

CU9600362

23-96

23-96

CIEN-R

EVALUACION DE PROLACTINA HUMANA DE PRODUCCION NACIONAL PARA SU EMPLEO EN RADIOIMMUNOANALISIS (RIA)

EVALUATION OF THE HUMAN PROLACTIN OF NATIONAL PRODUCTION FOR USE IN RADIOIMMUNOANASSAY (RIA)

Caso, R.

Centro de Isotopos. (CENTIS)
Habana, Cuba

Arranz, C.

Instituto Nacional de Endocrinología.
La Habana, Cuba

La Habana, Cuba

POOR QUALITY ORIGINAL

7 5 1 4

**EVALUACION DE PROLACTINA HUMANA DE PRODUCCION NACIONAL
PARA SU EMPLEO EN RADIOINMUNOANALISIS (RIA).**

**EVALUATION OF THE HUMAN PROLACTIN OF NATIONAL PRODUCTION
FOR USE IN RADIOIMMUNOASSAY (RIA).**

R.Caso¹, C.Arranz²

1. Centro de Isótopos (CENTIS), 2. Centro Nacional de Endocrinología (INEN)

La Habana, Cuba.

Subject Categories: B13.30

Key words: LH:M1; radioimmunoassay; antigen-antibody reactions; diagnostic techniques; labelling; iodine 125; radiochromatography, quality control:Q1.

“Evaluación de Prolactina Humana de Producción Nacional para su empleo en Radioinmunoanálisis (RIA)”.

RESUMEN

Se realizó un estudio detallado de las posibilidades de emplear como materia prima para la producción de Kits-RIA, la prolactina humana que se obtiene en los laboratorios Mario Muñoz de la IMEFA.

Las pruebas realizadas incluyeron marcaje con I-125, determinación de la calidad de la hormona marcada mediante técnicas de radiocromatografía y radioinmunoanálisis, preparación de patrones con la hormona, realización de las pruebas de control de calidad pertinentes para su introducción en el Kit-RIA de Prolactina.

Se concluyó que el producto reunía los requisitos necesarios para su empleo en la producción nacional de Kits-RIA.

ABSTRACTS

In this work was studied the possibility of using the Prolactin hormone as raw material to produce Kits-RIA of Prolactin. Was used the Prolactin, which is obtained in Cuba by the Farmaceutical Institute “Mario Muñoz”.

Was made the labelling of Prolactin with I-125, was used the hormone as standard and were done the probes of quality control.

The Prolactin Hormone had the necessary quality to produce Kits-RIA-Prolactin.

INTRODUCCION

La prolactina es una hormona proteica de la hipófisis, con peso molecular de 22 000 dalton [1]. En el ser humano desempeña un papel esencial en el control de la lactancia y puede suprimir la función gonadal.

Los niveles elevados de esta hormona en la sangre están relacionados con la enfermedad endocrina denominada hiperprolactinemia, siendo esta más común en la mujer que en el hombre. Los síntomas fundamentales en la mujer son la infertilidad, amenorrea con o sin galactorrea, tumores hipofisarios o microadenomas y en el caso del hombre la impotencia, pérdida del libido y disminución del volumen seminal [2].

Es por estas razones que la producción de un Kit de reactivos para la determinación de la prolactina plasmática es de extrema utilidad para el diagnóstico y tratamiento de las patologías antes mencionadas.

A partir de la prolactina humana altamente pura adquirida en las diferentes firmas comerciales se pueden obtener los principales componentes que constituyen el Kit de prolactina tales como: el radioligando, soluciones patrones y el anticuerpo anti-prolactina.

El objetivo de nuestro trabajo fué la evaluación de la prolactina de producción nacional como radioligando y para la preparación de las soluciones patrones del Kit.

Esto constituye un ahorro en cuestión de divisas al país ya que la Prolactina tiene un alto precio en las firmas comerciales.

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos utilizados son de calidad p.a de firmas reconocidas internacionalmente. Se empleó NaI-125 libre de portador (IMS-30, Amersham) en solución de NaOH.

La actividad de las muestras fueron determinadas en un contador Minigamma 1275 LKB.

La Prolactina de producción nacional fue entregada por la Empresa Farmacéutica Mario Muñoz en bulbos liofilizados en concentraciones de 100 ó 200µg/ml. Se utilizó para los trabajos un lote de producción 9101.

Los Kits de prolactina comerciales empleados en los análisis fueron gentilmente ofrecidos por el INEN, los cuales a su vez están evaluados contra Kits comerciales de la OMS-HRP.

1. Marcaje de la Prolactina humana de producción nacional.

Para el marcaje de la proteína se utilizó la técnica de cloramina-T, descrita por Greenwood y Hunter [1,3]. La misma consiste en una reacción de oxidación-reducción, en la cual se utiliza la cloramina-t como agente oxidante en una concentración 3.5mg/ml y el metabisulfito de sodio como reductor en una concentración de 1.94mg/ml. Se utilizó 1mCi de NaI-125 y la hormona en una concentración de 1mg/ml. El volumen de reacción no excedió 150µl y el tiempo de reacción los 10seg. La purificación de la mezcla reaccionante se realizó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100, con un flujo de 15ml/h. La composición del eluyente fue 0.15M de cloruro de sodio y 0.25% de Seroalbúmina bovina en una solución tampón fosfato 0.01M pH 7.6. El rendimiento de yodación por este método es de 50% y la actividad específica de 4MBq/µg.

1.2. Controles de calidad de la hormona marcada.

La hormona marcada debe reunir una serie de requisitos para poder ser utilizada como tal en el Kit de prolactina, entre ellos se pueden citar la pureza radioquímica con un valor mayor del 95% y su capacidad inmunológica no debe ser afectada después del proceso de marcaje. El porcentaje de unión específica debe encontrarse entre 30-40%. Estos aspectos son fundamentales para lograr buena sensibilidad y precisión en los resultados.

La pureza radioquímica fue determinada mediante la técnica de radiocromatografía, para lo cual se utilizó papel cromatográfico FN-1 de 10X150mm y metanol al 85% como solvente. Una vez de terminada la corrida se seca, se pica a intervalos de 0.5cm y se cuenta la actividad de cada fracción en el contador Gamma.

Como técnica alternativa para determinar la pureza radioquímica se empleó la precipitación con ácido tricloroacético al 10%, la cual informa acerca del porcentaje de proteínas presentes en la hormona marcada.

La actividad inmunológica de la hormona marcada se determinó por RIA [2], utilizando un Kit de prolactina comercial. La hormona marcada se diluyó hasta obtener una actividad de 20 000cpm/100µl y se incubó con la hormona fría durante 18-24 horas a temperatura ambiente con una concentración limitada de anticuerpos anti-prolactina, durante este intervalo de tiempo ocurrió la reacción competitiva por los sitios de unión del anticuerpo. La separación de las fracciones enlazadas y libres se realizó mediante la técnica del segundo anticuerpo en fase líquida. Después de la separación y centrifugación a 2500rpm durante

30min a 5°C, la actividad de la fracción enlazada se cuantificó en el contador de radiaciones gamma.

La estabilidad de un Kit-RIA comercial debe ser de un mes aproximadamente [2] y está determinado por el radioligando, el cual se deteriora con el tiempo. Por estas razones se ensayó la estabilidad del Kit utilizando como radioligando la nueva hormona marcada durante un mes.

2. Preparación de soluciones patrones de prolactina.

Para ser utilizada como patrón, la hormona debe tener un alto índice de pureza y un valor aceptable de actividad específica. Para la prolactina está reportado entre 15-30UI/mg en la bibliografía revisada, lo que depende del tipo de purificación y procedencia de las preparaciones del extracto hipofisiario del cual se parte [4,5].

La actividad específica de la hormona fue determinada mediante la técnica de RIA, utilizando un Kit comercial de la Amersham y un Kit de producción nacional.

La pureza de la hormona, se determinó también por RIA, para lo cual se realizaron diluciones de esta en un intervalo de 1/50 hasta 1/1600, partiendo de una concentración de 0.1µg/ml y se pusieron a reaccionar con su anticuerpo específico anti-prolactina, de esta forma también se conoce si desplaza como curva patrón. En estas mismas diluciones se hizo reaccionar con los anticuerpos de las posibles impurezas presentes en la muestra proteica, entre las cuales se pueden mencionar las hormonas hipofisarias, específicamente la hormona estimulante de las tiroides (TSH), luteinizante (LH), del folículo estimulante (FSH) y la hormona de crecimiento (GH). El porcentaje de impurezas se puede calcular utilizando la expresión (1), en la cual se comparan la reactividad de la prolactina con su anticuerpo específico y con el anticuerpo reactante al 50% de unión (ED-50).

$$\% \text{ IMPUREZA} = 100 \times \frac{\text{concentración de prolact. al ED-50}}{\text{concentración de sust. reactante al ED-50}} \quad (1)$$

2.1. Determinación de los parámetros de control de calidad del patrón.

Se determinaron los parámetros de control de calidad (ED-50, intercepto, pendiente y valores de muestras comerciales de control de calidad) necesarios dentro de un Kit comercial, los cuales fueron comparados con los valores de un kit comercial de producción nacional. Para esto se montó una curva patrón de prolactina con los valores del Kit comercial.

Se realizó además un estudio de concentración de la Prolactina en una población de 100 donantes testados contra el VIH y Hepatitis B, con el objetivo de verificar si la media poblacional cae en el intervalo de 100µU/ml-660µU/ml, ó sea valores normales (intermedios) de la curva patrón preparada a partir de Prolactina nacional. Con este fin se montó una curva patrón de prolactina nacional, se utilizó la hormona marcada a partir de la materia prima nacional y se incluyeron en la corrida las 100 muestras de donantes.

Se realizó un estudio de correlación como último parámetro de calidad de la curva patrón. Para esto se montaron cuatro muestras de donantes hiperprolactinémicos, cuatro de concentración normal y cuatro de baja concentración en una curva patrón nacional y en una curva patrón de un Kit comercial.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Marcaje.

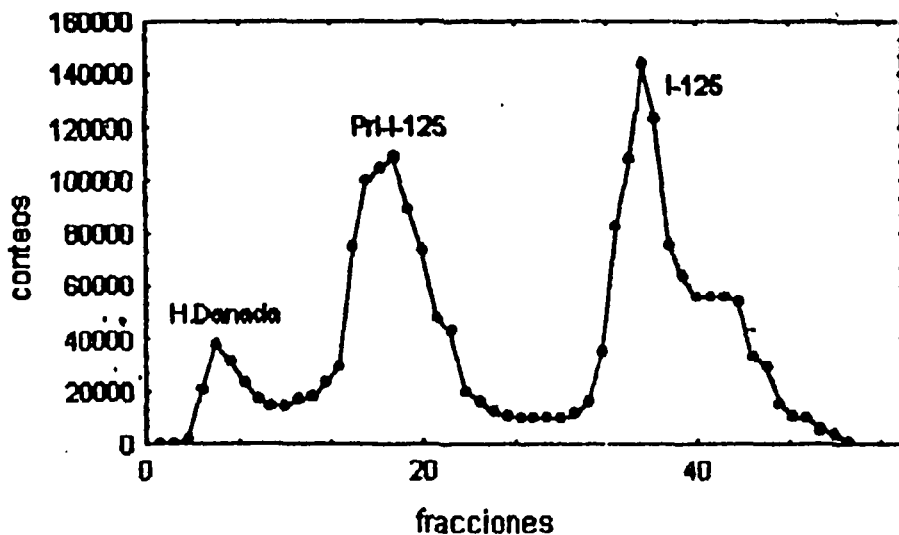
En la tabla No1 se muestran los resultados de 3 marcajes.

tabla No1

No	Eficiencia (%)	Act.Esp (MBq/ μ g)	Pureza RQ (%)	Precip TCA (%)	Unión Espec. (%)	Unión no Esp. (%)
1	50	2.9	90	92	27	10
2	40	3.6	95	97	35	4.3
3	40	3.4	96	97	38	5

De los resultados obtenidos se concluye que los requisitos necesarios para que una hormona pueda ser utilizada como radioligando en un kit comercial se cumplen. El gráfico 1 muestra un perfil de elución típico del proceso de purificación de la hormona marcada.

Fig 1. Purificación de Prolactina marcada con I-125.



La tabla No2 muestra los resultados de estabilidad del marcaje 3.

tabla No2

No	Unión no Especif. (%)	Unión Especif. (%)	Observaciones
1	4.3	35	análisis inmediato después del marcaje
2	6	25	a los 18 días del marcaje
3	7	24	a los 25 días del marcaje
4	10	20	al mes del marcaje

Los resultados de la tabla No2 sugieren que al cabo del mes el porcentaje de unión no específica de la hormona marcada aumenta considerablemente, por estas razones el Kit tendría una estabilidad de 20 días aproximadamente. Los resultados obtenidos en este sentido no están relacionados con el método de yodación utilizado, en el cual se usaron fuertes agentes oxidantes y reductores que pueden atacar los puentes disulfuros de las proteínas y atentar así contra su actividad inmunológica [7], pues la utilización de métodos de yodación más suaves como la lactoperoxidasa [6,7] arrojó resultados similares. Se le atribuye este efecto al proceso de extracción, purificación y conservación de la prolactina.

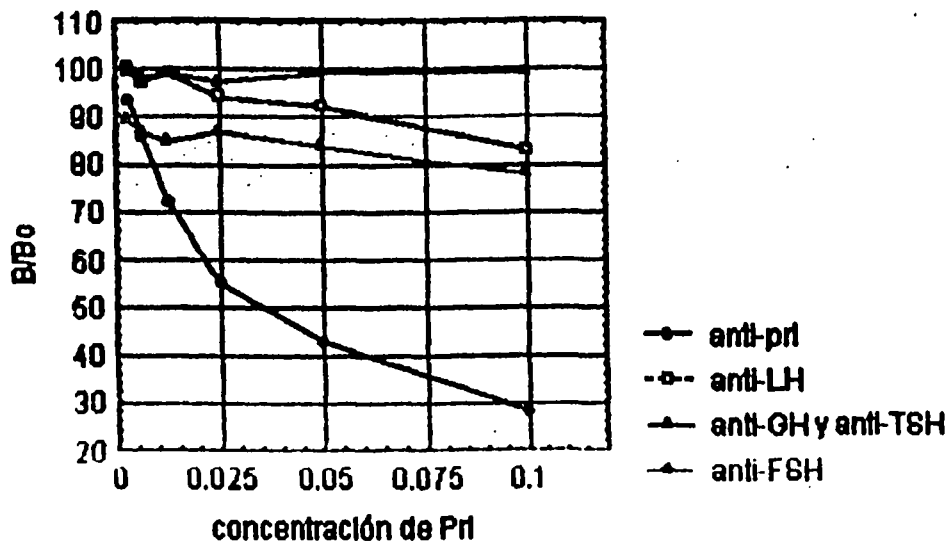
2. Soluciones patrones de prolactina.

La actividad específica de la hormona de producción nacional fué de 16.5 UI/mg contra el Kit de la Amersham y de 12 UI/mg contra el Kit de producción nacional. Este valor es aceptable si se compara con la hormona producida en la Amersham que es de 30 UI/mg [8]. En la tabla 3 se comparan los porcentos de unión específica obtenidos para cada dilución de la prolactina, utilizando los anticuerpos que puedan tener reacción cruzada con esta hormona contra los porcentos obtenidos empleando anticuerpo específico. Estos resultados se pueden observar gráficamente en la figura 2.

tabla No3

Dilución	Conc. Prolact (µg/ml).	anti-prolactina (%)	anti-LH (%)	anti-GH (%)	anti-FSH (%)	anti-TSH (%)
1/1600	0.0031	93	100	89	99	99
1/800	0.00625	86	97	87	98	93
1/400	0.0125	72	99	85	99	84
1/200	0.025	55	94	87	97	81
1/100	0.05	48	92	84	99	80
1/50	0.1	28	88	78	99	79

Fig 2. Pureza de prolactina nacional.



Al trazar una perpendicular al eje de las ordenadas por el punto ED-50, se observa que las curvas a través de las cuales se investiga la reactividad cruzada no se interceptan con la curva en la cual se utiliza el anticuerpo específico de anti-prolactina, lo que afirma que la reactividad cruzada con los diferentes anticuerpos es mínima y por tanto las impurezas presentes en la muestra proteica son despreciables según la fórmula 1.

De los resultados de la tabla No3 también se observa que la prolactina desplaza como curva patrón en las diluciones realizadas frente a su anticuerpo específico.

En la tabla No4 se comparan los porcentajes de unión específica obtenidos para cada punto de una curva patrón de prolactina de producción nacional, en la cual se emplearon las concentraciones reales del Kit-RIA-Prolactina, con los valores de una curva patrón de un Kit comercial de esta hormona.

tabla No4 •

ptos de curva	Kit comercial		Hormona en prueba (n ensayo) Bo			
	conc (μU/ml)	UniónEsp (%)	1ro (%)	2do (%)	3ro (%)	media (%)
1	72	92	90	89	82	87±3.6
2	144	80	74	69	68	70±2.6
3	287	62	52	53	48	51±2.1
4	575	46	39	42	37	39±2.1
5	1150	33	26	30	24	27±2.5
6	2300	19	16	18	18	17±1.8

Como se puede observar de la tabla No4, la curva preparada con la hormona en prueba desplaza en el rango deseado.

La tabla No5 muestra los parámetros de control de calidad de la hormona en prueba, comparados con los de un Kit comercial.

tabla No5

Parámetro	Kit Comercial	Hormona en prueba
ED-50	427±25	342±28
Intercepto	2.547±0.112	2.155±0.142
Pendiente	-0.941±0.008	-0/857±0.004
Suero Control 1	1411±75µU/ml	1361±160µU/ml
Suero Control 2	350±24µU/ml	295±41µU/ml
Suero Control 3	148±11µU/ml	126±18µU/ml

Los resultados de la tabla No5, dados como la media de 2 réplicas de 5 ensayos distintos, convencen que la hormona de producción nacional reúne los requisitos fundamentales para ser utilizada como patrón en el Kit-RIA de prolactina de producción nacional.

Los resultados del estudio de los 100 donantes muestran que la media poblacional es de 217±153 µU/ml, ó sea el intervalo en el cual se mueve la población normal es en el rango normal (medio) de la curva patrón.

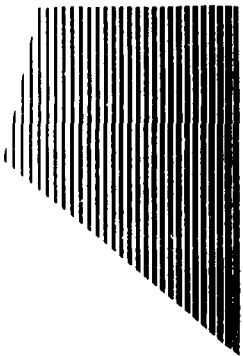
El estudio de correlación realizado arrojó un valor de 0.92 lo que es un buen indicador de la confiabilidad de los resultados utilizando la curva patrón y la hormona marcada a partir de la materia prima nacional.

CONCLUSIONES

1. La hormona Prolactina de producción nacional puede ser utilizada como radioligando en el Kit-RIA de esta proteína.
2. Esta hormona reúne los requisitos fundamentales de calidad necesarios para poder ser empleada como patrón en el Kit-RIA de prolactina.

REFERENCIAS

1. Michael L. Aubert, chapter 5, Handbook of Radioimmunoassay.
2. R. González y C. Arranz, Protocolo tecnológico para la preparación del Kit-RIA de Prolactina de producción nacional, INEN.
3. F. C. Greenwood, J. Hunter and J. S. Glover, Biochem. J., 89, 114 (1963).
4. U. J. Lewis, R. N. P. Singh and B. K. Seavy, Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1169 (1971).
5. P. Hwang, H. Guyda and H. Friesen, J. Biol. Chem., 247, 1955 (1972).
6. J. J. Thorrell and B. G. Johansson, Biochem. Biophys. Acta, 251, 363 (1971).
7. The Radiochemical Centre Ltd. Amersham, Bucks, England, RCC Review 18 (December 1977).
8. Catálogo Sigma Chemical Company (1991).



CIE

**CENTRO DE INFORMACION
DE LA ENERGIA NUCLEAR**

Calle 20 No. 4113 e/ 18A y 47, Playa

Telf.: 22-7527. Fax: 331188.

E mail: cien @ceniai cu