

OBTENCION DE UN ANTISUERO ESPECIFICO CONTRA LA FORMA 22K DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA (hGH)

Diana Bolívar Q.
Cecilia Anzola V.*,
Myriam S. de Gómez *.

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la obtención del anticuerpo policlonal específico contra la fracción monomérica 22K de la hormona de crecimiento humana (hGH). La hormona fue obtenida a partir de hipófisis humanas congeladas, mediante un esquema de extracción basado en diferencias de solubilidad y la fracción 22K separada por cromatografía de filtración por gel. El antisuero específico fue obtenido por inoculación del antígeno en conejos raza Nueva Zelanda, cuya producción fue controlada valorando el título por RIA. La caracterización parcial del antisuero se realizó mediante la determinación del título óptimo, especificidad, afinidad, y su aplicabilidad para cuantificación en términos de curva estándar y control de calidad, en comparación con el antisuero de referencia.

Los resultados indicaron que el antisuero puede emplearse en la cuantificación de hGH por RIA.

SUMMARY

This study describes the preparation of a polyclonal antibody specific for the 22K monomeric fraction of human growth hormone (hGH). The hormone was extracted from human frozen hypophysis, on the basis of differences in solubility and the isolated 22K form was purified by gel filtration chromatography.

The antiserum was raised by inoculating the antigen in New Zeland rabbits and the titer was assessed by RIA. Partial characterization of the antiserum included optimal titer, specificity, affinity and quantitative capability in terms of standard curve and quality control in comparison with a reference antiserum (NIDDK).

The reliability of the results indicated that this antiserum could be utilized for the quantitation of hGH by RIA.

INTRODUCCION

La hormona de crecimiento humana (hGH) es una proteína simple formada por una cadena de 191 aminoácidos, de secuencia conocida, secretada principalmente por las células somatotrópicas de la adenohipófisis(1).

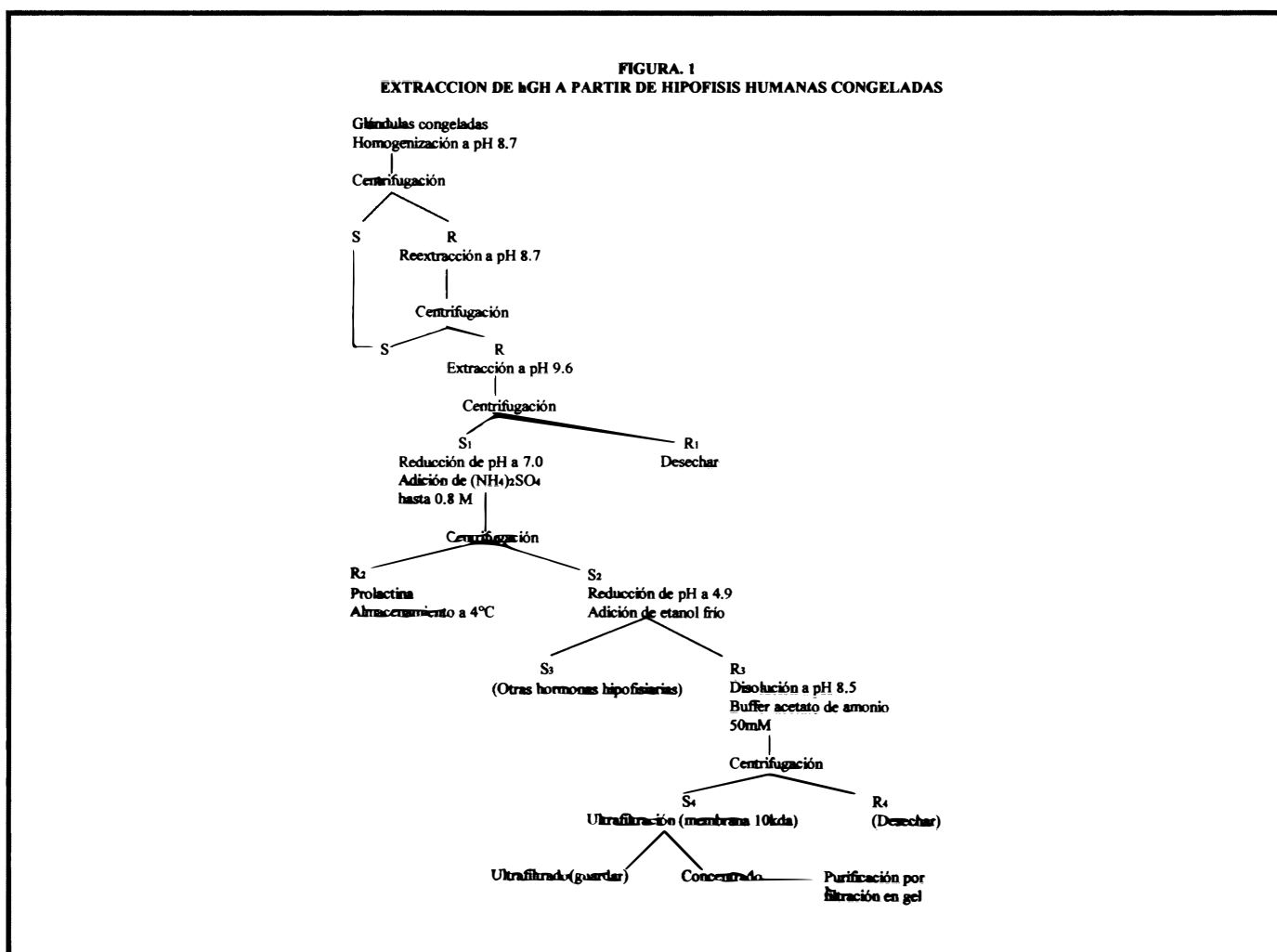
* Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia,
A.A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.
Keywords: Growth Hormone, pituitary gland, RIA.

En extractos hipofisarios y en suero humano se ha encontrado la forma monomérica (22k), como componente mayoritario, existiendo otras formas minoritarias (20K, 45K)(2). Su efecto promotor del crecimiento es ejercido en parte a través de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I y II) induciendo el crecimiento somático post-natal(3). Su secreción está controlada por el factor liberador de hGH (GHRH) y por la hormona inhibidora de la misma o somatostatina (GHRH) siendo también inhibida por los IGFs. Estos factores están influenciados por estímulos del sistema nervioso central sobre las neuronas hipotalámicas, por factores ambientales y biológicos como estrés, sueño, hipoglicemia, fármacos y otras hormonas como andrógenos y estrógenos.

La valoración del contenido de hGH en suero tiene un interés particular en el estudio de alteraciones del eje GH/IGF-I, especialmente las asociadas con retardo del crecimiento. Esta se realiza mediante diversas técnicas, siendo la más utilizada el radioinmunoensayo (RIA), por sus características de sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión y facilidad de ejecución (4).

El objetivo de este trabajo fue el de obtener el antisuero específico de la forma 22K de hGH (anti hGH), indispensable para el RIA de hGH, contribuyendo a la implementación de una tecnología propia para la obtención de "Kits" a nivel nacional con las consecuentes ventajas económicas.

FIGURA 1



PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

1. Glándulas pituitarias humanas colectadas en el Depto. de Patología del Instituto de Medicina Legal de Santafé de Bogotá.
2. Estándares hormonales - hGH (NIDDK hGH-RP-1(AFP-4793B)) cuya potencia para RIA es 2.2 UI/mg.
3. Animales: conejos raza Nueva Zelanda, sexo masculino de 45 días de edad.
4. NaI¹²⁵ Amersham.

Métodos

1. Extracción y purificación de hGH. Se siguió el método descrito por Vargas y Velásquez (5) con algunas modificaciones (figura 1). El polvo homogéneo correspondiente a las glándulas congeladas se trató con buffer Tris-fosfato 0.1M pH 8.7 (2 extracciones) y pH 9.6 (una extracción), a fin de extraer las hormonas hipofisarias. La prolactina se separó a pH 7.0 mediante la adición de sulfato de amonio hasta una concentración 0.8 M. Por adición de etanol a pH 4.9 se logró la precipitación de la fracción cruda de hGH, la cual se redisolvió en buffer de acetato de amonio 50 mM pH 8.5 y se concentró por ultrafiltración (Sartorius, membrana 10K,30 lb).

Esta fracción se purificó a través de una columna de Sephadex G-100 (1.6 cm x 100 cm) equilibrada con buffer de acetato de amonio 50 mM pH 8.5, eluyendo con el mismo buffer a una velocidad de 15 ml/h a 4°C, detectando la presencia de proteína por lecturas de absorbancia a 280 nm. Las fracciones de interés se reunieron y posteriormente se liofilizaron. El contenido protéico de las fracciones a lo largo de todo el proceso

se determinó por el método de Lowry (6) y la actividad hormonal mediante RIA (7).

2. Inmunización de hGH en conejos. El esquema de inmunización seguido fue el siguiente:

a. Animales: se seleccionaron 3 conejos Raza Nueva Zelanda de 45 días de edad (1 como control, 2 para inoculación: C1 y C2).

b. Antígeno: Se empleó hGH purificada en este trabajo.

c. Vía de inoculación: subcutánea.

d. Dosis inicial: Cada conejo se inoculó con 1 ml de liofilizado de hGH redisolto en buffer fosfato 50 mM pH 7.4 (200 µg de hormona) emulsificado con un volumen igual de adyuvante completo de Freud.

e. Dosis de refuerzo: Se aplicaron 3 refuerzos (48,70 y 91 días) el primero con igual cantidad inicial de hormona y los otros dos con cantidades decrecientes (160 y 106 µg), todos con adyuvante incompleto de Freud.

f. Evaluación del título: Se hicieron sangrados después de 10 días de cada inoculación, evaluando el contenido de anti-hGH mediante RIA.

g. Sangrado final: Al tener un título constante después de varios sangrados, se hizo la punción cardiaca. Los sueros obtenidos fueron almacenados a -20°C y posteriormente liofilizados.

3. Caracterización parcial del antisuero.

a. Título óptimo.- Se determinó mediante varias diluciones en la curva de calibración para RIA, escogiendo como dilución óptima la que presentara un porcentaje de enlace máximo entre 20 y 30% (8).

b. Especificidad.-Se evaluó mediante las técnicas de inmunodifusión e inmunolectroforesis (9,10) y por reacción cruzada con prolactina (hPRL).

c. Afinidad.- La afinidad del antisuero por hGH se determinó mediante la gráfica de Scatchard (11) tomando como base un RIA cualquiera de los efectuados.

d. Curva estándar.- Se siguió la metodología estandarizada por Rincón y Suárez (7) con algunas variaciones. La marcación de hGH comercial se hizo por el método de cloramina T (12) purificando por cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-200, Pharmacia) en columna (1.2 cm x 94 cm) equilibrada con buffer fosfato 0.3 M pH 7.4, evaluando la elución por lecturas de radiactividad en contador Gamma (Miniassay Type G-20, Iodine 125).

La actividad específica se calculó mediante la sumatoria de pico y curva de desplazamiento del trazador al 50% (13).

e. Control de calidad del RIA utilizando el anti-hGH obtenido.-

1) Control intra-análisis (14)

Los parámetros seguidos fueron:

1.1.Evaluación de la curva dosis-respuesta mediante:

- porcentaje de unión no específico.
- porcentaje de unión máxima.

- pendiente de la curva dosis-respuesta mediante la utilización del logit-log validando la linearización estadísticamente con las pruebas Syx y F.

1.2.Coeficiente de variación.

1.3.Relación respuesta-error.

1.4.Perfil de imprecisión.

2) Control inter-análisis (14)

Se construyeron cartas de control de calidad para visualizar la estabilidad del análisis.

f. Paralelismo.- Aplicando la prueba "t" de student se compararon las pendientes de una curva estándar con la obtenida de la muestra a analizar.

g. Comparación del antisuero obtenido con el de referencia internacional.- Utilizando la dilución óptima de los dos antisueros (el obtenido en C1 y C2) y el de referencia internacional se compararon las curvas estándar.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Extracción y purificación de hGH. La tabla 1 muestra el contenido protéico y la actividad hormonal en las tres fracciones obtenidas mediante la purificación del extracto crudo de hGH por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-100). La fracción Seph.I correspondió a proteínas de alto peso molecular, y la hormona eluyó en las fracciones Seph.II (dímero de hGH) y Seph.III (monómero). La potencia inmunológica alcanzada en esta última fue de 1.5 UI/mg, valor comparable al estándar internacional (2.2. UI/mg).

TABLA 1. Purificación del extracto crudo de hGH por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex-G-100.

TABLA 1

<i>Fracciones Cromatográficas</i>			
	SEPH I	SEPH II	SEPH III
PROTEINA (mg)	604,00	173,80	247,60
hGH (mg)	-	7,30	169,60
POTENCIA (UI/mg)*	-	0,12	1,50
*2,2 UI = 1 mg hGH			

2. Inmunización en conejos con hGH purificada.

El esquema de inmunización seguido permitió la obtención del antisuero de hGH, el cual fue determinado por RIA. Al día 27 después de la primera inoculación se observó una respuesta inmunológica aceptable la cual aumentó progresivamente hasta estabilizarse a los 89 días (% unión: 77.1% (C1) 85.5% (C2) dilución: 1:4000 (C1) 1:4000 (C2), tiempo en el cual se realizó punción cardiaca.

3. Caracterización parcial del antisuero.

a) Título óptimo.- Para escoger el título óptimo se empleó como parámetro el porcentaje de enlace que brinda la mayor sensibilidad, obteniéndose los valores de 27.96% (C1) y 30.42% (C2), para una dilución de 1:40000 en ambos antisueros.

b) Especificidad.- Mediante las técnicas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis pudo observarse claramente la formación de una banda de precipitación que es indicio de la especificidad en la respuesta.

Teniendo en cuenta que el grado de reactividad cruzada se expresa como la relación entre la masa del antígeno específico (hGH) requerido para obtener un 50% de unión y la masa del compuesto que puede presentar reacción cruzada (hPRL) para obtener el 50% de unión, pudo observarse que para ambos antisueros el

porcentaje de reactividad cruzada frente a PRL fue muy inferior al 1%, lo que expresa la alta especificidad de los antisueros, evaluados contra la fracción monomérica de hGH.

c) Afinidad.- Mediante el análisis de regresión lineal de las curvas de Scatchard (Gráfica 1) los valores obtenidos para la constante de afinidad fueron:

$Ka_1 = 3 \times 10^{10}$ L/mol y $Ka_2 = 2.8 \times 10^{10}$ L/mol. valores comprendidos dentro del rango reportado en la literatura ($10^9 - 10^{12}$ L/mol)(15) para anticuerpos empleados en la mayoría de los inmunoensayos.

La buena afinidad encontrada es expresión de la avidéz de unión entre hGH y el anticuerpo y es indicativo del alto grado de sensibilidad de los inmunoensayos en que se empleen.

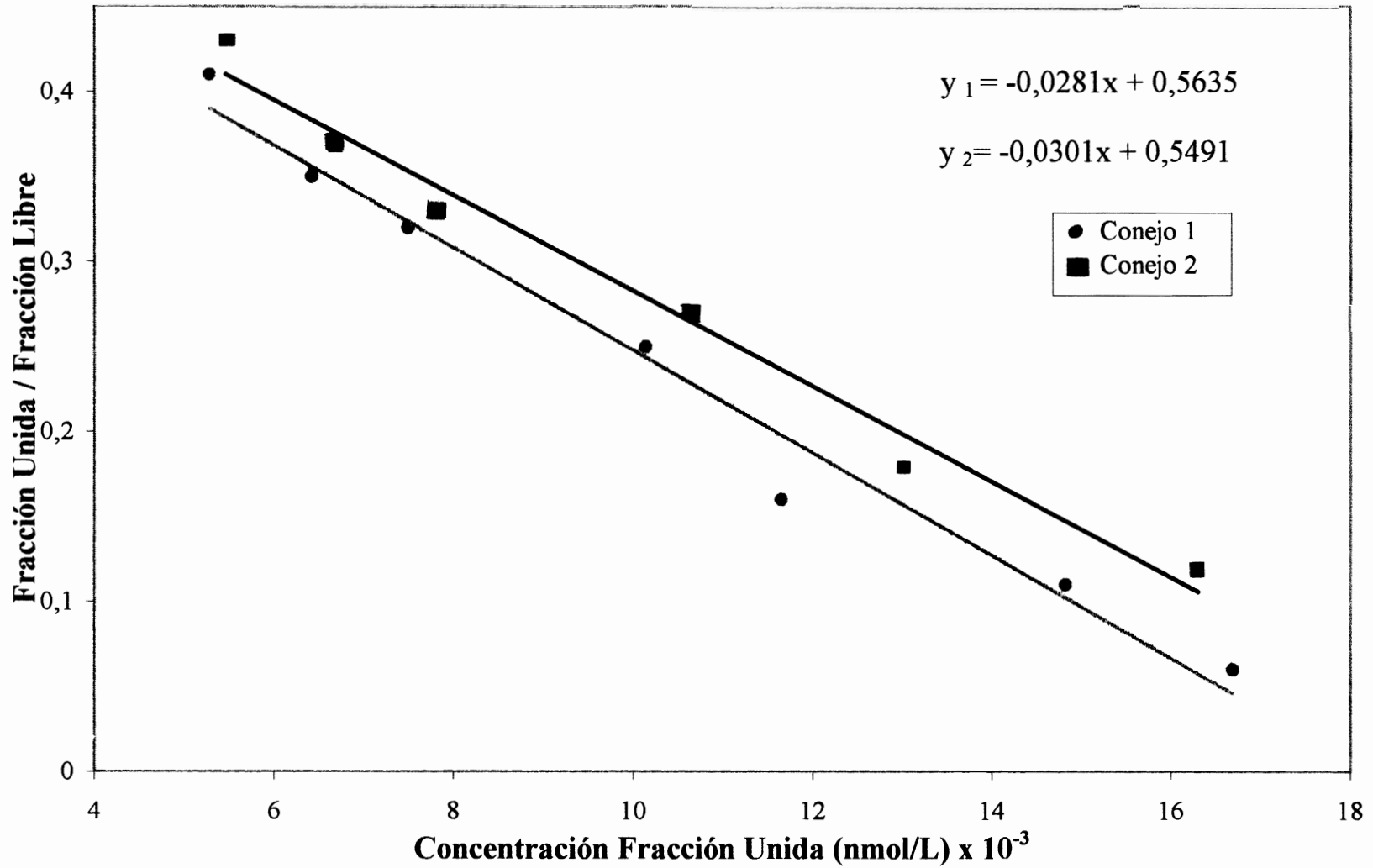
d) Actividad específica del trazador - Curva estándar.-

La actividad específica calculada mediante la metodología de sumatoria de pico fue de 72.58 mCi/mg y mediante la curva de desplazamiento del trazador al 50% de 67.02 mCi/mg, valores comprendidos dentro de los reportados en la literatura (60-110 mCi/mg)(4).

e) Curva estándar y Control de calidad del RIA utilizando el antisuero obtenido.-

GRAFICA I

GRAFICA 1.
DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD (Ka)
CURVA DE SCATCHARD



La tabla 2 muestra los resultados globales de los parámetros tenidos en cuenta como indicativos de las características del método.

TABLA 2 Resultados Generales Control de Calidad para RIA de hGH										
RIA NUMERO	CONEJO	CARACTERISTICA DEL RIA		CONTROLES DE CALIDAD (ng/ml hGH)			PENDIENTE	LINEARIDAD CURVA CALIBRACION		
		% NS	Bo	Qc BAJO	Qc MEDIO	Qc ALTO	b	Syx	F. obt.	F. Tab.
NORMA	C1/C2	≤5%	20-30%	0.92- 1.60	6.52- 9.10	21.95- 30.01	-2.30	≤0.23	≤F tab.	*
				0.74- 1.56	5.24- 8.68	13.51- 30.13				
1	1	3.24	27.96	0.94	6.81	23.07	-2.15	0.18	0.55	5.06
	2		30.41	1.07	7.75	24.69	-2.12	0.15	1.66	4.86
2	1	4.26	28.86	1.10	8.06	26.68	-2.18	0.24	0.18	5.06
	2		30.15	1.28	8.19	23.31	-2.13	0.21	0.94	5.32
3	1	1.60	29.00	1.40	8.41	23.45	-2.19	0.11	0.44	5.32
	2		30.18	0.90	8.14	30.14	-2.02	0.10	2.51	4.86
4	1	2.33	28.18	1.11	6.76	21.92	-2.20	0.10	0.30	5.32
	2		30.74	1.45	6.99	18.63	-1.98	0.09	5.21	5.32
5	1	4.32	28.44	1.24	7.16	22.00	-1.77	0.18	5.77	5.64
	2		28.52	0.78	5.72	22.40	-1.98	0.18	1.67	6.06
6	1	3.97	30.02	1.51	8.06	27.15	-2.32	0.22	0.70	5.64
	2		32.54	0.84	6.32	22.49	-1.84	0.06	1.25	5.64
7	1	2.21	27.21	1.51	6.67	22.72	-1.89	0.08	0.28	5.64
	2		29.76	1.30	6.00	18.49	-1.90	0.12	1.63	5.64
8	1	2.00	28.30	1.19	8.47	25.64	-2.56	0.11	0.68	6.06
	2		30.86	0.71	7.89	25.24	-2.24	0.22	1.45	5.64
9	1	5.13	29.55	1.06	6.59	22.41	-1.88	0.17	0.72	4.86
	2		26.32	0.83	5.81	22.70	-2.15	0.11	1.48	5.06
10	1	4.88	27.37	0.99	7.72	25.61	-2.05	0.20	3.26	5.64
	2		28.56	1.25	8.09	29.95	-1.99	0.16	0.93	5.32

* Dependiente del número de replicados (n) y del número de puntos de la curva de calibración (k).

Grados de libertad n-k y k-2 (95%)

El valor promedio del enlace no específico fue de 3.39 ± 1.2 , valor aceptable ya que se recomiendan valores menores al 5% (8). El valor promedio del porcentaje de unión máxima fué de 28.29% (C1) y 29.8% (C2), valores comprendidos dentro del rango aceptable para RIA de hGH (20-30%)(8).

Los valores de la pendiente siempre se encontraron cercanos al valor teórico (-2.303) y dentro de los límites de confianza al 95% ($-3.48 \leq -2.303 \leq -1.126$).

Los valores Syx obtenidos siempre estuvieron por debajo del valor límite (0.23)(14), indicando un buen índice de precisión para la curva dosis-respuesta.

El valor F calculado es inferior al tabulado al 95% de los límites de confianza, lo que indica que la línea de mejor ajuste es lineal para los antisueros específicos obtenidos.

Para el antisuero obtenido en C1 y C2 el nivel de confiabilidad es alto en mediciones que van desde 0.5 ng/ml hasta 10 ng/ml, rango que cubre los niveles normales de hGH en suero humano (16), constituyéndose en un indicativo de la posible utilidad de ellos en análisis clínico de hGH. En ambos antisueros el coeficiente de variación fue menor de 10% en el rango comprendido entre 1,5 y 22 ng/ml, siendo la mínima dosis detectable de 0.35 ng/ml(C1) y 0.28 ng/ml(C2), valores que se encuentran por debajo del valor mínimo de hGH empleado en la curva de calibración. En las cartas de control de calidad pudo apreciarse que las muestras testigo (control bajo, medio y alto) se encontraron bajo control estadístico lo cual evidencia la confiabilidad del método cuando se empleen en el RIA los antisueros específicos obtenidos en este trabajo.

Para determinar la incidencia de error en la evaluación de hGH al realizar diluciones y para verificar la identidad entre un analito y el patrón se efectuó la prueba del paralelismo. En las representaciones gráficas de ambos antisueros se observó un resaltable paralelismo, lo cual verifica la identidad entre el patrón y la muestra. Al comparar la curva dosis-respuesta de los antisueros

obtenidos (C1 y C2) con la obtenida utilizando un antisuero de referencia internacional pudo observarse un comportamiento muy similar. En conclusión los antisueros preparados en este trabajo presentan características de confiabilidad que permiten emplearlos en la cuantificación de hGH en RIA, ajustándose a los requerimientos de linealidad lo que permite ratificar la utilidad de los antisueros obtenidos, asegurando su futuro éxito como componente de "kits" de diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

Al programa IPICS, Universidad de Uppsala, Suecia; a Colciencias y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

1. Martin, J.B. J. Med. 288, 1384 (1973).
2. Abdel-Meguid, S. y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 6434 (1987).
3. Hadden, D.R. Acta Endocrin. Suppl. 124, 7 (1991).
4. Ilondo, M.M. y cols. J. of Clin. Endocr. and Metab. 70, 1445 (1990).
5. Vargas, A. y Velasquez, C. "Aislamiento y purificación de Hormona de Crecimiento Humana a partir de glándulas pituitarias congeladas." Tesis de grado: Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1984.
6. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Randall, R. J. Biol. Chem. 195, 265 (1951).
7. Rincón, R. y Suárez, A. "Determinación de los niveles séricos de Hormona de Crecimiento

- Humana en niños bogotanos preadolescentes normales". Tesis de grado: Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1992.
8. Dimund, R. "Radioimmunoassay of human growth hormone". En: "Manual of Clinical Immunology". American Society for Microbiology, 1976, p.197.
 9. Johansson, K.E. "Immunochemical experiments". Institute of Biochemistry University of Uppsala, Sweeden, 1974.
 10. Perl, L. y Liljas, L. *Anal. Biochem.* 65, 50 (1975).
 11. Rodbard, D. *Clin.Chem.* 20, 1255 (1974).
 12. Greenwood, F.C.; Hunter, W.H. *Nature*, 194, (1962).
 13. Camero, G. y Esquivel, D. *Revista Colombiana de Química*, 22 (1), 69 (1993),
 14. Jeffcoate, S. "Radioimmunoassay and related procedures in medicine". 2v. Viena, IAEA, 1978.
 15. Chard, T. "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology". Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1987, 6, p.2.
 16. Alsever, R. y Gotlin, M., "Handbook of endocrine test in adults and children". Year Book Medical Publishers, Inc.USA, 1976, p.6.