

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGÍA
Y NUTRICIÓN OTORGADO POR LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
(U.N.A.M.) Y EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS)

COMPORTAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS ANTISUBUNIDAD ALFA-GLUCOPROTEINAS

DR. GUSTAVO R.E. VITE RUIZ

SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA, HOSPITAL GENERAL, CENTRO MÉDICO NACIO-
NAL, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

México, D.F. 1984



Vo Bo -
JAN 20 1984



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Indice

1.- Introducción

- a. Características de las subunidades alfa
- b. Conducta inmunológica
- c. Actividad biológica
- d. Dinámica de secreción hipofisaria y placentaria de las hormonas glucoproteicas
- e. Secreción anormal
- f. Aplicación que se le ha dado en clínica a la -
cuantificación de subunidades alfa glucoprotei-
cas

2.- Material y Métodos

3.- Resultados

4.- Discusión

5.- Conclusiones

6.- Bibliografía

INTRODUCCION

En la actualidad se han reconocido varias hormonas de carácter glucoproteico como la Hormona Luteinizante (LH), Hormona Folículo Estimulante (FSH), Hormona Estimulante del Tiroides (TSH) y Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Estas se componen de dos subunidades distintas denominadas alfa y beta, las cuales se unen en forma no covalente (1). Las subunidades alfa son virtualmente idénticas en las cuatro hormonas, a las cuales les da la característica inmunológica, en tanto las subunidades beta son distintas, lo cual les confiere su actividad biológica específica. Se han descrito la secuencia de aminoácidos y estructura, tanto para subunidades alfa como las beta. Las hormonas glucoproteicas se componen de un "nucleo" o centro proteico, con brazos de carbohidratos como cadenas laterales las cuales terminan usualmente en ácido siálico, el cual forma en peso el 12% para la hCG; el 5% para FSH y el 1% para LH y TSH. Se ha demostrado que la pérdida en los residuos de ácido siálico en un 25% para la hCG

produce una disminución de la actividad biológica inicial y la pérdida en forma progresiva una disminución gradual de la actividad biológica "in vivo". Se ha calculado que el contenido total de carbohidratos para la hCG es de un 30% del peso. La extracción de ácido siálico de las cadenas laterales de carbohidratos como hemos mencionado previamente produce una disminución de la actividad biológica en la hCG pero no se ve afectada la actividad inmunológica, pero en cambio al ser extraído de FSH y LH produce pérdida de la actividad biológica y de la inmunológica, ésta última severamente dañada. Por otra parte, se conoce que el penúltimo residuo de azúcar de la cadena lateral de carbohidratos es la galactosa, la cual al ser descubierta es captada ávidamente a nivel hepático y de esta forma la hormona metabolizada. Así se ha sugerido que las hormonas glucoproteicas son metabolizadas por extracción de ácido siálico y exposición de la galactosa, apoyado por los estudios en que se demuestra menor contenido de ácido siálico en la FSH urinaria comparada con la sérica. Así la vida media de la hormona guarda una relación directa con el contenido de ácido siálico (29).

Características de las subunidades alfa.

La subunidad alfa de la hCG tiene un peso molecular de aproximadamente 14,700 de los cuales 10,000 son de la porción proteica y 4,700 para los carbohidratos; con un contenido de aminoácidos de 82 a 92 los cuales presentan un total de 5 uniones disulfuro. La secuencia de aminoácidos es muy semejante a la de FSH, LH y TSH (2). Los oligosacáridos se unen a los residuos 52 y 78. La unión no covalente en la hormona completa puede ser disociada por medio de amortiguadores que contienen urea en cromatografía de intercambio de iones(3).

Conducta inmunológica.

Al purificar hCG, FSH, LH y TSH y posteriormente utilizar un sistema de radioinmunoanálisis (RIA) para la subunidad alfa de la hCG y analizar la reactividad cruzada inmunológica con las demás hormonas glucoproteicas, se encuentran líneas de respuesta paralelas. De la misma forma analizando las subunidades alfa de las cuatro hormonas con un sistema homólogo de RIA para la alfa hCG también se obtienen líneas de respuesta paralelas, lo que sugiere una homología estructural entre

las subunidades alfa, en contraste con lo que sucede - con los efectuados para los sistemas de las subunidades beta de los mismos problemas. Para fines prácticos en - la especie humana las subunidades alfa son idénticas en las cuatro hormonas glucoproteicas, pero al ser comparadas con variedades no humanas se encuentra un 80% de homología en cuanto a presencia y secuencia de los aminoácidos, pero al analizar su reactividad cruzada no se obtiene respuesta paralela, por lo cual se les considera diferente a las de otras especies. En cambio las subunidades beta en las hormonas glucoproteicas son distintas para cada una de ellas tanto en la especie humana como no humana, pero existe gran semejanza para cada una de ellas entre las diferentes especies (2). Al analizar la reactividad cruzada de las subunidades beta de las distintas especies, se encuentran líneas de respuesta paralela, lo que les ha conferido gran utilidad en investigación entre distintas especies. De esta forma la reactividad cruzada reside en las subunidades beta para interespecies y en las subunidades alfa para la misma especie. Se han creado antisueros para las subunidades de las hormonas glucoproteicas, para el estudio de sínte-sis y secreción hipofisaria y placentaria. Estos antisueros pueden tener mayor afinidad a la forma libre de.

la subunidad que a la forma completa de la hormona, pero también pueden crearse anticuerpos en contra de ambos sistemas con una afinidad similar. Entre las subunidades beta de hCG y LH se pueden crear sistemas con varios sitios antigénicos, dependiendo de la especificidad del anticuerpo, pero hay otro tipo de anticuerpos que no se unen a la subunidad beta de la hormona completa, por estar involucrada a la estructura cuaternaria ó sea la relación que la molécula guarda entre sí en el espacio (5). Así la especificidad depende de algunas variables entre las cuales figuran: 1.- Método de la transportación o conjugación del anticuerpo; 2.- Dosis del antígeno; 3.- Adyuvante utilizado; 4.- Tiempo y ruta de administración; 5.- Pureza de las subunidades por inmunoadsorción (6). Como mencionaremos más adelante las subunidades alfa tienen una mayor respuesta inmunológica, la cual reside en un mayor número de sitios antigénicos en su estructura proteica (2).

Actividad biológica.

Esta reside en la subunidad beta lo que confiere especificidad biológica. Las hormonas glucoproteicas diso-

ciadas en sus subunidades no tienen ninguna actividad biológica, y cuando se encuentra actividad biológica - es por contaminación de hormona completa. Las subunidades puras sin actividad biológica, pueden ser recombinadas con su subunidad complementaria, con restitución de su actividad biológica en un 70% para hCG y en un - 30 a 40% para las hormonas glucoproteicas hipofisarias con especificidad biológica de la subunidad beta correspondiente (4,7).

Conociendo que la subunidad alfa no tiene reactividad cruzada con otras especies, la combinación de subunidad alfa no humana con beta humana, produce moléculas híbridas con actividad biológica de la subunidad - beta correspondiente. Ya se ha considerado que la vida media de las hormonas esta en relación con el contenido de ácido siálico, de esta forma las moléculas híbridas que contienen mayor cantidad de ácido siálico aumentan su potencia biológica. Así la actividad biológica depende de algunos factores, entre los cuales figuran la concentración de ácido siálico, alargando ó acortando la vida media, y su relación con exposición - de galactosa y captación a nivel hepático activando su metabolismo; así como la disociación de la hormona en sus subunidades y ambas contribuir a la reducción de -

la actividad biológica. Para el reconocimiento de la - hormona por el receptor del órgano blanco específico - es necesario que esté completa, de esta misma forma es necesaria para su preservación y para el alargamiento de su vida media.

Dinámica de la secreción hipofisaria y placentaria de las hormonas glucoproteicas.

En la gestación hCG aparece a los 8 a 10 días posteriores a la ovulación, y en esta forma se han detectado cantidades considerables de alfa hCG libre en el tejido placentario, en el suero y en la orina. En la evolución de la gestación hay un aumento marcado de alfa hCG libre en el tejido placentario en relación a la hormona completa. En cambio en el suero la hormona completa es 10 veces mayor que la subunidad alfa de hCG, En el embarazo no existe subunidad beta libre de hCG, lo que ha sugerido que el control de la síntesis de la hormona completa reside en la fracción beta sintetizada.

En el tejido hipofisario también se ha encontrado fracción alfa libre(8,9). Otras situaciones en las -

que se ha encontrado fracción alfa libre son la postmenopausia (8.10), así como la administración de LH RH y TRH (25), no se sabe si es un proceso pasivo o se libera como la hormona completa. Se han encontrado proporciones distintas de subunidades alfa y beta, lo que ha sugerido que el control de la síntesis de cada subunidad se efectúa por cromosomas distintos. Por otra parte la gran similitud entre las subunidades alfa, así como la presentación en exceso tanto en placenta como en la hipófisis ha sugerido que el mecanismo de síntesis y secreción de estas hormonas podría corresponder a la misma porción del genoma. Los modelos tumorales han sugerido una regulación independiente para la cantidad sintetizada de alfa o beta.

Secreción anormal.

Se ha observado una amplia heterogeneidad entre los péptidos hormonales secretados por una variedad de tumores. De esta forma se conoce que algunas hormonas como la insulina, gastrina, parathormona (PTH), corticotropina (ACTH), son sintetizadas en forma de prohormona o precursores en forma "Big" y pueden ser convertidos a

su forma nativa antes de su secreción. En algunos casos se secretan estas formas grandes, sugiriendo pérdida - proporcional de enzimas hidrolíticas del tumor, produciéndose de esta forma moléculas aberrantes de la hormona, las cuales pueden ser semejantes a las fisiológicas conociendo en la actualidad descripciones de material - inmunológicamente indistinguible de las subunidades alfa (10). Se han encontrado elevaciones de la subunidad en pacientes con carcinoma pulmonar de células en avena con una positividad de elevación del 12% para los hombres y el 30% para las mujeres; así como un 80 y 50% para hombres y mujeres respectivamente en insuficiencia renal crónica (21).

En pacientes con tumor carcinoide gástrico y carcinoma broncogénico, se ha logrado purificar las subunidades alfa y se han identificado variaciones significativas - en peso molecular y secuencia de aminoácidos comparada con la subunidad alfa estandar. De la misma manera estas subunidades alfa ectópicas tienen mínima capacidad de recombinación con la fracción beta, al contrario de lo que sucede con las fracciones normales, medido por - cuantificación de receptores a la hormona glucoproteica y por radioinmunoanálisis (11,12).

La subunidad beta de la hCG se ha encontrado en tumores

de origen trofoblástico y testicular, así como en los de origen del tracto gastrointestinal, encontrando asociación de hepatoma y pubertad precoz así como carcinoma pulmonar y ginecomastia. También se ha encontrado una importante correlación para la subunidad beta de la hCG con el grado de actividad de distintos tipos tumorales, descritos sorprendentemente para el cérvix, mama y melanoma y los ya conocidos de gonadas y tracto gastrointestinal, demostrando de esta forma su utilidad como un marcador tumoral endo y ectodérmico para su monitoreo (23). Hay distintos tipos tumorales como el carcinoma broncogénico y el carcinoide gástrico, que secretan esta subunidad en conjunto con otras hormonas así como presencia de subunidades beta en presencia o ausencia de la subunidad restante(10).

Los pacientes con hipotiroidismo primario, suelen presentar a nivel hipofisario, elevaciones de la subunidad alfa de TSH, así como a nivel sérico. De la misma forma Kourides en 1975 encontró que al administrar TRH a estos pacientes, se produce un aumento en la subunidad alfa libre de TSH (8).

Tumores hipofisarios productores de subunidades alfa.

Los tumores hipofisarios comúnmente secretan cantida-

des excesivas de PRL, GH, ACTH, manifestados por cuadros clínicos característicos. Las hormonas glucoproteicas se secretan raramente por los tumores hipofisarios (18). El reconocimiento clínico de estos síndromes y la cuantificación directa de las hormonas hipofisarias facilita la evaluación tanto diagnóstica como terapéutica.

Los tumores hipofisarios que no se asocian a un exceso de secreción hormonal han sido llamados "Adenomas cromófobos no funcionantes". También se ha propuesto por Kovacs la terminología de "Adenoma de células nulas" para los mismos tumores que no secretan hormonas (26) en donde se han incluido los adenomas productores de subunidad alfa probablemente en forma errónea. El diagnóstico de estos pacientes a menudo es difícil ya que no existe un marcador específico a seguir.

Las subunidades de las hormonas glucoproteicas pueden ser fácilmente detectadas en el suero normal aún en presencia de una u otra fracción (8,17).

Se han encontrado concentraciones elevadas de subunidad alfa en asociación con elevaciones marcadas de LH y FSH en pacientes con falla gonadal primaria. En este tipo de pacientes la secreción es estimulada por la administración de LH RH y TRH y se suprime con la sustitución hormonal respectiva (8).

Al contrario de esta respuesta los pacientes con tumor hipofisario responden levemente en relación a los pacientes con falla primaria, a la administración de LH RH y TRH, lo que ha sugerido relativa autonomía de los tumores productores de subunidad alfa. Así mismo los - pacientes con falla primaria y tumor hipofisario no - responden con disminución de las subunidades alfa al - ser sustituidos (20). Las subunidades alfa son similares desde el punto de vista inmunológico a las auténticas subunidades alfa , así como cromatográficamente, pero difieren al analizar su punto isoeléctrico, capacidad de combinación con la subunidad beta correspondiente y en la secuencia de aminoácidos(8,11,12).

Se han descrito tumores hipofisarios que además de secretar hormonas peptídicas ó glucoproteicas, secretan subunidades alfa (15,20,24)encontrando un 10% de frecuencia entre los tumores de tipo funcionante (22). La secreción aislada de subunidad alfa por tumores hipofisarios no ha sido bien reconocida, por la ausencia de las características clínicas y sólo se han descrito pocos casos(16,22). Estos pacientes tienen una disminución en los niveles de subunidad alfa glucoproteica - posterior a la cirugía o radioterapia satisfactoria hacia los valores normales (20).

Es importante mencionar los hallazgos de Kovacs en donde de 343 tumores hipofisarios, sólo 9 presentaron positividad de inmunoperoxidasa para subunidad alfa, describiendo un sólo caso puro y los demás combinados con otras hormonas (26).

Aplicación que se le ha dado a su cuantificación en clínica.

Los tumores hipofisarios productores de hormonas glucoproteicas ó peptídicas son fácilmente detectables en estadios tempranos, ya que las hormonas específicas sirven de marcador tumoral, para el diagnóstico temprano y monitoreo en el tratamiento. En cambio los pacientes con tumores no funcionantes, crean gran dificultad en el diagnóstico temprano, en el manejo y en el monitoreo posterior. De esta forma los pacientes son captados por alteraciones visuales y de expansión tumoral y sólo pueden ser monitoreados por campimetrías y estudios radiológicos.

Por medio de la cuantificación de subunidades alfa tenemos la oportunidad de un marcador tumoral más y de brindar al paciente el diagnóstico y manejo más temprano y monitoreo post-tratamiento.

También se ha sugerido la utilidad con pruebas dinámicas con LH RH y TRH en los pacientes con falla gonadal primaria y alteraciones de la silla turca, en los cuales existe hiporespuesta al estímulo hormonal y en los que se debe sospechar tumor hipofisario (15). Otra observación ha sido en los pacientes con tirotoxicosis - con TSH aumentada en donde no se detecta subunidad beta y hay elevaciones de subunidad alfa, en los que se debe sospechar tumor hipofisario (20).

En nuestro medio no se tiene experiencia en la determinación de subunidades alfa glucoproteicas, por lo que se desconoce su relevancia en diversas circunstancias como las mencionadas ó en otras como el embarazo normal o patológico, condiciones que suelen sucederse frecuentemente en México. Por este motivo se decidió estudiar la capacidad de los anticuerpos dirigidos contra las subunidades alfa de hCG, FSH, LH, y TSH por el método de radioinmunoanálisis con el fin de precisar - las condiciones de reacción en equilibrio para su aplicación en clínica.

MATERIAL Y METODOS

Antecedentes.- Los métodos diseñados para la extracción de glucoproteínas se conocen desde 1969 en las descripciones originales de Bahl y Donini (13,14).

Este procedimiento básicamente consiste en los siguientes pasos: 1) fraccionamiento en etanol; 2) cromatografía de columna en carboxi-metil Sephadex; 3) filtración en gel de Sephadex G 200 ó G 100; 4) corroboración por electroforesis de una molécula heterogénea e inmunológicamente homogénea.

Posteriormente Aloj y col. en 1973 efectuaron la metodología para la disociación de las glucoproteínas en sus dos subunidades alfa y beta, por medio de urea ó por ácido propiónico descrito por Pierce y Kourides (7,17).

La purificación posterior de las subunidades se efectúa por medio de cromatografía de intercambio de iones y pasos sucesivos de filtración en gel, siendo posible preparar subunidades con una contaminación menor al 1% de hormona completa o de otras subunidades (3). Posteriormente se han creado sistemas de radioinmunoanálisis para las subunidades específicas y pa-

ra la forma nativa, las cuales son la base de la metodología actual en los cuales se utilizan sistemas de doble anticuerpo con trazadores marcados conocidos (7, 8, 17, 19).

Reactivos.

Se utilizó buffer fosfato (0.01 M PO_4 , 0.15 M Na Cl, a un pH de 7.8) obtenido de Sigma Chemical Co., St - Louis Mo. USA. La hormona purificada hTSH se obtuvo de Sorin Biomedica S.p.A. Saluggia Italia; hLH y hFSH de Cambridge Medical Diagnostic, Inc. Billerica, MA, USA. y la hCG de Amersham International pic Inc. Cambridge United Kingdom. Las hormonas radioiodinadas se obtuvieron también de las mismas casas comerciales. Los anticuerpos generados contra las subunidades alfa de hCG, FSH, LH, y TSH se obtuvieron a través de la - National Pituitary Agency., National Institute of Health Bethesda Maryland, USA., National Institute of Child Health and Human Development y del National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases.

Características de los anticuerpos.

Alfa-hCG.- El anticuerpo contra la subunidad alfa de

hCG(hCG-SA6) venfa en un concentrado liofilizado y sin diluir en una preparación de 0.5 ml. Alfa-FSH.- El anticuerpo contra la subunidad alfa de FSH (hFSH 68/38 alfa FSH #1) venfa en un concentrado de 1 ml de una dilución 1:20. Alfa-LH.- El antisuero contra la subunidad alfa de LH (hLH 68/38 alfa LH #1) venfa en un concentrado de 1 ml en una dilución 1:5. Alfa-TSH.- El antisuero contra la subunidad alfa de TSH (hTSH 68/38 alfa TSH #1) venfa en un concentrado de 1 ml en una dilución 1:50.

Procedimiento.

Se efectuaron diluciones seriadas de los anticuerpos (anti-alfa hCG, FSH, LH y TSH) en solución buffer - fosfato (PBS) y a continuación se procedió a valorar su capacidad de precipitación (ideal del 50%) en presencia de hormona marcada. Posteriormente se incluyeron para su estudio comparativo en los sistemas de radioinmunoanálisis correspondiente en que se utilizaron los anticuerpos de alta especificidad (beta hCG, FSH - LH y TSH íntegras) determinandose el porcentaje de inhibición de fijación de la hormona correspondiente.

El radioinmunoanálisis se efectuó tanto con los anticuerpos anti-alfa glucoproteínas como con los anticuerpos de los Kits comerciales. Para todos los radioinmunoanálisis se efectuaron muestras por duplicado. Para la determinación de las cuentas totales se utilizaron los tubos estandar antes de la decantación. Se utilizó un contador Packard 5230.

Radioinmunoanálisis para subunidad alfa de hCG..- El radioinmunoanálisis para la subunidad alfa de hCG se efectuó en la siguiente forma: 1) Se utilizaron 100 ul de PBS para cuentas inespecíficas y unión máxima y para los tubos estándar se utilizaron 100 ul de la muestra correspondiente. 2) Se agregaron 100 ul de anti-alfa hCG en todos los tubos excepto en los de cuentas inespecíficas; se mezclaron en Vortex y se incubaron por 30 minutos a 37°C. 3) Se agregaron 50 ul de hCG - marcada con I-125 en todos los tubos; se mezcla en Vortex e incuba a 37°C por 45 minutos. 4) Se agregó 1 ml del segundo anticuerpo en todos los tubos; se mezcló e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 3000 RPM; se decantó el sobrenadante y se determinaron las CPM del precipitado.

Radioinmunoanálisis para la subunidad alfa de FSH.- Este se efectuó de la siguiente forma: 1) Se utilizaron 100 ul de PBS para las cuentas inespecíficas y 200 ul del estandar 0 para cuentas inespecíficas y unión máxima; la misma cantidad para cada una de las muestras estandar de FSH. 2) Se agregaron 100 ul de FSH marcada con I-125 en todos los tubos. 3) Se agregaron 100 ul de anti-alfa FSH en todos los tubos excepto a los de cuentas inespecíficas. 4) Todos los tubos de incubaron a temperatura ambiente por 4 hrs. 5) Se agregó 1 ml de reactivo precipitante y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos; se centrifugó por 15 minutos a tres mil RPM; se decantó el sobrenadante y se determinaron las CPM del precipitado.

Radioinmunoanálisis para subunidad alfa de LH.- Se efectuó de la siguiente forma: 1) Se incluyeron 100 ul de PBS para cuentas inespecíficas, y para la unión máxima se utilizaron 200 ul del estandar 0; ésta misma cantidad se agregó a las cuentas inespecíficas; para las muestras estandar se agregaron 200 ul para cada una de ellas. 2) Se agregaron 100 ul de anti-alfa LH a todos los tubos, excepto a los de cuentas inespecifi-

cas; todos los tubos se mezclaron en Vortex e incubaron a temperatura ambiente por 2 horas. 3) Se agregaron - 100 ul de LH marcada con I-125 a todos los tubos e incubaron dos horas a temperatura ambiente. 4) Se agregó 1 ml del reactivo precipitante e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente; se centrifugó por 15 minutos a 3000 RPM; se decantó y se determinaron las CPM del pre cipitado.

Radioinmunoanálisis para subunidad alfa de TSH.- Este se efectuó de la siguiente forma: 1) Para las cuentas inespecíficas y para la unión máxima se utilizó PBS a razón de 200 ul y la misma cantidad para las muestras estandar. 2) Se incluyeron 100 ul de PBS para cuentas inespecíficas y la misma cantidad de anticuerpo anti-alfa TSH para los demás tubos. 3) Se agregaron 100 ul de TSH marcada con I-125 en todos los tubos; se incubó de 16 a 24 hrs a temperatura de 18 a 25°C. 4) Se a gregó 1 ml de reactivo pre cipitante e incubó por 15 - minutos a la misma temperatura. 5) Se centrifugó por 15 minutos a 3000 RMP; se decantó y se determinaron - las CPM del precipitado.

RESULTADOS

En las figuras 1 a 4 se hayan graficadas las diluciones graduales de anticuerpo en que se precipitaron las cuentas por minuto de hormona marcada (hCG, FSH, LH y TSH). En todos los casos las diluciones tomadas para la elaboración de la curva estándar correspondiente fueron aquellas equivalentes al 50% (B/T); semejante a la presentada por los anticuerpos dirigidos contra la molécula intacta.

Como puede apreciarse en la figura 2 se detecta un punto prematuro de decaimiento para alcanzar una precipitación del 50% por parte de anti-alfa FSH, lo que traduce una escasa capacidad neutralizante. Con el resto de los anticuerpos (anti-alfa hCG, LH, TSH) se observó interacción antígeno-anticuerpo con las distintas concentraciones y las curvas de precipitación obtenidas fueron más bien definidas.

Una vez que se había precisado la dilución de los anticuerpos correspondientes a las subunidades alfa, se procedió a caracterizar los porcentajes de inhibición de la fijación utilizando hormona altamente purificadas libre y marcada (I-125) ver fig. de la 5 a la 8.

De acuerdo a las curvas de inhibición de la fijación de - hormona marcada se obtuvo una mejor distribución de la - curva con el antisuero contra alfa hCG intacta. En el caso de LH (figura 7) se obtuvo un par de curvas cruzadas con una aparente capacidad de precipitación mayor por parte de antialfa-LH, en ésta circunstancia no se pudo identificar paralelismo alguno. En FSH al igual que LH tampoco se corroboró paralelismo con FSH intacta. La curva generada con anti-alfa FSH demostró escasa inhibición de - FSH I-125, la cual fué casi horizontal. Con TSH fué posible generar una curva paralela con TSH intacta; sin embargo de acuerdo a la pendiente por hallarse poco inclinada dió la impresión de no poder diferenciarse adecuadamente entre los niveles de TSH intacta. No obstante el paralelismo fué evidente aunque menos acentuado que para el caso de hCG.

DISCUSION

Los resultados de este estudio han permitido definir la capacidad de precipitación de una población de anti-

cuerpos dirigidos contra subunidades alfa de diversas -
hormonas proteicas (hCG, FSH, LH, TSH) que fueron obte-
nidos a traves de la agencia Nacional de la Pituitaria, -
para su uso en radioinmunoanálisis.

En la fase inicial del estudio correspondiente a los -
porcentajes de precipitación de hormona marcada se encon-
tró que para neutralizar el 50% de antígeno de FSH, se re
quieran grandes concentraciones de anticuerpo (1:200) és-
to aún cuando pudiera ser debido a condiciones de almace-
namiento en que se mantuvo el anticuerpo y perdiera así -
capacidad para precipitar FSH, también pudiera estar dado
por el tiempo de almacenamiento, en que se perdiera dicha
capacidad, sin embargo llama la atención que esto no ha-
lla sucedido con los demás anticuerpos. Eliminando cual-
quiera de las circunstancias señaladas, podría concluirse
que para el anticuerpo anti-alfa FSH se necesitan gran-
des cantidades para reconocer a la molécula intacta puri-
ficada; ello traduce una gran limitación para su empleo -
rutinario en la determinación por radioinmunoanálisis de
la subunidad alfa de FSH. No obstante los resultados de -
la curva de inhibición de FSH apoyan más el concepto de -
deterioro del anticuerpo, además de acuerdo a Donini y -
col. anti-alfa FSH deberá precipitar cuando menos cantida-
des proporcionales de la hormona purificada.

Por otro lado puesto que se precipitaron el 50% de las cuentas de FSH I-125 y no se discriminó bien entre niveles de FSH libre, el anticuerpo es de muy escasa especificidad.

La curva para hCG mostró un mayor paralelismo y una inclinación muy satisfactoria, ya que independientemente del anticuerpo hay que recordar que hCG en su porción proteica posee más diferencias estructurales con las demás hormonas, con una mayor solidez estructural, así como mayor antigenicidad de la subunidad alfa.

Al analizar la curva estandar de inhibición para LH - la mayor inclinación de anti-alfa LH nos traduce mayor especificidad; dando la impresión de reaccionar con un componente de mayor afinidad que alfa LH y demostrando que el determinante se encuentra en la subunidad alfa. Para conocer lo que sucede a este nivel será necesario en forma posterior las pruebas para reactividad cruzada en todas sus formas.

En la curva correspondiente para TSH nos llama la atención la coincidencia del paralelismo observado entre TSH y hCG, lo que probablemente tiene relación filogenética con la conocida actividad intrínseca de TSH para la hCG. Quizá la menor diferenciación entre los niveles re-

fleja mayor especificidad para la cuantificación de subunidades alfa proteica en forma genérica.

Se concluye que en la elaboración de los radioinmunoanálisis de subunidades alfa proteicas, los resultados que se obtengan de su medición deben tener en cuenta las propiedades inherentes de los anticuerpos aquí estudiados, - ya que como fué demostrado exhiben importantes particularidades de comportamiento.

FIGURAS

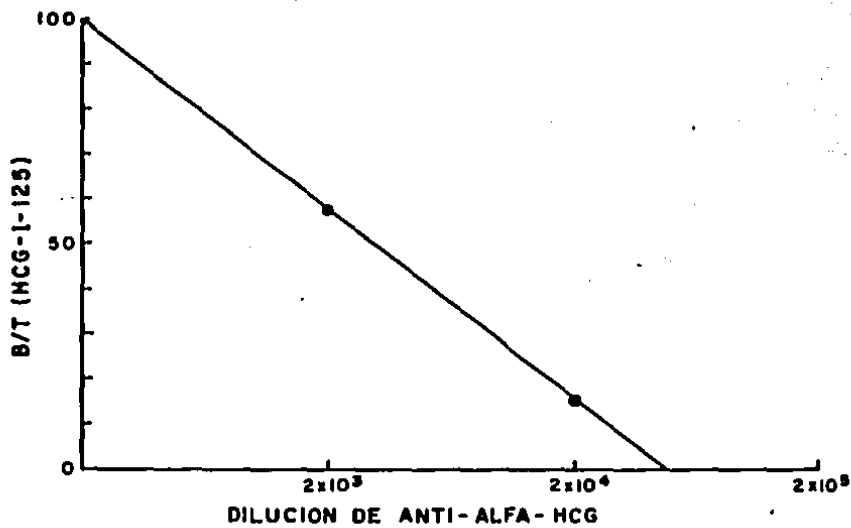


Figura No. 1

Curva de dilución del anticuerpo anti-alfa hCG.
(B/T) = Porcentaje de precipitación de las cuentas totales de hCG marcada.

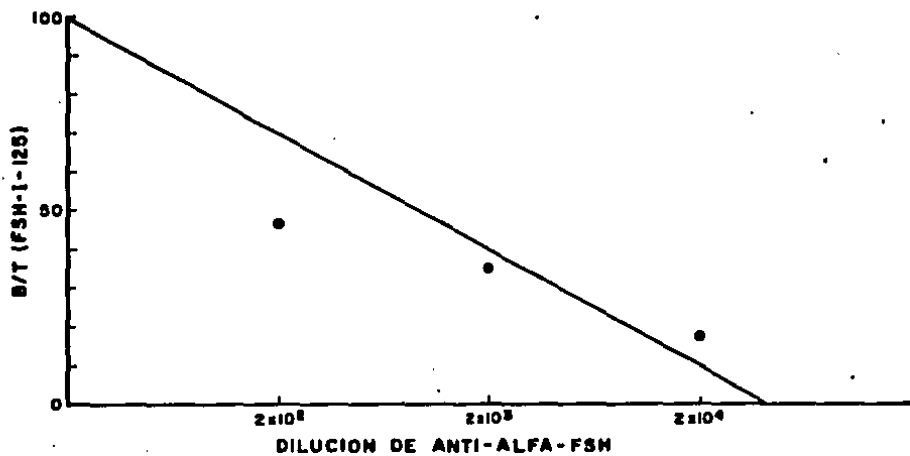


Figura No. 2

Curva de dilución del anticuerpo anti-alfa FSH.

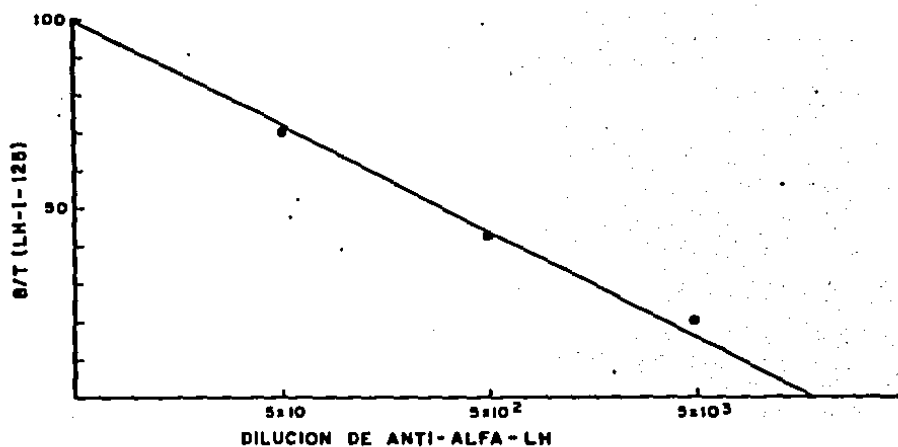


Figura No. 3
Curva de dilución del anticuerpo anti-alfa LH.

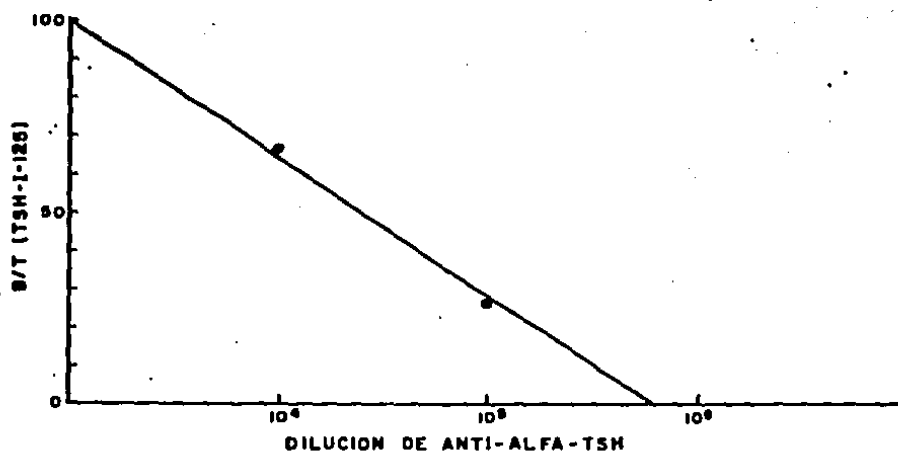


Figura No. 4
Curva de dilución del anticuerpo anti-alfa TSH.

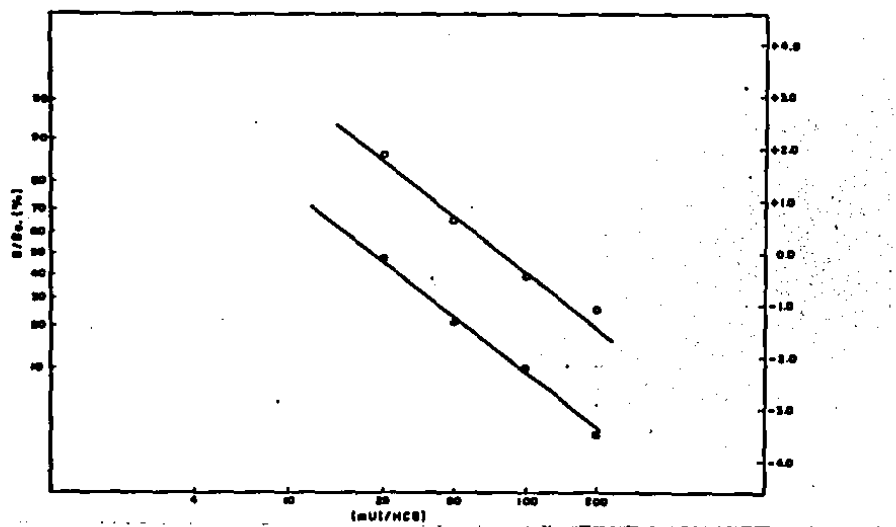


Figura No. 5

Curva estándar del anticuerpo anti-alfa hCG (círculos abiertos) en relación con la curva para el anticuerpo contra la subunidad beta de la hCG (círculos cerrados).

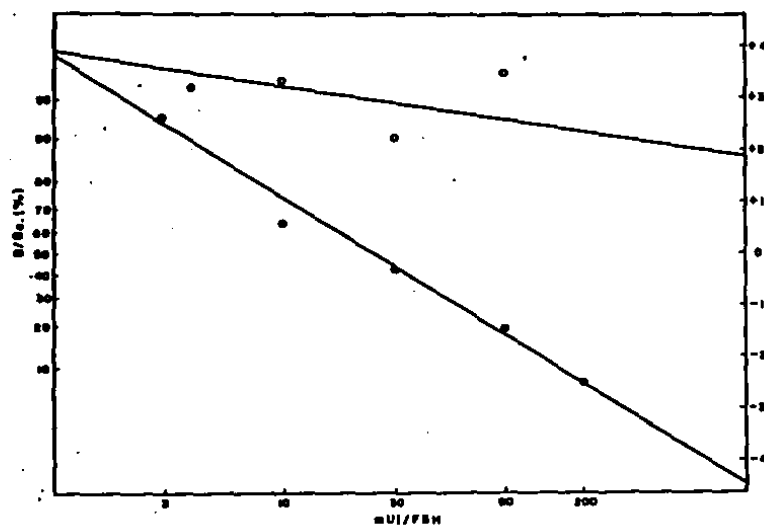


Figura No. 6

Curva estándar del anticuerpo anti-alfa FSH (círculos abiertos) en relación con la curva para el anticuerpo contra FSH integral (círculos cerrados).

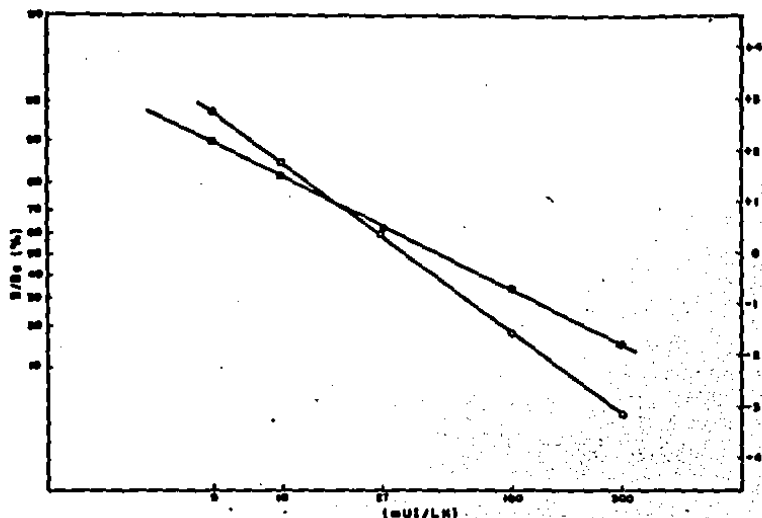


Figura No. 7

Curva estándar del anticuerpo anti-alfa LH (círculos abiertos) en relación con la curva para el anticuerpo contra LH íntegra (círculos cerrados).

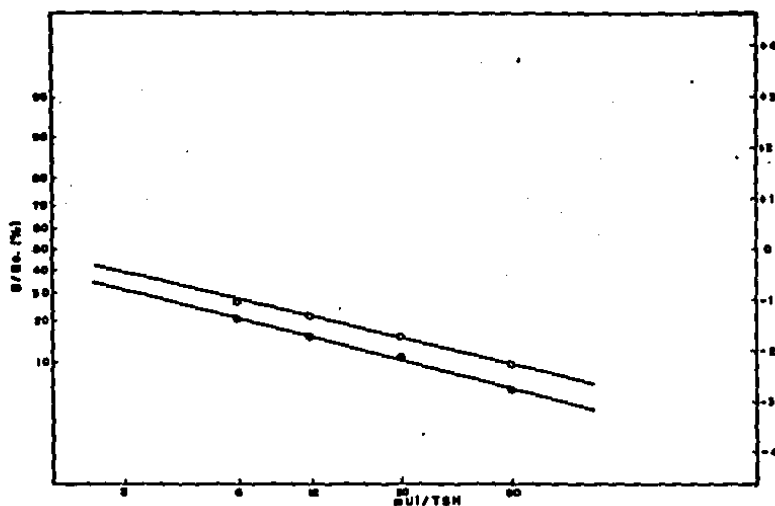


Figura No. 8

Curva estándar del anticuerpo anti-alfa TSH (círculos abiertos) en relación con la curva para el anticuerpo contra TSH íntegra (círculos cerrados).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Saxena, B.B. and Rathnam, P.: Dissociation phenomenon and subunit nature of follicle-stimulating hormone - from human pituitary glands. J Biol Chem., 246: 3549, 1971
- 2.- Bahl, O.P.: Human chorionic gonadotropin, its receptor and mechanism of action. Federation Proc., 36: - 2119, 1977
- 3.- Swaminathan, N. and Bahl, O.P.: Dissociation and recombination of subunits of human chorionic gonadotropin. Biochem Biophys Res Commun., 40:422, 1970
- 4.- Morgan, F.J., Candfield, R.E., Vaitukaitis, J.L. and Ross, G.T.: Properties of the subunits of human chorionic gonadotropin. Endocrinology., 94: 1601, 1974
- 5.- Delais-Kitabgi, J., Laburthe, M. and Rosselin, G.: - Immunological specificity of the beta subunit of human chorionic gonadotropin (hCG). Hor Metab Res., 6: 527, 1974
- 6.- Actions of antisera to hCG-beta: in vitro and in vivo assessment. Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford Endocrinology., 1: 379, 1977

- 7.- Pierce, J.G. Eli Lilly Lecture.: The subunits of pituitary thyrotropin- their relationship to other glycoprotein hormones. Endocrinology., 89: 1331, 1971
- 8.- Kourides, I.A., Weintraub, B.D., Ridgway, E.C. and Malloof, F.: Pituitary secretion of free alpha and beta - subunit of human thyrotropin in patients with thyroid disorders. J Clin Endocrinol Metab., 40: 872, 1975
- 9.- Prentice, L.G. and Ryan, R.J.: LH and its subunits in human pituitary, serum and urine. J Clin Endocrinol Metab., 40: 303, 1975
- 10- Rosen, S.W. and Weintraub, B.D.: Ectopic production of the isolated alpha subunit of the glycoprotein hormones. N Engl J Med., 290: 1441, 1974
- 11- Weintraub, B.D., Krauth, G., Rosen, S.W. and Rabson, A.S.: Differences between purified ectopic and normal alpha subunits of human glycoprotein hormones. J Clin Invest., 56: 1043, 1975
- 12- Weintraub, B.D., Stannard, B.S. and Rosen S.W.: Combination of ectopic and standard human glycoprotein hormone alpha with beta subunits: Discordance of immunologic and receptor-binding activity. Endocrinology., - 101: 225, 1977.

- 13.- Bahl, O.M.: Human Chorionic Gonadotropin. J Biol Chem 244:567, 1969
- 14.- Donini, S., Oliveri, V., Ricci, G. and Donini, P.: - Subunits of human chorionic gonadotrophin: an immunochemical study. Acta Endocrinologica., 73: 133, 1973
- 15.- Kourides, I.A., Weintraub, B.D. Rosen, S.W., Ridgway, E.C., Kliman, B. and Maloof, F.: Secretion of alpha - subunit of glycoprotein hormones by pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab., 43:97, 1976
- 16.- Ridgway, E.C., Klibanski, A., Ladenson, P., Clemmons, D., Beitins, I.Z., CaArthr, J.W., Martorana, M.A., - Zervas, N.T.: Pure alpha-subunit secreting pituitary adenomas. N Engl J Med., 304: 1254, 1981
- 17.- Kourides, I.A., Weintraub, B.D., Levko, M.A. and Maloof, F.: Alpha and beta subunits of human thyrotropin: purification and development of specific radioimmunoassays. Endocrinology., 94:1411, 1974
- 18.- Snyder, P.J., and Sterling, F.H.: Hypersecretion of LH and FSH by pituitary adenoma. J Clin Endocrinol Metab., 42: 544, 1976
- 19.- Parlow, A.F. and Shome, B.: Specific, homologous radioimmunoassay of Highly purified subunits of human -

- pituitary follicle stimulating hormone. J Clin Endocrinol Metab., 39: 195, 1974
- 20.- Kourides, I.A., Ridgway, E.C., Weintraub, B.D., Bigos, S.T., Gerchengorn, M.C. and Maloof, F.: Thyrotropin-induced hyperthyroidism: Use of alpha and beta subunit levels to identify patients with pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab., 45: 534, 1977
- 21.- Hagen, C., Gilby, E.D., Mc Neilly, A.S., Olgaard, K. Bondy, P.K., and Rees L.H. : Comparison of circulating glycoprotein hormones and their subunits in patients with oat cell carcinoma of the lung and uraemic patients on chronic dialysis. Acta Endocrinol., 83: 26, 1976
- 22.- Klibanski, A., Ridgway, E.C. and Zervas, N.T.: Pure alpha subunit-secreting pituitary tumors. J Neurosurg., 59: 585, 1983
- 23.- Ayala, A.R., Saad, A., Vázquez, X., Ramirez-Wiella, G., Diaz Perches, R.: Human chorionic gonadotropin immunoreactivity in serum of patients with malignant neoplasms. Am J Reprod Immunol., 3:149, 1983
- 24.- Peterson, R.E., Kourides, I.A., Horwith, M., Vaughan E.D. Jr., Saxena, B.B. and Fraser, R.A.R. : Luteini-

zing hormon and alpha subunit secreting pituitary tumor: positive feedback of oestrogen. J Clin Endocrinol Metab., 52: 692, 1981

25.- Edmonds, E., Molitch, M., Pierce, J.G., and Odell, W D.: Secretion of alpha subunit of luteinizing hormone by the anterior pituitary. J Clin Endocrinol Metab., 41: 551, 1975

26.- Kovacs, K., Horvath, E., Ryan, N., and Ezrin, C. : Null cell adenoma of the human pituitary. Virchows - Archiv Pathol Anat and Histol., 387: 165, 1980

27.- Cravioto, H., Fukaya, T., Zimmerman, E.A., Kleinberg D.L. and Flamm, E.S.: Immunohistochemical and electron-microscopic studies of functional and non-functional pituitary adenomas including one TSH secreting tumor in a thyrotoxic patient. Acta Neuropathol (Berl)., 53:281, 1981

28.- Taylor, C.R.: Immunoperoxidase Techniques. Arch Pathol Lab Med., 102:113, 1978

29.- Braunstein, G.D., Vaitukaitis, J.L. and Ross, G.T. : The in vivo behavior of human chorionic gonadotropin after dissociation into subunits. Endocrinology., - 91: 1030, 1972