

Determinación por radioinmunoanálisis de la hormona luteinizante en plasma humano

J. A. F. Tresguerres, M. Martínez-Guarro, A. Tejero* y A. Oriol-Bosch

Cátedra de Endocrinología Experimental
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid - 3

(Recibido el 15 de noviembre de 1974)

J. A. F. TRESGUERRES, M. MARTINEZ-GUARRO, A. TEJERO and A. ORIOL-BOSCH. *Radioimmunologic Method for the Measurement of Plasmatic LH in Humans*. Rev. esp. Fisiol., 31, 99-104. 1975.

A simple radioimmunologic method for the measurement of plasmatic LH concentration is described. This procedure utilizes a second antibody for the separation by precipitation of the bound from the free hormone. LH is labelled with ^{125}I by means of a modified Greenwood and Hunter Chloramine T procedure. Three reference compounds, LER-907, MRC 68/40 and 2nd IRP-HMG, have been compared. The daily plasma concentrations of LH along the menstrual cycle in 12 young normal women and the changes induced by 100 μg LHRH were measured, validating the method used since it is capable of detecting the expected variations.

Gracias a las técnicas del radioinmunoanálisis (RIA), introducido por BERSON y YALLOW (3, 16), se ha hecho factible la detección de los niveles fisiológicos de la hormona luteinizante (LH), en cantidades pequeñas de plasma u orina (1, 10).

La sencillez metodológica del RIA de LH ha conducido a la introducción en el mercado de varios «Kits» comerciales, que permiten su fácil determinación. Sin embargo, su disponibilidad limitada a las fechas de producción, el corto tiempo de su utilización, la imposibilidad de purifi-

cación de los componentes, especialmente la hormona marcada, por su escasa cantidad y el precio relativamente elevado que no permiten la introducción de suficientes controles de calidad, son inconvenientes que presentan dichos «Kits» y que han sugerido la conveniencia de desarrollar un método para la medida de LH, utilizando materiales de diferentes orígenes.

Material y métodos

La LH humana altamente purificada para marcaje (2.000 UI/mg) y el anticuerpo anti-LH-HCG han sido adquiridos a Calbiochem AG, así como la cloramina T

* Cátedra I de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid - 3.

y el metabisulfito sódico. Los reactivos fosfato monopotásico, disódico y yoduro potásico son Merck, de calidad reactivo análisis. El Sephadex G-75 y Columna de Cromatografía K-15/30 de Pharmacia (Uppsala). El I^{125} (Hoechst) tiene una actividad específica de 8-15 Ci/mg. La albúmina bovina (BSA), Fracción V, *Sigma Chemicals* (USA). El segundo anticuerpo es de cabra con antigammaglobulina de conejo y ha sido adquirido a *Antibodies Incorporated* (USA).

Los preparados de referencia utilizados son: a) LER-907, suministrado por NIAMD*, constituido por un extracto parcialmente purificado de hipófisis humana, con 48 UI de LH y 20 UI de FSH por mg. b) El 2.º IRP-HMG**, constituido por un extracto de orina de mujeres posmenopáusicas, conteniendo 40 UI de LH y 40 UI de FSH por ampolla. c) El MRC 68/40**, que es un preparado muy purificado de extracto hipofisario, conteniendo 77 UI de LH por ampolla.

Tampones. El tampón de fosfatos 0,5 M (A) se confecciona con 418 ml de una solución de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (44,5 g en 500 ml) y 82 ml de otra de KH_2PO_4 (6,8 g en 100 ml), ajustando el pH a 7,6. El tampón B se prepara por dilución 1/10 del anterior (0,05 M) y el tampón C es de 1/50 del primero (0,01 M).

Preparación de la columna de Sephadex. Se utiliza una columna para cromatografía Pharmacia K-15/30. Se pesan 4 g de Sephadex G-75 y se equilibran en 100 ml de agua durante 24 horas. Se empaqueta la columna y se equilibra con tampón B durante 1-2 horas. Seguidamen-

te se satura con 250 μ l del mismo tampón con 20 % de BSA lavándola a continuación durante 15-30 minutos.

Marcaje de la hormona. La LH altamente purificada (2 μ g), se disuelve en 10 μ l de tampón C y se hace reaccionar con un milicurio de I^{125} en el vial de transporte del mismo, en el que previamente se han añadido 25 μ l de cloramina T disueltos en 20 μ l de tampón B. Se agita suavemente durante 30 segundos y seguidamente se adicionan 125 μ g de metabisulfito sódico en 100 μ l del mismo tampón. Se aspiran los 155 μ l resultantes y se depositan con mucho cuidado en la columna de Sephadex, previamente preparada.

El vial donde se ha verificado la reacción se lava dos veces con 100 μ l de una solución de IK en tampón B (10 mg/ml), que se pone también en la columna. La separación cromatográfica de la hormona marcada y el exceso de I^{125} libre se realiza con el tampón B. A los 7 minutos, se comienzan a tomar fracciones de 1,5 ml en tubos que contienen 100 μ l de solución al 20 % de BSA en el mismo tampón.

Purificación. La LH marcada según lo descrito precisa de ulteriores purificaciones. Estas se efectúan en la misma columna cromatográfica, con idéntico eluyente y las fracciones a recoger son de igual volumen que lo descrito en el apartado anterior. Es aconsejable que el volumen de LH marcada a purificar no sea superior a 4 ml.

Preparación de reactivos para el RIA. El anticuerpo liofilizado se diluye al 1:10 en tampón C, adicionado de 2 % de suero normal de conejo y se congela a -20° C inmediatamente. A partir de esta solución de almacenamiento se prepara la dilución de trabajo de 1:2.000 en el mismo tampón con 0,05 M EDTA.

Los preparados de referencia LER-907, 2.º IRP-HMG y MRC 68/40 se disuelven

* National Pituitary Agency, National Institute for Arthritis and Metabolic Diseases, USA.

** Medical Research Council de Gran Bretaña, Departamento de Estándars Biológicos de la OMS.

en tampón C con 1 % de BSA, separándose en pequeñas fracciones que se congelan a -20°C . En el momento de su uso se disuelven en el mismo tampón hasta conseguir concentraciones desde 0,25 mIU hasta 32 mIU en 200 μl . Estos estándares se pueden preparar y conservar congelados a -20°C durante dos meses.

La LH- I^{125} recién purificada se disuelve en tampón C con 0,1 % de BSA hasta conseguir 20.000 cpm en 100 μl . El segundo anticuerpo de cabra antigammaglobulina de conejo debe calibrarse previamente, analizando cuál es la cantidad mínima que consigue el máximo de precipitación del complejo anticuerpo-LH- I^{125} . Dicha cantidad se lleva hasta 200 μl con tampón C.

Proceso. Se realiza en tubos de plástico ($7,5 \times 1$ cm) en los que se añaden sucesivamente: 200 μl de estándar o cantidad variable de muestra de plasma (25 a 400 μl) completando hasta un volumen total de 500 μl con tampón C con 1 % de BSA; 200 μl de solución 1:2.000 de antisuero anti-LH-HCG y 100 μl de hormona marcada. A continuación se agita en vortex durante 5 segundos.

Transcurridos 5 días de incubación a 4°C se añade el segundo anticuerpo previamente titulado y se vuelve a incubar a la misma temperatura entre 3 y 24 horas. A continuación se centrifuga a 3.000 rpm durante 30 minutos y se descarta el sobrenadante. El precipitado se cuenta en contador gamma (Nuclear Chicago) dejando acumular suficiente número de cuentas para tener un error inferior al 1 %.

Muestras. Se han obtenido muestras de sangre a lo largo del ciclo menstrual de 12 jóvenes voluntarias normales, entre las 9 y 11 horas de la mañana, en días alternos durante los primeros y últimos días del ciclo y diariamente en los centrales, estimados como preovulatorios. Todas las voluntarias tomaron su temperatura basal a lo largo del ciclo y se sometieron a un examen ginecológico.

A un grupo de 7 pacientes infértiles se les tomó muestras de sangre antes y a los 30, 60 y 120 minutos de la administración endovenosa rápida de 100 μg de hormona hipotalámica estimulante de la secreción gonadotrófica hipofisaria (LHRH) de origen sintético.

Resultados

Marcaje y purificación. Entre los 15 y 18 ml de elución de la columna de Sephadex G-75 se obtiene un primer pico de radiactividad, correspondiente a la LH- I^{125} . A continuación, aparece otro pico, generalmente mayor y que corresponde al I^{125} libre (fig. 1).

En purificaciones subsiguientes se obtienen de igual forma un primer pico de I^{125} fijado a la LH, seguido de otro más pequeño correspondiente al unido a los péptidos de degradación de la LH, siendo la magnitud de este segundo pico proporcional al tiempo transcurrido desde el marcaje.

RIA. En las condiciones de trabajo descritas se obtiene una relación de hormona libre a unida de aproximadamente 0,66, correspondiente a una unión del 40 % de la actividad total en la dilución

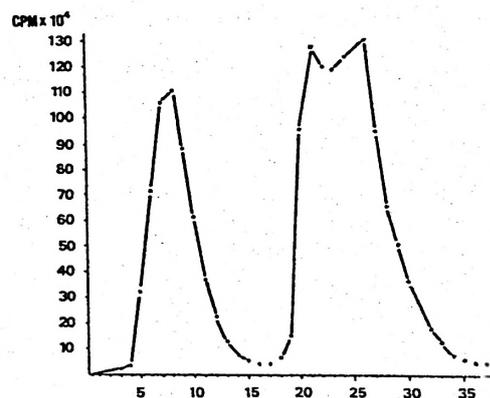


Fig. 1. Marcaje de LH con 1 mCi de I^{125} . El primer pico contiene la hormona radiactiva y el segundo el yodo libre.

utilizada del anticuerpo, a concentración cero de hormona fría.

Las curvas de calibración obtenidas muestran una pendiente utilizable entre 0,25 y 8 mIU si empleamos el LER-907 y entre 1 y 16 mIU si utilizamos el MRC 68/40 o el 2.º IRP-HMG, no siendo paralelas las pendientes de los dos últimos con respecto al primero al realizar una linearización logit-log (fig. 2). El método da un coeficiente de variación dentro de la misma serie del 9 y del 20 % cuando se comparan series analíticas diferentes.

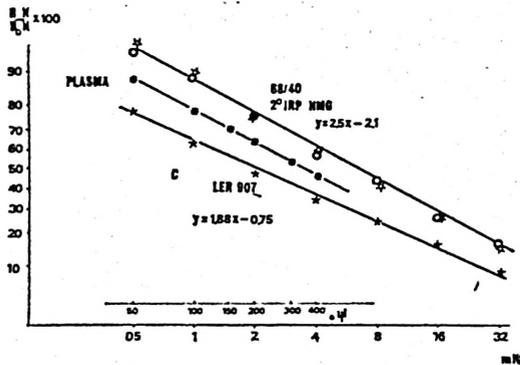


Fig. 2. Linearización logit-log, de curvas de LH con diferentes patrones, comparándolos con diluciones de plasma de posmenopáusicas.

La linealidad obtenida al añadir distintos volúmenes demuestra que la cantidad de hormona medida es satisfactoria, obteniéndose un coeficiente de correlación alto ($r = 0,9$).

Validación fisiológica del método. Los valores obtenidos en un grupo de 12 mujeres jóvenes clínicamente normales y cuyos ciclos de carácter bifásico se han controlado por la temperatura corporal basal, se hallan presentados en la figura 3. En ella se evidencia la existencia de un máximo de concentración en el centro del ciclo coincidiendo con el período periovulatorio.

Las modificaciones en la concentración

plasmática de LH tras la administración endovenosa de 100 μg de LHRH en 7 mujeres (fig. 4) evidencian la capacidad del método para detectar las respuestas hipofisarias a dicho estímulo.

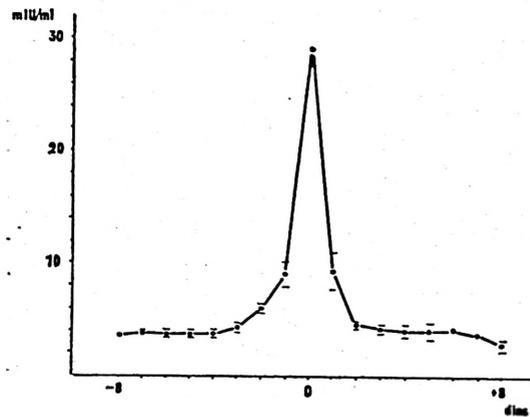


Fig. 3. Medidas de las concentraciones plasmáticas de LH a lo largo de 12 ciclos menstruales en mujeres jóvenes normales. Los valores de LH han sido sincronizados tomando como día cero el de concentración máxima. Valores medios y errores estándar.

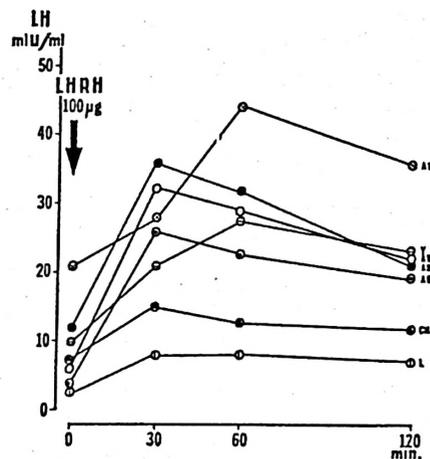


Fig. 4. Variaciones en las concentraciones de LH tras la administración intravenosa de 100 μg de la hormona hipotalámica estimulante de la secreción de gonadotropinas (LHRH) sintética.

Discusión

El método utilizado se basa en el descrito originalmente por MIDGLEY, JR. (10). El marcaje de la LH ha sido realizado con I¹²⁵ (7) en vez del I¹³¹ utilizado originalmente por GREENWOOD *et al.* (6) y por MIDGLEY, JR. (10) por la mayor vida media de este isótopo.

Puesto que la hormona marcada se degrada, se hacen precisas nuevas purificaciones si no se utiliza dentro del intervalo máximo de una semana después del marcaje. Debido a que durante los dos meses de utilización posible de la hormona, baja gradualmente su actividad específica, es conveniente ir disminuyendo progresivamente la cantidad de radiactividad que se introduce en el RIA para así trabajar siempre con la misma masa de LH-I¹²⁵ y que de esta manera se mantenga siempre constante el cociente hormona radiactiva a antisuero utilizado en el ensayo.

Para la separación de la hormona libre de la unida al anticuerpo, se pueden utilizar varios métodos: cromatoelectroforesis (3), separación por inmuoadsorbente (9), separación en fase sólida (4), inmunoprecipitación por doble anticuerpo con centrifugación (5, 11, 12). Todos ellos presentan el inconveniente de su complejidad instrumental o peor reproducibilidad frente a la precipitación por medio de un segundo anticuerpo que capta el complejo hormona-antisuero específico y que es un sistema sencillo y de fácil manejo (10).

Es conveniente la adición de una cierta cantidad de suero de conejo (0,4 % en el volumen total de incubación de cada tubo de RIA) de forma que se aumente suficientemente la formación del precipitado y pueda así separarse por simple centrifugación (5, 10, 11). En la literatura se menciona un mínimo de 24 horas de incubación con el segundo anticuerpo para conseguir la misma precipitación; sin embargo, parecen ser suficientes tres horas a 4° C para conseguirla. El problema de

la elección del preparado de referencia no parece estar todavía resuelto. Por ello se estudió el paralelismo, por linearización logit-log, de las curvas patrones obtenidas con LER-907, 2.° IRP-HMG y MRC 68/40 con la curva obtenida con cantidades crecientes de plasma humano. Se encontró un paralelismo adecuado con la del 2.° IRP-HMG y el MRC 68/40 mientras que el LER-907 no lo presentaba, por lo cual no parece conveniente su utilización, pues introduciría errores variables dependiendo de la cantidad de LH presente en cada muestra. Este problema ha sido recientemente señalado (2, 13), habiéndose llegado a plantear la necesidad de utilizar como preparado de referencia plasma de mujer menopáusica previamente calibrado. Los resultados obtenidos, sin embargo, no hacen necesaria dicha medida porque tanto el 2.° IRP-HMG como el MRC 68/40 parecen adecuados para dicho fin.

Los valores obtenidos para la LH, con el método descrito, a lo largo de los ciclos menstruales coinciden con los obtenidos por otros autores (14, 15), presentando un máximo de concentración plasmática en la mitad del ciclo, a partir del cual comienzan a subir los valores de progesterona. Asimismo, la magnitud y la cinética de la respuesta del LH plasmático tras la administración de LHRH es similar a las descritas recientemente (8).

El método presentado permite la determinación de LH en plasma con una sensibilidad mínima de 0,6 mIU/ml a un coste sensiblemente inferior al de los «Kits» comerciales, con una adecuada reproductibilidad.

AGRADECIMIENTOS

A la generosa donación de LER-907 por el *National Pituitary Agency* (NIH, Bethesda, Md. USA) y al Departamento de Estándars Biológicos del *Medical Research Council* de Gran Bretaña que suministró los preparados 68/40 y 2.° IRP-HMG. Al Dr. J. Cortés por el es-

tudio ginecológico de las voluntarias y al Dr. Borull que administró LHRH a sus pacientes, y a la Srta. Carmen Martínez Parra por su ayuda técnica.

Resumen

Se describe la puesta a punto de un método sencillo para la medida de LH plasmático, utilizando un segundo anticuerpo para separar, por inmunoprecipitación, la hormona trazadora marcada libre de la ligada al anticuerpo. Se ha marcado un preparado de LH altamente purificado con I^{25} , basándonos en el método de la cloramina T descrito por Greenwood y Hunter. Se comparan tres preparados de referencia LER-907, MRC 68/40 y 2.º IRP-HMG para su utilización como patrones.

Se han determinado las concentraciones de LH plasmático en 12 mujeres jóvenes, voluntarias y normales, a lo largo de un ciclo menstrual controlado clínicamente, así como la respuesta obtenida a la administración de 100 μ g de la hormona hipotalámica estimulante de la secreción gonadotrófica sintética (LHRH).

Bibliografía

1. AONO, T., GOLDSTEIN, D. P., TAYMOR, M. L. y DOLCH, K.: *Am. J. Obst. Gynec.*, **96**, 996, 1967.
2. BANGMAN, D. R. y BORTH, B.: *Acta Endocrinologica*, **71**, 625, 1972.
3. BERSON, S. A., YALLOW, R. S., GLICK, S. M. y ROTH, J.: *Metabolism*, **13**, 1135, 1964.
4. CATT, K. J.: En «Karolinska Simposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology» (E. Diczfalusy, edit.). *1st Symposium: Immunoassay of Gonadotrophins*. Estocolmo, 1969, pág. 22.
5. GARCÍA, M. D. y GUTIÉRREZ, O.: *Reproducción*, **1**, 53, 1974.
6. GREENWOOD, E. C., HUNTER, W. M. y GLOVER, J. S.: *Biochem. J.*, **89**, 114, 1963.
7. HUNTER, W. M.: En «Karolinska Simposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology» (E. Diczfalusy, edit.). *1st Symposium: Immunoassay of Gonadotrophins*. Estocolmo, 1969, pág. 134.
8. KASTIN, A., GUAL, C. y SCHALLY, A. V.: *Rec. Progr. Hormone Res.*, **28**, 201, 1972.
9. KULIN, H. E., RIFKIN, A. B. y ROSS, G. T.: *J. Clin. Endocr.*, **28**, 543, 1960.
10. MIDGLEY, JR., A. R.: *Endocrinology*, **79**, 10, 1966.
11. MIDGLEY, JR., A. R., REBAR, R. W. y NISWENDER, G. D.: En «Karolinska Simposia on Research in Reproductive Endocrinology» (E. Diczfalusy, edit.). *1st Symposium: Immunoassay of Gonadotrophins*. Estocolmo, 1969, pág. 247.
12. MORGAN, C. R. y LAZAROV, A.: *Diabetes*, **12**, 115, 1963.
13. NAKAMURA, R. M., NAGATA, Y., OSBORN, C. y MISHELL, JR., D. R.: *Acta Endocrinologica*, **75**, 478, 1974.
14. ROSS, G. T., GARGILLE, C. M., LIPSETT, M. B., RAYFORD, P. L., MARSHALL, J. L., STOTT, C. A. y ROBBARD, D.: *Rec. Progr. Hormone Res.*, **26**, 1, 1970.
15. VANDE WIELE, R. L., BOGUMIL, J., DYENFURTH, I., FERIN, M., JEWELWEI, CZ. R., WARREN, M., RIZKALLAH, T. y MINNWHAIL, G.: *Res. Progr. Hormone Res.*, **26**, 63, 1970.
16. YALLOW, R. S. y BERSON, S. A.: *J. Clin. Invest.*, **39**, 157, 1960.