

11213

4 2c

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA. DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

"HETEROGENEIDAD INMUNOLOGICA DE LAS
SUBUNIDADES ALFA GLUCOPROTEICAS"

DR. MIGUEL AGUSTIN S. MADERO FERNANDEZ DEL CASTILLO
SERVICIO DE ENDOCRINOLOGIA
HOSPITAL GENERAL DEL CENTRO MEDICO NACIONAL
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, MEXICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INTRODUCCION

Las hormonas glucoproteicas humanas, hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (HCG) están compuestas de dos subunidades con enlaces no covalentes y que se denominan alfa y beta, estas subunidades difieren entre sí por el número de aminoácidos que integran su cadena (ligeramente mayor para la subunidad beta), el número de uniones covalentes disulfuro y su heterogeneidad exhibida cuando se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida (1). La subunidad beta de cada hormona es la responsable de la actividad biológica y actividad inmunológica dentro de la hormona intacta (2). La subunidad alfa es distinta para cada hormona, sin embargo, la contribución de ellas en el efecto biológico es el mismo puesto que la recombinación de una subunidad alfa derivada de una hormona con una subunidad beta de otra hormona distinta da como resultado una actividad biológica idéntica a la de la hormona de la que proviene la correspondiente subunidad beta (3). No obstante que existe gran similitud entre las subunidades alfa, se reconocen diferencias mínimas en el contenido de carbohidratos y la composición de aminoácidos (4). Al igual que las subunidades beta, las alfa pueden circular libremente en el suero pero ninguna

de las dos tiene actividad biológica independiente si no es en la forma intacta o unida (5). El origen de las subunidades libres circulantes no parece deberse a la disociación periférica de la hormona intacta sino a una producción directa de la célula secretora hipofisaria o placentaria según el caso (6). Previamente se han reportado distintos grados de reactividad cruzada inmunológica entre las subunidades alfa (7), pero al contrario de las subunidades beta no se reconoce reacción cruzada con las correspondientes subunidades alfa de LH, alfa FSH, alfa TSH y alfa coriónica de estas especies (8).

Mediante el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra las subunidades alfa libres se han generado métodos radioinmuno-métricos que utilizan doble anticuerpo para su medición (9), en esta forma se sabe que existe elevación de subunidad alfa circulante en mujeres postmenopáusicas y en condiciones patológicas como el hipotiroidismo primario e hipertiroidismo secundario (7,10) y en diversos tumores hipofisarios (11-12), a lo que más recientemente se ha agregado un grupo de los previamente conocidos como tumores "no funcionantes" de hipófisis (13-14).

No obstante que existen métodos para la medición de subunidades de hormonas glucoproteicas, la reactividad cruzada para las distintas subunidades alfa limitan las conclusiones acerca de la proveniencia de dicha subunidad o su célula productora. Ejemplo de esto es la supresibilidad incompleta que se obtiene de los niveles circulantes de alfa subunidad en sujetos hipotiroideos que reciben tratamiento de substitución con hormonas tiroideas, las cuales por mecanismos de retroalimentación negativa bloquean la proporción de subunidad alfa correspondiente a TSH, pero no así aquella dada por otras hormonas glucoproteicas como LH, FSH y HCG (7). Por otro lado, se ha demostrado reactividad cruzada entre anticuerpos dirigidos contra la subunidad alfa y la hormona intacta (7). Existen anticuerpos desarrollados específicamente contra subunidad alfa LH, alfa FSH, alfa TSH y alfa HCG. No obstante, durante la preparación de dichos anticuerpos puede haber contaminación con otras subunidades o pequeños fragmentos con inmunoreactividad como ha sido postulado por Donini y col (15).

En el presente trabajo se evalúan distintos anticuerpos dirigidos contra subunidades alfa de las cuatro hormonas glucoproteicas principales en el ser humano, midiendo su capacidad para unir a las hormonas intactas utilizando los estándares

de estuches comerciales para cuantificación de LH, FSH, TSH y HCG por radioinmunoanálisis. El objetivo es establecer el grado de reactividad cruzada de estos anticuerpos con la hormona intacta.

MATERIAL Y METODOS

Los anticuerpos (Ab) preparados en conejo contra las subunidades alfa hormona luteinizante (Ab alfa LH), alfa hormona folículo estimulante (Ab alfa FSH), alfa hormona estimulante del tiroides (Ab alfa TSH) y alfa gonadotropina coriónica (Ab alfa HCG) fueron obsequio de la National Pituitary Agency, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA. Los estándares de las hormonas glucoproteicas (LH, FSH, TSH y HCG se tomaron de diferentes firmas comerciales (Cambridge Medical Diagnostics, Inc., Billerica Ma. EUA; Sorin Biomedica, S. p. A, Saluggia, Italia y Amersham International, UK). Del mismo modo los anticuerpos contra la hormona intacta (Ab LH, Ab FSH, Ab TSH y Ab beta HCG) contenidos en las preparaciones previas se compararon para establecer su capacidad de inhibir la fijación de hormona intacta marcada (LH-Il25, FSH-Il25, TSH-Il25 y HCG-Il25). Las cuentas por minuto se registraron en un gamaespectómetro (Packard, Chicago, Ill, EUA).

Hormona luteinizante

En el estudio de hormona luteinizante se analizaron cinco grupos de inhibición de LH-I125, en cada grupo fueron colocados en tubos de 10 x 75 mm 200 μ l de LH purificada preparada en suero equino a las concentraciones de 0, 10, 27 y 100 mUI/ml calibrados contra el LER 907 en ng/ml y convertido a mUI/ml de acuerdo al segundo estándar internacional de preparado de orina de mujer postmenopáusica (2o. IRP-HMG). Se añadieron 100 μ l de los anticuerpos de acuerdo a los siguientes grupos: 1er grupo Ab LH, 2o. Ab alfa LH, 3o. Ab alfa FSH, 4o. Ab alfa TSH y 5o. Ab alfa HCG. En todos los tubos se agregaron 100 μ l de LH-I125. Se incubó por cuatro horas a temperatura ambiente después de lo cual se añadió el segundo anticuerpo (Inmunoglobulina de cabra contra inmunoglobulina de conejo) preparado en polietilenglicol. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se llevó al contador para conocer las cuentas por minuto.

Hormona estimulante del folículo

En este estudio también se incluyeron cinco grupos de inhibición de FSH-I125, en cada grupo se colocaron en tubos 10 x 75 mm 200 μ l de FSH purificada preparada en suero equino a con-

centraciones de 0, 10, 30 y 90 mUI/ml comparado al LER 907 ng/ml y convertido a mUI/ml de acuerdo al 2o. IRP HMG. Se añadieron 100 μ l de FSH-1125 a todos los tubos y enseguida 100 μ l de los Ab en la forma siguiente: 1er. grupo: Ab FSH, 2o. Ab alfa FSH, 3o. Ab alfa LH, 4o. Ab alfa TSH y 5o. Ab alfa HCG. Se incubó durante cuatro horas a temperatura ambiente y se añadió 1 ml del segundo anticuerpo (inmunoglobulina de cabra contra inmunoglobulina de conejo) preparado en polietilenglicol. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar, decantar y contar en la misma forma que se hizo para el ensayo anterior.

Hormona estimulante del tiroides

Se analizaron cinco grupos de inhibición de TSH-1125, en cada uno y en tubos de 10 x 75 mm se colocaron 200 μ l de TSH purificada y preparada con albúmina sérica bovina a concentraciones de 0, 10, 20 y 50 μ UI/ml (MRC 6B/38). Se añadieron a todos los tubos 100 μ l de TSH-1125 y enseguida 100 μ l de los Ab en la manera siguiente: 1er. grupo Ab TSH, 2o. Ab alfa TSH, 3o. Ab alfa LH, 4o. Ab alfa TSH y 5o. Ab alfa HCG. Se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente y se agregó 1 ml de segundo anticuerpo (inmunoglobulina de carnero contra inmunoglobulina de conejo) preparado en polietilenglicol. Se incubó

15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar, decantar y contar en la misma forma que los ensayos anteriores.

Gonadotropina coriónica humana

Se incluyeron también cinco grupos de inhibición de HCG-1125, en cada uno y en tubos de 10 x 75 mm se colocaron 100 μ l de HCG purificada a concentraciones de 0, 10, 50 y 100 mUI/ml calibrado contra el segundo estándar internacional (2o IS) para HCG (61/6) en donde 1 ng/ml es equivalente a 10 mUI/ml. Se añadieron 100 μ l de Ab en la siguiente forma: 1er grupo Ab beta HCG, 2o. Ab alfa HCG, 3o. Ab alfa LH, 4o. Ab alfa FSH y 5o. Ab alfa TSH. Se incubó durante 30 minutos a 37°C y se añadieron 100 μ l de HCG-1125 a todos los tubos. Se incubó a 37° C por 45 minutos. Se añadió 1 ml del segundo anticuerpo. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar, decantar y contar en la misma forma que se hizo con los ensayos anteriores. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado. Las diluciones de Ab que se usaron son como sigue: Ab alfa LH 1:500, Ab alfa FSH 1:400, Ab alfa TSH 1:20,000 y Ab alfa HCG 1:2000 de acuerdo a la mayor actividad demostrada en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio.

Los cálculos de inhibición se hicieron con base en el índice:

$$\frac{B - NS}{B_0 - NS} \times 100$$

en donde B son las cuentas por minuto para cualquiera de las concentraciones de hormona, B₀ son las cuentas por minuto para la concentración O y NS son las cuentas por minuto consideradas como unión inespecífica. Los resultados expresados en porcentaje de unión fueron graficados en papel Logit-Log. Los porcentajes de reacción cruzada se calcularon con base en la pendiente obtenida en cada una de las curvas estándar linealizadas; la fórmula empleada para calcular fue:

$$\text{reacción cruzada} = \frac{50\% \text{ de inhibición del Ab de referencia}}{50\% \text{ de inhibición del Ab problema}} \times 100$$

El coeficiente de variación intraensayo fue de 3.1% para LH, 2.44% para FSH, 1.62% para TSH y 1.99% para HCG.

RESULTADOS

Los anticuerpos dirigidos contra las subunidades alfa de las hormonas proteicas, demostraron poseer diferentes tipos de interacción en presencia de las hormonas purificadas intactas demostrándose diversos grados de reacción cruzada. Las capa-

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

tidades máximas (%) de fijación de hormonas observadas con cada anticuerpo se hallan enlistadas en la tabla 1. En ella se puede observar que Ab alfa FSH precipitó niveles de hormona marcada en proporciones mayores en todos los casos que cualquiera de los otros anticuerpos. En menor grado que Ab alfa FSH, Ab alfa HCG también prevaleció sobre la población restante de anticuerpos. A continuación se señalan las reacciones observadas con los Ab alfa en presencia de concentraciones conocidas de LH, FSH, TSH y HCG purificadas (Figuras 1 a 4) (Tabla 2).

Hormona luteinizante

Los Ab alfa FSH y Ab alfa HCG no exhibieron reacción cruzada alguna antes las diferentes cantidades de LH (mUI/ml) incluidas en el sistema de radioinmunoanálisis, mientras que Ab alfa LH y Ab alfa TSH demostraron un paralelismo semejante en las curvas de inhibición de fijación de LH-1125 detectándose en ambos una sensibilidad mayor para detectar concentraciones mínimas de LH (3.0 y 7.0 mUI/ml respectivamente) que Ab LH (10 mUI/ml). Los porcentajes de reacción cruzada fueron: Ab alfa LH 142.9% y Ab alfa TSH 189%.

Hormona estimulante del folículo

Contra lo esperado, Ab alfa FSH fue el único incapaz de reconocer los niveles de FSH intacta incluidos en el sistema de radioligando. Ab alfa TSH y Ab alfa LH exhibieron paralelismo estrecho en la inhibición de fijación de FSH-1125 aunque de menor sensibilidad (10.0 mUI/ml) y menos acentuado que con el Ab FSH. La reacción cruzada fue de 92.8% para Ab alfa TSH y 118% para Ab alfa LH. Ab alfa HCG reaccionó paralelamente al Ab FSH, la reacción cruzada fue del 1%.

Hormona estimulante del tiroides

Todos los anticuerpos contra subunidades alfa presentaron curvas de inhibición de fijación de TSH-1125 con diversos grados de paralelismo. Ab alfa FSH exhibió la reacción cruzada de menor intensidad (menor del 1%) y menor sensibilidad (50 μ UI/ml). Ab alfa LH y Ab alfa HCG demostraron un paralelismo semejante entre sí y más pronunciado que Ab TSH. La reacción cruzada obtenida con Ab alfa LH fue de 139.5%, mientras que con Ab alfa HCG de 49.5%. Los niveles de sensibilidad alcanzados con Ab alfa LH y Ab alfa HCG fueron de 19 y 22 μ UI/ml respectivamente. La curva de inhibición generada con Ab alfa TSH demostró franco paralelismo con aquella dada por Ab TSH. La reacción cruzada fue de 58.3% y la sensibilidad

de 9.0 μ UI/ml.

Gonadotropina coriónica

Como en el caso de FSH, los Ab alfa FSH no reconocieron tampoco las concentraciones disponibles de HCG libre. Las curvas de inhibición de HCG-1125 generadas con Ab alfa HCG, Ab alfa TSH y Ab alfa LH exhibieron franco paralelismo con aquella obtenida con el anticuerpo dirigido contra la subunidad beta de HCG, aunque con menor sensibilidad (Ab alfa HCG: 24.0 mUI/ml; Ab alfa TSH: 7.0 mUI/ml; Ab alfa LH: mUI/ml). El porcentaje de reacción cruzada obtenido con Ab alfa HCG fue de 21%, con Ab alfa TSH 50% y con Ab alfa LH 66%.

RESULTADOS GLOBALES

Al analizar las gráficas en conjunto destaca que el Ab alfa FSH desconoce prácticamente a la totalidad de las hormonas glucoproteicas estudiadas. Contrario a esto, Ab alfa TSH inhibió la fijación de hormonas radioiodinadas en forma casi armoniosa y en ocasiones de mayor intensidad que como lo hicieron los anticuerpos dirigidos contra la estructura íntegra de LH, FSH, TSH y HCG. Otro tanto, aunque en forma poco menos prominente se observó también con el anticuerpo alfa LH. Ab alfa HCG reaccionó en forma poco acentuada con los radio-

inmunoensayos de FSH y HCG, tuvo conducta semejante a Ab alfa LH y Ab alfa TSH en el radioinmunoensayo para TSH y no exhibió reacción alguna con el radioinmunoensayo de LH. En los radioinmunoensayos homólogos solo Ab alfa FSH no reconoció a su correspondiente hormona íntegra libre.

DISCUSION

Los resultados de este trabajo resaltan principalmente la ausencia de homogeneidad de los anticuerpos dirigidos contra la subunidad alfa glucoprotéica para precipitar sustancias homólogas o heterólogas íntegras. Esto se contrapone a observaciones previas en el sentido de que la semejanza estructural y antigénica de las hormonas glucoprotéicas en la misma especie yace en la subunidad alfa (8). En nuestro estudio se observó la mejor uniformidad de interacción antígeno-anticuerpo en los ensayos para HCG hecho que coincide con otras observaciones (15). La razón de esto pudiera tener bases filogenéticas ya que se ha considerado a la HCG como la hormona precursora de las hormonas glucoprotéicas. El comportamiento heterogéneo de los anticuerpos quizá sea debido a diferencias en las determinantes antigénicas lo que constituye una propiedad inherente a los antígenos en general (16), a pesar de que puedan tener pesos moleculares equivalentes o conforma-

ción semejante.

Uno de los hechos más sobresalientes fue la incapacidad demostrada por Ab alfa FSH para precipitar los diferentes tipos de hormona intacta incluidos en el sistema de radioinmunoanálisis, preservando la capacidad de precipitar el homólogo marcado con I-125, incluso en proporciones sensiblemente mayores que cualesquiera de los otros anticuerpos. La razón para este fenómeno la desconocemos, ya que, por otra parte este tipo de hallazgo al parecer no ha sido reportado previamente y se aparta del concepto general de radioinmunoanálisis en donde el anticuerpo siempre exhibe mayor afinidad por el antígeno libre o purificado que el radioiodinado. Es difícil la posibilidad de que haya existido un error, ya que esta conducta de Ab alfa FSH se puso de manifiesto en repetidos ensayos y ante diferentes hormonas glucoprotéicas. Otra explicación alterna es que las propiedades antigénicas de la hormona marcada con I-125 en los diversos ensayos fueran muy diferentes de sus homólogos no marcados. Por último, cabe la posibilidad de un fenómeno de prozona. Ab alfa TSH exhibió un comportamiento homogéneo y casi igual que todos los anticuerpos anti-molécula intacta. Este hecho explica por qué en estudios previos se le ha utilizado para medir producción de alfa proteína en

condiciones anormales (10,14). Lo mismo podría decirse de Ab alfa LH que se comportó en forma semejante aunque menos homogénea que Ab alfa TSH.

Ab alfa HCG exhibió una conducta altamente discriminatoria para LH lo que lo hace útil en la determinación de subunidades alfa, sobre todo en los casos de postmenopausia, en donde las concentraciones altas de gonadotropinas podrían dar una reacción cruzada con Ab alfa TSH y Ab alfa LH. Por este motivo convendría utilizarlo también en el estudio diagnóstico de los adenomas hipofisarios no funcionantes. Por otra parte, destaca que junto con Ab alfa LH se observó una gran capacidad de saturación cuando se ponen a reaccionar Ab alfa HCG y LH en presencia de TSH. Este tipo de conducta al parecer no ha sido descrita con anterioridad aunque no debe de extrañar que TSH pueda tener capacidad antigénica mayor ante Ab alfa HCG y Ab alfa LH ya que ontogénicamente LH y HCG tienen actividad intrínseca de TSH, situación que no se ha constatado que compartan otras substancias glucoprotéicas u hormonas adenohipofisarias. Este hallazgo permite suponer que los anticuerpos Ab alfa LH y Ab alfa HCG pudieran ser de gran utilidad en el estudio del hipertiroidismo secundario.

Se concluye que las subunidades alfa LH, FSH, TSH y HCG en el humano no comparten las mismas determinantes antigénicas a pesar de la estrecha semejanza en el número y tipo de aminoácidos de que están compuestas. Cuando se trata de estudiar producción hormonal alfa en humanos, resultaría conveniente efectuar estudios con radioinmunoensayos heterólogos de Ab alfa TSH, Ab alfa LH y Ab alfa HCG.

Tabla 1. Capacidad máxima de fijación hormonal (I-125) obtenida con anticuerpos anti-alfa glucoproteína

Anticuerpo	LH	FSH	%	HCG	TSH
Anti-alfa-LH	29.59	11.95		28.06	16.09
Anti-alfa-FSH	48.42	27.3		38.01	54.8
Anti-alfa-HCG	37.57	22.93		30.77	46.0
Anti-alfa-TSH	5.3	15.09		20.66	49.9

Tabla 2. Porcentaje de reacciones cruzadas

Anticuerpo	LH	FSH	HCG	TSH
Anti-alfa-LH	142.9	118.8	66.01	139.56
Anti-alfa-FSH	1	1	1	1
Anti-alfa-HCG	1	1	21.01	49.55
Anti-alfa-TSH	189	92.8	50.51	58.34

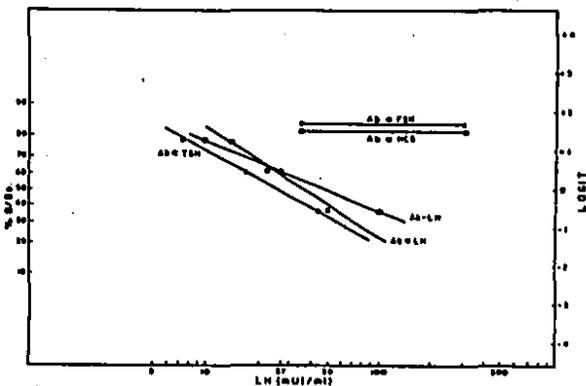


Figura 1. Curvas de inhibición usando anticuerpos anti alfa subunidades de hormonas glucoprotéicas en ensayo heterólogo de LH

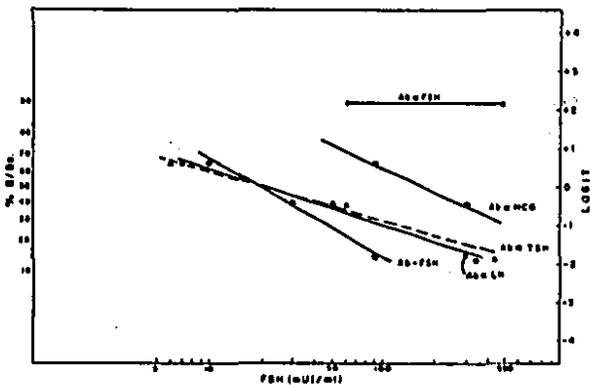


Figura 2. Curvas de inhibición usando anticuerpos anti alfa subunidades de hormonas glucoprotéicas en ensayo heterólogo de FSH

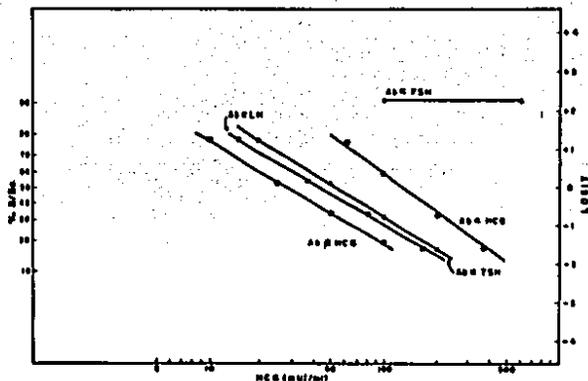


Figura 3. Curvas de inhibición usando anticuerpos anti alfa subunidad de hormonas glucoprotéicas en ensayo heterólogo de β HCG

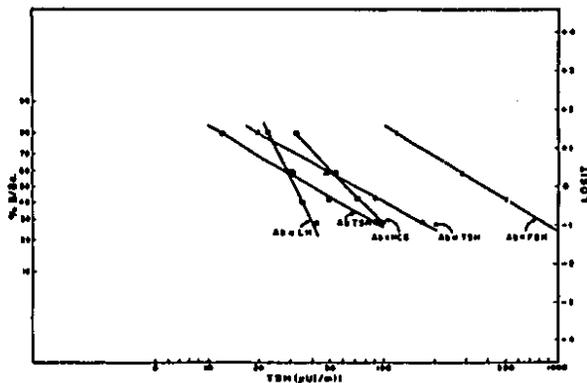


Figura 4. Curvas de inhibición usando anticuerpos anti alfa subunidad de hormonas glucoprotéicas en ensayo heterólogo de TSH

BIBLIOGRAFIA

1. Pierce JG. Eli Lilly Lecture: The subunits of pituitary thyrotropin - Their relationship to other glycoprotein hormones. *Endocrinology*, 1971, 89: 1331
2. Liao TH and Pierce JG: The presence of a common type of subunit in bovine thyroid-stimulating and luteinizing hormones. *J Biol Chem* 1970, 245:3275
3. Cheng KW, Glazer AN and Pierce JG: The effects of modification of the COOH terminal regions of bovine thyrotropin and its subunits. *J Biol Chem* 1973, 248:7930
4. Shuurs AHWM, De Jager E and Homan JD: Studies on human chorionic gonadotropin. *Acta Endocrinol (Kbh)* 1968,59:120
5. Laburthe MC, Dolais JR and Rosselin GE: Evidence for circulating alfa subunits of pituitary gonadotropins in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1973,37:156
6. Kourides IA, Weintraub B, Ridgway et.al: Pituitary secretion of free alpha and beta subunit of human thyrotropin in patients with thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 1975,40:872
7. Valtukaitis JL and Ross GT: Subunits of human glycoprotein hormones. *Israel J of Med Sci* 1974,10:1280
8. Wilber JF: Human pituitary thyrotropin. en: *Endocrinology*. De Groot LJ et.al. (eds). Grune and Stratton, New York 1979 pp 141
9. Kourides IA, Weintraub BD, Leuko MA et.al.: Alpha and beta subunits of human thyrotropin. Purification and development of specific radioimmunoassay. *Endocrinology* 1974,94:1411
10. Kourides IA, Ridgway EC, Weintraub BD, et.al.: Thyrotropin-induced hyperthyroidism: Use of alpha and beta subunit level to identify patients with pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1977,45:534
11. Kourides IA, Weintraub BD, Rosen SW, et.al.: Secretion of alpha subunit of glycoprotein hormones by pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1976,43:97

12. Lamberg BA, Pelkonen R, Gordin A, et.al.: Hyperthyroidism and acromegaly caused by a pituitary TSH and GH secreting tumour. Acta Endocrinol 1983,103:7
13. Ridgway EC, Klibanski A, Landerson PW, et.al.: Pure alpha-secreting pituitary adenomas. N Eng J Med 1981,304:1254
14. Klibanski A, Ridgway EC, Zervas NT, et.al.: Pure alpha subunit-secreting pituitary tumors. J Neurosurg 1983,59:585
15. Donini S, D'Alessio I and Donini P: Subunits of human chorionic gonadotropin: immunological and biological studies. Acta Endocrinol 1975,79:749
16. Goodman JW: Antigenic immunogenicity and specificity. en: Funderberg HH, Caldwell JL, Stites DP and Wells JV (eds). Basic and clinical immunology. Lange Medical Publications, 1980 pp 45