

Aislamiento y purificación de tirotropina humana a partir de glándulas hipofisarias para su uso en el inmunodiagnóstico

Lilian Pérez-López,* Liliana Hernández-Pérez,* Antonio Melchor-Rodríguez,* Orlando Zulueta-Rodríguez,* Raquel López-Cisnero*

RESUMEN

En este trabajo se describe un procedimiento de purificación de TSH humana (hTSH) a partir de glándulas hipofisarias mediante cromatografía de inmunoadfinidad, empleando un anticuerpo policlonal específico contra la cadena beta de la hormona. Las glándulas se secaron con acetona y se pulverizaron empleando un molino. La extracción de TSH se realizó con la mezcla acetato de amonio:etanol. El extracto resultante se precipitó con etanol al 87% (v/v). El precipitado obtenido se resuspendió con éter dietílico y se dejó secar por evaporación. El polvo fue resuspendido en solución salina-fosfato pH 7.4, clarificado y aplicado a una columna empacada con Sepharose-IgG de carnero anti β TSH. La elución de la hormona se realizó con glicina 0.2 mol/L pH 2.8. La TSH obtenida se liofilizó y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La pureza se evaluó mediante PAGE-SDS tomando como referencia TSH comercial. La TSH purificada mostró una masa molecular de 54.1 kDa y una pureza de 93.87%. La caracterización de las subunidades se realizó mediante PAGE-SDS desnaturizante, obteniéndose dos bandas correspondientes a las subunidades α y β , con masas moleculares de 16.8 kDa y 20.2 kDa, respectivamente. El rendimiento y el grado de purificación fueron 43.7 y 41.7%, respectivamente. La actividad específica de la TSH purificada fue de 21.1 UI/mg. El procedimiento de purificación diseñado es sencillo, reproducible y permite obtener la hormona con características físico-químicas y biológicas similares a la hormona comercial, indicada para su uso como inmunógeno o estándar de calibración.

Palabras clave: Tirotropina, TSH, hormonas glicoproteicas, aislamiento, purificación, cromatografía de afinidad.

ABSTRACT

A simple method is describe for the efficient purification of human thyrotropin from pituitary glands by immunoaffinity chromatography, using a polyclonal antibody anti β TSH. The glands were dried with acetone, and a powder of pituitary glands was obtained using a mill. The extraction operation was performed with a mixture of ammonium acetate:ethanol. The obtained extract was precipitated with 87% (v/v) ethanol. The pellet was recovered by centrifugation, suspended in diethyl ether and finally dried by evaporation. The resultant powder was resuspended in saline-phosphate buffer pH 7.4, clarified and applied to a column packed with goat IgG anti β TSH-Sepharose 4B. The TSH fraction was eluted with 0.2 mol/L glycine pH 2.8, lyophilized and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The purity was analyzed by SDS-PAGE using commercial TSH as control. Purified TSH showed a molecular mass of 54.1 kDa and a purity of 93.87%. Subunit characterization was carried out by SDS-PAGE under reducing conditions. Dissociated TSH migrated as two bands, corresponding to α and β chains, with a molecular mass of 16.8 kDa and 20.2 kDa, respectively. The recovery of TSH by this procedure was 43.7%, and a purification factor of 41.7% was reached. The specific activity obtained was 21.1 UI/mg. These results indicate that immunoaffinity purification of TSH by means of this polyclonal antibody is a simple one-step procedure, which is reproducible and allows obtaining a hormone with physical-chemical characteristics, and a biological activity very similar to the commercial one. This hormone is appropriate for use as immunogens or immunoassay calibrators.

Key words: Thyrotropin, TSH, glycoprotein hormones, isolation, purification, affinity chromatography.

* Grupo de Purificación de Proteínas. Centro de Inmunoensayo. Ciudad Habana, Cuba.

Correspondencia:

Lic. Lilian Pérez-López

División de Inmunoquímica. Grupo de Purificación de Proteínas. Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Avenida 25, Apartado postal 6653, Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: iqlilian@cie.sld.cu

Recibido: 17-10-2008

Aceptado: 18-11-2008

INTRODUCCIÓN

La hormona estimulante de la tiroides, o tirotropina (TSH), es una glicoproteína compleja de 210 aminoácidos, con una masa molecular de 28 a 30 kDa, producida y secretada por las células tirotropas adenohipofisarias. Su principal función consiste en la modulación de la biosíntesis y secreción de tiroxina, así como la regulación del funcionamiento de la glándula tiroides, con el fin de mantener los niveles de las hormonas tiroideas dentro de los límites adecuados.^{1,2}

La TSH forma parte de la familia de las gonadotropinas, hormonas heterodiméricas formadas por dos subunidades unidas no covalentemente, la subunidad alfa (α) que es codificada por el mismo gen en las hormonas luteinizantes (LH), folículo estimulante (FSH) y gonadotropina coriónica (CG); y la subunidad beta (β), de cada una de ellas, que es codificada por genes diferentes,³ lo cual le confiere especificidad a la molécula para la unión al receptor⁴ y permite su determinación inmunológica en suero.

La cuantificación de TSH en suero y/o sangre posibilita el diagnóstico de hipotiroidismo congénito en los recién nacidos,⁵ donde los niveles de esta hormona en sangre superan los niveles fisiológicos.⁶ El diagnóstico temprano de esta enfermedad ha sido posible por el desarrollo de métodos de inmunoanálisis, los cuales requieren de anticuerpos de elevada pureza y especificidad capaces de reconocer a la TSH.

La obtención de tirotropina con un alto grado de pureza reviste gran importancia para la confección de estándares e inmunización de animales, de los cuales se obtienen los anticuerpos policlonales (AcP) y monoclonales (AcM) utilizados en los inmunoensayos. También es útil su empleo en el desarrollo de ensayos para la evaluación de la actividad biológica de los sobrenadantes de hibridomas en cultivo, productores de AcM específicos a la β TSH, así como durante la evaluación de los líquidos ascíticos ricos en estos anticuerpos.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se diseñó un método de purificación que utiliza la cromatografía de inmunoafinidad, con el objetivo de obtener esta molécula con un elevado grado de pureza a partir de hipófisis humana. La matriz de purificación utiliza como ligando un AcP obtenido y purificado en el Centro de Inmunoensayo (CIE), el cual reconoce a la subunidad beta de la TSH con la calidad requerida para ser utilizado en la purificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

El aislamiento y purificación de la TSH humana (hTSH) se realizó a partir de glándulas hipofisarias libres de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y negativas para anticuerpos contra el virus de la hepatitis C, el VIH 1 y el VIH 2, colectadas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Militar Carlos J. Finlay (Ciudad de La Habana, Cuba).

Aislamiento y purificación de los anticuerpos policlonales anti β TSH

Adsorción del antisuero de carnero anti hTSH mediante cromatografía de inmunoafinidad en AH Sepharose 4B-hCG

La obtención de los AcP anticadena beta de la TSH se realizó a partir de un antisuero de carnero específico a la hormona obtenido en el Bioterio (CIE, Cuba). Se adsorbieron 100 mL del antisuero en una columna de inmunoafinidad empaquetada con AH Sepharose 4B-hCG (1.6 x 20 cm) (Farmacia, Suecia), a un flujo de 5 mL/h y una temperatura de 4°C. Posteriormente se equilibró la columna con solución salina-fosfato pH 7.4 (PBS), se regeneró con la solución glicina 0.2 mol/L pH 2.8 y se volvió a adsorber el antisuero.

Precipitación del antisuero adsorbido contra la cadena alfa de la CG humana (hCG)

La fracción gammaglobulina del antisuero de carnero adsorbido contra la cadena alfa de la hCG se obtuvo por precipitación salina con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado al 50% (v/v). El precipitado obtenido se recuperó por centrifugación a 3,550 g, durante 20 min a 22°C (centrífuga HITACHI SCR7BA, Japón). La fracción globulina se resuspendió y se dializó extensivamente contra PBS pH 7.4. Este suero se adsorbió por segunda vez contra la cadena alfa de la hCG y finalmente se dializó frente a la solución fosfato de potasio 0.01 mol/L pH 7.

Purificación de los anticuerpos policlonales anti β TSH mediante cromatografía de intercambio iónico en el FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

La fracción gammaglobulina dializada se centrifugó durante 10 min a 13,400 g a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5415R (Eppendorf, Alemania) y el so-

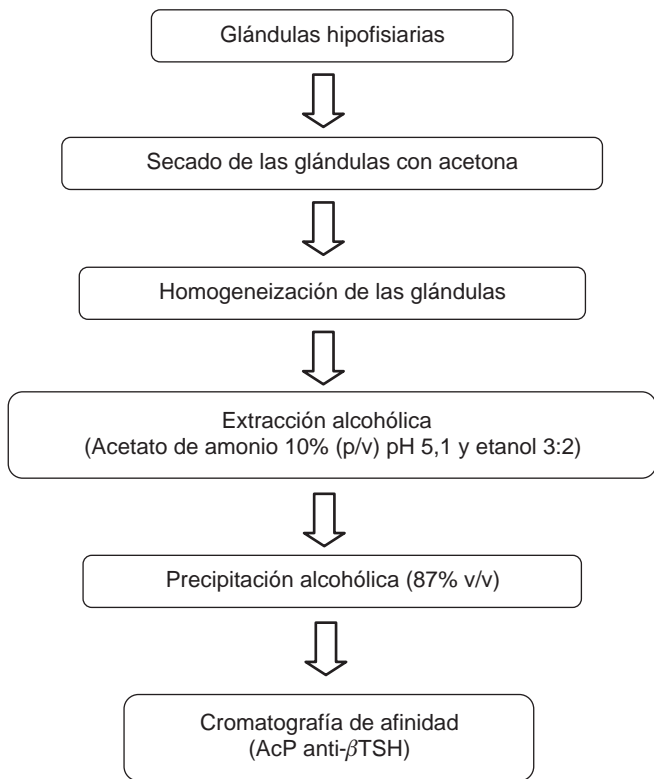


Figura 1. Etapas del proceso de purificación de la TSH humana a partir de glándulas hipofisarias.

Secado de las glándulas

Las hipófisis almacenadas a -20°C se descongelaron y se lavaron con solución de NaCl al 0.85% (p/v). Se secaron con 1L de acetona previamente refrigerada a 4°C , efectuando cambios de la misma cada 3 h durante 48 horas. Posteriormente, se pasaron las glándulas a un papel filtro del tipo POLYTRAP 295 PF (Schleicher & Schuell, Alemania), colocado en una campana extractora donde se dejaron secando alrededor de 24 horas.

Extracción y precipitación alcohólica

Las hipófisis secas se sometieron a un proceso de congelación en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en un molino de cuchillas (IKA, Alemania); al polvo obtenido se le adicionaron 500 mL de la mezcla de extracción acetato de amonio al 10% pH 5.1 y etanol absoluto en una relación 3:2. La mezcla resultante se agitó suavemente durante 48 horas a

4°C . El sobrenadante se recuperó mediante centrifugación durante 30 min a una velocidad de 11,750 g a 4°C (centrífuga refrigerada Beckman J-20XP, EUA) seguidamente se repitió el proceso en iguales condiciones, uniéndose ambos sobrenadantes en una sola fracción.

Las glicoproteínas presentes en la fracción anterior se precipitaron con etanol absoluto al 87% (v/v), durante 48 h a 4°C . El precipitado obtenido se recuperó mediante centrifugación a 11,750 g durante 30 min a 4°C . Se resuspendió en 5 mL de éter dietílico y se centrifugó a 27,216 g durante 5 min a 4°C . Se desechó el éter dietílico y se removió el precipitado hasta que se obtuvo un polvo de color blanco, el cual se resuspendió en PBS pH 7.4 para la preparación del extracto de hipófisis.

Cromatografía de inmunoafinidad en Sepharose 4B-AcP anti β TSH

Se recircularon 10 mL de extracto de hipófisis en una columna 1.6 x 20 cm y volumen de lecho 21 mL, empaquetada con la matriz de afinidad Sepharose 4B-AcP anti β TSH equilibrada con PBS pH 7.4, durante 12 horas a un flujo de 6 mL/h a 4°C . La TSH enlazada se eluyó con la solución reguladora glicina 0.2 mol/L pH 2.8. Se colectaron fracciones a razón de 0.5 mL/tubo; se determinó la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Ultrospec II (Pharmacia-LKB, Suecia) y se estimó la concentración de TSH con el estuche de reactivos UMELISA TSH. Las fracciones reactivas para TSH se mezclaron y se dializaron extensivamente frente a PBS pH 7.4.

Liofilización de la TSH purificada

La muestra de TSH purificada se dializó frente a 2 L de bicarbonato de amonio 100 mmol/L. A la muestra dializada se le adicionó sacarosa al 5% como preservante y se prepararon alícuotas de 2 mL, las cuales se liofilizaron (USIFROID SMH FPS, Francia).

Estimación de la concentración de proteínas

En todos los pasos del proceso de purificación de TSH se realizó la estimación de la concentración de proteínas totales por el método de Lowry et al,¹² utilizando albúmina de suero bovino como estándar y la cuantificación de la hormona se realizó con el empleo del ensayo UMELISA TSH⁸ (CIE, Cuba).

Determinación de los parámetros de control del proceso de aislamiento y purificación de la TSH

Los valores de concentración de TSH y de proteínas totales se utilizaron para el cálculo de los parámetros de control del proceso de purificación según se describe por Chávez et al.¹³

Control de calidad de la TSH purificada

Determinación de la pureza en condiciones reductoras

La determinación de la pureza se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol (PAGE-SDS), que se realizó en un PhastSystem (Pharmacia-LKB, Suecia).

Cuadro I. Características de las proteínas patrones de baja masa molecular del estuche de calibración de electroforesis (Pharmacia Biotech, Suecia).

Proteína patrón	Masa molecular (kDa)	Fuente
Fosforilasa b	94.0	Músculo de conejo
Albumina	67.0	Suero bovino
Ovalbúmina	43.0	Huevo de gallina
Anhidrasa carbónica	30.0	Eritrocito bovino
Inhibidor de tripsina	20.1	Frijol de soya
α -Lactoalbumina	14.4	Leche bovina

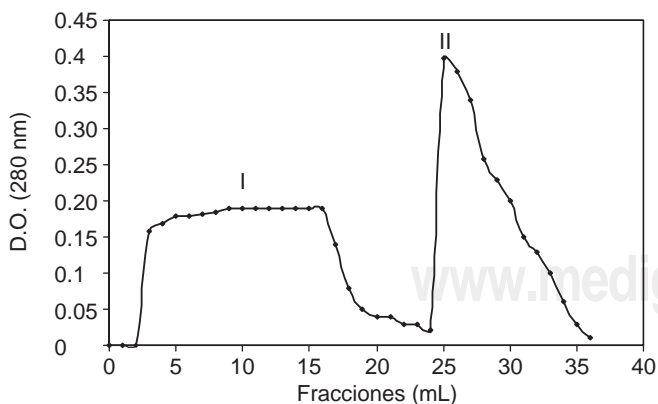


Figura 2. Perfil cromatográfico típico de la obtención del AcP anti β TSH obtenido por cromatografía de intercambio iónico en Mono Q HR.

Determinación de la pureza en condiciones nativas

La pureza se evaluó, además, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE nativo). Se empleó el gel PhastGel Gradient 8-25 (Pharmacia, Suecia). La corrida electroforética y el revelado se llevaron a cabo en el PhastSystem, empleando nitrato de plata en la tinción. Se estimaron las masas moleculares de las subunidades alfa y beta, así como de la hormona intacta, empleando como referencia TSH humana comercial y el estuche de calibración de proteínas patrones de baja masa molecular (Pharmacia Biotech, Suecia), mostrado en el cuadro I.

A la electroforesis nativa de la hTSH purificada se le determinó el porcentaje de pureza por densitometría (Imaging Densitomer Model GS-700, Bio-Rad, EUA). Este equipo se encuentra acoplado a una computadora que posee un programa de análisis de pureza (Molecular Analyst, Versión 1.4.4, Bio-Rad, EUA).

RESULTADOS

Aislamiento y purificación del anticuerpo policlonal anti β TSH. Control de calidad

La IgG de carnero específica para la cadena β de la TSH se obtuvo en la fracción no absorbida mediante

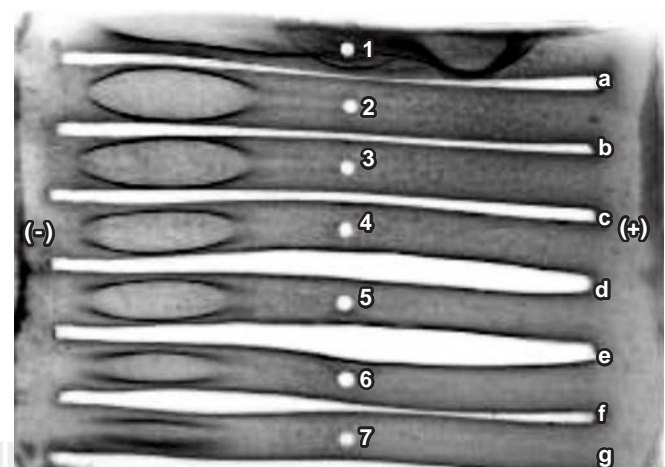


Figura 3. Inmuno-electroforesis del anticuerpo policlonal anti β TSH obtenido por cromatografía de intercambio iónico. Pozo 1: Suero normal de carnero. Pozo 2-7: Anticuerpo policlonal anti β TSH purificado, desde puro hasta una dilución 1:32. Canales a-g: Suero de conejo específico para proteínas séricas totales de carnero. Se observa un único arco de precipitación correspondiente a la IgG ovina.

cromatografía de intercambio aniónico en la matriz Mono Q HR (pico número 1, *Figura 2*). Se obtuvo una masa total de 439.9 mg de AcP, en un volumen de 93 mL, con una concentración de 4.73 mg/mL. El rendimiento del proceso de aislamiento y purificación de los anticuerpos fue de 4.4 mg por mL de antisuero procesado.

La preparación de AcP anti β TSH obtenida resultó homogénea por inmunoelectroforesis frente a suero de conejo para proteínas séricas totales de carnero; pues se observó un único arco de precipitación correspondiente a la IgG ovina (*Figura 3*).

En la *figura 4* se muestra el PAGE-SDS del AcP, las masas moleculares relativas estimadas para las cadenas pesadas y ligeras fueron de 55.2 kDa y 27.8 kDa, respectivamente.

La especificidad del AcP, así como la calidad de la adsorción contra hCG se evaluó comparando las señales de fluorescencia (F) de las muestras de TSH y hCG, obteniéndose elevadas señales de F para TSH y bajas señales de F para hCG, lo que evidenció sólo el reconocimiento de la tirotropina por el AcP (*Figura 5*).

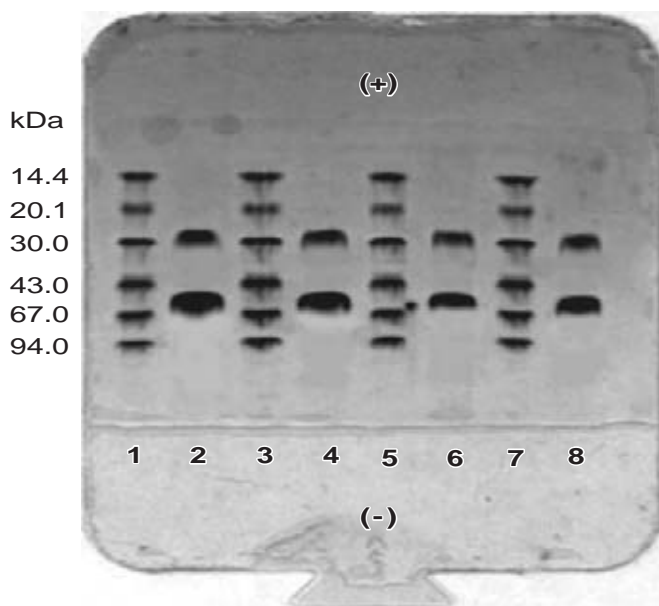


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol de la muestra de AcP anti β TSH. Posiciones 1, 3, 5, 7: proteínas patrón de baja masa molecular. Posiciones 2, 4, 6, 8: AcP anti β TSH purificado por cromatografía de intercambio iónico.

Acoplamiento de los anticuerpos policlonales anti β TSH a la matriz CNBr-Sepharose 4B. Estudio de la capacidad de la matriz

El porcentaje de inmovilización del AcP anti β TSH en la matriz CNBr Sepharose 4B fue de 95.5%, lo cual significó que se fijaron a la matriz 207.5 mg de AcP. Como resultado final se obtuvieron 21 mL de volumen de lecho con un índice de inmovilización de 9.88 mg de AcP/mL de lecho.

La estimación de la capacidad de la matriz se realizó utilizando la curva de ruptura (*Figura 6*), obteniéndose un valor de 1,972.8 mUI de TSH/mL de gel. La concentración a la que se elimina el 5% de la hormona aplicada fue de 16.1 mUI/mL. Se tomó como 100% el valor de concentración de TSH que se correspondió con las fracciones en que se saturó la matriz (161.5 mUI/mL). El tiempo de elución para una pérdida de TSH del 5%, fue de 58.58 min para un volumen de muestra aplicado de 5.85 mL. En su totalidad, la matriz preparada mostró una capacidad de 41,428.8 mUI de TSH.

Aislamiento y purificación de la TSH

Se partió de un total de 612 glándulas hipofisarias, las cuales una vez secas rindieron una masa de 97.4 g. Las mismas se trituraron con un molino de análisis, obteniéndose 96.7 g de un polvo fino (polvo de acetona). La extracción de las glicoproteínas en la mezcla de extracción acetato de amonio:etanol trans-

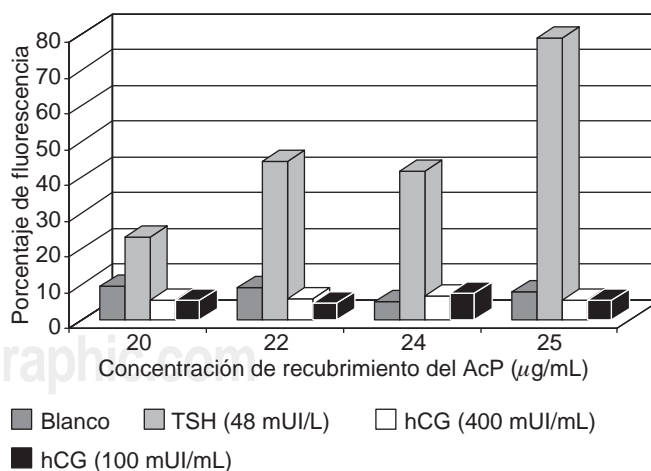


Figura 5. Evaluación de la especificidad del AcP anti- β TSH. Se comparan las señales de fluorescencia de las muestras de TSH y hCG.

currió con una elevada eficiencia, pues la mezcla de sobrenadantes (3.22 L) mostró una actividad total de 244.5 UI de TSH, lo que equivale a una recuperación de 0.4 UI de TSH/glándula. En esta etapa se recuperaron por centrifugación 3 g de un polvo blanquecino con un alto contenido de glicoproteínas, entre ellas la TSH, obteniéndose un rendimiento de 4.9 mg de polvo por glándula procesada.

Se disolvieron 200 mg del polvo de hipófisis en PBS pH 7.4. Se aplicaron 10 mL (15,327.5 mUI) de extracto clarificado por centrifugación y filtración a la matriz de afinidad Sepharose 4B-AcP anti β TSH, previamente equilibrada con PBS pH 7.4. La TSH enlazada se obtuvo en una única fracción (Figura 7), correspondiente al pico de mayor actividad de TSH con un rendimiento del 57.07%, como se muestra en el cuadro II.

Evaluación de la pureza de la TSH purificada

En el PAGE nativo se observó una banda correspondiente a la hTSH de movilidad electroforética similar a la hTSH comercial con una masa molecular estimada de 50.23 kDa para la hormona comercial y de 51.65 kDa para la hormona purificada (Figura 8). El

análisis densitométrico del gel arrojó un porcentaje de pureza de 93.87%.

En el PAGE-SDS de la hTSH purificada se observaron dos bandas correspondientes a las cadenas α y β de la hormona, con movilidades electroforéticas similares a las bandas de las cadenas de la hTSH comercial, con valores de masa molecular de 17.15 kDa para la subunidad alfa y 20.03 kDa para la subunidad beta de ambas proteínas (Figura 9).

DISCUSIÓN

La TSH humana ha sido aislada y purificada principalmente a partir de hipófisis de cadáveres humanos¹⁴⁻¹⁹ aunque también ha sido obtenida de otras fuentes como la placenta,²⁰ el suero de pacientes aquejados de desórdenes tiroideos²¹⁻²³ y mediante técnicas de ingeniería genética.²⁴⁻³⁰

Para llevar a cabo el aislamiento y la purificación de la hTSH se escogió la hipófisis humana, pues en ella se encuentra la tirotropina en mayor cantidad debido a su síntesis por parte de las células tiotropas

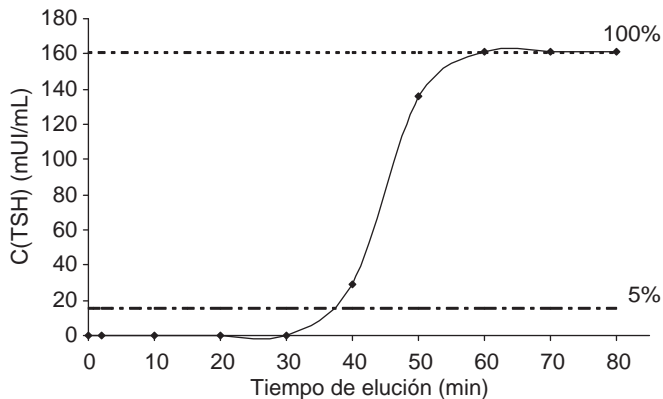


Figura 6. Curva de ruptura del estudio de la capacidad de la matriz Sepharose 4B-AcP anti β TSH.

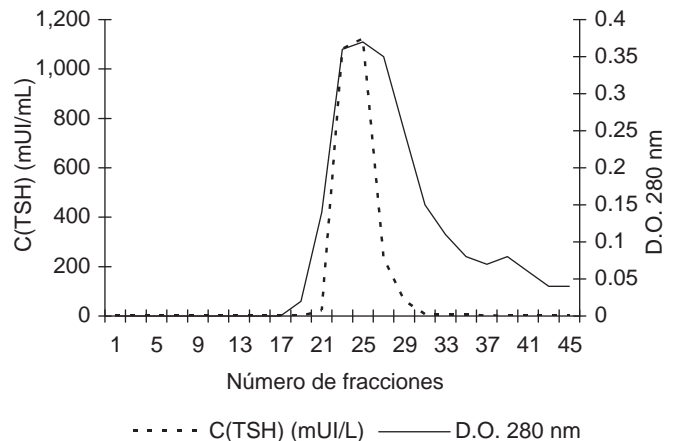


Figura 7. Perfil cromatográfico típico de la obtención de TSH por cromatografía de inmunofinidad.

Cuadro II. Resultados del proceso de aislamiento y purificación de TSH (n = 5), mediante cromatografía de inmunofinidad en Sepharose 4B-AcP anti β TSH.

Etapas	Proteínas totales (mg)	Actividad específica (mUI de TSH/mg de proteínas)	TSH total (mUI)	Grado de purificación	Rendimiento (%)
Extracto de hipófisis	6.750	227.07	15,327.5	1	100
Cromatografía de inmunofinidad	0.112	5,276.80	8,746.8	23.24	57.07

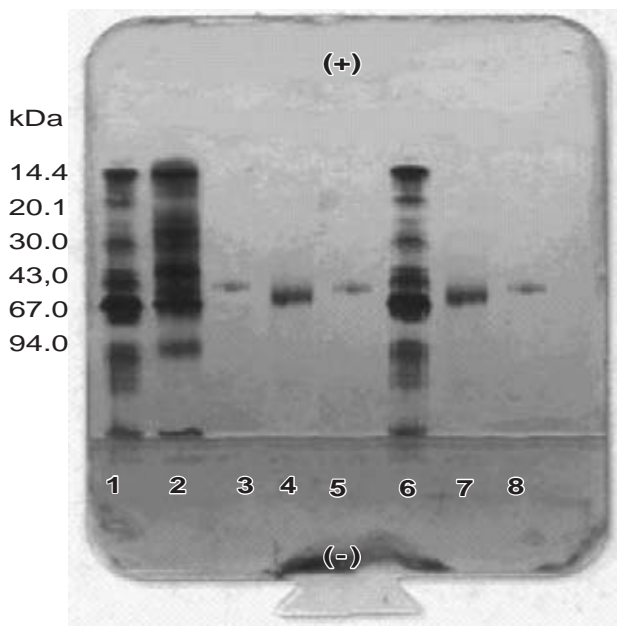


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-nativo) de la hTSH obtenida mediante cromatografía de inmunoafinidad. Posiciones 1 y 6: proteínas patrones de baja masa molecular. Posición 2: Extracto de hipófisis. Posiciones 3, 5 y 8: hTSH comercial. Posición 4 y 7: hTSH purificada.

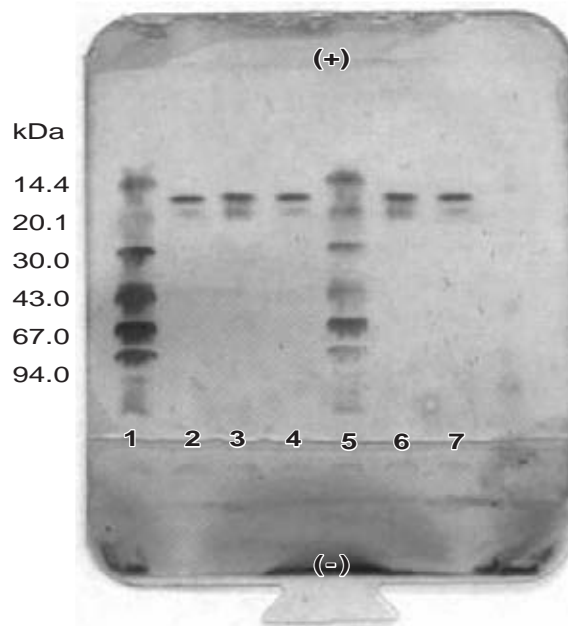


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol de la hTSH. Se observan las cadenas α y β de la hormona. Posiciones 1 y 5: Proteínas patrones de baja masa molecular. Posiciones 2, 4 y 7: TSH humana comercial. Posición 3 y 6: hTSH purificada por afinidad en Sepharose 4B-AcP anti β TSH.

adenohipofisiarias. A pesar de que la hormona ha sido aislada también de suero humano, este último no se considera una fuente apropiada para su aislamiento, ya que en condiciones fisiológicas, sus concentraciones son muy bajas (0.5 mUI/L a 5 mUI/L).^{31,32}

La mayoría de los protocolos de purificación descritos en la literatura utilizan como primera etapa un paso de captura que tiene como objetivo concentrar la hormona, para utilizar posteriormente un método cromatográfico, que posea una alta resolución, como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacciones hidrofóbicas o la cromatografía de afinidad.^{10,16,18,19} En este sentido, el método utilizado constituye una adaptación de otros métodos de inmunoafinidad descritos para el aislamiento de la hormona a partir de un extracto de glándulas hipofisiarias,^{10,11} mediante el empleo de una cromatografía de inmunoafinidad, utilizando un AcP obtenido en carnero, específico a la subunidad beta de la hormona. Este tipo de cromatografía, debido a su elevada especificidad, facilita la separación de la hormona del resto de las glicoproteínas contenidas en la muestra inicial, pues la similitud estructural existente entre ellas, constituye un hecho que dificulta la separación individual de las mismas.

La extracción de la TSH se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Steelman et al en 1958,³³ con algunas modificaciones. La etapa de extracción transcurrió con una elevada eficiencia, pues la mezcla de sobrenadantes mostró una actividad total de 244.5 UI de TSH, lo que equivale a una recuperación de 0.4 UI de TSH/glándula. Este valor duplica al alcanzado por Chapman et al en 1981,¹⁸ quienes obtuvieron 0.2 UI de TSH/glándula, lo que pudiera estar fundamentado, en nuestro caso, por el uso del molino de análisis que permite la obtención de la masa hipofisiaria en forma de un polvo muy fino con un tamaño de partícula pequeño que facilita la extracción de las hormonas del tejido, a diferencia de los investigadores mencionados que emplearon un homogeneizador de cuchillas tipo Polytron para la ruptura celular.

Para llevar a cabo el proceso de purificación se obtuvo el AcP anti β TSH, con demostrada especificidad para la TSH humana, la adsorción contra la subunidad α de la hCG garantizó la no reactividad del mismo con el resto de las hormonas glicoproteicas (Figura 5). La avidéz del AcP permite la desorción de la hormona de la matriz de inmunoafinidad bajo condiciones suaves de elución (glicina 0.2 mol/L pH 2.8).

La pureza de la hTSH obtenida se analizó mediante PAGE nativo y PAGE desnaturante, y se comparó con un patrón comercial. Ambas técnicas demostraron que la cromatografía de afinidad empleando el AcP anti- β TSH como ligando permite obtener un preparado de TSH homogéneo. Además, ambas hormonas, la hTSH purificada y la hTSH comercial mostraron similares comportamientos electroforéticos, revelando bandas de 51.65 kDa y 50.23 kDa, respectivamente. A pesar de que las masas moleculares estimadas no coinciden con la reportada para la hTSH (28-30 kDa),¹¹ los valores estimados concuerdan con lo establecido por numerosos investigadores al estimar la masa molecular mediante técnicas electroforéticas. Este fenómeno, en el que las proteínas migran como una banda ancha por encima de su masa molecular real, es típico de las glicoproteínas, argumentándose como posible causa la influencia de las cadenas glucídicas presentes en las hormonas, cuyo contenido en la TSH puede alcanzar hasta el 35% de su masa molecular.^{2,11}

En el PAGE-SDS se apreciaron dos bandas (Figura 9), cuya movilidad fue similar a la obtenida para las subunidades de la hormona comercial, 17.15 kDa para la subunidad alfa y 20.03 kDa para la beta. La hTSH comercial mostró valores de masa molecular de 17.47 kDa (subunidad alfa) y 20.03 kDa (subunidad beta), conforme a lo reportado para la hormona.^{2,34}

El procedimiento empleado para el aislamiento y la purificación de la TSH humana a partir de hipófisis es sencillo y reproducible. Se logró obtener una preparación de TSH humana con un grado de pureza elevado y adecuado para su uso como inmunógeno o como estándar de calibración.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Licenciada Senia Bermúdez por la revisión del texto en el idioma inglés; al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Militar Carlos J. Finlay por la recogida de las glándulas y al Grupo de Pesquisa Neonatal del Centro de Inmunoensayo por la colaboración en la cuantificación de las muestras.

REFERENCIAS

- Ryan RJ, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Keutmann HT. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. *FASEB J*. 1988; 2: 2661-9.
- De Groot LJ, Hennemann G. The thyroid and its diseases. Chapter 4. En: Mariotti S. [eds]. Normal physiology of the hypothalamic-pituitary-thyroidal system and other endocrine glands. [Libro en Internet, actualizado en 2006]. Disponible en: <http://www.thyroidmanager.org/chapter4/4-frame.htm>
- Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev*. 2002; 82: 473-502.
- Nadir R, Farid and Szkudlinski MW. Minireview: structural and functional evolution of the thyrotropin receptor. *Endocrinology*. 2004; 145: 4048-57.
- Postellon DC, Bourgeois MJ, Varma S. Congenital hypothyroidism e Medicine, actualizado Mayo 28,2008. Disponible en: <http://www.emedicine.com/PED/topic501.htm#section~Treatment>.
- Koop MD. TRH-TSH-Thyroid. Perspective: genetics defects in the etiology of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*. 2002; 143: 2019-24.
- Ouchterlony O, Nilsson LA. *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis*. En: Wear DM, Herzenberg LA, Blackwell C [eds]. Handbook of experimental immunology. Vol. 1. Immunochimistry. Oxford: Blackwell; 1986. p. 32.1-32.50.
- Herrera DV, González EC, Pérez PL, Frómata A. Normalización del UMELISA TSH NEONATAL® a discos de 3 mm. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2006; 37: 119-224.
- Doran MP. *Bioprocess engineering principles*. New York: Academic Press. 1995. p. 234-52.
- Pekonen F, Williams DM, Weintraub BD. Purification of thyrotropin and other glycoprotein hormones by immunoaffinity chromatography. *Endocrinology*. 1980; 106: 1327-32.
- Lock AJ, van Denderen J, Aarden LA. Purification of bovine thyroid-stimulating hormone by a monoclonal antibody. *Endocrinology*. 1988; 122: 319-24.
- Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
- Chávez MA, Díaz J, Pérez U, Delfin J. *Temas de enzimología*. Vol II. ENPES. La Habana. 1990.
- Hartree AS, Butt WR, Kirkham KE. The separation and purification of human LH and TSH. *J Endocrinol*. 1964; 29: 61-9.
- Parlow AF, Condliffe PG, Reichert LE, Wilhelmi AE. Recovery and partial purification of FSH and LH during the purification of TSH from human pituitary glands. *Endocrinology*. 1965; 76: 27-34.
- Hartree AS. Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. *Biochem J*. 1966; 100: 754-61.
- Sairam MR, Chrétien M, Li CH. On the isolation of human pituitary hormones. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978; 47: 1002-8.
- Chapman GE, Renwick AGC, Livesey JH. The isolation of human pituitary hormones from frozen glands. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981; 53: 1008-13.
- Himaya J, Surus A, Renwick AGC. Purification of human pituitary LH and TSH by hydrophobic chromatography. *J Endocrinol*. 1990; 125: 493-500.
- Hershman JM, Starnes WR. Extraction and characterization of a thyrotropic material from the human placenta. *J Clin Invest*. 1969; 48: 923-9.
- Miura Y, Perkel VS, Papenberg KA, Johnson MJ, Magner JA. Concanavalin-A, lentil, and ricin lectin affinity binding characteristics of human thyrotropin: differences in the sialylation of thyrotropin in sera of euthyroid, primary, and central hypothyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989; 69: 985-95.

22. Papandreou MJ, Persani L, Asteria-Ronin C, Beck-Peccoz P. Variable carbohydrate structures of circulating thyrotropin as studied by lectin affinity chromatography in different clinical conditions. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77: 393-8.
23. Donadio S, Pascual A, Thijssen JHH, Ronin C. Feasibility study of new calibrators for thyroid-stimulating hormone (TSH) immunoprocures based on remodelling of recombinant TSH to mimic glycoforms circulating in patients with thyroid disorders. *Clin Chem.* 2006; 52: 286-97.
24. Szkudlinski MW, Teh NG, Grossmann M, Tropea JE, Weintraub BD. Engineering human glycoprotein hormone superactive analogues. *Nat Biotechnol.* 1996; 14: 1257-63.
25. Grossmann M, Wong R, Szkudlinski MW, Weintraub BD. Human thyroid-stimulating hormone (hTSH) subunit gene fusion produces hTSH with increased stability and serum half-life and compensates for mutagenesis-induced defects in subunit association. *J Biol Chem.* 1997; 272: 21312-6.
26. Fares FA, Yamabe S, Ben-Menahem D, Pixley M, Hsueh AJW, Boime I. Conversion of thyrotropin heterodimer to a biologically active single-chain. *Endocrinology.* 1998; 139: 2459-64.
27. Szkudlinski MW, Grossmann M, Leitolf H, Weintraub BD. Human thyroid-stimulated hormone: structure-function analysis. *Methods.* 2000; 21: 67-81.
28. Azzam N, Bar-Shalom R, Kraiem Z, Fares F. Human thyrotropin (TSH) variants designed by site-directed mutagenesis block TSH activity *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology.* 2005; 146: 2845-50.
29. Fugazzola L. Expanding use of recombinant hTSH. *Ann Endocrinol.* 2007; 68: 220-3.
30. Emerson CH, Torres MS. Recombinant human thyroid-stimulating hormone: pharmacology, clinical applications and potential uses. *Biodrugs.* 2003; 17(1): 19-38.
31. Spencer CA, LoPresti JS, Patel A, Guttler RB. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990; 70: 453.
32. Spencer CA, Schwarzbein D, Guttler RB, LoPresti JS, Nicoloff JT. Thyrotropin (TSH)-releasing hormone stimulation test responses employing third and fourth generation TSH assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76: 494-8.
33. Steelman SL, Segaloff A, Mays MG. Preparation of highly active human gonadotropin and growth hormone. *Arch Biochem Biophys.* 1958; 78: 262-3.
34. Grossmann M, Weintraub BD, Szkudlinski MW. Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. *Endocr Rev.* 1997; 18: 476-501.