

Radioinmunoensayo nuevo para la subunidad alfa de las hormonas hipofisiarias¹.

Jaime Saavedra S., M. D.² y Keith Mashiter, Ph. D.³

RESUMEN

Este estudio ha establecido y validado un radioinmunoensayo para la subunidad alfa de la hormona foliculo estimulante humana (FSH-h). El ensayo se puede hacer en 3 días, con una muestra de suero de un volumen de 0.1 ml con una sensibilidad de 0.8 ng/ml. La cantidad de hormona que puede ser leída de la curva estándar varía entre 0.8 a 50 ng/ml. Su reproductividad dentro del ensayo fue de 7% y entre ensayos de un 15%. La reacción cruzada con otras gonadotropinas fue la siguiente: FSH, 7.3%; LH, 6% y TSH, 3.0%. Debido a la especificidad del ensayo, es improbable que ocurran interferencias con otras gonadotropinas circulantes o subunidades, a menos que se presenten niveles patológicos excesivos.

Las hormonas gonadotrópicas (LH, FSH, TSH, HCG) son glicoproteínas. Estructuralmente se componen de dos subunidades, alfa y beta, asociadas por uniones monocovalentes. Dentro de una misma especie la subunidad alfa de las hormonas glicoproteicas posee la misma secuencia de aminoácidos¹.

La subunidad beta de LH, FSH, TSH y HCG, tiene una secuencia de aminoácidos diferente para cada hormona y es portadora de la información que confiere la actividad hormonal específica cuando se asocia con la subunidad alfa^{2,3}.

El peso molecular aproximado de la LH humana (LH-h), FSH humana (FSH-h) y su subunidad alfa es 28 000, 33 000 y 14 000, respectivamente.

La subunidad alfa de la LH-h y FSH-h contiene 89 aminoácidos. La subunidad beta de LH-h, FSH-h y TSH-h contiene 115 aminoácidos y un peso molecular de 13 000. La subunidad beta de la HCG contiene 145 aminoácidos.

Algunos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que ninguna de las subunidades posee una actividad biológica independiente cuando se comparan con la hormona intacta^{4,5}. En otros se ha visto que las subunidades de las hormonas glicoproteicas pueden circular independientemente de la hormona intacta^{6,7}. Además, se sabe de un aumento en los niveles circulantes de la subunidad alfa después de un estímulo con GnRH⁷⁻⁹. La presencia de la subunidad alfa en la sangre, como respuesta a GnRH, se debe a una secreción independiente de ésta y no a que la hormona se disocia en la periferia. En efecto, la administración exógena, por ejemplo de LH, no causa ningún cambio en los niveles circulatorios de la subunidad alfa de LH-h¹⁰.

Las observaciones acumuladas sobre la secreción de las subunidades, indican que la pituitaria forma y libera la subunidad alfa y que la subunidad beta es la limitante en la biosíntesis de las hormonas glicoproteicas.

Mediante experimentos muy específicos y sensitivos se ha demostrado que la subunidad alfa se encuentra en la circulación de todos los hombres y en las mujeres pre y postmenopáusicas^{11,12}.

Durante el embarazo, la subunidad alfa de HCG aparece con concentraciones altas en el tejido placentario, el plasma y la orina¹³. La placenta contiene gran cantidad de subunidad alfa libre particularmente en los dos últimos trimestres del embarazo. En contraste la subunidad beta se encuentra en muy poca cantidad en el tejido placentario¹⁴. Estas diferencias en la concentración pueden reflejar las secreciones diferenciales de la placenta; lo más probable es que esto sea el resultado de una

1. Trabajo realizado en el Laboratorio Frances Fraser del Hospital Hammersmith de Londres, Unidad de Endocrinología, Departamento de Medicina Interna, Royal Postgraduate Medical School, con el apoyo financiero de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
2. Profesor Auxiliar I, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Endocrinologist, Senior Lecturer in Medicine and Chemical Pathology Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London.

depuración plasmática de la HCG diferente a la de la subunidad alfa, pues la vida media de la subunidad alfa es menos de una décima parte de la molécula nativa¹⁵.

Recientemente se demostró que las hormonas glicoproteicas se pueden producir y sintetizar extraglandularmente en una gran variedad de neoplasmas. En particular, se ha visto que los carcinomas bronquial y pancreático y los tumores carcinoides producen la subunidad alfa. Se ha descubierto la producción de HCG y sus subunidades, en pacientes con tumores en pulmón, estómago, hígado, ovarios y testículos. También se sabe que los carcinomas broncogénico y pancreático elaboran la subunidad beta de HCG¹².

La producción de la subunidad alfa por algunas células neoplásicas y aun por ciertas bacterias, indica que puede ser una proteína primitiva con una función general en la regulación celular¹⁶.

MATERIALES Y METODOS

Preparaciones hormonales. La subunidad alfa de la FSH-h utilizada tanto para iodinación como para hacer los estándares, la suministró gentilmente el Dr. A. F. Parlow (National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases NIAMDD, National Pituitary Agency, USA). Para valorar la especificidad del radioinmunoensayo se emplearon las siguientes preparaciones hormonales:

1. TSH-h para iodinación, suministrada por la National Pituitary Agency, NIAMDD.
2. FSH-h para iodinación, código CPDS-2, se obtuvo con el Profesor W. Butt, Birmingham, UK.
3. LH-h para iodinación, código IRC-2, proveniente del Profesor W. Butt, Birmingham, UK.
4. LH hipofisiaria, código 68/40, primera preparación internacional de referencia, la facilitó el Dr. D. R. Bangham, NIBSC, London, UK. Cada ampolla contiene aproximadamente 11.6 μg de LH y por definición equivale a 77 unidades internacionales (UI). Este material se derivó de LH ICR-2 con una actividad bioensayable para FSH menor de 0.9 UI.
5. FSH y LH hipofisiaria, código 78/549, segunda preparación internacional de referencia, suministrada por el Dr. D. R. Bangham, NIBSC, London, UK. Cada ampolla contiene casi 500 μg de extracto de hipófisis humana y por definición equivale a 25 UI de LH y 10 UI de FSH.

Antisuero. El primer anticuerpo utilizado en el radioinmunoensayo (antisubunidad alfa de FSH-h) se obtuvo en conejo y se recibió del Dr. A. F. Parlow en frascos de 1.0 ml a una dilución de 1:20; 0.2 ml de esta solución se diluyeron 10 veces en amortiguador de fosfato, 0.05 M con suero de conejo no inmune al 2% para obtener una dilución de 1:200, y se conservó a -20°C en cantidades de 0.2 ml. El uso de un segundo anticuerpo es necesario para separar el "anticuerpo unido" que se precipita del antígeno libre marcado.

El antisuero para gammaglobulina de conejo se originó en burro (suero de burro anticonejo) y se almacenó a -20°C en porciones de 0.5 ml.

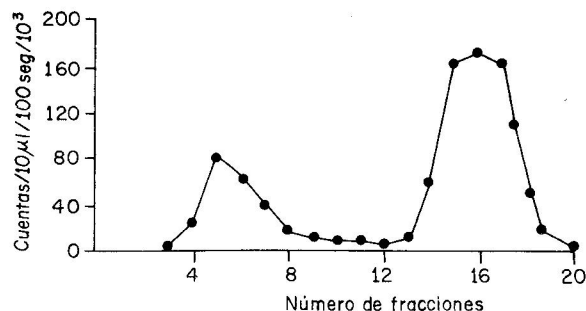


Figura 1. Purificación en gel de cromatografía de la subunidad alfa de FSH-h iodada. La mezcla de iodación (vol 100 μl) se colocó en una columna de sefadex G-50 (fino) de 20×1.2 cm, preparada en amortiguador de barbitone, pH 8.6. Se colectaron manualmente fracciones de aproximadamente 1 ml y se contaron alícuotas de 0.1 μl para medir su radioactividad. El péptido iodado se encontró entre las fracciones 4 y 8.

Iodinación. La subunidad alfa de FSH-h fue iodada con I^{125} según la modificación propuesta por Greenwood *et al.*¹⁷ para el método de la cloramina T, y se alcanzó una actividad específica de 73-236 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Después de la iodación la subunidad marcada se purificó en una columna de sefadex G-50 (fino) de 20.0×1.2 cm.

El patrón típico de iodación de la subunidad alfa de FSH-h muestra 2 picos (Figura 1). El primer pico contiene la subunidad marcada y el segundo pico el yodo libre. Las fracciones más inmunorreactivas se determinaron por su unión en un exceso de anticuerpo y se combinaron para almacenarlas a -4°C .

Dilución estándar para la subunidad alfa de FSH-h. La misma preparación de subunidad alfa de FSH-h que se empleó para la iodación se usó para hacer la curva estándar. A cada frasco de iodación con 2 μg de subunidad alfa de FSH-h se le añadieron 2 ml de amortiguador de borato con pH 7.5, para obtener 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; la dilución anterior se diluyó en 18 ml de amortiguador de borato obteniéndose 100 ng/ml y posteriormente se prepararon diluciones dobles desde 100 ng/ml hasta 2 ng/ml en fracciones de 1 ml (solución de trabajo) que se almacenaron a -20°C . Para cada experimento se descongeló un conjunto de los estándares y se tomaron 100 μl de cada dilución preparada.

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

Valoración del Antisuero.

A. Primer anticuerpo. Para determinar la dilución más adecuada para el radioinmunoensayo, se prepararon diluciones en un rango de 1:50 000 a 1:300 000, que se incubaron por 48 horas con una cantidad fija de antígeno (subunidad alfa I^{125} -FSH-h).

Los resultados señalan que la dilución final del primer anticuerpo que produce 50% de unión de la subunidad alfa marcada bajo estas condiciones fue 1:200 000 (Cuadro 1, Figura 2). Las curvas estándares hechas con las distintas diluciones del antisuero (Figura 3) indican que hay poca diferen-

Cuadro 1
Dilución del Primer Anticuerpo vs. Unión
de la Subunidad Alfa de FSH-h.

Dilución final	Experimentos			x% Bo/Tc
	1 % Bo/Tc	2 % Bo/Tc	3 % Bo/Tc	
1:50 000	87	—	—	87.0
1:100 000	67	—	—	67.0
1:150 000	56	52.0	54	54.0
1:200 000	53	49.0	50	50.6
1:250 000	46	—	47	46.5
1:300 000	40	57.6	39	46.0

x recuperación 64 ± 7.2 (DE)

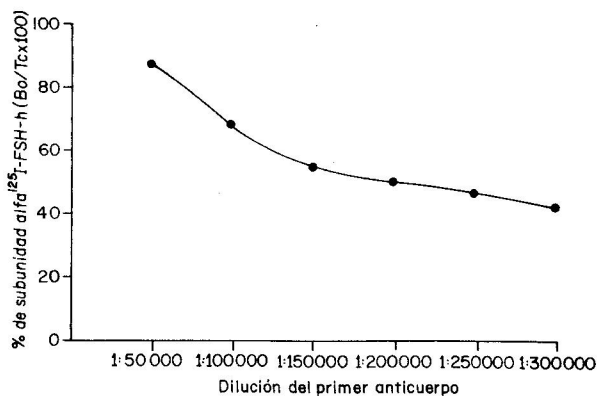


Figura 2. Titulación del antisero para la subunidad alfa de FSH-h. La radioactividad en los tubos estándares "cero" (BO) en las diferentes diluciones de anticuerpo se expresó como un porcentaje de la radioactividad total (Tc) añadida. La dilución final del primer anticuerpo que originó 50% de unión de lo marcado, bajo las condiciones del ensayo fue 1:200 000.

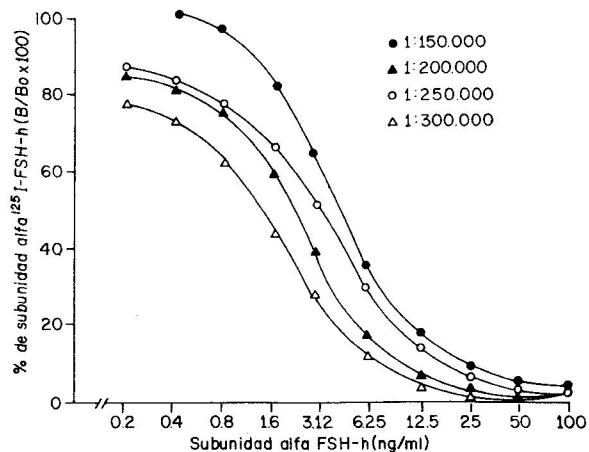


Figura 3. Curvas estándares para la subunidad alfa de FSH-h según las diluciones del antisero. La radioactividad en cada tubo que contiene el precipitado (B) se expresa como un porcentaje de la radioactividad unida en los tubos "cero" del estándar (BO). La curva de dilución de antisero: 1:200 000 se usó en los ensayos posteriores.

cia entre ellas, pero la curva 1:200 000 demostró ser la más satisfactoria.

B. Segundo anticuerpo. Para producir un precipitado visible y firme es necesario añadir un suero portador, de la misma especie del primer anticuerpo.

La concentración del suero portador es importante porque contiene gammaglobulina y en exceso podría inhibir la unión entre el primero y el segundo anticuerpos y provocar una precipitación incompleta. Si se añade una cantidad insuficiente de suero portador, el precipitado que se produce es ligero, y se adhiere poco al tubo y hace imposible decantar el supernadante.

Para titular el segundo anticuerpo (burro anticonejo) se realizaron experimentos, con diluciones variables en presencia de una cantidad fija de suero no inmune al conejo. Para titular el suero portador se utilizaron concentraciones fijas del segundo anticuerpo, variando las diluciones del suero no inmune al conejo. Los resultados muestran que con una dilución 1:200 de suero de conejo no inmune, la máxima precipitación del segundo anticuerpo ocurrió entre 1:20 y 1:80 (Figura 4).

Con la dilución constante (1:50) del segundo anticuerpo, se encontró que el suero de conejo no inmune da la máxima unión por encima de 1:100 (Figura 5).

Por tanto, en los experimentos siguientes se utilizaron de rutina las diluciones 1:200 para suero de conejo no inmune y 1:50 para el segundo anticuerpo.

El tiempo de incubación para el segundo anticuerpo no fue crítico en un rango de 4-72 horas. Entonces, por conveniencia, se empleó en el radioinmunoensayo un tiempo de incubación de 24 horas.

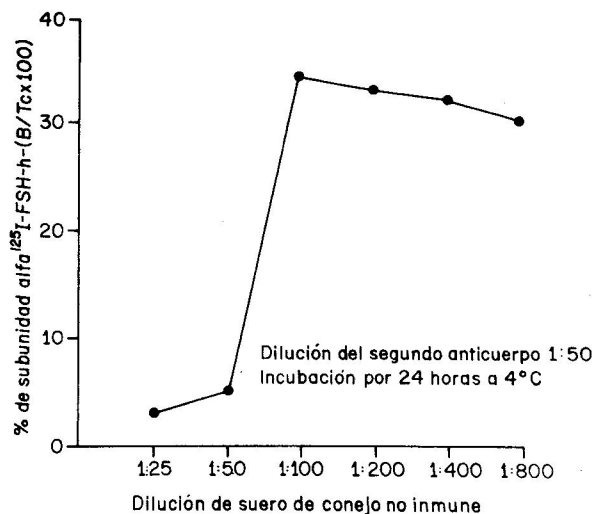


Figura 4. Valoración del segundo anticuerpo. Efecto de la concentración de suero de conejo no inmune en el ensayo de la subunidad alfa de FSH-h, con dilución del segundo anticuerpo (suero de burro anticonejo) 1:50. Como las diluciones mayores de 1:100 dieron la máxima unión, se seleccionó 1:200.

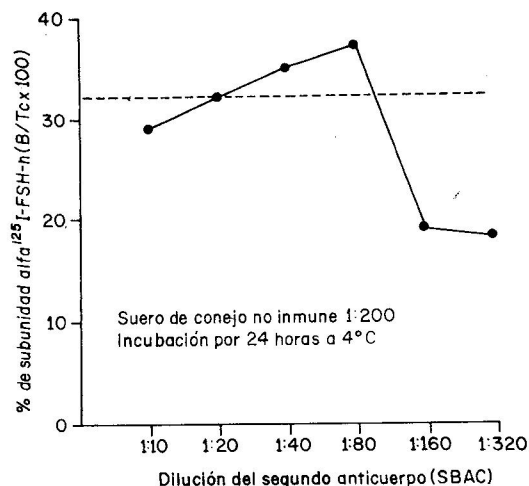


Figura 5. Valoración del segundo anticuerpo. Se incubaron diferentes diluciones de suero de burro anticonejo (SBAC) con una cantidad constante de suero de conejo no inmune (1:200). Para los ensayos experimentales el segundo anticuerpo se usó en dilución 1:50.

Procedimiento del radioinmunoensayo. La subunidad alfa de FSH-h se midió en el suero por radioinmunoensayo de doble anticuerpo. En cada experimento se incluyeron sueros de niveles hormonales conocidos para controlar la calidad. El volumen de incubación fue 0.6 ml, con un primer anticuerpo en dilución 1:200 000; las muestras de suero se utilizaron sin diluir.

ANEXO

En el siguiente flujograma se describe la técnica del radioinmunoensayo:

Día 1: Preparación de la curva estándar y muestras de suero.

1. A cada estándar o tubo desconocido se le adiciona:
 - 0.3 ml de amortiguador de borato pH 8.4.
 - 0.1 ml del primer anticuerpo (conejo antisubunidad alfa de FSH-h) diluido 1:40 000 en una solución 1:200 de suero de conejo no inmune hecha en amortiguador de borato más EDTA 0.025 M.
 - 0.1 ml de subunidad alfa ¹²⁵I-FSH a todos los tubos incluyendo 4 con ¹²⁵I-FSH-h únicamente para el conteo de la radioactividad total.
2. Tubos sin el primer anticuerpo (cuadruplicado).
 - 0.3 ml de amortiguador de borato con pH 8.4.
 - 0.1 ml de suero de conejo no inmune 1:200 en amortiguador de borato más EDTA 0.025 M.
 - 0.1 ml de subunidad alfa ¹²⁵I-FSH-h.
3. Tubos "cero" (cuadruplicado)
 - 0.3 ml de amortiguador de borato, pH 8.4.
 - 0.1 ml del primer anticuerpo (conejo antisub-

unidad alfa de FSH-h diluido 1:40 000) en solución 1:200 de suero de conejo hecho en amortiguador de borato más EDTA 0.025 M.
0.1 ml de subunidad alfa ¹²⁵I-FSH-h. Incubar a 4°C.

Día 2: Adición del segundo anticuerpo. Añadir 0.1 ml de suero de burro anti-conejo a todos los tubos en una dilución 1:50. Incubar a 4°C.

Día 3: Separación del precipitado. Centrifugar durante 20 minutos a 8°C todos los tubos excepto los 4 que contienen únicamente ¹²⁵I-FSH-h, a 200 rpm. Decantar el sobrenadante. Contar la radioactividad de los tubos que contienen el sobrenadante. Contar la radioactividad total de los tubos que tienen únicamente ¹²⁵I-FSH-h.

Cálculo de los resultados. Las cuentas contenidas en el precipitado de cada tubo, y por tanto la hormona unida (B), se expresan como un porcentaje de las cuentas unidas en los tubos "cero" de la curva estándar (B0). Además se incluyó el valor de la unión no específica (UNE) que es un indicador importante de la calidad del experimento. El parámetro de respuesta B/B0 corregido por UNE se puede calcular como sigue:

$$\frac{B - UNE}{B0 - UNE}$$

y de esta forma dibujar la curva estándar.

Los valores de las muestras desconocidas se leyeron directamente de la curva estándar, pues los patrones y las muestras se incluyeron en el mismo experimento.

Sensibilidad del radioinmunoensayo. La sensibilidad del radioinmunoensayo definida como la mínima cantidad de hormona demostrable, fue de 0.8 ng/ml de subunidad alfa de FSH-h. Ésta es la cantidad mínima que en la curva estándar produce una caída significativa del porcentaje de hormona marcada unida al anticuerpo ($P < 0.02$).

La diferencia promedio de unión entre los tubos "cero" y los 0.8 ng/ml de la curva estándar fue 15%. Por tanto, los valores leídos por debajo de 0.8 ng/ml se informan como menos de 0.8 ng/ml. La cantidad de hormona que se puede leer en la curva estándar varía de 0.8 a 50 ng/ml. La Figura 6 muestra una curva estándar compuesta de 12 radioinmunoensayos consecutivos, donde se aprecia lo descrito antes.

Validación del radioinmunoensayo.

Efecto del suero en la curva estándar. Para determinar el efecto del suero humano en la curva estándar de la subunidad alfa de FSH se añadieron diferentes volúmenes de suero. El resultado muestra que la adición de 0.05 ml de suero, suprime la unión en 33% mientras que 0.1 ml de suero (equivalente al volumen de la muestra desconocida) la suprimió en 50% y 0.2 ml de suero la suprimieron en 75% (Figura 7). Se pensó que esto se pudiera deber a la presencia de la subunidad alfa de FSH-h en el suero usado para este experimento. Para determinar la veracidad de esta hipótesis se agregaron cantidades diferentes de suero fetal bovino y medio de cultivo que contenía 10% de suero fetal bovino, sin encontrar ninguna

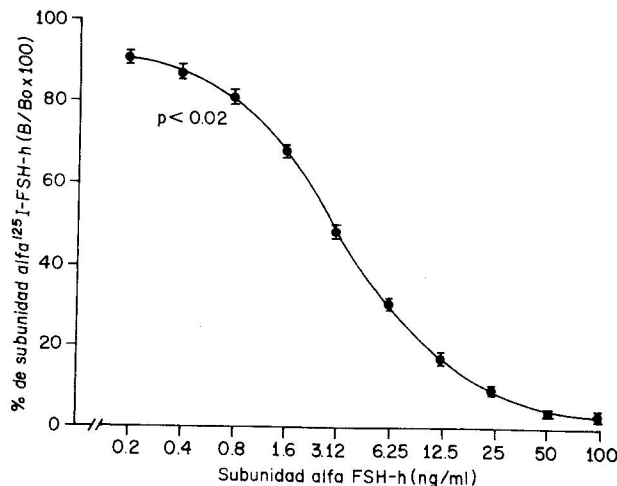


Figura 6. Curva estándar compuesta de 12 ensayos consecutivos de la subunidad alfa de FSH-h. Aquí se muestra tanto el promedio \pm el error estándar del promedio, y la significancia de la diferencia en la unión entre los tubos "cero" y la concentración más baja de la solución estándar.

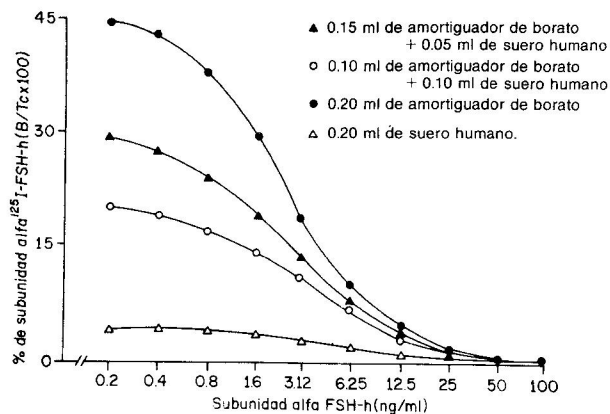


Figura 7. Valoración del efecto del suero humano en la curva estándar del ensayo de la subunidad alfa de FSH-h. La radioactividad unida en cada tubo (B) se expresa como un porcentaje de la radioactividad total (Tc). Se añadieron volúmenes diferentes de suero humano.

consecuencia en la unión de la hormona marcada al anticuerpo (menos de 5% de diferencia en cualquier punto de la curva) como se aprecia en las Figuras 8 y 9. Por tanto, se puede deducir que el efecto de la supresión de unión del suero humano en la curva estándar de la subunidad alfa de FSH se debió a la presencia de la subunidad alfa.

Variación del radioinmunoensayo. Para valorar la reproducibilidad, tanto dentro y entre radioinmunoensayos, se incluyó una mezcla ("pool") de sueros en cuadruplicado en cada experimento. El coeficiente de variación (CV) se calculó para las mezclas de la siguiente fórmula:

$$\text{Proporción del CV} = \frac{100 \times \text{desviación estándar}}{\text{Valor promedio}}$$

Se encontró 15% del CV entre los experimentos y 7% dentro de los experimentos.

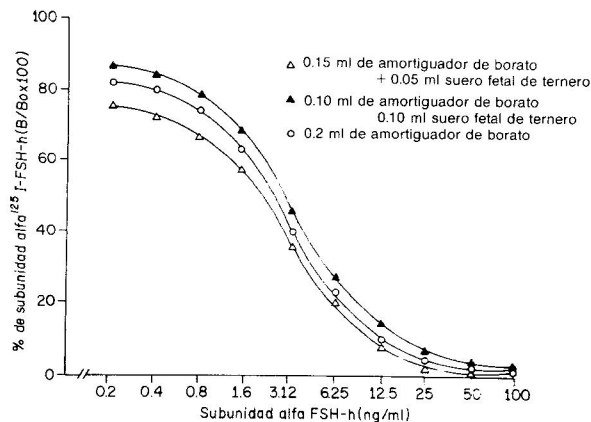


Figura 8. Valoración del efecto del suero fetal del ternero en la curva estándar del ensayo de la subunidad alfa de FSH-h.

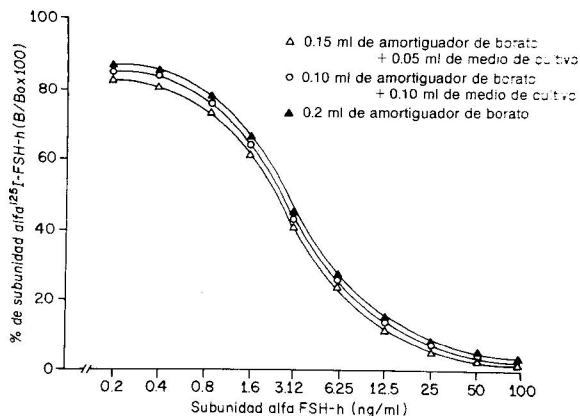


Figura 9. Valoración del efecto del medio de cultivo que contiene 10% de suero fetal bovino en la curva estándar del ensayo de la subunidad alfa de FSH-h.

Recuperación de la hormona añadida. Con este fin, se realizó el siguiente experimento: se determinó por radioinmunoensayo la concentración de la subunidad alfa de FSH-h endógena en un "pool" de suero; luego, se añadieron cantidades conocidas de subunidad alfa a las muestras, y se procesaron después de mezclar. La recuperación de la hormona añadida varió entre 53% y 71% (Cuadro 2).

Especificidad del radioinmunoensayo de la subunidad alfa de FSH-h, LH y FSH. En los experimentos que se hacen con hormonas glicoproteicas se presentan diferentes grados de especificidad, por la sobreposición de sus estructuras químicas y por los problemas para preparar materiales puros en los anticuerpos. Para determinar la especificidad del radioinmunoensayo de la subunidad alfa de FSH-h se colocaron en el radioinmunoensayo las preparaciones hormonales FSH (CPD-2), TSH (NIH), LH (ICR-2), LH 69/104, LH 68/40, FSH/LH 78/549.

Las curvas para los estudios de reactividad cruzada en el radioinmunoensayo se muestran en las Figuras 10, 11 y 12 y se resumen en los Cuadros 3, 4 y 5.

Cuadro 2
Recuperación de la Hormona Añadida

Concentración de FSH-h Endógena (mezcla) (a)	Añadida ng/ml (b)	Medio a+b=c ng/ml	Recobrado c-a=d ng/ml	% $\frac{d}{b} \times 100$
0.81	1.60	1.90	1.09	68
0.81	3.15	3.00	2.19	70
0.81	6.25	4.10	3.29	53
0.81	12.50	8.00	7.19	58
0.81	25.00	18.50	17.69	71

Los resultados muestran que el ensayo tiene una especificidad más o menos alta, pues la reactividad cruzada en las preparaciones relativamente puras FSH (CPD-2), TSH (NIH), LH (ICR-2) es de 6% o menos que al utilizar LH 69/104, que es un extracto hipofisiario con algunas impurezas. La preparación LH 68/40, bastante pura, da una reactividad cruzada alta (14%). El compuesto FSH/LH 78/549 ofrece una reactividad cruzada de menos de 1%, que indica ciertas impurezas en el material. La subunidad beta de la FSH-h presenta una reactividad cruzada inferior a 1%, y demuestra así la necesidad de la hormona intacta para una reactividad cruzada total.

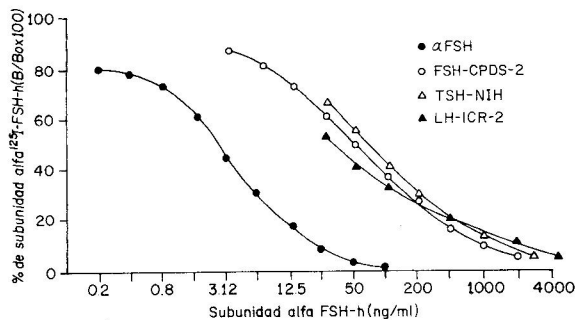


Figura 10. Reacción cruzada de varias hormonas hipofisiarias glicoproteicas en el radioinmunoensayo de la subunidad alfa de FSH-h.

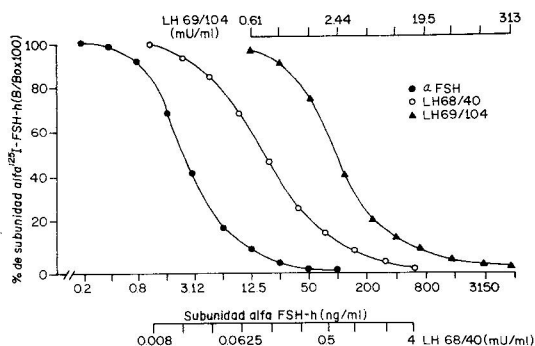


Figura 11. Reacción cruzada de la LH-h estándar en el radioinmunoensayo de la subunidad alfa de FSH-h.

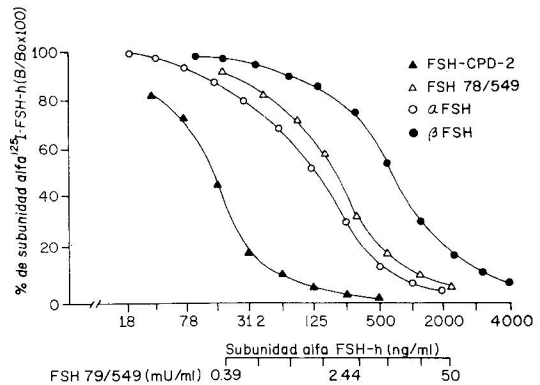


Figura 12. Reacción cruzada de varias preparaciones de FSH-h y sus subunidades en el radioinmunoensayo de FSH con FSH/LH 79/549 como estándar.

Cuadro 3
Especificidad del Radioinmunoensayo de FSH-h para las Hormonas Gonadotrópicas

Preparación	50% de desplazamiento ng/ml	% de potencia en peso
Subunidad alfa de FSH-h	2.4	100.0
FSH-CPD-2	64.0	3.7
TSH-NIH	80.0	3.0
LH-ICR-2	39.0	6.0

Cuadro 4
Especificidad del Radioinmunoensayo de la Subunidad Alfa de FSH-h para las Hormonas Gonadotrópicas LH.

Preparación	50% de desplazamiento ng/ml	% de potencia en peso
Subunidad alfa de FSH-h	2.6	100
LH 68/40	18.5 (122 mU LH)	14
LH 69/104	100.0 (5 mU LH 2 mU FSH)	

Cuadro 5
Especificidad del Radioinmunoensayo de la FSH-h para sus Subunidades Alfa y Beta

Preparación	50% de desplazamiento ng/ml	% de potencia en peso
FSH 78/549	250 (5 mU)	0.4
FSH-CPD-2	15.5	100.0
Subunidad alfa de FSH-h	155.0	10.0
Subunidad beta de FSH-h	700.0	0.14

DISCUSION

Este estudio ha permitido establecer el radioinmunoensayo para la subunidad alfa de las gonadotropinas humanas hipofisarias. El experimento utiliza 0.1 ml de suero humano, con una sensibilidad de 0.8 ng/ml. Se demostró que el efecto de supresión del suero humano en la curva estándar de la subunidad alfa de FSH-h se debe básicamente a la presencia de esta forma libre en el suero.

Interpretar la especificidad del radioinmunoensayo para la subunidad es difícil por la sobreposición de las estructuras químicas de las hormonas glicoproteicas hipofisarias y por la dificultad en obtener materiales puros para preparar anticuerpos. Diversos autores¹⁸⁻²¹ encontraron una reacción cruzada en el radioinmunoensayo de LH y FSH. También Rosenberg y Bulat⁸ observaron una reacción cruzada parcial de la subunidad alfa de FSH-h en los ensayos para FSH, LH y la subunidad beta de FSH. Lo anterior se puede deber a contaminación con otras preparaciones pues ninguna de las hormonas glicoproteicas es 100% pura. Las curvas para los estudios en el radioinmunoensayo de la subunidad alfa de FSH-h (Figuras 8, 9 y 10) muestran que hay relativamente poca reactividad cruzada con otras gonadotropinas (menos de 6%).

Únicamente aparecen valores falsos significativos (mayores de 0.8 ng/ml) si los valores de LH están en un exceso de 38 mU de LH 68/40, como se encuentra en muestras de suero patológico o de pacientes menopáusicas; sin embargo esto se puede sobrevalorar con base en la pureza de la hormona LH 68/40.

Por la alta especificidad del ensayo se puede concluir que es muy poco probable que haya interferencias con otras gonadotropinas circulantes o con sus subunidades, a menos que éstas tengan valores anormales.

SUMMARY

This study has established and validated a radioimmunoassay for h-FSH alpha subunit. The assay could be run using a serum sample volume of 0.1 ml with sensitivity of 0.8 ng/ml. Reproducibility was 7% and 15% within and between assay respectively. Cross-reaction the high specificity of this assay, interference by other circulating gonadotrophins or subunits is unlikely to occur unless gross pathological levels.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a los miembros del personal y colegas del Instituto de Obstetricia y Ginecología, Unidad de Endocrinología en el Departamento de Medicina Interna, Royal Post Graduate Medical School, Hospital Hammersmith, Londres, sin cuya ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

En particular hay mucho reconocimiento por el estímulo y apoyo recibidos de los profesores Alvaro Cuadros (Cali, Colombia), M. G. Elder, y del Dr. Keith Mashiter (London,

UK.) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), entidad que proporcionó el apoyo financiero para realizar este trabajo.

REFERENCIAS

- Pierce, J. G., Liao, T. H., Howard, S. M., Shome, B. y Cornell, J. S.: Studies on structure of thyrotropin: Its relationship to luteinizing hormone. **Recent Prog Horm Res** 27: 165-212, 1971.
- Reichert, L. E. Jr., Lawson, G. M. Jr., Leidenberg, F. L. y Trowbridge, C. G.: Preparation and properties of subunits of human luteinizing hormone. **Endocrinology** 93: 938-946, 1973.
- Hartree, A. S., Thomas, M., Braikевич, M., Bell, E. T., Christie, D. W., Tayler, R. y Pierce, J. G.: Influence of alpha and beta subunits on the kinetics of formation and activity of native and hybrid molecules of LH and human chorionic gonadotropin. **J Endocrinol** 51: 169-180, 1971.
- Kammerman, S. y Canfield, R. E.: The inhibition of binding of iodinated human chorionic gonadotropin to mouse ovary *in vivo*. **Endocrinology** 90: 384-389, 1972.
- Catt, K. J., Dufau, M. L. y Tsuruhara, T.: Absence of intrinsic biological activity in LH and HCG subunits. **J Clin Endocrinol Metab** 36: 73-79, 1973.
- Prentice, L. G. y Ryan, R. J.: LH and its subunits in human pituitary luteinizing hormone in serum and urine. **J Clin Endocrinol Metab** 40: 303-312, 1975.
- Hagen, C. y McNeilly, A. S.: The specificity and application of a radioimmunoassay for the alpha subunit of luteinizing hormone in man. **Acta Endocrinol** 78: 664-674, 1975.
- Rosenberg, E. y Bulat, G.: Immunoreactive alpha y beta subunits of follicle stimulating and luteinizing hormones in peripheral blood throughout the menstrual cycle and following stimulation with synthetic gonadotrophin releasing hormones (GnRH). **J Endocrinol Invest** 2: 233-239, 1979.
- Steyne, D. M., Conte, A. F., Grumbach, M. M. y Kaplan, S.: Plasma glycoprotein hormone alpha subunit in the neonate and prepubertal children. Effects of luteinizing hormone releasing hormone. **J Clin Endocrinol Metab** 50: 450-454, 1980.
- Edmonds, M., Molitch, M., Pierce, J. G. y Odell, W. D.: Secretion of alpha subunit of luteinizing hormone (LH) by the anterior pituitary. **J Clin Endocrinol Metab** 41: 551-555, 1975.
- Kourides, I. A., Weintraub, B. D., Ridgway, E. C. y Malloff, F.: Pituitary secretion of free alpha and beta subunits of human thyrotropin in patients with thyroid disorders. **J Clin Endocrinol Metab** 40: 872-885, 1975.
- Rosen S. W., Weintraub, B. D., Vaitukaitis, J. L., Sussman, H. H., Hershman, J. M. y Muggia, F. M.: Placental proteins and their subunits as tumour markers. **Ann Intern Med** 82: 71-83, 1975.
- Franchimont, P., Gaspard, V., Reuter, A. y Haynen, G.: Polymorphism of protein and polypeptide hormones. **Clin Endocrinol** 1: 315-336, 1972.
- Vaitukaitis, J. L.: Changing placental concentration of human chorionic gonadotrophin and its subunits during gestation. **J Clin Endocrinol Metab** 38: 755-760, 1974.
- Vaitukaitis, J. L., Ross, C. T., Braunstein, G. D. y Rayford, P. L.: Gonadotrophins and their subunits. Basic and clinical studies. **Recent Prog Horm Res** 32: 289-331, 1976.
- Greenwood, F. C., Hunter, W. M. y Glover, J. S.: The preparation of ¹²⁵I labelled growth hormone of high specific activity. **Biochem J** 89: 114-123, 1963.
- Franchimont, P.: Radioimmunoassay for gonadotrophic hormones. In: **Protein and polypeptide hormones**, pp. 99-109, Ed. M. Margoulies, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1968.
- Midgley, A. R.: Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone. **J Clin Endocrinol Metab** 27: 295-299, 1967.
- Faiman, C. y Ryan, R. J.: Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone. **J Clin Endocrinol Metab** 27: 444-447, 1967.
- Schalaff, S., Rosen, S. W. y Roth, J.: Antibody to human follicle stimulating hormone: cross reactivity with three other hormones. **J Clin Invest** 47: 1722-1729, 1968.
- Odell, W. D. y Swerdloff, R. S.: Progesterone induced luteinizing and follicle stimulating hormone surge in post menopausal women: A simulated ovulatory peak. **Proc Natl Acad Sci USA** 61: 529-536, 1968.