1. Reichert, E. L.; Lawson, M. G. *Endocrinology*, 1973, 92, 1034.
2. Jacobson, G.; Ross, P.; Wide, L. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987, 252, 409.
3. Lenhinger, A. L. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 2 edición. Ed. Omega S. A., Barcelona, 1989, p. 818.
4. Hernández, L. R.; Velez, A. *Inmunoanálisis. Fundamentos y aplicaciones*. Lab. Endocrino Velez Lab. Bogotá, 1990, p.37.
5. Hunter, W.; Greenwood, F. *Nature*. 1962, 194, 465.
6. North East Thames Region Immunoassay Unit (NETRIA). TSH IRMA, 1970.
7. Vargas, A.; Velásquez, C. A. *Aislamiento y purificación de la hormona de crecimiento (hGH) a partir de glándulas pituitarias congeladas*. Bogotá, 1984. Tesis Químico Farmacéutico. Universidad Nacional.
8. Lowry, D. H.; Rosebrough, N. J.; Randall, R. *J. Biol. Chem.* 1951, 195, 265.
9. Laemli, U. *Nature*. 1970, 227, 680.
10. Diagnostic Products Corporation. Coat.A. - Count TSH IRMA. Mayo 1991.

11. Diagnostic Products Corporation. TSH. Double Antibody. Febrero 1990.
12. Tof, A. D. *Mayo Clin. Proc.* 1988, 63, 1035.
13. Camero, G.; Esquivel, D. *Ensayos de obtención y purificación de hormona Luteinizante (LH) a partir de hipófisis humanas congeladas*. Bogotá, 1991. Tesis Químico Farmacéutico. Universidad Nacional.
14. Hartree, S. A. *Biochem. J.* 1966, 100, 754.
15. Chapman, G. et al.. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1981, 53, 1008.
16. Chin, W. et. al. *Endocrinology*, 1980, 107, 1389.
17. Jacobson, G.; Roos, P.; Wide, L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 490, 403.