

## Un nuevo método de purificación de la hormona folículo estimulante humana

M. Morell \* y W. R. Butt

Departamento de Fisiología y Bioquímica. Facultad de Medicina  
Universidad de Granada (España)

(Recibido el 26 de octubre de 1970)

M. MORELL y W. R. BUTT. *Purification of Human Follicle Stimulating Hormone*. R. esp. Fisiol., 27, 95-98. 1971.

For the first time a completely pure extract of FSH, exempt of its usual contaminating agents; luteinizing hormone and albumin, was obtained. The inactivation of the contaminating agents was done by immunological means. The authors speculate about the possibilities of this pure preparation in the field of the basic Physiology of the Follicle Stimulating Hormone.

En la purificación de la hormona folículo estimulante (FSH) se viene tropezando con la dificultad de separar sus contaminantes habituales: albúmina (Alb.) y hormona luteinizante (LH). Por otra parte, el llegar a conseguirlo es de suma importancia, no sólo porque sería la única forma de poder realizar estudios definitivos sobre las acciones fisiológicas de la FSH, sino por el hecho de haber obtenido tal hormona como antígeno puro, lo que llevaría consigo poder preparar mejores antisueros y realizar más fácilmente su marcaje con isótopos.

Para conseguir este objetivo se ha acudido a cromatografías repetidas (2, 9), a digestiones enzimáticas (10, 11) e incluso a la acción de detergentes suaves (6). A pesar de estos múltiples esfuerzos, aún no se ha logrado ninguna preparación de FSH totalmente pura.

En el presente trabajo es la primera vez que se intenta, por caminos distintos a los antes citados, conseguir un preparado de FSH exento de actividades de albúmina y de LH. Para ello nos hemos valido de la inactivación de los contaminantes más arriba citados por medios inmunológicos.

### Material y métodos

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN INICIAL DE FSH.** Se parte de hipófisis humanas conservadas en acetona a 4° C. Estas hipófisis se someten a un proceso de deshidratación a base de acetona; el producto obtenido se seca con más acetona, quedando reducido a un polvo fino. En él se aísla la FSH siguiendo el esquema de BUTT *et al.* (5). El material empleado fue el correspondiente a la fracción CM<sub>1</sub>, que es la obtenida tras la cromatografía en carboximetilcelulosa, y la de CP<sub>1</sub>, que se obtiene tras la cromatografía en dietilamino-etil-celulosa (2, 7).

\* Dirección actual: Departamento de Fisiología y Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Tenerife (España).

**PREPARACIÓN DE ANTISUEROS.** Se siguió el procedimiento recomendado por BUTT *et al.* y WOLF (3, 13). Después se utilizó antiHCG en lugar de antiLH aprovechando la reacción cruzada que se produce entre LH y antiHCG.

**CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE ANTISUERO A AÑADIR.** En primer lugar se titula el antisuero con hemáties marcados con los respectivos antígenos y mediante la reacción de hemoaglutinación. En el caso de la FSH se utilizaron los preparados CM<sub>1</sub> y CP<sub>1</sub> en soluciones de una concentración igual a 20 y 100 µg/ml. El efecto final se objetiva mediante la reacción de inhibición de la hemoaglutinación (4, 12).

**VALORACIONES BIOLÓGICAS E INMUNOLÓGICAS.** En la valoración biológica de FSH se siguió el método de BROWN (1) y el de PARLOW (8) para la LH. Para llevar a cabo estas valoraciones se tomó una alícuota de 0,1 ml de cada uno de los tubos más representativos, tras el paso por la columna de Sephadex. En la localización de las actividades inmunológicas de FSH, LH y albúmina se empleó la reacción de inhibición de la hemoaglutinación según las técnicas antes referidas.

**PROCEDIMIENTO GENERAL.** Se emplearon los preparados CM<sub>1</sub> y CP<sub>1</sub>, que son de distinto grado de pureza, añadiéndole a cada uno de ellos las cantidades, previamente calculadas, de antiHCG y anti-albúmina. Se mezclan bien y dejan incubar durante la noche a 4° C. Después se centrifuga y se toma el sobrenadante, que se pasa por una columna de Sephadex G-200, preparada con buffer fosfato a pH 7.4 y previamente saturada con albúmina.

Se recogen fracciones de 2.5 ml y se comprueba en cada una de ellas la actividad biológica e inmunológica de FSH, LH y albúmina, al mismo tiempo que se siguen los cambios en la concentración proteica mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu.

## Resultados

En la figura 1 se presentan los resultados de FSH desde el punto de vista biológico e inmunológico, así como la concentración proteica. Se puede observar que no aparecen actividades de LH, ni de albúmina, encontrándose un máximo de actividad de FSH en el tubo 10 de los obtenidos tras el pase por Sephadex G-200. Este máximo coincide con la máxima concentración proteica. En la tabla I se sintetizan todos estos datos.

Tabla I. *Valoración biológica de hormona foliculo estimulante.*

Fracciones de 2,5 ml obtenidas tras la cromatografía en columna de Sephadex G-200. En las distintas columnas se especifica la concentración proteica y las actividades de FSH, albúmina y LH en cada una de las fracciones obtenidas. En cada valoración se han utilizado 6 ratones.

| Tubo n.º | D.O.  | A.B.*<br>FSH<br>peso ovario<br>mg | Actividad inmunológica |    |     |
|----------|-------|-----------------------------------|------------------------|----|-----|
|          |       |                                   | Alb                    | LH | FSH |
| 1        | 0,238 | 6,43                              | —                      | —  | —   |
| 2        | 0,175 |                                   | —                      | —  | —   |
| 3        | 0,265 |                                   | —                      | —  | —   |
| 4        | 0,305 |                                   | —                      | —  | +   |
| 5        | 0,450 |                                   | —                      | —  | +   |
| 6        | 0,533 |                                   | —                      | —  | +   |
| 7        | 0,614 | 18,35                             | —                      | —  | +   |
| 8        | 0,650 |                                   | —                      | —  | +   |
| 9        | 0,615 |                                   | —                      | —  | +   |
| 10       | 0,867 |                                   | —                      | —  | +   |
| 11       | 0,550 |                                   | —                      | —  | +   |
| 12       | 0,330 |                                   | —                      | —  | +   |
| 13       | 0,312 | 13,21                             | —                      | —  | +   |
| 14       | 0,201 |                                   | —                      | —  | +   |
| 15       | 0,300 |                                   | —                      | —  | +   |
| 16       | 0,130 |                                   | —                      | —  | +   |
| 17       | 0,080 | 4,70                              | —                      | —  | —   |
| 18       | 0,030 |                                   | —                      | —  | —   |
| 19       | 0,015 |                                   | —                      | —  | —   |
| 20       | 0,000 |                                   | —                      | —  | —   |

\* FSH = hormona foliculo estimulante; Alb = albúmina; LH = hormona luteinizante; A.B. = actividad biológica.

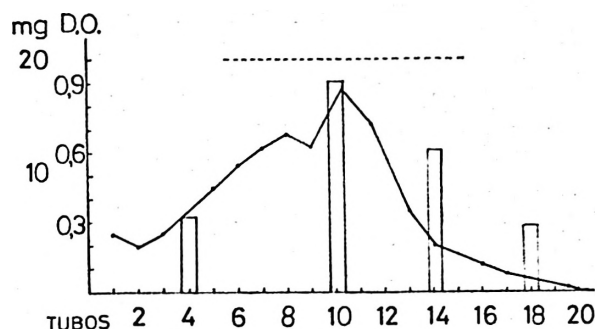


Fig. 1. Valores referentes a las actividades biológica, inmunológica y de proteína de preparados de hormona folículo estimulante.

Actividad inmunológica (---); actividad biológica (—); mg de proteína (□).

### Discusión

El método inmunológico empleado en la inactivación de los contaminantes LH y albúmina, presentes en nuestros preparados de FSH, da un rendimiento superior a los métodos enzimáticos (10, 11) y al conseguido tras la utilización de detergentes suaves (6) empleados por otros autores en la purificación de FSH. En el caso de los métodos enzimáticos, debido a que la contaminación enzimática puede tener consecuencias en la utilización del preparado en seres humanos y, si se intenta purificar, además de no conseguirlo totalmente, se pierde una buena proporción de hormona. En cuanto a los detergentes, sólo se puede decir que, aparte de no llegar a una inactivación total de la LH, puede afectar seriamente a la actividad biológica del preparado.

En la figura 1 se puede observar cómo el tubo 10 contiene sólo FSH, resultado que fue contrastado por métodos biológicos e inmunológicos y con una gran coincidencia en los resultados obtenidos por ambos métodos. Este tubo contiene, pues, una preparación de FSH totalmente desprovista de sus contaminantes habituales: LH y albúmina, los cuales no pudieron ser detectados, al menos por los métodos a nuestro alcance.

No se han comprobado las propiedades del preparado obtenido, aunque se puede afirmar que su actividad biológica es igual o ligeramente superior a la que sirvió de punto de partida (140-200 U.I./mg de FSH en el CM<sub>1</sub>) y comparable a las otras preparaciones similares descritas en la literatura (3, 6, 9, 11). Para el preparado CP<sub>1</sub>, los resultados fueron más variables.

Aún nos queda por estudiar si esta preparación de FSH es la más idónea para investigaciones de tipo fisiológico, pues uno de los mayores obstáculos para comprender la fisiología elemental de la hormona folículo estimulante (FSH) es la gran dificultad encontrada al intentar separar esta hormona de la LH (11); se espera que la FSH obtenida por nosotros sirva para estos fines.

### Resumen

Por primera vez se presenta un preparado de hormona folículo estimulante hipofisaria totalmente exenta de sus contaminantes habituales: hormona luteinizante y albúmina. La inactivación de estos contaminantes se consiguió por métodos inmunológicos.

### Bibliografía

- BROWN, P.: *J. Endocr.*, **13**, 59, 1955.
- BUTT, W. R., CROOKE, A. C. y CUNNINGHAM, F. J.: *Biochem. J.*, **81**, 596, 1961.
- BUTT, W. R., CROOKE, A. C. y CUNNINGHAM, F. J.: *Nature*, **197**, 388, 1963.
- BUTT, W. R., CROOKE, A. C., CUNNINGHAM, F. J. e INGRASSIA, F.: *Proc. R. Soc. Med.*, **57**, 51, 1964.
- BUTT, W. R., CUNNINGHAM, F. J. y HARTREE, A. S.: *Proc. R. Soc. Med.*, **57**, 107, 1964.
- JIANG, N. S. y ALBERT, A.: *J. Clin. Endocr.*, **28**, 1295, 1968.
- MORELL, M., CROOKE, A. C. y BUTT, W. R.: *J. Endocr.*, **41**, 571, 1968.
- PARLOW, A. F.: In «Human Pituitary Gonadotrophins», CHARLES C. THOMAS y

- ALBERT, A. (ed.). Springfield, III, p. 301, 1961.
9. ROOS, P.: Human Follicle Stimulating Hormone. Upsala, 1967.
10. REICHERT, L. E.: *J. Endocr., Clin.*, **27**, 1065, 1967.
11. REICHERT, L. E.: *Endocrinology*, **84**, 9, 1969.
12. WIDE, L., ROOS, P. y GEMZEL, A. C.: *Acta Endocr.*, **37**, 445, 1961.
13. WOLF, A.: *Nature*, **211**, 942, 1966.