

Estudio comparativo sobre el poder de adsorción de FSH entre caolín y montmorillonita. Relación actividad biológica-inmunológica

M. Ruiz, M. Diego, M. T. Miranda y M. Morell

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

(Recibido el 22 de mayo de 1981)

M. RUIZ, A. M. DIEGO, M. T. MIRANDA and M. MORELL. *Comparison of Adsorption Capacity for FSH Between Kaolin and Montmorillonite. Biological and Immunological Activity Relation.* Rev. esp. Fisiol., 38, 29-34. 1982.

The adsorption capacity of urinary FSH has been studied comparatively with kaolin and montmorillonite, a new type of bentonite, never used before in gonadotrophin adsorption. To measure adsorption capacity, two different assay methods were used: bioassay (for biological activity of the kaolin and montmorillonite extracts) and radioimmunoassay (RIA) for the immunological activity of FSH in both extracts. From the present results a biological activity increase was observed in montmorillonite extracts, while no significant differences between immunological activity of FSH were found in either extract. These findings suggest that montmorillonite could replace kaolin in gonadotrophins extraction and purification methods.

Existen en la actualidad varios métodos para la extracción de gonadotropinas a partir de orina, los cuales difieren considerablemente en naturaleza y complejidad. BORTH y MENZI (5), usando como punto final el test de útero de ratón, encontraron que el método que mayor rendimiento ofrecía era el método de adsorción en caolín y precipitación con acetona (19), el cual presentaba además la ventaja de su economía y rapidez.

En el presente trabajo se realiza un estudio comparativo sobre el poder de adsorción de FSH urinaria entre dos arcillas: el caolín (arcilla utilizada normalmente en este tipo de extracción) y la

montmorillonita o bentonita (que por primera vez se utiliza en la adsorción de FSH urinaria). Se utilizó orina de mujer postmenopáusica, debido a que posee un marcado incremento en la producción de FSH y LH, ya que desaparece el *feedback* negativo ejercido por los esteroides ováricos.

Al mismo tiempo, se determinaron la actividad biológica e inmunológica de FSH que es adsorbida por cada tipo de arcilla, utilizando técnicas específicas y altamente sensibles, como son el Bioensayo y el Radioinmunoensayo (RIA). De esta forma, se estudia la correlación inmunobiológica (cociente B/I) en extrac-

tos urinarios, sobre los que existe muy poca información.

Material y métodos

El método de adsorción de FSH fue el mismo para ambas arcillas: el método de BORTH (4), modificación del de SCOTT (19), que consiste en adsorción en pH ácido y precipitación con acetona. Se utilizó la misma orina de mujer postmenopáusica, para ambas extracciones. Así, se obtienen dos tipos de extractos: uno, procedente de la adsorción con caolín y, otro, procedente de la adsorción con montmorillonita.

Para llevar a cabo las valoraciones de FSH en ambos extractos, se emplearon un bioensayo y un RIA. El primero, según el test de STEELMANN y POHLEY (20), modificado por BROWN (6), utilizando ratonas de 21 días de edad, de 8 a 11 g de peso y alimentadas *ad libitum*. En este bioensayo se trazó la recta estándar con unidades crecientes de FSH (según el 2° IRP-hMG). Al mismo tiempo, se determinaron los criterios de seguridad del bioensayo (sensibilidad, exactitud y precisión) (7, 12). El estándar utilizado fue un extracto urinario purificado de la casa Farma-Lepori (Pergonal 500), que contiene 71 U.I. de FSH según el 2° IRP-hMG.

Para comparar las actividades biológicas en ambos tipos de extractos, se utilizó un diseño de 4 puntos descrito por FINNEY (11), modificación del diseño de BORTH (3).

El RIA usado para la determinación de la actividad inmunológica de la FSH fue un método de precipitación con doble anticuerpo de la casa Diagnostic Products Corp. En este RIA, se construyeron dos rectas estándar (intraensayo e interensayo) y se determinaron también los criterios de seguridad (sensibilidad, exactitud y precisión [7, 12]). El estándar utilizado en este RIA fue un extracto pu-

rificado de origen hipofisario, suministrado por la misma casa comercial.

Para comparar la actividad inmunológica de FSH en ambos tipos de extractos (caolín y montmorillonita) se utilizó un contraste de hipótesis bilateral mediante una *t* de Student.

Además, se calculó el cociente entre la actividad biológica e inmunológica (B/I) de FSH en ambos extractos, sustituyendo los valores encontrados por bioensayo y RIA en sus respectivas rectas estándar.

Resultados

Se presentan los datos referentes a las actividades biológicas e inmunológica de FSH en extractos de caolín y montmorillonita. En el bioensayo, se construyó la recta estándar (fig. 1) con un coeficiente de correlación (*r*) de 0,99. Los criterios de seguridad fueron bastante aceptables. En la tabla I, se representan los mg de peso ovárica obtenidos tras la administración de dos niveles de dosis, tanto del estándar, como de los extractos de caolín

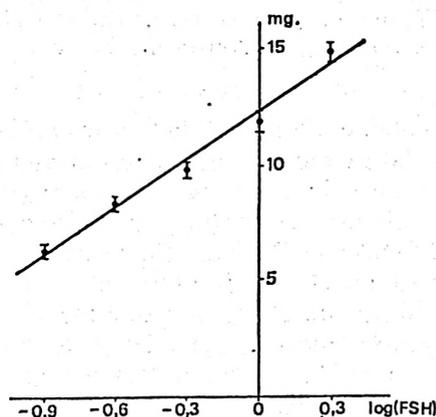


Fig. 1. Recta estándar del test de Steelman-Pohley ($y = 12,28 + 6,81 \log x$; $r = 0,99$). En ordenadas, pesos ováricos en mg. En abscisas, los log. de las concentraciones de FSH. Cada valor se representa por $\bar{x} \pm E.E.M.$

Tabla I. Expresión de los pesos ováricos, en mg, obtenidos en el test de Steelmann-Pohley ($\bar{x} \pm E.E.M.$) y sus unidades correspondientes (según el 2.º IRP-hMG) al sustituirlos en la recta estándar; a dos niveles de dosis del estándar y de los extractos. Número de animales por grupo, 5.

Estándar		Caolín		Montmorillonita	
0,5 U.I.	1 U.I.	1/360 *	1/180	1/360	1/180
9,9 ± 0,24 mg	12,1 ± 0,40 mg	9 ± 0,83 mg	11,4 ± 0,87 mg	10,2 ± 0,37 mg	12 ± 0,32 mg
0,45 U.I.	0,94 U.I.	0,33 U.I.	0,74 U.I.	0,49 U.I.	0,91 U.I.

* Las fracciones numéricas indican la parte del extracto de orina de 24 horas que se inyecta.

y montmorillonita. En la tabla II, se representan los valores obtenidos tras la aplicación del tratamiento matemático de FINNEY (11). Se obtuvo una potencia del contraste (R) mayor para los extractos de montmorillonita que para los de caolín, lo que demuestra una mayor actividad biológica de FSH en aquellos extractos obtenidos con montmorillonita. Los criterios de aplicabilidad de los extractos (λ , L_p , L_d , L_r) fueron aceptables.

En el RIA, se obtuvieron dos rectas estándar, una intraensayo, y otra interensayo (fig. 2), ambas con un coeficiente de correlación (r) de $-0,99$. Los criterios de seguridad fueron más aceptables, como era de esperar, que los obtenidos por bioensayo. Los resultados obtenidos tras el RIA de 1/180 del extracto total de orina de 24 horas por ambos métodos (caolín y montmorillonita) fueron de $0,334 \pm 0,008$ U.I., para el caolín, y

$0,332 \pm 0,12$ U.I., para la montmorillonita, según el 2.º IRP-hMG. Aplicando la t de Student, no se encontraron diferencias significativas, de lo que se deduce que ambos tipos de extractos tienen la misma actividad inmunológica de FSH.

Sustituyendo en la recta estándar los mg de peso ovárico encontrados en el bioensayo para 1/180 del extracto total de orina de 24 horas, se obtuvo un B/I de 2,21 para los extractos de caolín y de 2,73 para los extractos de montmorillonita.

Tabla II. Expresión de los resultados del bioensayo de Steelman-Pohley, tras la aplicación del tratamiento matemático de Finney.

	Estándar-caolín	Estándar-montmor.
Potencia del contraste (R)	0,78	1,03
Pendiente combinada (b)	7,64	6,64
Índice de precisión (λ)	0,19	0,11
Diferencias entre preparaciones (L_p)	N.S.	N.S.
Divergencia (L_d)	N.S.	N.S.
Regresión combinada	12,5 *	34,7 **

N.S. = no significativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

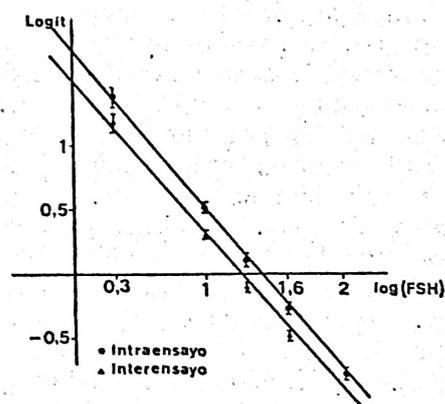


Fig. 2. Rectas estándar del RIA de FSH, intraensayo (4 determinaciones por cada nivel de dosis, en un mismo análisis) e interensayo (10 determinaciones por cada nivel de dosis, en análisis diferentes).

En ordenadas, los logit; en abscisas, los log. de las concentraciones de FSH. Cada valor se representa por $\bar{x} \pm E.E.M.$

Discusión

Se presenta un estudio comparativo entre el poder de adsorción de FSH urinaria en dos arcillas: el caolín y la montmorillonita, siendo esta última la primera vez que se utiliza para este tipo de extracción, si bien ha sido utilizada como fase sólida en el RIA de FSH (17).

La actividad biológica para la FSH obtenida en orina de 24 horas de mujer postmenopáusica, con ambos métodos, entra dentro de los valores encontrados en otras publicaciones (1, 2, 18), aunque esta actividad varía dependiendo de la edad de la mujer, del método de extracción y del bioensayo utilizados.

Atendiendo a la potencia del contraste (R), en la comparación estándar-caolín y estándar-montmorillonita, se obtuvo una mayor potencia en los extractos de montmorillonita, por lo que se puede decir que esta arcilla adsorbe más cantidad de FSH biológicamente activa que los extractos de caolín.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la actividad inmunológica medida por RIA, en ambos extractos, lo que hace pensar que ambas arcillas adsorben la misma cantidad de FSH inmunológicamente activa. El problema fundamental en este punto de la discusión es la falta de información sobre los valores radioinmunológicos de extractos urinarios de gonadotropinas, ya que la mayoría de los trabajos publicados sobre RIA de FSH se realizan en muestras de suero o hipófisis (14).

El problema de la actividad biológica e inmunológica en una misma hormona es interesante, no sólo desde el punto de vista estructural (8, 16, 21), sino también desde el punto de vista práctico, pues los métodos inmunológicos están reemplazando a los biológicos en las determinaciones hormonales. En este trabajo, el cociente B/I fue de 2,21 en los extractos de caolín y de 2,73 en los extractos de montmorillonita. Estos valores están dentro de los

límites encontrados en otras publicaciones (9, 10, 13, 15), si bien sólo (15) utiliza extractos urinarios en su comparación. A través de estos resultados, se puede observar que el B/I es mayor en los extractos de montmorillonita, debido a un aumento de la actividad biológica, ya que la actividad inmunológica permanece invariable en ambos métodos de extracción.

Por último, se puede concluir que el método de adsorción con montmorillonita posee mayor capacidad de captación de FSH que el de caolín, en cuanto a actividad biológica se refiere. Es de esperar que modificando el método utilizado, descrito originalmente para la adsorción con caolín, se pueda conseguir una mayor capacidad de adsorción de FSH.

Resumen

Se estudia el poder de adsorción de FSH urinaria en dos tipos de arcillas: caolín, arcilla clásica en este tipo de extracción, y montmorillonita o bentonina, no empleada en la adsorción de gonadotropinas. Para cuantificar este poder de adsorción, se utilizan dos métodos de determinación hormonal: Bioensayo y Radioinmunoensayo (RIA). Según los resultados obtenidos, se observa un aumento de la actividad biológica en extractos de montmorillonita, mientras que no existen diferencias significativas en la actividad inmunológica de ambos extractos. Estos hallazgos hacen pensar que la montmorillonita pueda sustituir al caolín en los procesos de extracción y purificación de gonadotropinas.

Bibliografía

1. ALBERT, A.: *Fertil. Steril.*, 10, 60-82, 1959.
2. APOSTOLAKIS, M.: *Acta endocr., Copenh.*, 49, 1-16, 1966.
3. BORTH, R.: *Acta endocr.*, 35, 454-458, 1960.
4. BORTH, R.: En «Human Pituitary Gonadotrophins» (A. Albert, ed.). Thomas, París, 1961. pp. 13-15.
5. BORTH, R. y MENZI, A.: *Acta endocr., Copenh.*, suppl. 90, 17-24, 1964.

6. BROWN, P. S.: *J. Endocrin.*, **13**, 59-64, 1955.
7. BROWN, J. B., BULBROOK, R. P. y GREENWOOD, F. C.: *J. Endocrin.*, **16**, 41-50, 1957.
8. BUTT, W. R., CROOKE, A. C., CUNNINGHAM, F. G. y WOLF, A.: *J. Endocrin.*, **25**, 541-547, 1963.
9. DIEBEL, N. D., YAKAMOTO, M. y BOGDANOVA, E. M.: *Endocrinology*, **92**, 1065-1078, 1973.
10. FAIMAN, C. y RYAN, R. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **165**, 1130-1138, 1967.
11. FINNEY, D. J.: En «Statistical Methods in Biological Assay» (D. J. Finney, ed.). Charles Griffin & Company Ltd., Londres, 1978. pp. 227-235.
12. KRAUSE, P. K., HUMMERICH y POULSEN, K.: En «Radioimmunoassay of Renin-Angiotensin System» (P. K. Krause, W. Hummerich, K. Poulsen, eds.). G. Thieme, Stuttgart, 1978, pp. 153-155.
13. LEINDERBERGER, F. L., WILLASCHECK, R., PAHNKE, V. G. y REICHERT, Jr., L. E.: *Acta endocr., Copenh.*, **81**, 54-61, 1976.
14. MORELL, M. y BUTT, W. R.: *Rev. esp. Fisiol.*, **27**, 95-98, 1971.
15. MORELL, M., BUTT, W. R. y AYANZ, A.: *Rev. esp. Fisiol.*, **27**, 45-48, 1971.
16. MORELL, M., CROOKE, A. C. y BUTT, W. R.: *J. Endocrin.*, **41**, 571-575, 1968.
17. MORELL, M. y MAS, M.: *Rev. Diag. Biol.*, **22**, 271-274, 1973.
18. ROSS, P.: *Acta endocr., Copenh.*, **131**, 32-37, 1968.
19. SCOTT, L. D.: *Br. J. exp. Path.*, **21**, 320-332, 1941.
20. STEELMAN, S. L. y POHLEY, F. M.: *Endocrinology*, **53**, 604-616, 1953.
21. VAITUKAITIS, J. L., ROSS, G. T. y REICHERT, Jr., L. E.: *Endocrinology*, **92**, 411-416, 1973.

