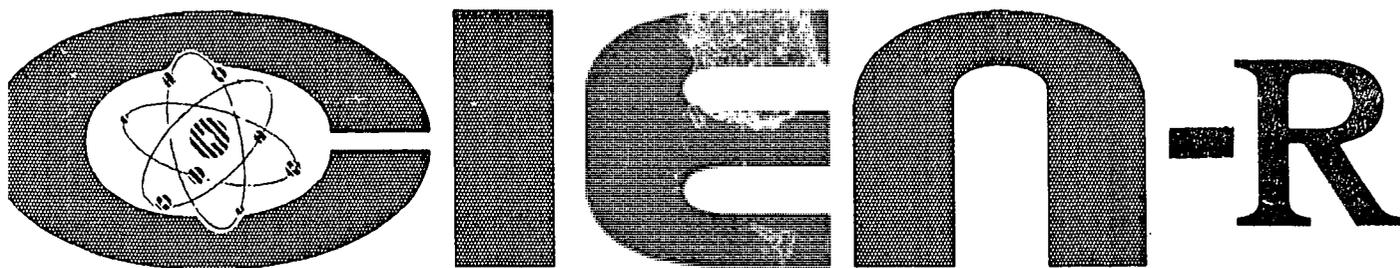


CV9600363

24-96

24-96



OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PROLACTINA A PARTIR
DE PROLACTINA HUMANA DE PRODUCCION NACIONAL

OBTENTION OF ANTIBODIES ANTI-PROLACTIN FROM HUMAN
PROLACTIN OF NATIONAL PRODUCTION

Caso, R.; Mosquera, M.

Centro de Isotopos. (CENTIS)

Perez, E.

Centro de Investigaciones de Mejoramiento Animal
(CIMA).

Arranz, C.

Instituto Nacional de Endocrinología.

La Habana, Cuba

POOR QUALITY
ORIGINAL

7 103 1 4

**OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PROLACTINA A PARTIR DE
PROLACTINA HUMANA DE PRODUCCION NACIONAL**

**OBTENTION OF ANTIBODIES ANTI-PROLACTIN FROM HUMAN
PROLACTIN OF NATIONAL PRODUCTION**

R.Caso¹, E.Pérez², M.Mosquera¹, C.Arranz³

**1-Centro de Isótopos (CIMA) 2-Centro de Investigación para el Mejoramiento Animal
(CIMA) 3-Instituto Nacional de Endocrinología (INEN)**

La Habana, Cuba.

Subject Categories: B13.30.

Key words: rabbits; L_H:M₁; radioimmunoassay; antigen-antibody reactions: Q1; diagnostic techniques.

“Obtención de anticuerpos anti-prolactina a partir de prolactina humana de producción nacional”.

RESUMEN

Se estudió la posibilidad de utilizar la hormona prolactina, producida por la Empresa Farmacéutica Mario Muñoz de la IMEFA, como inmunógeno para la obtención del antisuero anti-prolactina. Se realizó la validación del antisuero (titulación, especificidad y afinidad), con el fin de ser utilizado en la producción de Kits-RIA de Prolactina.

Se concluyó que el anticuerpo reúne los requisitos necesarios para su utilización en la producción de Kits-RIA de Prolactina.

ABSTRACTS

In this work was studied the use of the Prolactin hormone as immunogen, which is obtained in Cuba by the pharmaceutical institute “Mario Muñoz”, to produce the antibody anti-prolactin. Was made the validation of obtained antibody (titration, specificity and affinity). The produced antibody had the necessary quality to be use as a component of the Kits-RIA-Prolactin.

INTRODUCCION

La determinación de las concentraciones de la prolactina plasmática es de extrema utilidad para el diagnóstico y tratamiento de las patologías tales como infertilidad, amenorrea con o sin galactorrea, tumores hipofisarios, pérdida del libido y disminución del volumen seminal [1,2].

En nuestro país se utiliza con este fin la técnica ultramicroanalítica de Radioinmunoanálisis (RIA), la cual consiste en una reacción competitiva que se establece entre la prolactina marcada con I-125 y la prolactina plasmática por los sitios de unión del anticuerpo específico anti-prolactina. [2].

El Kit-RIA tiene entre sus componentes fundamentales el anticuerpo específico de la hormona a determinar. Este componente se obtiene, utilizando como materia prima la hormona en cuestión de alta pureza, por un proceso de inmunización en una especie diferente de la que procede la hormona [3,4].

Existen casas comerciales que venden el anticuerpo con la calidad requerida para ser incluido en el Kit-RIA [5]. El costo de estos anticuerpos es elevado por lo que el presente trabajo se propuso la obtención de los anticuerpos anti-prolactina en conejos, a partir de la hormona que se obtiene en Cuba, así como la validación y caracterización de los parámetros óptimos para ser incluida en el Kit-RIA-Prolactina de producción nacional.

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos utilizados son de calidad p.a de firmas internacionales reconocidas.

La radiactividad se determinó con un contador LKB tipo Minigamma 1275.

Para la validación de los anticuerpos se utilizaron Kits producidos y ofrecidos gentilmente por el INEN, los cuales a su vez están validados contra Kits comerciales de la OMS-HRP.

1. Obtención de anticuerpos anti-prolactina.

Con este fin se utilizaron 2 conejos de la raza semigigante blanco con un peso corporal de ± 10 libras cada uno. La alimentación fue "al libitum".

Como inmunógeno se utilizó la hormona prolactina que produce la Empresa Farmacéutica Mario Muñoz. La alta pureza de la hormona se comprobó en trabajos anteriores [6].

Se aplicó un esquema de inmunización con inyecciones intradérmicas cada 21 días en la zona dorsal anterior del lomo del animal en múltiples puntos.

La composición del inmunógeno fue 0.15mg de prolactina complementado con 0.5ml de adyuvante completo de Freund y 0.5ml de suero fisiológico a pH 7.0, durante todo el proceso de inmunización, el cual consistió en cuatro ciclos de 21 días cada uno.

Las extracciones de sangre se realizaron por la vena marginal de la oreja del conejo cada 7 días posteriores a las inmunizaciones. Se realizaron en total cuatro extracciones de sangre y una quinta para el sacrificio de los animales.

2. Validación de los anticuerpos obtenidos.

Con el objetivo de determinar la concentración óptima del anticuerpo para su introducción dentro del Kit comercial, se realizó la titulación de las extracciones de sangre en un intervalo de diluciones sucesivas 1/2 desde 1/100 hasta 1/64000. Para cada punto se montó el porcentaje de unión específica y no específica, los cuales fueron comparados con puntos controles.

Una vez escogido el título óptimo se introdujeron estos en un Kit nacional para determinar los parámetros de calidad y compararlos con los del Kit comercial.

Posteriormente se estudió la especificidad y afinidad de los anticuerpos.

La especificidad consistió en determinar la reactividad cruzada del anticuerpo con los posibles antígenos reactantes [3], los cuales podrían ser la hormona de crecimiento (GH) y la hormona estimulante de las tiroides (TSH). Con este fin se introdujo el anticuerpo obtenido en la dilución óptima en un Kit nacional y se hizo reaccionar con los antígenos reactantes en concentraciones patológicas. Se utilizaron concentraciones desde 0.032 μ g/ml hasta 0.5 μ g/ml en diluciones sucesivas 1/2 para la GH y concentraciones desde 0.115 μ g/ml hasta 1.83 μ g/ml en diluciones sucesivas 1/2 para la TSH.

El porcentaje de reactividad cruzada se determinó según la expresión:

$$\% \text{ Reactiv. Cruzada} = 100 \times \frac{\text{concentración de prolactina al ED-50}}{\text{conc. de sustancia reactante al ED-50}}$$

en la que se compara la reactividad en el punto medio de la curva patrón.

La afinidad de los anticuerpos consistió en la determinación de las constantes fisico-químicas de ellos (constante de afinidad, constante de disociación y concentración de los sitios de unión del anticuerpo), para lo cual se utilizó el método del Scatchard Plot [7].

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de las titulaciones realizadas mostraron que no ocurrió levantamiento de anticuerpos en las primeras extracciones, observándose buenos títulos en la cuarta extracción, por lo que se decidió sacrificar los animales, debido a la ausencia de cantidades suficientes de inmunógenos para la continuación de los ciclos de inmunización. Se observó una ligera disminución de los títulos después del sacrificio de estos.

Se seleccionaron para la validación de los anticuerpos los títulos de 1/4000 para el conejo 1 y 1/1000 para el segundo conejo, según los resultados de las titulaciones realizadas. Los anticuerpos obtenidos se introdujeron en un Kit comercial sustituyendo el anticuerpo específico, con el objetivo de determinar los parámetros de calidad y fueron comparados con los del Kit comercial nacional ya estandarizado. Estos resultados se muestran en la tabla No1.

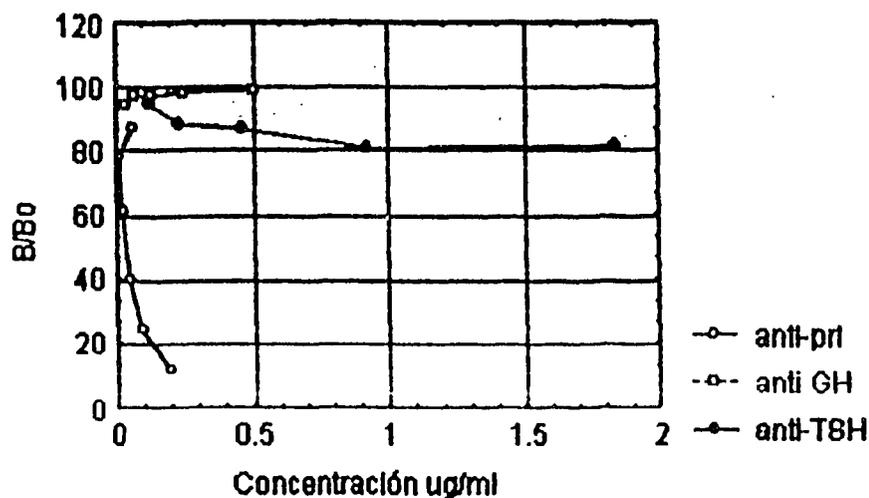
tabla No1

| Parámetro Control | Utilizando Kit Comercial | Utilizando dilución 1/4000 del anticuerpo conejo 1 | Utilizando dilución 1/1000 del anticuerpo conejo 2 |
|-------------------|--------------------------|--|--|
| pendiente | -0.982±0.008 | -1.125 | -0.976 |
| intercepto | 2.370±0.112 | 2.898 | 2.530 |
| ED-50 | 259±25 | 376 | 390 |
| Suero Control 1 | 934±262µU/ml | 849±109µU/ml | 863±88µU/ml |
| Suero Control 2 | 206±43µU/ml | 196±40µU/ml | 178±7µU/ml |
| Suero Control 3 | 84±22µU/ml | 127±51µU/ml | 110±12µU/ml |

Los resultados de las diluciones escogidas para los anticuerpos obtenidos caen en el rango de trabajo del Kit comercial, por estas razones se escogieron ellas para el estudio de especificidad y afinidad.

La figura 1 muestra los resultados de la especificidad de los anticuerpos obtenidos para el conejo 1. Los resultados de la especificidad del conejo 2 son similares.

Fig 1. Reactividad Cruzada del anticuerpo anti-Prl.



Las curvas de los antígenos reactivos no se cruzan con la curva de interés en la cual se emplea la prolactina como antígeno, por lo que la reactividad cruzada es despreciable según la expresión explicada con anterioridad.

La tabla No2 refleja los resultados de las constantes físico-químicas de los anticuerpos obtenidos según la técnica del Scatchard Plot.

Tabla No2

| Constante | Conejo 1 | Conejo 2 |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Const Afinidad K_{α} (L/M) | 0.43×10^9 | 0.53×10^9 |
| Const Disociación K_d (M/L) | 2.31×10^{-9} | 1.86×10^{-9} |
| Conc Sitios de unión al Ac (M) | 1.02×10^{-9} | 1.24×10^{-9} |

Estas constantes se encuentran dentro del rango característico de trabajo de los anticuerpos policlonales para su uso en radioinmunoanálisis.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron anticuerpos anti-prolactina a partir de la prolactina humana de producción nacional con los parámetros de calidad (título, especificidad y afinidad) requeridos para su utilización en la técnica de radioinmunoanálisis.

BIBLIOGRAFIA

1. Michel L. Aubert, Chapter 5, Handbook of Radioimmunoassay.
2. R. González y C. Arranz, Protocolo tecnológico para la preparación del Kit-RIA-Prolactina de producción nacional, INEN.
3. Vaitukaitis J.L., Robbins J.B., A method for producing specific antisera with small doses of immunogen, J. Clin. Endoc. Metab, 33, 988, 1971.
4. C. Arranz, R. González y R. Robaina, Producción de anticuerpos anticuriel en conejo para su uso en Radioinmunoanálisis, Rev. Cubana Biomedicina, 6 (1), 89-94, Ene 1987.
5. Catálogo Sigma Chemical Company, 1991.
6. R. Caso y C. Arranz, Evaluación de Prolactina de producción nacional para su uso en Radioinmunoanálisis, CENTIS.
7. Scatchard D, The attraction of proteins for small molecules and ions, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660, 1949



CIEn

**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