

Caracterización parcial de la hormona estimulante de la tiroides (hTSH), de hipófisis humana

LILIA RINCÓN H.
MARBEL GODOY H.
CECILIA ANZOLA V.*
MYRIAM S. DE GÓMEZ^{1*}

RESUMEN

En este trabajo se describe un método para la obtención y purificación de Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) de pituitaria. El contenido protéico se determinó por la técnica de Lowry y el contenido hormonal mediante el Análisis Inmunorradiométrico IRMA. La potencia inmunológica de la preparación final dió un valor de 3187 mUI/mg. Mediante PAGE-SDS se evidenció la naturaleza multicomponente de la hormona. Por isoelectroenfoque en columna se encontró el PI entre 5.72 y 6.02. La inmunotransferencia, usando métodos de detección enzimática, permitió el reconocimiento de las formas posiblemente monomérica y dimerica de la hormona.

SUMMARY

A method to obtain and purify Human Thyroid Stimulating Hormone (hTSH), from pituitary gland is described. The protein content was determined by Lowry and the hormone concentration by Immunoradiometric assay. The final preparation showed an immunological potency of 3187 mUI/mg. Analysis by SDS-PAGE demonstrated the multicomponent nature of the hormone. Electrofocusing experiments in column gave a PI in the range 5.72-6.02 and Western blot with enzyme immunodetection allowed the identification of the possible monomeric and dimeric forms of the hormone.

INTRODUCCION

La hormona estimulante de la Tiroides (hTSH) o tirotrópina es una glicoproteína de peso molecular aproximado 33000 Da, producida por las células basófilas de la pituitaria (1). En varias

publicaciones (2,3) relacionadas con su purificación se ha puesto de manifiesto su heterogeneidad. Sin embargo, no se ha establecido con claridad si la actividad tirotrópica de dichas preparaciones heterogéneas es una propiedad de uno o de varios de sus componentes.

En este trabajo se describe un método para la extracción y purificación de TSH a partir de pituitarias humanas conservadas congeladas así como también su caracterización, con el objetivo de seleccionar un material para ser empleado como preparación de referencia en el diagnóstico de esta hormona a fin de lograr una producción local de hormonas hipofisarias puras y plenamente identificadas.

PARTE EXPERIMENTAL

Extracción y purificación de TSH.

Las glándulas pituitarias fueron colectadas en el Departamento de Patología del Instituto de Medicina Legal en Santafé de Bogotá. Para la extracción se siguió el método descrito por J. Ayala y C. Carvajal (4), con algunas modificaciones que incluyen tiempos mayores de precipitación de las diferentes hormonas y pasos adicionales en la purificación de TSH (figuras 1 y 2).

Determinación de la actividad hormonal por IRMA.

Marcación del anticuerpo con NaI¹²⁵ (Amersham).

Se siguió el método de Cloramina-T (5) y el anticuerpo marcado se purificó por cromatografía de filtración en gel (Sephacryl-S-300, Pharmacia) equilibrando la columna (1x44 cm) con buffer fosfato 50 mM pH 7.4 y evaluando la elución por lecturas de radiactividad en contador gamma (Miniassay Type G-20 Iodine 125). Se obtuvo una actividad específica de 18.5 Ci/g.

IRMA.

La actividad hormonal de TSH se monitoreó a lo largo del proceso mediante el Análisis Inmunorradiométrico "IRMA", siguiendo el protocolo estandarizado por J. Ayala y C. Carvajal (4). Como estándar se usó hTSH suministrado por NIDDK (1.5 UI/mg), anti-TSH monoclonal y anti-TSH policlonal acoplado a celulosa microcris-talina (NETRIA, Inglaterra).

*1 Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

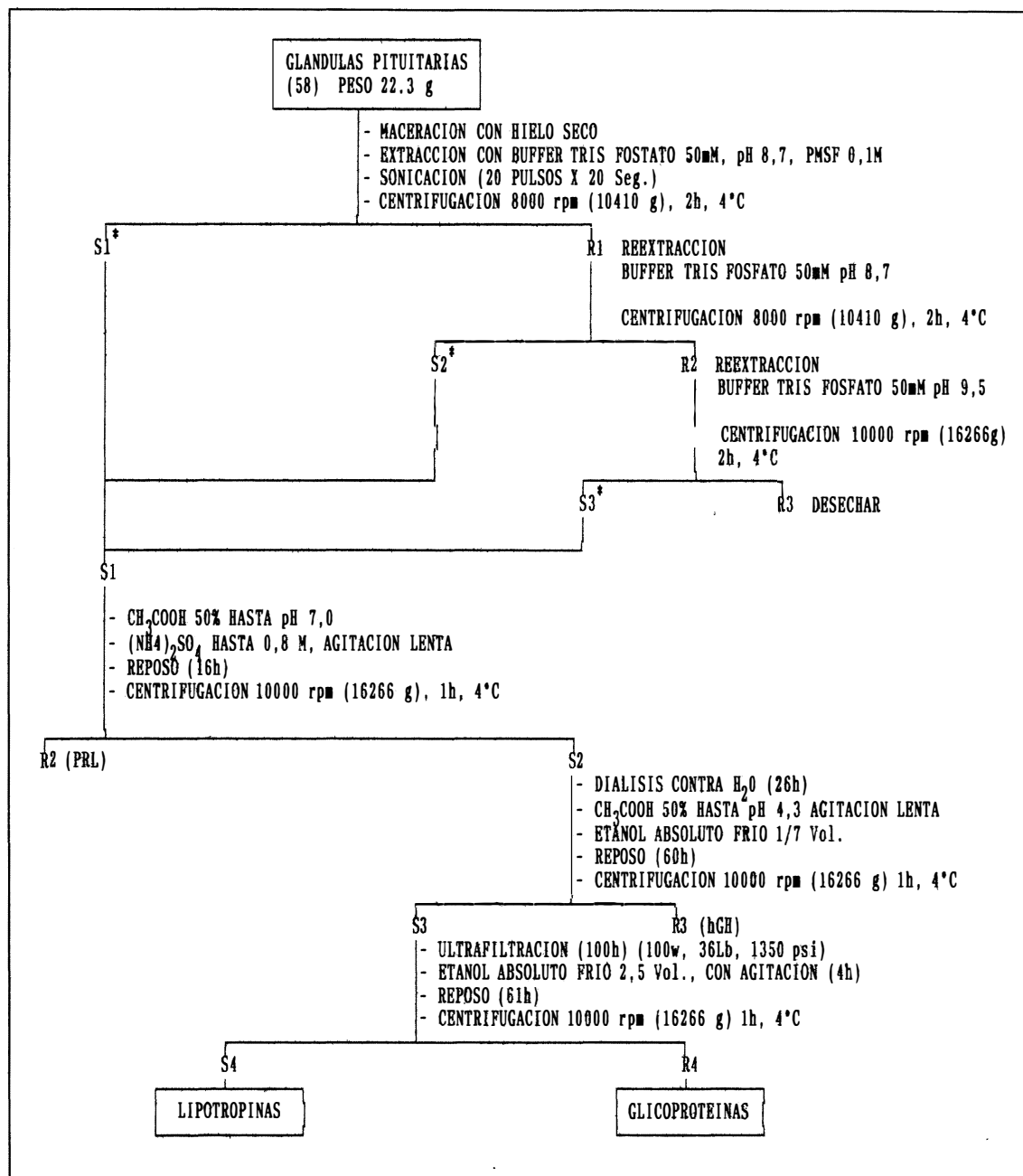


FIGURA No. 1 EXTRACCION DE HORMONAS HIPOFISIARIAS

Determinación de algunos parámetros físicoquímicos de TSH.

Peso Molecular.

La determinación del peso molecular aparente se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) después de reducción con β-

mercapto etanol (6,7). Se usaron marcadores de PM 14400-94000 Da, como patrones de referencia. Las condiciones de la electroforesis donde se presentó una mejor resolución fueron: gel de concentración: T 5.2%, C 2.4%; gel de separación: T 12.5%, C 1.54%; tiempo de corrida: 2 horas; 120 volt-30 mA-16°C; tinción: azul de coomassie y nitrato de plata.

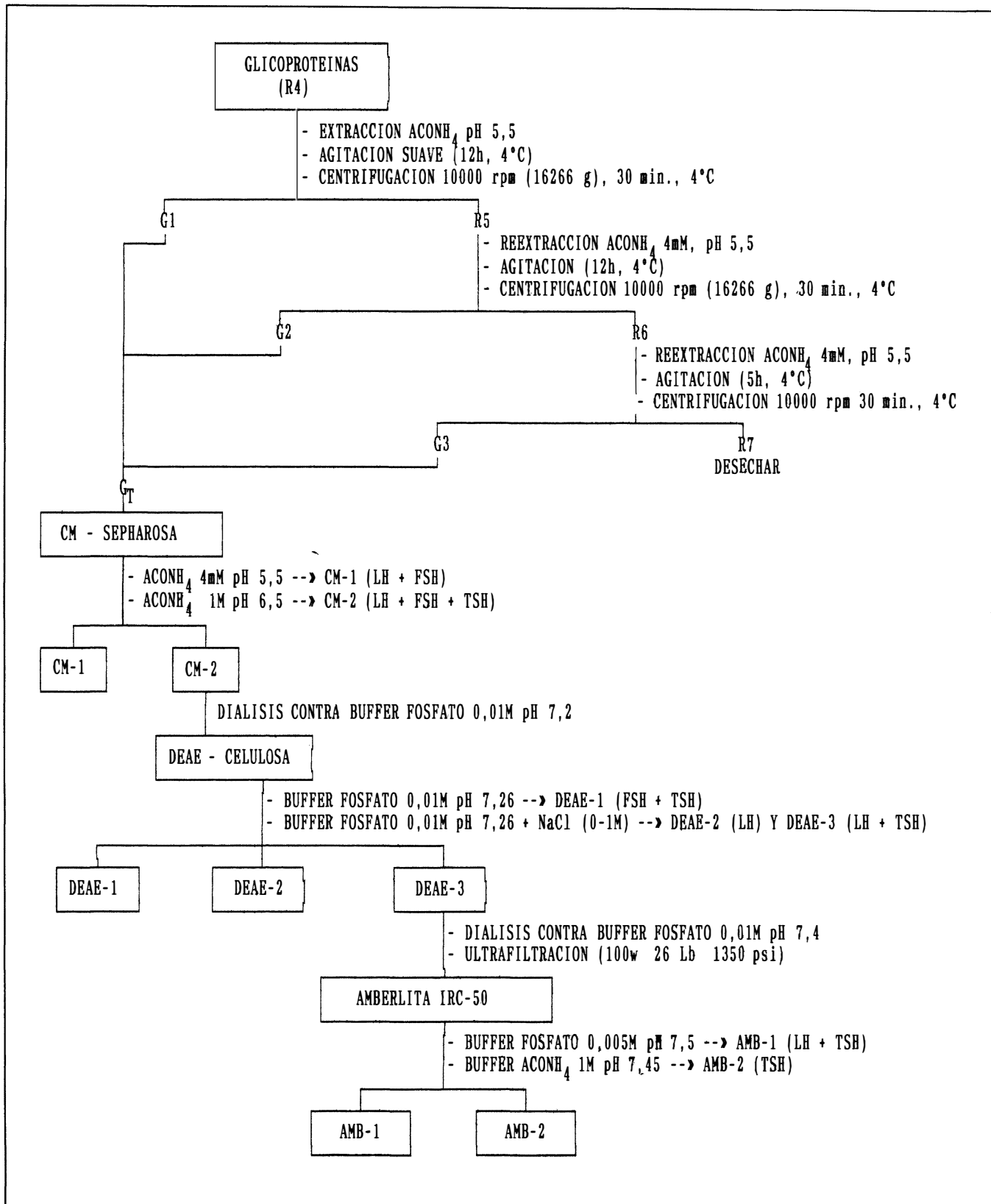


FIGURA No. 2 SEPARACION DE HORMONAS GLICOPROTEICAS

Punto isoeléctrico (PI).

Se empleó la técnica de isoelectroenfoque preparativo en columna con gradiente de densidad (8,9). Se utilizó una columna de 110 ml (LKB Bromma) con gradiente de sacarosa (50-5%) y anfolitos (2%) en un rango de pH de 3-10 (PHARMALYTE). Las corridas se hicieron a 1600 volt (37W) durante 48 horas a 4°C. El gradiente de pH se eluyó con agua destilada (3 ml/fracción) haciendo el registro de absorción al U.V. a 280 nm.

Reconocimiento Inmunológico.

La presencia de TSH se estableció mediante la técnica de transferencia de proteínas de geles de PAGE-SDS a filtros de nitrocelulosa (Western blotting) (10,11). El antígeno TSH se hizo reaccionar con anti-TSH obtenido en ratón, fijando el complejo antígeno-anticuerpo con glutaraldehído (12) y visualizando el complejo bien por incubación con anti-IgG en ratón conjugado con fosfatasa (donado por el Instituto Nacional de Cancerología) o peroxidasa (donado por el Instituto Colombiano Agropecuario) y posteriormente revelado con Fast-Blue (para fosfatasa) y 4-cloro-1-naftol (para peroxidasa) (11) o por autorradiografía, usando anticuerpo marcado radiactivamente (10).

RESULTADOS Y DISCUSION**Extracción y purificación**

La tabla I muestra el contenido protéico (determinado por el método de Lowry (12)) y la actividad hormonal de las diferentes fracciones de la extracción. Observando los valores se nota un incremento gradual de la actividad hormonal a medida que la hormona se fue purificando. Partiendo de la fracción glicoprotéica cruda (GT), su paso por CM-Sepharosa aumentó la actividad TSH aproximadamente 3 veces (fracción CM-2) y respecto a ésta, la fracción DEAE-3 aumentó su valor de actividad aproximadamente 5 veces, resultado que concuerda con el obtenido en trabajo previo (1365 mUI/mg)(4) realizado en este laboratorio. Este valor obtenido es superior a algunos reportados en la literatura (13) y comparable al valor del estándar proveniente del NIDDK (1.5 UI/mg) usado en el IRMA de la hormona.

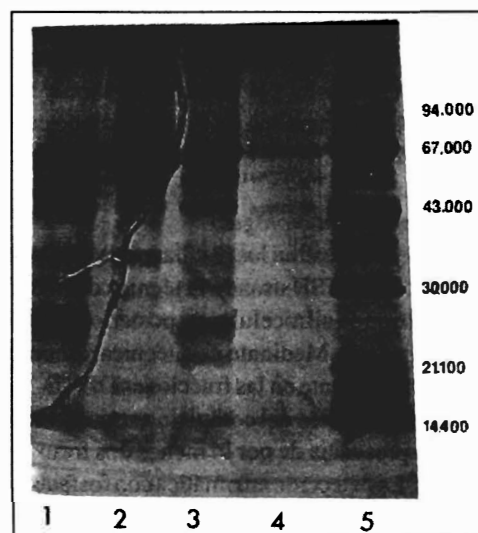
Al someter la fracción DEAE-3 a purificación adicional sobre Amberlita IRC-50, la actividad TSH fue incrementada en 3 veces su valor (AMB-2). El resultado obtenido (3.19 UI/mg) es superior a los reportados en la literatura (2.5 UI/mg (13), 3.0 UI/mg (14)) y demuestra la importancia de incluir esta etapa en la purificación de la hormona. Si se considera que TSH es la hormona glicoprotéica con menor contenido en la glándula pituitaria, la recuperación lograda en este trabajo (17.5 mg/1000 glándulas) es buena (14 mg/1000 glándulas (14), 12 mg/1000 glándulas (15)) lo que indica que la metodología adaptada en este trabajo lleva a la obtención de un mayor rendimiento de dicha hormona.

TABLA 1.**CONTENIDO PROTEICO Y ACTIVIDAD HORMONAL DE TSH EN LAS DIFERENTES FRACCIONES DE LA EXTRACCION**

FRACCION	PROTEINA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD HORMONAL (mUI/mg proteína)
S1	2986.5	28.2
S3	931.5	59.7
GT	282.9	86.8
CM-1	13.7	20.9
CM-2	90.8	231.7
DEAE-1	17.4	181.9
DEAE-2	2.8	74.7
DEAE-3	15.3	1013.1
AMB-1	3.6	97.5
AMB-2	0.48	3187.5

DETERMINACION DE ALGUNOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS DE TSH**Peso Molecular**

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

**FIGURA No 3**
DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR ELECTROFORESIS EN PAGE-SDS TINCION CON NITRATO DE PLATA

CARRIL	CANTIDAD (ug)
1 DEAE-3	5.0
2 TSH-Estándar	5.0
3 AMB-1	6.0
4 AMB-2	5.0
5 Patrones de P.M.	10.0

La fracción enriquecida en TSH (AMB-2) mostró la presencia de 6 bandas, indicando su naturaleza multicomponente. Las tres primeras bandas, que corresponden a pesos moleculares de 67100, 47500 y 42700 Da, posiblemente pueden ser formas agregadas o heterogéneas de la hormona. La banda de peso molecular 30500 Da correspondería a la hormona TSH en su forma monomérica y las bandas de peso molecular 23600 y 14300 Da, según reportes bibliográficos (16), pueden corresponder a las subunidades α y β de TSH.

La fracción DEAE-3 resolvió un mayor número de bandas, lo que demuestra lo acertado del último paso de purificación a través de Amberlita IRC-50. Las bandas adicionales pueden corresponder a contaminación de otras hormonas glicoprotéicas (17).

El patrón de TSH para yodar, el cual es de alta pureza, presenta un comportamiento muy semejante al de la fracción enriquecida en TSH (AMB-2), destacando la alta calidad y pureza de la hormona obtenida en este trabajo. Los patrones de peso molecular presentan varias bandas que pueden corresponder a degradación de estas proteínas.

Punto Isoeléctrico

La técnica de electroenfoque permite la separación de anfólitos con diferencias en su PI de solo 0.02 unidades de pH. Basados en este método de alto grado de resolución pudo establecerse, mediante dos ensayos realizados, que el PI de TSH varía en un rango de pH entre 5.72 y 6.02, valor que concuerda con datos obtenidos en investigaciones anteriores (5.5 (14) y 6.0 (18)).

Reconocimiento Inmunológico

Las figuras 4 y 5 muestran los resultados del reconocimiento inmunológico de la TSH usando la técnica de transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa y posterior detección con fosfatasa y peroxidasa. Mediante esta técnica se comprobó la identidad de TSH presente en las fracciones DEAE-3 y AMB-2 por detección enzimática del complejo antígeno-anticuerpo, demostrando la presencia de por lo menos dos formas hormonales diferentes. La detección enzimática con fosfatasa alcalina permitió observar el reconocimiento inmunológico de las formas hormonales de peso molecular 30500 y 67000 Da, correspondientes posiblemente a las formas monomérica y dimerica de TSH respectivamente. Con la enzima peroxidasa solo se detectó la forma monomérica. Estos resultados comprueban una mayor sensibilidad de la detección enzimática utilizando fosfatasa ya que la detección de anti-TSH monoclonal reconocido por anti-IgG es a su vez reconocido por un tercer anticuerpo conjugado a dos moléculas de fosfatasa, lo que incrementa la señal en la reacción cromogénica posterior

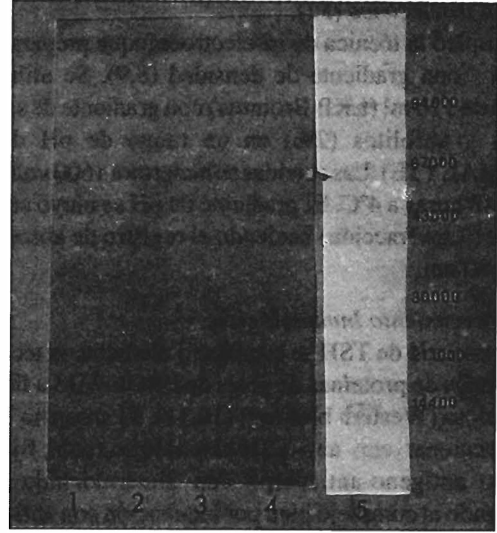


FIGURA No 4

TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA DETECCIÓN CON FOSFATASA

CARRIL

- 1 Estándar de TSH
- 2 DEAE-3
- 3 AMB-2
- 4 Control (hGH)
- 5 Marcadores de P.M.

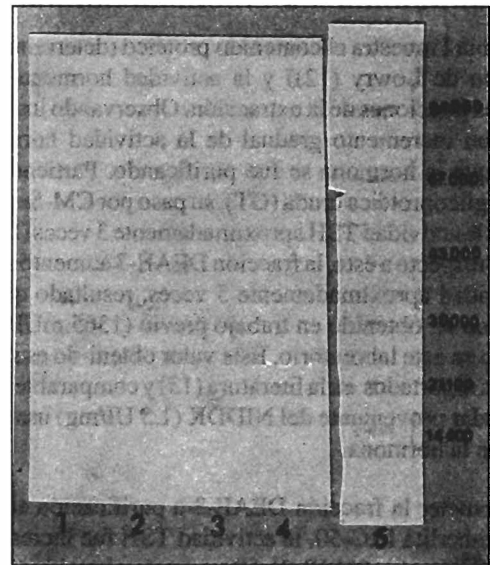


FIGURA No 5

TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA DETECCIÓN CON PEROXIDASA

CARRIL

- 1 Estándar de TSH
- 2 DEAE-3
- 3 AMB-2
- 4 Control (hGH)
- 5 Marcadores de P.M. 0

(sensibilidad 1 ng), mientras que con peroxidasa se utiliza anti-IgG conjugado directamente a ella en proporción 1:1 (sensibilidad 10 ng).

En la detección del complejo radiomarcado después de 7 días de exposición de la película a -70°C , se observó en forma tenue la banda a la altura de 30000 Da, tanto en el estándar como en la muestra AMB-2, correspondiendo posiblemente a la forma monomérica de la hormona.

Estos resultados comprueban la pureza y calidad de la hormona obtenida, la cual podrá ser utilizada posteriormente como patrón de yodación y de referencia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Programa IPICS, Universidad de Uppsala, Suecia, a Colciencias y al Depto. de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

1. F.S.GRENSPAN. *Basic and Clinical Endocrinology*, 3ed. Prentice-Hall International Inc. 1991, p.89.
2. G.JACOBSON,P.ROSS,L.WIDE. *Biochem.et Biophys. Acta*, **625**, 146 (1980).
3. G.JACOBSON,P.ROSS,L.WIDE. *Arch. Biochem. and Biophys*, **252**, 409 (1987).
4. J. AYALA, C. CARVAJAL. *Ensayos de obtención de hormona estimulante de la tiroides (TSH) a partir de hipófisis humana congelada*. Tesis. Universidad Nacional. 33 (1992).
5. W.HUNTER, F.GREENWOOD. *Nature*, **194**, 465 (1962).
6. J.F.PODUSIO,D.RODBARD. *Anal. Biochem*, **101**, 394 (1980).
7. V.K.LAEMI. *Nature*, **227**, 680 (1970).
8. L.K.B. *Electrofocusing Seminar notes*. LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden (1979).
9. L.K.B. *Electroenfoque preparativo en gradiente de densidad*. LKB-Producter AB,Bromma, Sweden (1979).
10. J. SYMINGTON, M.GREEN, K.BRACKMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **78**, 177 (1981).
11. H.TOWBIN,J.GORDONN. *J.Immunol.Methods*, **72**, 313 (1984).
12. N.IREKAGI,R.KENNET. *J. Immunol. Methods*, **124**, 205 (1989).
13. G.CHAPMAN,ET AL. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **53**, 1008 (1981).
14. S.A.HARTREE, ET AL. *J. Endocrinol*, **53**, 95 (1972).
15. CH.MCLEAN,ET AL. *The pituitary*. Ed. by Berardewell and Robertson. Betler Worths., 1980, p.364.
16. L.E. REICHERT, G.M.LAWSON. *Endocrinology*, **92**, 1034 (1973).
17. A. PÉREZ, C. BEDOYA. *Ensayos de caracterización de la hormona luteinizante (LH) a partir de hipófisis humana congelada*. Tesis. Universidad Nacional. 25 (1992).
18. P. ROOS, ET AL. *Biochem. et Biophys. Acta*, **379**, 247 (1975).