

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE HORMONA LUTEINIZANTE HUMANA

I - EXTRACCION A PARTIR DE HIPOFISIS

Germán Camero, Diego F. Esquivel, Stella C. de Rodríguez y Myriam S. de Gómez*.
*Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Santafé de Bogotá, D.C. Colombia

Keywords: Luteotropin, pituitary, immunoassay.

RESUMEN

Este trabajo describe un método para extraer y purificar la hormona luteinizante humana (hLH) a partir de glándulas pituitarias congeladas.

De un lote de 47 hipófisis (18.4 g) se separaron las fracciones con actividad de prolactina (Prl) y de hormona de crecimiento (hGH), quedando un residuo de glicoproteínas. Una primera cromatografía con CM-Sepharosa permitió separar la hormona folículo estimulante (FSH) de las otras dos hormonas, LH y TSH (tirotropina). Mediante intercambio aniónico con DEAE-Celulosa se logró separar finalmente la LH de la TSH.

La potencia inmunológica de la preparación final de LH dio un valor de 28.169 UI/mg de proteína, valor que se ubica dentro de los más altos reportados para estándares internacionales de referencia para esta hormona. La recuperación global del proceso fue de 7.8 mg de LH/ 100 glándulas equivalente a 19.93 mg de LH/ 100 g de tejido.

ABSTRACT

A method for the extraction and purification of human luteinizing hormone (hLH) from frozen pituitary glands is described.

The fractions corresponding to prolactin (Prl) and growth hormone (hGH) were separated from a batch of 47 glands (18.4 g), leaving a glycoprotein residue. A first chromatography on CM-Sepharose separated follicle stimulating hormone (FSH) from the other two hormones, LH and TSH (tyrotropin). Finally a chromatography on DEAE-Cellulose made it possible the separation of LH and TSH.

The immunological potency of the final LH preparation was 28.169 IU/mg protein, figure that corresponds to the highest values reported for the international LH reference preparations. The global recovery of the process was 7.8 mg LH/100 glands or 19.9 mg LH/100 g tissue.

INTRODUCCION

Las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) son secretadas por la glándula pituitaria de todos los vertebrados y en forma conjunta modulan y controlan la función de las gónadas. La LH es la encargada de estimular la ovulación en la mujer, la formación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona. En el hombre, actúa sobre las células de Leydig dando como resultado la secreción de testosterona. La alteración en la síntesis, secreción y modo de acción de la LH a nivel de los órganos blanco, conduce a trastornos en el ciclo reproductivo y en algunos casos se puede llegar a esterilidad.

Durante las últimas décadas se han venido haciendo esfuerzos considerables con el fin de poder desarrollar métodos que permitan la determinación de los niveles circulantes de la hormona, como instrumentos clínicos en el diagnóstico de patologías asociadas con una disfunción de LH.

Dentro de los métodos más sensibles figura el inmunoanálisis en sus varias modalidades: RIA (Radioinmunoanálisis), IRMA (Inmunorradiométrico), ELISA (Inmunoenzimático) y DELFIA (Inmunofluorométrico). En todos ellos se requiere de cantidades significativas de hormonas puras a partir de las cuales se obtienen los antiseros, los trazadores y las preparaciones de referencia para la cuantificación.

El interés del presente trabajo es el de extraer y purificar la hormona LH a partir de hipófisis humanas congeladas, continuando con el esquema integral de separación de las hormonas hipofisiarias, dentro del cual ya se ha logrado la purificación de la hormona de Crecimiento (GH) (1) y la Prolactina (Prl) (2). Se pretende establecer una metodología propia que permita la producción local de hormonas para la elaboración de los reactivos del RIA, con una potencia inmunológica y rendimientos comparables a los de las preparaciones internacionales de referencia.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Las glándulas pituitarias provenientes de cadáveres se recolectaron durante autopsias en el Departamento de Patología del Instituto de Medicina Legal, Santafé de Bogotá y se conservaron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

El material de partida fue el residuo de glicoproteínas obtenido después de la extracción de Prl y GH, según el procedimiento descrito por Vargas y Velásquez (1) (figura 1).

Extracción de Glicoproteínas:

Al residuo crudo conteniendo glicoproteínas se le practicaron tres extracciones sucesivas con acetato de amonio 4 mM, pH 5.3 con el fin de solubilizar las proteínas, obteniéndose un sobrenadante denominado GT, a partir del cual se separaron las tres glicoproteínas con base en sus diferencias en punto isoeléctrico (3).

Separación de FSH:

El sobrenadante GT se aplicó a una columna de CM-Sepharosa (1x30 cm) equilibrada con el mismo buffer de acetato de amonio anterior y la proteína fue eluída a una velocidad de 9 ml/h verificando el perfil mediante lecturas de absorbancia a 280 nm. La primera fracción proteica eluída correspondió a FSH (fracción CM1) y la proteína retenida, cuya separación se logró con acetato de amonio 1M, pH 6.5, resultó ser una mezcla de LH y TSH (fracción CM2). Los detalles del método se observan en la figura 1.

Separación de LH de TSH:

A la fracción CM2 dializada contra agua se le adicionó etanol absoluto frío, se centrifugó y redisolvió el precipitado en buffer glicina 0.1 M, pH 9.5 conteniendo 0.03% de tolueno. Se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa (1.2x24 cm) equilibrada con el mismo buffer y se eluyó a una velocidad de 4.5 ml/h. Se obtuvo un primer pico de proteína que se denominó DEAE-1 y luego mediante buffer acetato de amonio 1 M, pH 7.3 se separó un segundo pico designado DEAE-2.

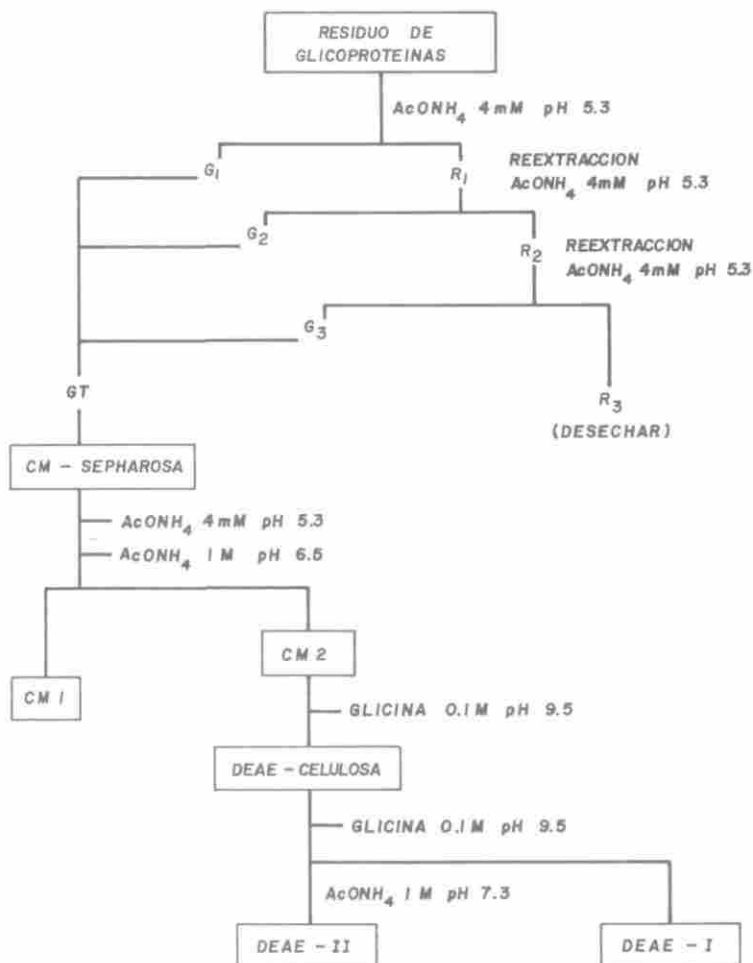
El contenido de LH y FSH se estableció por medio de RIA (4), el de TSH por IRMA (5) y la proteína total por el método de Lowry (6).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las condiciones empleadas en la homogenización y extracción de las glándulas congeladas, permiten la solubilización de la mayoría de las proteínas allí contenidas, tal como se reportó en un trabajo previo (1).

En la tabla 1 se muestran los valores de proteína total recuperada en cada uno de los pasos del proceso de extracción, al igual que la cantidad de hormona LH obtenida, tomando como referencia un patrón internacional cuya potencia inmunológica es de 10.000 UI por mg. de proteína. De esta manera, en cada uno de los pasos intermedios de la extracción y para la preparación final, se calculó el valor de la actividad hormonal de LH.

FIG. 1 PURIFICACION DE GLICOPROTEINAS



El extracto crudo inicial (S1) presentó una potencia de 910.33 UI de LH/mg de proteína. Después de retirar la prolactina y la hormona de crecimiento, se obtuvo la fracción conteniendo las glicoproteínas (GT), cuya potencia de 4959 UI LH/mg muestra un incremento 5.5 veces respecto de la preparación inicial. Este aumento en potencia pone de manifiesto el enriquecimiento en LH de la fracción de interés y la efectividad en la separación de proteínas contaminantes. En S4 o fracción de lipotropinas, se encontró un valor de actividad como LH muy baja, lo que indica una pérdida no significativa de la hormona.

Aprovechando el mayor carácter básico de la LH en comparación con las demás glicoproteínas, se ensayó la cromatografía de intercambio iónico para lograr su separación. En la figura 2 se muestra el perfil obtenido después de aplicar el extracto crudo GT a la columna de CM-Sepharsa. La primera fracción de proteínas ácidas no retenidas resultó ser principalmente FSH. Esto está de acuerdo con los reportes de punto isoeléctrico, que la muestran como la proteína más ácida de las tres (PI 5-6) (3).

La LH se encontró distribuída en las dos fracciones eluídas CM1 y CM2 en una proporción de 1:2 (ver tabla 1), lo que indica que no está constituída por una especie molecular única, sino que existen variantes de carga. Este carácter multicomponente

Tabla 1. Extracción de LH a partir de hipófisis humanas.
(n = 47 glándulas, 18.2 g)

FRACCION	VOLUMEN (ml)	PROTEINA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD HORMONAL ^{a)} (UI LH/mg prot)
S1	270.0	2430.0	910.33
G1	12.0	126.7	5929.4
G2	9.0	21.7	4871.2
G3	4.4	8.8	982.7
GT	21.0	160.7	4959.0
S4	14.3	171.6	266.0
CM1	12.5	51.1	3658.0
CM2	6.6	24.0	7810.4
DEAE-1	3.7	0.6	214.3
DEAE-2	9.4	3.7	28169.0

a) Determinación hecha por RIA usando como estándar: l preparación de potencia 10000 UI LH/mg.

ha sido encontrado en muchas de las hormonas tanto en pituitaria como en suero, aunque el origen del mismo no ha sido establecido con claridad. Se ha sugerido el "splicing" alternativo de un mismo gen, modificaciones postranscripcionales o postraduccionales, como también la actividad proteolítica durante el almacenamiento y/o la extracción de las hormonas. Aunque el buffer de extracción contenía inhibidores de proteinasas y todo el proceso se realizó a 4 °C, no se puede eliminar del todo la actividad proteolítica.

La fracción CM2, que tenía la mayor potencia de LH se escogió para continuar la purificación de la hormona. El cromatograma obtenido con DEAE-Celulosa se muestra en la figura 3. En DEAE-1 se encontró una cantidad despreciable de LH, en cambio la mayor actividad se concentró en DEAE-2. Por RIA su potencia fue de 28.169 UI/mg, es decir, un incremento de 3.5 veces con relación a CM2. Este valor resulta altamente satisfactorio, si se compara con el asignado a la preparación internacional de referencia empleada en este trabajo, que es de 10.000 UI/mg.

La recuperación global del proceso fue de 7.81 mg LH/ 100 glándulas, valor susceptible de mejorar si se tiene en cuenta que sólo se procesó la fracción CM2 quedando una parte de la hormona en CM1 (aprox. 30%). La recuperación lograda en este trabajo es mejor a la reportada por otros autores como Mc Lean et al. (7 mg/ 100 glándulas) (7), Hartree (3.5 mg/ 100 glándulas) (3) e inferior a la lograda por Simionescu et al. (10.1 mg/ 100 glándulas) (8).

Sin embargo, los resultados permiten concluir que la metodología seguida condujo a una preparación de LH con una potencia hormonal que se ubica dentro de los valores más altos reportados en la literatura.

La contaminación con FSH (0.006 IU/mg) y TSH (0.047 UI/mg) está dentro de los rangos aceptados para preparaciones internacionales de referencia (9). Actualmente se están realizando estudios con el fin de hacer una caracterización bioquímica más completa de la hormona final obtenida.

CONCLUSIONES

El procedimiento empleado en este trabajo que combina dos sistemas de cromatografía de intercambio iónico, permitió obtener una preparación de hormona Luteinizante con una alta actividad. La potencia inmunológica establecida por RIA indica la integridad, por lo menos a nivel estructural de la hormona, lo que la hace adecuada para su empleo como estándar en el RIA y como antígeno en la producción de antisuero. La recuperación global, si bien es aceptable, es susceptible de ser mejorada recuperando la fracción de la hormona que por su mayor carácter ácido se separó junto con FSH.

FIG. 2 CROMATOGRAFIA CM - SEPHAROSA

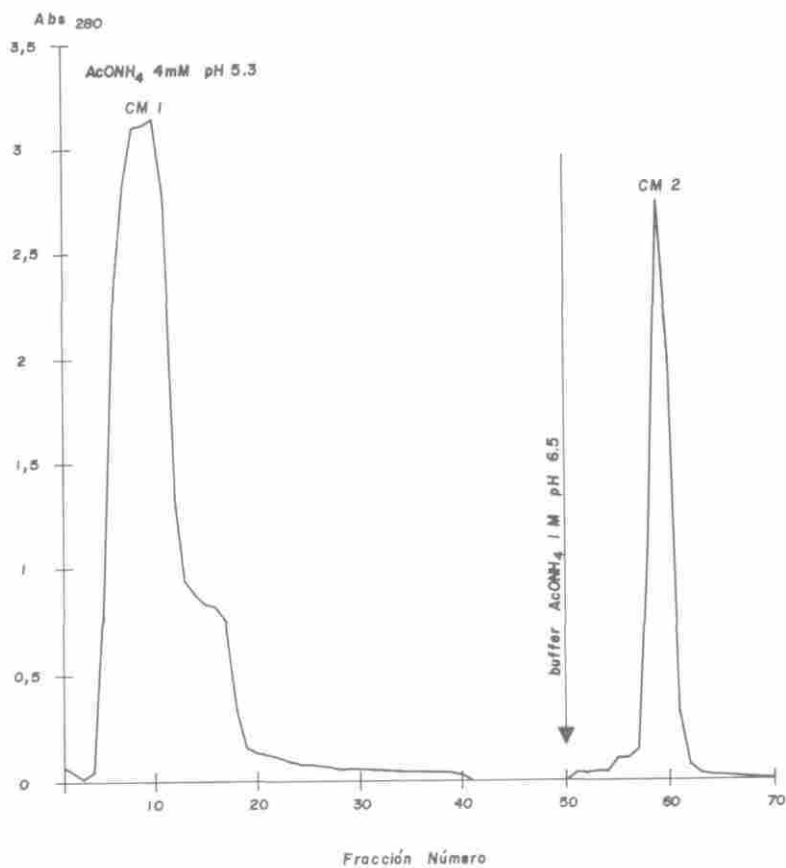
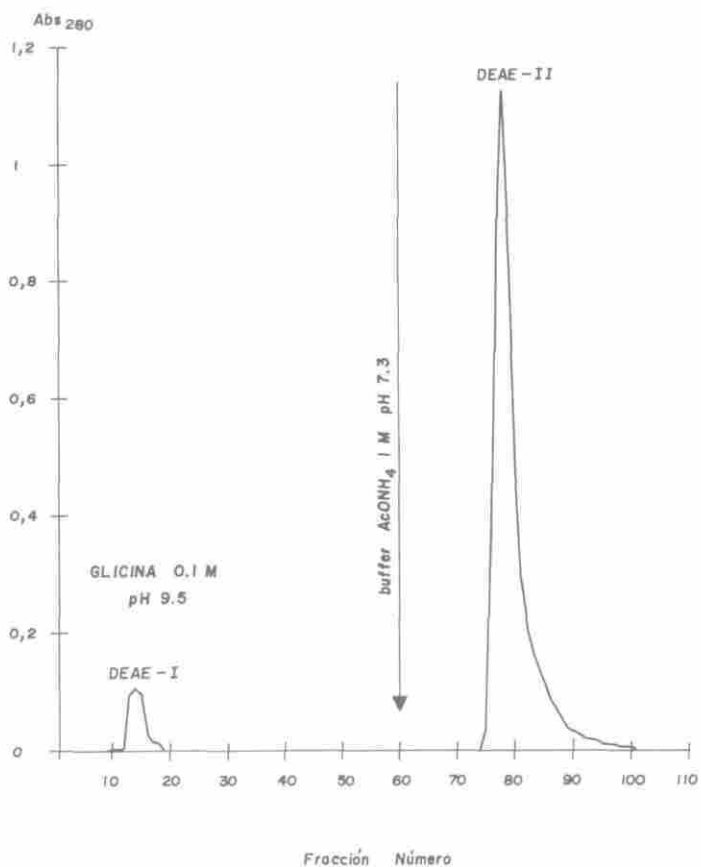


FIG. 3 CROMATOGRAFIA DEAE - CELULOSA



AGRADECIMIENTOS

Al Programa Internacional de Ciencias Químicas (IPICS) de la Universidad de Uppsala, Suecia, a Colciencias, al Departamento de Química de la Universidad Nacional y al Instituto de Medicina Legal por su valiosa colaboración en el suministro de las muestras biológicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Vargas, A.; Velasquez, C., . "Aislamiento y Purificación de Hormona de Crecimiento Humana a partir de Glándulas Pituitarias Congeladas". Tesis de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 1984.
2. Rodríguez, S. C. de; Gómez, M. S. de; Aschner, P., *Rev. Col. de Química*, 1987, 16, 57
3. Hartree, A. S., *Methods in Enzymology*, XXXVII. Hormone Action. Part B. Peptide Hormones. Ed. O'Malley, B.W. y Hardman J.G. Acad. Press, 1975.
4. Storring, P. L.; Zaidi, A.A.; Mistry, Y.G.; Froysa, B.; Stenning, B.E. y Diczfaluzi, E., *J. Endocr.*, 1981, 91, 353.
5. Hunter, W. M., *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, International Atomic Energy Agency, Viena, 1982, pp 3-21.
6. Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R., *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
7. McLean, C.; Hodgkinson, S.; Lowry, P., *The Pituitary*, Ed. Berardwill and Robertson, Butterworths, 1980, pp 238-264.
8. Simionescu, L.; Grigorescu, D. Z.; Dimitriu, V.; Aman, E., *Rev. Roum. Med. Endocrinol.*, 1983, 21 (3), 181.

