

OPTIMIZACION DE UN METODO DE RADIORRECEPTOANALISIS PARA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA.

Guillermo Ramírez* y Myriam S. de Gómez
Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Keywords: Human growth hormone, membrane receptor.

RESUMEN

Se realizó la optimización de un método de radiorreceptoanálisis (RRA) para hormona de crecimiento humana (hGH), utilizando una preparación parcialmente purificada de receptores aislados de hígado de rata hembra. Se compararon dos métodos para el aislamiento y dos sistemas de homogenización, encontrándose como mejores condiciones la centrifugación a 30000g y suspensión de las membranas en buffer fosfosalino (PBS). Los receptores hepáticos obtenidos de rata macho dieron una respuesta muy pobre. Se optimizaron los parámetros para la interacción hormona-receptor, tales como tiempo y temperatura de incubación, método de separación de la fracción libre y enlazada de la hormona, y eliminación de la hormona endógena. El análisis de Scatchard mostró la existencia de una sola clase de sitios ligadores de alta afinidad con una constante de disociación K_d igual a 0.301nM.

ABSTRACT

A radioreceptorassay (RRA) for human growth hormone (hGH) was standardized utilizing partially purified receptors from the liver of female rats. Two methods for isolation and two homogenization systems were compared, the best results obtained by centrifuging at 30000g and suspending the membranes in phosphosaline buffer (PBS). A poor response was observed with receptors from liver of male rats. The parameters for the hormone-receptor interaction like time, temperature, presence of endogenous hormone and separation of bound and free fractions were optimized. The Scatchard analysis showed the existence of a single class of high affinity binding sites, with a dissociation constant, K_d of 0.301 nM.

INTRODUCCION

La hormona de crecimiento humana (hGH) es una familia de péptidos muy heterogénea (1), habiéndose reportado el aislamiento de numerosas variantes tanto de carga como de masa. La actividad inmunológica y biológica de estas variantes difiere de la que presenta la forma principal de la hormona (22K-hGH). Recien-

temente se ha propuesto (2) que la hGH es una prohormona, que al ser procesada en el organismo da lugar a péptidos de menor peso molecular, que poseen cada uno alguna de las actividades que se han observado para la hGH en el organismo.

La medida de la actividad biológica de la hGH y de sus variantes es un paso crucial cuando se intenta la caracterización de cada uno de los péptidos aislados. Para este fin se han utilizado diversos métodos, tanto in vivo como in vitro (1), la mayoría de los cuales requieren el uso de animales hipofisectomizados.

Se han utilizado receptores de hGH aislados de hígado (3,4) o glándula mamaria (5) de diferentes animales con el fin de medir la bioactividad de las preparaciones de hGH o de sus variantes.

En este trabajo se ha realizado la evaluación de diversos parámetros que afectan el receptoanálisis, utilizando receptores hepáticos aislados de rata, para obtener las mejores condiciones para la determinación de la bioactividad de la hormona y sus variantes aisladas de pituitaria.

MATERIALES Y METODOS

Materiales biológicos y reactivos especiales

Ratas Fisher 344, 3 a 4 meses de edad, 250 a 400 g de peso. Hormona de crecimiento humana, lote NIAMDD-hGH-I-1 y NIAMDD-hGH- RP-1 (2,2 UI/mg); prolactina humana, lote NIADDK-hPRL-I-7 (3,5 UI/mg); anti-hGH, lote NIAMDD-anti-hGH-1 (donados por el Dr. S. Raiti, NIAMDD-NPPH, Maryland University School of Medicine, USA) ^{125}I -Na obtenido de Amersham (Gran Bretaña) o New England Nuclear (DuPont, USA).

Preparación de ^{125}I -hGH

Se usó el método de cloramina T (3), para la marcación de la hormona con yodo radioactivo. La purificación se hizo en una columna de Ultrogel AcA-54 (1,2 x 100 cm), eluyendo con PBS-bSA (NaCl 150 mM, Fosfato 50 mM, albúmina de suero bovino (bSA) 0,1%, azida de sodio 0,1%) pH 7,4, a una velocidad de flujo de 10ml/hora. La calidad del hGH marcada se determinó midiendo la actividad inmunológica (unión del trazador a un exceso de anti-hGH) y la actividad específica (autodesplazamiento en radioinmunoanálisis) como describen Cadman y cols. (6), utilizando un radioinmunoanálisis (RIA) específico (7).

Preparación de las membranas de hepatocito

El hígado fue homogenizado en sacarosa 0,3 M (5 ml/g de tejido) mediante disrupción ultrasónica (6 pulsos, 10 seg, 200 Watt), luego se centrifugó 15 minutos a 1500xg y la suspensión sobrenadante se dividió en dos porciones: una fue centrifugada a 30000xg, 30 min., resuspendiendo el precipitado en buffer Tris-HCl (25 mM, pH 7,6) o en PBS (fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y la otra fue purificada parcialmente por filtración en gel (Sepharosa CL-4B, 35x38 mm)

eluyendo con buffer Tris-HCl o PBS (velocidad de elución 1 ml/min). Las suspensiones membranales almacenadas a -20°C se pueden utilizar hasta 12 meses después de preparadas. La proteína total se determinó por el método de Lowry (9).

Determinación de la capacidad de enlace de los receptores

200 ul suspensión de membranas (300-400ug de proteína), 50 ul de hGH radioactiva (25000 cpm) y 50ul de buffer de hGH no marcada (600 ng) se incubaron a temperatura ambiente en un agitador rotatorio durante dos horas, se adicionó 2.5 ml de solución buffer de acetato 25 mM, pH, 5,4 a 0°C, para detener la reacción y se centrifugó inmediatamente a 2500xg durante 15min. Se determinó la radioactividad unida a las membranas.

Comparación de los receptores aislados en membranas hepáticas de rata macho y hembra.

Se aislaron membranas de hígado de hembra y macho por medio de centrifugación a 30000xg, resuspendiéndolas en buffer Tris-HCl o PBS. Se determinó la capacidad de enlace como se indicó anteriormente. También se midió la capacidad de enlace de los receptores en presencia de cantidades variables de iones calcio (entre 1 y 10 mM de concentración final), bSA (entre 0.05 y 0,5%) y EDTA (entre 1 y 20 mM), manteniendo las demás condiciones de incubación. Se hizo la eliminación de la hormona endógena mediante la adición de MgCl₂ (concentración final 2M y 4M) incluyendo un control sin tratar y tratado con agua.

Determinación de las condiciones adecuadas para la reacción Hormona-Receptor

Se establecieron las condiciones adecuadas para efectuar la reacción: tiempo y temperatura de incubación, separación de las fracciones libre y ligada de la hormona, rango de concentración y especificidad del receptor por hGH. También se hicieron determinaciones de control de calidad (variación inter- e intra- análisis y paralelismo del comportamiento con diferentes preparados de hGH).

RESULTADOS Y DISCUSION

Marcación de hGH con ¹²⁵I-NaI

La actividad inmunológica de la hormona marcada osciló entre 75 y 85% del trazador adicionado durante el experimento. Estos valores indican que la hormona conserva sus características inmunológicas a pesar del tratamiento a que se sometió la proteína y a la incorporación del yodo en su estructura. Se ha reportado (3) que valores del orden de los obtenidos en este trabajo permiten utilizar la hormona marcada en radiorreceptoanálisis (RRA).

En la determinación de la actividad específica de la hormona marcada, utilizada en la realización de este trabajo, se obtuvieron valores en el rango de 70-100 uCi/ug (2,47-3,53 MBq/ug) similares a los reportados por otros investigadores en el área (3, 6, 10).

Preparación de las membranas de hepatocito de rata.

Las cantidades de membranas (expresadas como proteína total) obtenidas en los dos métodos ensayados en este trabajo, así como los resultados de la determinación de la capacidad de enlace (proteína adiconada a la mezcla de incubación, enlace total y enlace específico) se indican en la Tabla No. 1.

TABLA No. 1
CANTIDAD Y CAPACIDAD DE ENLACE DE LAS MEMBRANAS
HEPATICAS OBTENIDAS

Buffer	Método de aislamiento	Peso hígado (g)	Proteína membranaral (mg)	Capacidad de enlace		
				Proteína (ug)	ET* (%)	EE** (%)
PBS	Centrifugación	2.75	60.7	351	31.0	64.9
	Filtr. gel	2.75	93.3	299	24.6	57.5
Tris-HCl	Centrifugación	2.25	54.5	356	15.8	23.0
	Filtr. gel.	2.25	60.8	240	19.2	35.9

*ET: Enlace total; **EE: Enlace específico.

En estos resultados se observa que la filtración en gel conduce a una mejor recuperación de proteína membranaral que en el caso de centrifugación y aunque esta técnica ha dado buenos resultados en la purificación de membranas de eritrocitos (8), en el presente caso se presentaron dificultades metodológicas, que obligaron a discontinuar su uso. En los demás experimentos realizados se utilizó la centrifugación a 30000xg y suspensión posterior de las membranas en PBS.

Comparación de los receptores para hGH presentes en membranas hepáticas de rata macho y hembra.

Los resultados para las membranas aisladas de hígado de rata macho (11 g) y rata hembra (14 g) aparecen en la Tabla No. 2.

TABLA No. 2
DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE ENLACE DE RECEPTORES
 AISLADOS DE RATA MACHO Y RATA HEMBRA

Origen	Membranas		Proteína en incubación (ug)	ET (%)	EE (%)
		Buffer			
Macho		PBS	396	10.5	18.0
		Tris-Cl	374	20.0	12.5
Hembra		PBS	366	40.3	55.0
		Tris-Cl	344	41.4	16.0

Se observa que las membranas provenientes de rata hembra presentan una mejor respuesta a la hGH, con porcentajes de enlace total 2,5 veces más altos.

Aunque Kyle y col. (3) recomiendan el uso de los receptores obtenidos de rata macho, debido a su mayor carácter somatogénico, los resultados aquí obtenidos indican que con los niveles de proteína membranal utilizados (16 veces menores) la respuesta de los receptores de macho frente a la hGH es pobre. La capacidad de enlace determinada para los receptores aislados de rata macho concuerda con resultados reportados (11), donde se demostró que la cantidad de receptores en la superficie celular está regulada por la concentración extracelular de hormona de crecimiento, con lo cual hay momentos en los que la concentración de las moléculas receptoras es muy baja.

El ensayo de la adición de iones calcio, EDTA y BSA a la mezcla de incubación, que ha sido recomendada en varios reportes (3,4,5), no mostró una mejoría en la capacidad de enlace. En todos los casos se observó un incremento de las interacciones inespecíficas al adicionar calcio debido probablemente a que el metal contribuye a estabilizar las interacciones entre las dos proteínas.

La eliminación de la hormona endógena (Tabla No. 3) no condujo a un aumento significativo en el enlace específico en membranas de rata hembra, en cambio se duplicó con las provenientes de rata macho, al adicionar agua o cloruro de magnesio.

TABLA No. 3
EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS MEMBRANAS CON MgCl₂
PARA ELIMINAR LA HORMONA DE CRECIMIENTO ENDOGENA (rGH)

	Rata Macho			Rata Hembra		
	Proteína (ug)	E T (%)	E E (%)	Proteína (ug)	E T (%)	E E (%)
Control	441	9.2	14.2	422	27.5	49.4
Agua	390	13.5	26.0	366	23.2	53.5
MgCl ₂ 2M	367	16.1	33.4	396	18.1	33.2
MgCl ₂ 4M	440	17.0	22.5	374	18.9	45.3

Los resultados obtenidos son similares a otros reportados (11,12), donde el tratamiento de las membranas de hígado de rata macho con cloruro de magnesio inducían aumento del enlace específico. Baxter y cols. (12) reportan que las membranas de rata hembra no se afectan por el tratamiento con MgCl₂.

Determinación de las condiciones adecuadas para la reacción hormona-receptor.

Los resultados de los ensayos realizados con membranas de rata hembra (380 ug de proteína/tubo) en buffer PBS incubando 1-6 horas a temperatura ambiente con agitación permanente y 2-24 horas a 4°C, se indican en la Figura No. 1.

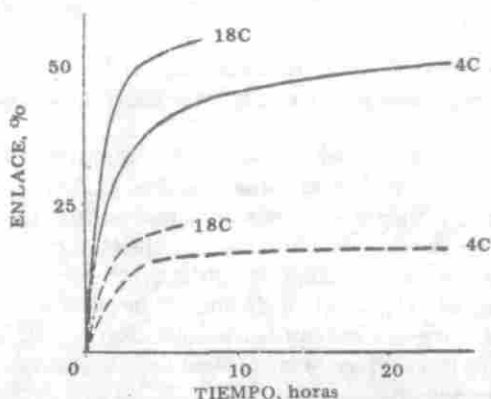


Figura 1. Efecto de tiempo y temperatura de incubación en el enlace total (—) y específico (---) de hGH a los receptores membranales.

Se observa que al incubar a 4°C, los valores del enlace total y enlace específico tienden a estabilizarse después de 6 horas. Cuando el proceso se efectúa a temperatura ambiente y con agitación permanente, luego de 2 horas se han alcanzado valores de enlace similares a los logrados en la incubación por 6 horas a 4°C, y al cabo de 4 horas a temperatura ambiente los resultados son mejores que al incubar 24 horas a 4°C.

Cuando la incubación a temperatura ambiente se prolonga hasta las 6 horas los incrementos en los valores de enlace total y específico son bajos, por lo cual se podría recomendar que la incubación del receptoanálisis se realice por un período de 4-6 horas a temperatura ambiente y con agitación permanente. La incubación por 16 horas no se ensayó debido a que la degradación de los componentes de las membranas se vería favorecida por la exposición tan prolongada a temperatura ambiente, lo cual no sucede con preparaciones bastante puras de receptores como las usadas por Roos y cols. (13).

Para la separación de las fracciones libre y ligada de la hGH se ensayó la adición de buffer acetato 25mM, pH 5,4 a 0°C o solución de polietilenglicol (6000) 7,4%. Los resultados obtenidos no mostraron una diferencia significativa indicando que cualquiera de los dos reactivos puede ser empleado en la separación de las dos fracciones. Se eligió el buffer acetato por su menor costo. El rango útil de trabajo se situó entre 0,8 y 50 nM (5 y 250 ng de hGH en la mezcla de incubación) (Fig. 2).

La variabilidad intra e interanálisis dio valores alrededor del 10%, semejantes a los reportados por otros autores (4).

Prueba de Paralelismo

Para realizar esta determinación se utilizaron dos muestras hGH obtenidas de hipófisis y purificadas por cromatografía de intercambio iónico y hGH patrón (NIAMDD-hGH-1 (FP-4793B)), como estándares en la curva de calibración. Con los datos obtenidos se realizó una gráfica logit (% enlace) vs. log (hGH) y se determinó la pendiente de las rectas por regresión lineal. La prueba estadística

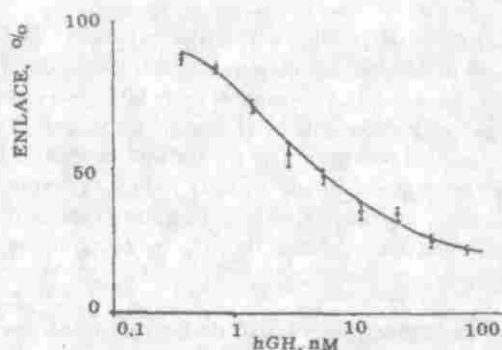


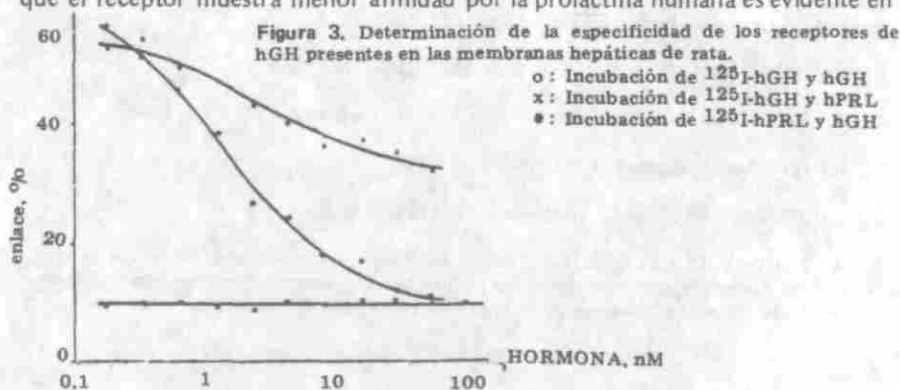
Figura 2. Curva de calibración para la determinación de hGH por receptoanálisis (\bar{x} : promedio \pm SD; n = 4).

del paralelismo (valor t de Student) (14) mostró que no había diferencias significativas en los valores de las pendientes y en el comportamiento de los receptores con la hGH patrón y las muestras purificadas en el laboratorio. Este hallazgo es importante, ya que el método de RRA estandarizado en este trabajo podrá ser utilizado en la evaluación de la bioactividad de la hGH de pituitaria.

Determinación de la especificidad del receptor por la hormona de crecimiento y la prolactina humanas.

Los resultados de este experimento se indican en la Figura No. 3. Se observa una buena reacción de los receptores membranales con la hGH, en tanto que las respuesta a la hPRL es pobre. Cuando se trata de desplazar ^{125}I -hGH de los sitios de unión utilizando hPRL, la masa de esta hormona necesaria para lograr un efecto similar al de la hGH es varias veces mayor (para lograr el desplazamiento de 50% de ^{125}I -hGH de los sitios receptores debe estar presente 4.84 nM de hGH o 94.8 nM de hPRL). Esto indica una alta afinidad del receptor por la hGH que solo se afecta por la presencia de hPRL en altas concentraciones.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Kyle y cols. (3), quienes utilizaron receptores de rata macho y los de Bonifacino y cols. (15) y Roos y cols. (13), quienes trabajaron con receptores de rata hembra. Una confirmación de que el receptor muestra menor afinidad por la prolactina humana es evidente en



la curva de desplazamiento de hPRL radioactiva por hGH. Como el receptor muestra mejor afinidad por la hGH al efectuar la incubación de hPRL radiactiva y hGH, la hGH ocupa todos los sitios receptores y la hPRL presente en muy baja proporción será incapaz de desplazar la hGH de esos sitios, con lo cual la hormona radioactiva ocupará sitios receptores de baja afinidad o sitios de unión inespecífica. Como el porcentaje del enlace es muy bajo y la forma de la curva es casi plana se puede inferir que la unión de la hormona radioactiva ocurrió con componentes de membranas que carecen de carácter receptor para este tipo de compuestos.

Determinación de las constantes de afinidad de los receptores membranales por la hGH y hPRL.

Mediante el análisis de Scatchard (16) se determinó la presencia de sitios ligadores de alta afinidad, cuya constante de disociación K_d fue 0.301 nM ($n=4$). Este valor es similar a otros valores reportados (0.112 y 0.370 nM, (13); 0.22 nM, (15)). El dato obtenido para la constante indica que el receptor presente en las membranas de rata tiene una buena afinidad por la hGH, especialmente cuando se compara con valores reportados para las hormonas aisladas de la hipófisis de rata (para rPRL oscila entre 20 y 116 nM y para rGH entre 1.29 y 11.8 uM (13)). A pesar de que este trabajo se efectuó con preparaciones prácticamente crudas de receptores, el valor de la constante de afinidad obtenido es muy similar al reportado por Roos y cols. (13), quienes utilizaron receptores aislados de hígado de rata purificados mediante cromatografía de afinidad.

AGRADECIMIENTOS

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

BIBLIOGRAFIA

1. R.K. CHAWLA et al., *Ann. Rev. Med.*, 1983. **34**, 519.
2. M.A.M. SeELEM, *Endocrinology*, 1988. **123**, 1565.
3. C.V. KYLE et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1982. **169**, 368.
4. T. TSUSHI M.A., H.G. FRIESEN, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1973. **37**, 334.
5. R.P. SHIU et al., *Science*, 1963. **180**, 968.
6. H. CADMAN, M. WALLIS, *Biochem J.*, 1981. **198**, 605.
7. A. VARGAS, C. VELASQUEZ. "Aislamiento y caracterización de hormona de crecimiento humana a partir de glándulas pituitarias congeladas", Tesis de grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 1984.

8. G. FROMAN et al., *Prep. Biochem.*, 1980, **10**, 59.
9. R.K. SCOPES, "Protein Purification: principles and practice", 1st. Ed., Springer Verlag, New York, 1981.
10. G. BAUMANN et al., *Endocrinology*, 1988, **122**, 976.
11. T. BICK et al, *Endocrinology*, 1989, **125**, 1711.
12. R.C. BAXTER et al., *Endocrinology*, 1982, **111**, 1020.
13. P. ROOS et al., *Prot. Biol. Fluids*, 1987, **35**, 277.
14. R. STEEL, J. TORRIE, "Bioestadística", 2a. Edición, Mc-Graw Hill, Bogotá, 1985. cap. 10.
15. J.S. BONIFACIO et al., *Biochem. J.*, 1981, **194**, 385.
16. P. MUNSON, D. RODBARD, *Anal. Biochem.*, 1980, **107**, 220.