

ESPECIES DE PROLACTINA INMUNORREACTIVA EN SUERO DE HIPERPROLACTINEMIA

Aureliano Cruz*, Gustavo Forero*, Stella de Rodríguez** y Myriam S. de
Gómez**

*Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes

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

Keywords : Hyperprolactinemia, Macroprolactinemia

RESUMEN

La posible existencia de formas moleculares de prolactina (PRL) diferentes a la monomérica (23 K) se investigó en tres mezclas de suero femenino. (normal, embarazo y adenoma). Las muestras de suero se fraccionaron en Sephadex G-100 y la actividad inmunológica se estableció por medio de Radioinmunoanálisis (RIA) específico. La recuperación global del método fue de 70%. Los sueros hiperprolactinémicos (embarazo y adenoma) presentaron además de la especie monomérica, otras formas con actividad hormonal localizadas en el rango de elución de pesos moleculares entre 60K y 150K que representan un 35% del total. En contraste, el suero normal sólo presentó la forma 23K.

En todos los casos se observó la naturaleza multicomponente de la hormona, encontrándose hasta 3 picos en la zona de elución de la forma monomérica denominada (Prolactina pequeña) y por lo menos tres o cuatro picos en la correspondiente a la agregada (prolactina grande).

Estos resultados sugieren la posible relación entre la aparición en el suero de prolactina grande y estados fisiológicos y/o patológicos asociados con una señal elevada de prolactina.

ABSTRACT

The possible presence of PRL forms different to the monomeric one (23 KDa) was investigated in three female serum pools (normal, pregnancy and adenoma). The serum samples were fractionated on Sephadex G-100 and the immunological activity was established by specific RIA. The overall recovery was 70%.

The hyperprolactinemic serum (pregnancy and adenoma) showed in addition to the monomeric PRL, other species with hormonal activity in the MW range of 60 KDa to

150 KDa, being 35% of the total PRL. In contrast, in normal serum only the 23KDa form was detected.

In all cases the multicomponent nature of the hormone was observed, three peaks were found in the elution zone corresponding to the monomeric form (Small Prolactin) and at least three to four peaks in that corresponding to the aggregated form (Big Prolactin).

These results suggest a possible relationship between the presence in serum of the Big PRL and physiological and/or pathological conditions associated with increased prolactin serum levels.

INTRODUCCION

La Prolactina (PRL) es una hormona hipofisiaria que interviene en un gran número de procesos. Existen muchos estudios dirigidos a esclarecer la gran variedad de sus efectos biológicos y actualmente se está dedicando mucha atención a lo relativo a supolimorfismo bioquímico. En suero humano se ha encontrado predominantemente la forma monomérica de PRL de peso 23 Kd, de la cual se han encontrado 3 isómeros de carga (1) y además formas diméricas y agregados mayores (2). Se ha reportado la existencia de PRL glicosilada en suero humano (3,4) de la cual no se conoce todavía su significado fisiológico.

Por otra parte, en la pituitaria, el fluido amniótico el mismo suero humano y en algunas especies animales (rata, ratón,) se han identificado fragmentos proteolíticos de PRL de pesos moleculares 8,16, 18 y 21 Kd.

En este trabajo se analizó la heterogeneidad de la PRL en el suero femenino de individuos normales, de mujeres embarazadas y de pacientes hiperprolactinémicos con sospecha de adenoma, con el fin de establecer una posible relación entre estas formas y estados fisiológicos y/o patológicos asociados con una secreción elevada de PRL.

Las especies inmunorreactivas se identificaron por Radioinmunoanálisis (RIA) específico de las fracciones del suero separadas por cromatografía de filtración en gel.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos Especiales

Los reactivos para el RIA de PRL fueron donados por el

Dr.Salvatore Raiti del National Hormone and Pituitary Program, NIDDK, U.S.A.

Prolactina humana, lote NIDDK, LPRL17AFP9900.

AntiProlactina obtenida en conejo, lote NIDDK, Anti-PRL 3AFPC-11580.

Anti Ig G donada por el Hospital Militar Central, Bogotá.

¹²⁵I. Na. Amersham, Inglaterra.

Recolección de Muestras

Las muestras fueron colectadas con los pacientes en ayunas y en horas de la mañana.

- Sueros Normales : se recogieron trece muestras de suero de mujeres con un promedio de edad de 25 años sin antecedentes de abortos, alteraciones hormonales o fisiológicas.
- Sueros Hiperprolactinémicos por embarazo : Se recogieron siete muestras de mujeres embarazadas, todas de último trimestre, cuyas edades oscilaban entre 18 y 30 años.
- Sueros Hiperprolactinémicos con patología asociada a adenoma hipofisiario de elevada secreción de PRL, se recolectaron dieciocho muestras de mujeres con edad promedio de 25 años.

Marcación de Prolactina

Para la marcación de Prolactina se utilizó el método de cloramina T con ¹²⁵I (5). La purificación se hizo en una columna de Sephacryl S-200 (1,0x40 cm) eluyendo con buffer PBS-BSA (Fosfato 50 mM, conteniendo NaCl 1%, 0.1% de BSA, albumina sérica bovina, azidato de sodio 0,1%) pH 7.4 Colectando fracciones de 0.5 ml.

La actividad específica de la PRL marcada se calculó midiendo la cantidad de yodo incorporado en relación a la masa de la hormona.

Radioinmunoanálisis de PRL

La determinación de la potencia inmunológica se hizo mediante Radioinmunoanálisis específico para Prolactina, para lo cual se usó el método descrito en Rodríguez S. de (5).

Se determinó el título del primer anticuerpo, Anti PRL escogiendo la máxima dilución en la cual se enlaza entre un 30 a un 50% del trazador en ausencia de hormona no marcada y la dilución del segundo anticuerpo (Anti IgG) donde se obtiene el máximo enlace.

Separación de Prolactina de Suero Humano

Se usó una columna de Sephadex G-100 (1,5x90 cm) eluyendo con buffer Acetato de Amonio (50 mM, EDTA 5 mM, azida de sodio 10 mM) pH 8.5, a una velocidad de flujo de 7 ml/hora.

El contenido de proteína total se determinó según el método de Lowry (6).

RESULTADOS Y DISCUSION

Marcación de hPRL con ^{125}I . y Purificación :

En la purificación de la hormona marcada se obtuvo el perfil de elución mostrado en la Fig.1 el cual presenta 4 picos a cada uno de los cuales se les determinó actividad inmunológica dando un valor de 45% para el pico II, valor que se encuentra dentro del rango aceptable para un Radioinmunoensayo (7), por lo tanto, se usó este pico II como trazador en el análisis.

En la determinación de la actividad específica de la hormona marcada, se obtuvo un valor de $22.5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, valor que se ajusta a los rangos normales reportados (7).

Determinación de hPRL por Radioinmunoanálisis :

Se determinó el título del primer y segundo antisuero, obteniéndose una titulación final óptima para el primero de 1:30000 y de 1:16 para el segundo antisuero, en presencia de suero normal de conejo en una concentración de 2% . Como trazador se usó la mezcla del pico II de la marcación de la hormona.

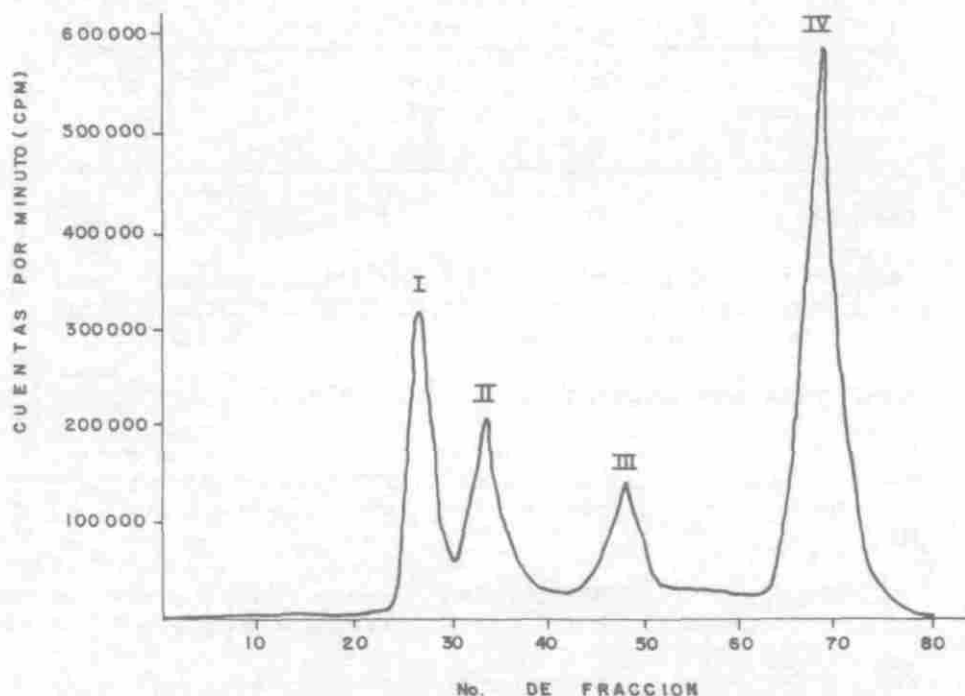


FIGURA 1.- PURIFICACION DE PROLACTINA MARCADA EN SEPHACRYL S- 200

Se realizó la curva de calibración de la Prolactina mediante el empleo de estandar en un rango de 1.25 ng a 100 ng.

El cálculo de los resultados del RIA se hizo en base a la transformación logitlog, utilizando el programa desarrollado por el Dr. Sten Z. Cekan, Hospital Karolinska, Suecia.

Recolección de Muestras.

En la tabla 1 se muestran los contenidos de proteína total y de hPRL en los sueros estudiados antes y después de concentrarlos mediante ultrafiltración.

TABLA No. 1
DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL Y PROLACTINA
EN LOS SUEROS ANALIZADOS

	Proteína Inicial	Proteína Postconcentración	Proteína Total	hPRL ng/ml
	mg/ml	mg/ml	(mg)	
NORMAL	105.1	239.7	838.9	20.7
EMBARAZO	81.4	170.4	1192.8	944.5
ADENOMA	107.5	178.5	1071.0	715.5

Separación de PRL de Suero Humano :

Se hizo una calibración de la columna de Sephadex G 100 mediante la determinación del volumen muerto, volumen total y proteínas de peso molecular conocido: albúmina sérica bovina (64 Kd) Lisozima (15Kd) y Prolactina marcada (23 Kd).

El perfil de elución de las proteínas se muestra en la fig.2.

La separación de Prolactina en cada uno de las mezclas concentradas de suero normal, embarazo y adenoma se realizó aplicando 2 ml de muestra a la columna de sephadex G 100, cuyo contenido de proteína y hormona se observa en la Tabla No.2.

Los perfiles de elución de la PRL obtenidos en los tres tipos de mezclas de sueros fraccionados en la columna de Sephadex G-100 se muestran en la fig.3.

Figura 3: Cromatografía de filtración en gel de prolactina de suero normal (A), Embarazo (B), ademona (c). Las flechas superiores representan la posición de proteínas de peso molecular conocido

En el suero normal se encontró un solo pico de PRL inmunorreactiva correspondiendo a la forma monomérica principal (23 Kd), mientras que en los sueros

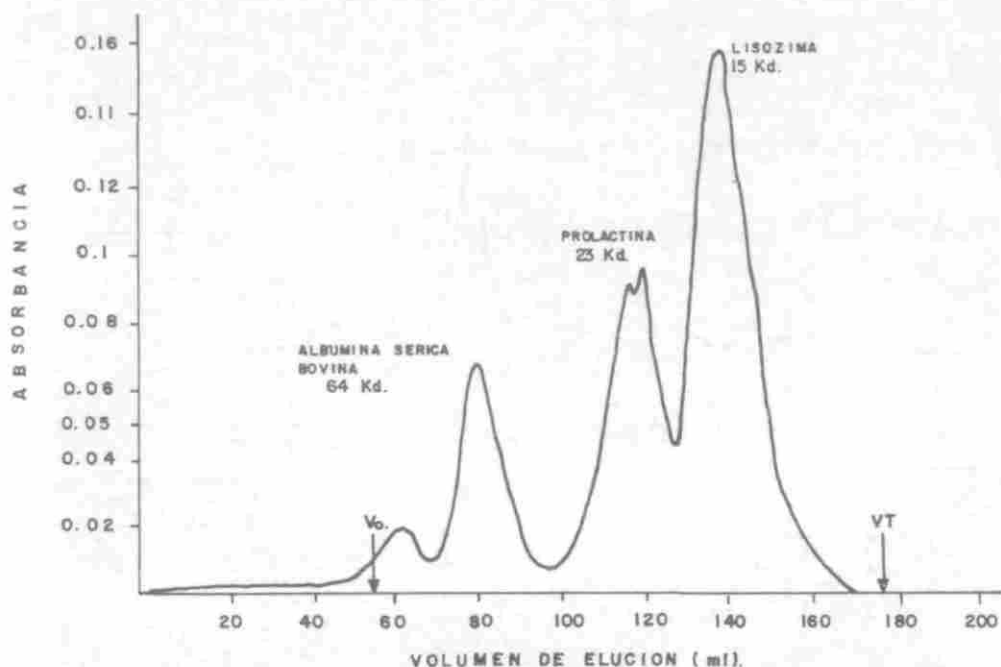


FIGURA 2.- CALIBRACION POR PESO MOLECULAR DE UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-100

TABLA No. 2
PROTEINA Y hPRL APLICADA A LA COLUMNA DE SEPHADEX G-100

SUERO	PRL Total Aplicada (ng)	Proteína Total Aplicada (mg)
NORMAL	41.0	479.4
EMBARAZO	1889.0	340.8
ADENOMA	1431.0	357.0

hiperprolactinémicos (embarazo y adenoma) se observó claramente la presencia de otras formas de PRL, de mayor peso molecular alrededor de 66 Kd y 100 Kd. Estas especies de PRL agregada y macromolecular respectivamente, representan aproximadamente el 30% del total de PRL circulante, siendo la forma macro un poco más elevada en el suero de embarazo (tabla 3). Se confirma que estas formas agregada y macromolecular no están presentes en el suero normal en base a la

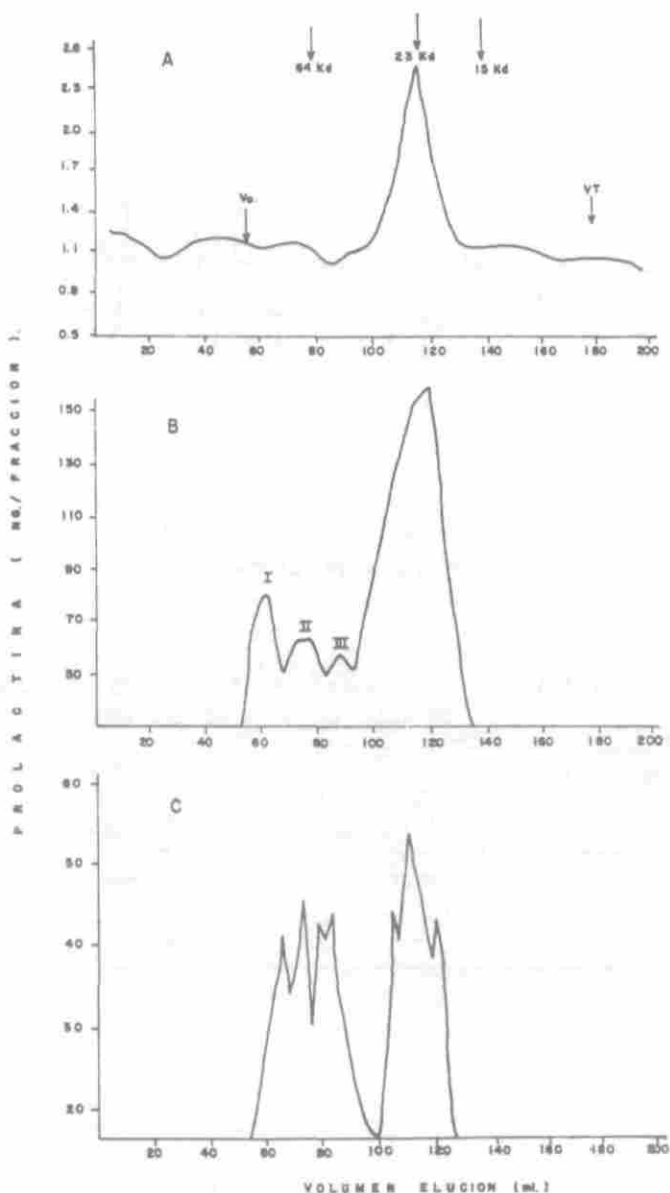


FIGURA No.3.- CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL DE PROLACTINA DE SUERO NORMAL (A), EMBARAZO (B), ADENOMA (C). LAS FLECHAS SUPERIORES REPRESENTAN LA POSICION DE PROTEINAS DE PESO MOLECULAR CONOCIDO.

sensibilidad que da las determinaciones por RIA, las cuales son del orden de ng. La recuperación global del proceso fue en promedio de 74.6%, en términos de PRL medida por RIA específico para la forma monomérica. Este hecho puede tener algún significado ya que se está asumiendo que la interacción del antisuero antiPRL con las formas mayores de PRL, ocurre a través de los mismos sitios de reconocimiento.

TABLA No. 3
CONCENTRACION Y PORCENTAJES DE hPRL RECUPERADA EN LAS
CROMATOGRAFIAS DE LOS SUEROS

SUERO	PROLACTINA RECUPERADA			TOTAL
	MACRO (100 Kd)	AGREGADO (66 Kd)	MONOMERICA (23 Kd)	
EMBARAZO	152.3 (12%)	304.4 (24.2%)	797.1 (63.5%)	1253.8 (66.3%)
ADENOMA	67.5 (5.6%)	338.6 (28.4%)	781.6 (65.8%)	1167.7 (82.9%)

La evidencia experimental indica actualmente que la PRL además de agregarse, puede también glicosilarse, según se muestra en otro estudio (8) donde variantes de PRL con peso molecular de 21 Kd y 23 Kd fueron encontradas, lo que puede introducir modificaciones estructurales, que se ven reflejadas en su interacción con el anticuerpo preparado contra la forma monomérica principal 23K. Shoupe (9) encontró una forma de la hormona de peso 60 Kd en suero de embarazo la cual se une a concanavalina A y más tarde Sinha (10) y Lewis (4) reportaron otra forma 25 Kd de PRL en plasma humano la cual es también probablemente glicosilada. La inmunorreactividad de las PRL glicosiladas parece ser menor que la de la monomérica y se desconoce hasta ahora su significado fisiológico.

La zona de elución correspondiente al monómero principal mostró también heterogeneidad molecular, especialmente en el suero de adenoma (fig.3). Se identificaron 3 formas, de peso aproximado 25 Kd, 23 Kd y 21 Kd.

La forma 21 Kd se presume tiene su origen por el rompimiento proteolítico de la hormona y se produce naturalmente en pituitaria y en órganos blanco como glándula mamaria y próstata (9). En este trabajo se muestra que esta forma proteolítica se encuentra también en el suero humano hiperprolactinémico fisiológico (embarazo) o patológico (adenoma).

Los resultados de este trabajo muestran diferentes formas secretorias de PRL en pacientes hiperprolactinémicos en comparación con individuos normales. Esto posiblemente sea el reflejo de la existencia de otros mecanismos endocrinos de regulación de la secreción de PRL, en situaciones de elevada producción de la hormona. Estos mecanismos pueden contribuir a modular la actividad biológica del pool de hormona circulante, lo cual está sustentado en parte por el efecto que tiene

la glicosilación en la inmunorreactividad de la PRL, indicando un papel crucial de los carbohidratos. Este aspecto está siendo investigado con el fin de identificar mejor la naturaleza de las formas agregada y macro de PRL.

BIBLIOGRAFIA

1. Nyberg, F. Roos P. and Wide L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1980, 625, 255.
2. Larrea, F. et al. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1989, 68, 982.
3. Hashim, I. et al. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1990, 71, 111.
4. Lewis, U.J., N.P. Singh, Y.N. Sinha y W.P. Vanderlann. *Endocrinology*, 1985, 116, 359.
5. Rodriguez, S. de. Ensayos de obtención de Prolactina Humana dentro de un esquema integral de separación de hormonas hipofisarias. Tesis de grado Magister. Departamento de Química. 1986 .
6. Lowry, O. H. et al *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265.
7. Villamil, W. Marcación con ¹²⁵I. Radioinmunoanálisis de Prolactina y su aplicación de estudio de la Ginecomastia. Tesis de Grado 1982.
8. Liu, James et al. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1990, 71, 605.
9. Shoupe, D, et al. *Am. J. Obstet Gynecol.* 1983, 147, 482.
10. Sinhay, N., Gilligan T.A. y Lee Dw. *J. Clin. Endocrin Metab.* 1984, 58, 752.