



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ENSAYO DEL RADIO - RECEPTOR DE HORMONA LUTEINIZANTE DEL  
FELICULO (h LH) Y GONADOTROFINA CORIONICA (h CG)  
EN EL CUERPO AMARILLO DEL OVARIO DE VACA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**ALBERTO MEDINA MOLINA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA**

**1985**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

" ENSAYO DEL RADIO-RECEPTOR DE HORMONA LUTEINIZANTE  
DEL FOLICULO (hLH) Y GONADOTROFINA CORIONICA (hCG)  
EN EL CUERPO AMARILLO DEL OVARIO DE VACA "

## CONTENIDO

- 1- Introducción
- 2- Material
- 3- Métodos
- 4- Resultados
- 5- Discusión
- 6- Resumen y  
Conclusiones
- 7- Referencias

# 1.- I N T R O D U C C I O N

## I- ANTECEDENTES

### - LA GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA

- A) Históricos y Científicos
- B) Métodos de obtención y purificación
- C) Métodos de detección y cuantificación
- D) Mecanismos de acción hormonal

### - RADIORECEPTORES

- A) Antecedentes históricos y científicos
- B) Actualidad de la técnica

## II- LA IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

## III- PROPOSITOS

## 1- INTRODUCCION

## - LA GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA

## A) Antecedentes históricos y científicos.

La gonadotrofina coriónica humana (hCG) es una glicoproteína que es producida por el tejido placentario, específicamente por el sincitiotrofoblasto (1), que puede detectarse y medirse en suero y orina de mujeres embarazadas.

Ya en 1905 Halban (1,2) señaló que debía existir una sustancia o sustancias de origen placentario causante de los cambios característicos del organismo materno durante el embarazo.

En 1913 Aschner (2,3) describió la hiperhemia ovárica, la formación del cuerpo lúteo y el estro de las cobayas vírgenes tratadas con extractos placentarios humanos; el descubrimiento de la hCG se atribuye tradicionalmente a Aschheim y Zondek (1-3) quienes en 1927 demostraron su presencia en sangre y orina de embarazadas, que cuando se inyectaban a ratonas inmaduras y vírgenes causaba el crecimiento ovárico y formación del cuerpo amarillo; así, establecieron que la medida de esta hormona debía ser la base de las pruebas de embarazo.

A través del tiempo se han realizado una serie de estudios en diferentes laboratorios (4-14) con el fin de obtener un mayor conocimiento de las propiedades físico-químicas de esta glicoproteína: como el peso molecular (P.M.), punto isoeléctrico (pI), subunidades que la integran, secuencia de aminoácidos, contenido y composición de carbohidratos, así como su posición en la cadena polipeptídica, etc. Algunos de los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 1; como puede observarse, los datos son heterogéneos, lo que algunos autores lo atribuyen principalmente a que las fracciones de hCG purificadas en sus laboratorios contienen diferentes cantidades de carbohidratos y que como consecuencia de esto, el

patrón cromatográfico, electroforético y la actividad biológica se alteran.

Actualmente se acepta que la hCG tiene un P.M. de 36,700 a 38,000 (2, 13), que su pI es de 4.5 y que contiene de 30 a 33% de carbohidratos (2, 6, 10); que está formada de dos subunidades (6, 15-18) denominadas  $\alpha$  (alfa) y  $\beta$  (beta), que no están covalentemente unidas (2) y que por sí solas no presentan actividad biológica (8, 17, 18). La alfa tiene 92 aminoácidos y la beta tiene 145; sus P.M. van de 14,500 a 15,000 y 22,000 a 23,000 respectivamente (2, 13); además, ya se conoce la secuencia de sus aminoácidos (16, 17) y su contenido de carbohidratos (6).

Las funciones que se le han atribuido a la hormona en el organismo son:

- Rescatar y mantener el cuerpo amarillo en el período de peri-implantación (1, 2, 19, 20) alrededor del día 8 al 10 después de la ovulación y también se ha informado que en otras especies hay otra molécula similar a la hCG ("hCG-like") que se produce en el microvilli de la mórula misma. Cuando se produce en concentraciones por debajo del nivel normal generalmente se presenta aborto espontáneo (1, 2, 9, 19, 21-24).
- Tiene una acción sinérgica con la prolactina, el estradiol y la progesterona cuando estas hormonas tienen niveles apropiados en sangre (2, 19, 25, 26).
- Estimula la síntesis de andrógenos testiculares fetales y la proliferación de células de Leydig del feto masculino (2, 27-29).
- Está en estudio su posible efecto inmunosupresivo, el cual probablemente elimina el proceso de inmunorechazo por parte de la madre hacia el feto (2, 19). Resulta interesante mencionar que la hCG además de producirse en el sincitiotrofoblasto se detecta en células neoplásicas como los adenocarcinomas, hepa-

tomas, en carcinomas ováricos y testiculares; también se ha sugerido que estas células la producen para protegerse del inmunorechazo por parte de las células sanas; sin embargo, la hormona de este origen tiene bajas proporciones de carbohidratos y como consecuencia su actividad biológica sobre los órganos blanco característicos es despreciable o nula (2, 4, 5, 11, 13, 19).

- Se le conocen funciones homólogas a las de la hLH (hormona luteinizante humana) en ambos sexos (1-3, 9).
- Finalmente se le ha detectado en esperma y testículo humano (2, 18) y en blastocistos de animales antes de la nidación, en ratona, rata y coneja (2, 20), aunque no se sabe que función tiene en esas estructuras.

#### B) Métodos de obtención y purificación.

Se le ha obtenido a partir de orina de mujeres embarazadas (4, 5, 30, 31) en el primer trimestre del embarazo; de preparaciones comerciales poco purificadas (6-12), de extractos placentarios normales (14, 32-34), o con malformaciones tumorales (14, 31, 32) y a partir de cultivo de tejidos (2, 33).

Los métodos de obtención de hCG a partir de orina se basan de manera general en la separación de pigmentos y sales con un sistema de kaolín con una solución alcalina. El producto es acidificado y se liofiliza (30). El polvo se redissuelve en una solución amortiguadora y a partir de aquí son variables los pasos de purificación subsecuentes (ver Tabla 1) ya que, mientras algunos autores llevan dicho polvo a una gel filtración (7) y después a un intercambio iónico (aniónico o catiónico) otros invierten la secuencia de los procedimientos (4, 5).



Cuando se trata de preparaciones comerciales solo se utilizan los procedimientos de purificación (6-12).

Si el origen es el tejido placentario normal o patológico (14, 32-34), este se congela o procesa de inmediato; se pesa y homogeniza en agua destilada o en el amortiguador apropiado. Se eliminan los restos grandes de tejido por medio de filtración en gasas y la suspensión se centrifuga para poder eliminar células y fragmentos celulares grandes. El sobrenadante se lleva a los pasos de purificación de cromatografía en gel o de intercambio iónico ya descritos.

### C) Métodos de detección y cuantificación.

Las diferentes fracciones eluidas de la cromatografía en gel o de intercambio iónico ya liofilizadas se pesan para determinar sus rendimientos en polvo y se someten a métodos de cuantificación de proteínas para conocer la concentración de  $\mu\text{g}$  de proteína por mg de polvo.

La siguiente etapa que las hormonas deben pasar en su caracterización es la valoración de su capacidad inmunogénica (capacidad de una molécula de producir anticuerpos en un organismo); su actividad inmunológica, en la que la hormona se cuantifica por medio de técnicas inmunológicas in vitro ya estandarizadas (35) y su actividad biológica practicando bioensayos en animales de laboratorio; estos pueden ser cualitativos (hiperemia ovárica en ratona inmadura; o la expulsión de espermatozoides en anfibio) (1, 36) o cuantitativos, que generalmente se basan en el aumento del tamaño en: ovario, útero, vesículas seminales, o próstata en ratas inmaduras o hipofisectomizadas (1, 3, 36). La cuantificación depende de la aplicación de las dosis útiles de la hormona problema, cuyas respuestas se comparan con las que se obtienen en grupos similares de animales, los cuales

reciben dosis equivalentes o similares de una hormona estándar, ya sea internacional o de referencia. Los bioensayos se han aplicado para el diagnóstico de embarazo desde 1927 (ver Tabla 2); sin embargo estas técnicas muestran desventajas como son: disponibilidad de muchos animales; variabilidad en la respuesta de un lote a otro y a veces en diferentes épocas del año; consumen grandes cantidades de hormona; las pruebas se deben realizar a veces en períodos largos y tienen una sensibilidad pobre. Estas son las razones por las que dichos procedimientos se utilizan menos cada día, aunque su especificidad los mantiene aún dentro de muchos laboratorios, sobre todo aquellos que extraen y purifican hormonas.

Las alternativas para fines diagnósticos son las pruebas inmunológicas (2, 36-39). Desde 1960 se han descrito las técnicas de inhibición de la hemoaglutinación y la de partículas de latex en placa (ver Tabla 2) las que continúan utilizándose con pequeñas variantes (40, 41). En nuestro país estos métodos son los más utilizados debido a que presentan las siguientes ventajas: bajo costo, rápidos en su realización y muchos se pueden practicar fuera del laboratorio; son confiables en un 95% después de la sexta semana del último período menstrual, con sensibilidades que van desde 0.5 a 1.5 U.I. (Unidades Internacionales) por ml de orina (2, 3, 36-38); cuando se aplican antes del período señalado su confiabilidad decae dramáticamente (21, 23, 36, 37, 42, 43).

Debido a que los ginecólogos y clínicos de los hospitales reclaman la necesidad de pruebas de mayor sensibilidad y altamente confiables para estar en posibilidades de poder asignar un tratamiento adecuado a pacientes con embarazo de alto riesgo, con abortos espontáneos frecuentes o en quienes se sospeche la presencia de posibles tumores malignos (relacionados o no con el tejido placentario) o como simple monitoreo de los perfiles hormonales a través del embarazo, se ha recurrido

a la metodología del radioinmunoanálisis (RIA) que en 1969 se desarrolló para la hCG (21-24, 37). Esta técnica se fundamenta en la competencia entre una hCG radioiodada (con  $^{125}\text{I}$  ó  $^{131}\text{I}$ ) y una hCG "frfa" por unirse a un anticuerpo específico para la hormona. Esta metodología tiene una sensibilidad de 25 mU.I. por ml de suero, lo que hace posible detectar el embarazo desde el séptimo día después de la ovulación. El procedimiento se ha comercializado en países desarrollados y en México se importa en forma de estuches.

La última modalidad de estos métodos de detección y cuantificación de hormonas son los métodos de radioreceptor que se basan en una variante del RIA en este caso una hormona "marcada" compete con otra "frfa" por una proteína ubicada en la membrana celular de un órgano blanco (el receptor), el cual es capaz de reconocerlas y unir las de manera altamente específica debido a que presenta una configuración tridimensional complementaria y se piensa que las une por medio de atracciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos, etc. Este método es altamente sensible ya que detecta concentraciones tan pequeñas que van de 0.3 a 4.0 ng de hCG por ml de suero (2, 20, 21); se realiza en 2 horas y es altamente reproducible; tiene la sensibilidad del RIA y la especificidad del bioensayo, por lo cual se le considera un método con gran futuro dentro del campo de la endocrinología.

#### D) Mecanismos de acción hormonal.

Se sabe que las hormonas son señales químicas que colaboran en la coordinación del metabolismo de un organismo multicelular.

Los cambios en el medio ambiente tanto interno como externo alteran los niveles de hormona circulante y a su vez los niveles hormonales influyen en los ajustes del medio interno.

Algunas hormonas pueden actuar sobre uno, dos o varios órganos blancos y hay también el caso contrario en donde un receptor puede unir una ó más hormonas.

La unión de la hCG y la hLH a su receptor tanto ovárico como testicular se ha demostrado en estudios radioautográficos (44-50), en homogenados celulares altamente purificados (47, 51-54) y en células dispersadas enzimáticamente (50, 55, 56).

No obstante el mecanismo íntimo de la acción hormonal que en dichas células se desencadena aunque se estudia intensamente aún no está por completo dilucidado.

Algunos investigadores (57-62) plantean que este complejo hormona-receptor inicia la respuesta de la célula de manera similar a como lo describe Sutherland y col. (63) para las células hepáticas. La hormona circulante en la sangre es el PRIMER MENSAJERO que interactúa con el receptor membranar el que a su vez, estimula al sistema adenil ciclasa incorporado a la membrana plasmática de su órgano blanco; esta enzima induce la conversión de ATP (adenosín trifosfato) a cAMP (5 adenosín monofosfato cíclico) o SEGUNDO MENSAJERO, el cual ejerce el efecto característico de la hormona, que a nivel de ovario induce la síntesis de estrógenos y progesterona y a nivel de testículo la elaboración de andrógenos y testosterona, etc. (59-61, 64). Sin embargo otros autores (45, 64-66) proponen que el sitio receptor no solo es membranar sino que describen receptores intracitoplásmicos y más aún, muy recientemente se han descrito procesos de internalización del complejo hormona-receptor para hCG y hLH (67-69).

#### - RADIORECEPTORES.

##### A) Antecedentes históricos y científicos.

Para que se desarrollara esta metodología fue necesario conocer primero las condiciones de marcaje de las hormonas proteicas (70, 71) con  $^{125}\text{I}$  o con  $^{131}\text{I}$  y que

a la metodología del radioinmunoanálisis (RIA) que en 1969 se desarrolló para la hCG (21-24, 37). Esta técnica se fundamenta en la competencia entre una hCG radiiodada (con  $^{125}\text{I}$  ó  $^{131}\text{I}$ ) y una hCG "frfa" por unirse a un anticuerpo específico para la hormona. Esta metodología tiene una sensibilidad de 25 mU.I. por ml de suero, lo que hace posible detectar el embarazo desde el séptimo día después de la ovulación. El procedimiento se ha comercializado en países desarrollados y en México se importa en forma de estuches.

La última modalidad de estos métodos de detección y cuantificación de hormonas son los métodos de radioreceptor que se basan en una variante del RIA en este caso una hormona "marcada" compite con otra "frfa" por una proteína ubicada en la membrana celular de un órgano blanco (el receptor), el cual es capaz de reconocerlas y unirlas de manera altamente específica debido a que presenta una configuración tridimensional complementaria y se piensa que las une por medio de atracciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos, etc. Este método es altamente sensible ya que detecta concentraciones tan pequeñas que van de 0.3 a 4.0 ng de hCG por ml de suero (2, 20, 21); se realiza en 2 horas y es altamente reproducible; tiene la sensibilidad del RIA y la especificidad del bioensayo, por lo cual se le considera un método con gran futuro dentro del campo de la endocrinología.

D) Mecanismos de acción hormonal.

Se sabe que las hormonas son señales químicas que colaboran en la coordinación del metabolismo de un organismo multicelular.

Los cambios en el medio ambiente tanto interno como externo alteran los niveles de hormona circulante y a su vez los niveles hormonales influyen en los ajustes del medio interno.

reciben dosis equivalentes o similares de una hormona estándar, ya sea internacional o de referencia. Los bioensayos se han aplicado para el diagnóstico de embarazo desde 1927 (ver Tabla 2); sin embargo estas técnicas muestran desventajas como son: disponibilidad de muchos animales; variabilidad en la respuesta de un lote a otro y a veces en diferentes épocas del año; consumen grandes cantidades de hormona; las pruebas se deben realizar a veces en períodos largos y tienen una sensibilidad pobre. Estas son las razones por las que dichos procedimientos se utilizan menos cada día, aunque su especificidad los mantiene aún dentro de muchos laboratorios, sobre todo aquellos que extraen y purifican hormonas.

Las alternativas para fines diagnósticos son las pruebas inmunológicas (2, 36-39). Desde 1960 se han descrito las técnicas de inhibición de la hemoaglutinación y la de partículas de latex en placa (ver Tabla 2) las que continúan utilizándose con pequeñas variantes (40, 41). En nuestro país estos métodos son los más utilizados debido a que presentan las siguientes ventajas: bajo costo, rápidos en su realización y muchos se pueden practicar fuera del laboratorio; son confiables en un 95% después de la sexta semana del último período menstrual, con sensibilidades que van desde 0.5 a 1.5 U.I. (Unidades Internacionales) por ml de orina (2, 3, 36-38); cuando se aplican antes del período señalado su confiabilidad decae dramáticamente (21, 23, 36, 37, 42, 43).

Debido a que los ginecólogos y clínicos de los hospitales reclaman la necesidad de pruebas de mayor sensibilidad y altamente confiables para estar en posibilidades de poder asignar un tratamiento adecuado a pacientes con embarazo de alto riesgo, con abortos espontáneos frecuentes o en quienes se sospeche la presencia de posibles tumores malignos (relacionados o no con el tejido placentario) o como simple monitoreo de los perfiles hormonales a través del embarazo, se ha recurrido

## 2.- Material

### I. RECOLECCION DEL MATERIAL BIOLOGICO

#### a) Material:

- 50 Bolsas de plástico
- 1 Caja de Poliuretano
- 1 Congelador a -30°C

### II. EXTRACCION Y OBTENCION DE LOS RECEPTORES

#### a) Material:

- 1 Charola de plástico de 30x38 cm con hielo
- 2 Vasos de precipitado de 100 ml
- 1 Probeta de 100 ml
- 2 Pipetas serológicas de 1 ml
- 100 Tubos de ensayo de 12x75 mm
- 1 Aguja de raquia del No. 18
- 1 Jeringa de 25 ml
- 3 Gradillas de plástico
- 3 Pipetas Pasteur
- 1 Homogenizador
- 1 Estuche de disección
- 1 Balanza de torsión
- 1 Centrífuga IEC Modelo PR6
- 1 Centrífuga Beckman Spinco Modelo L (con rotor SW-25)
- 1 Centrífuga Sorvall RC2-B (con rotor SS-34)

## b) Reactivos y Soluciones:

TRIS (Hidroximetilaminometano)	(Merck)
Ditiotreitol	(Bayer)
Sacarosa	(Merck)
Cloruro de magnesio	(Baker)
Acido clorhídrico	(Merck)
Solución amortiguadora de TRIS-HCL (para centrifugación)	

TRIS	10 mM
------	-------

Ditiotreitol	1 mM
--------------	------

Cloruro de magnesio	1 mM
---------------------	------

Sacarosa	0.25 M	(Hyland)
----------	--------	----------

Aforar a 1 litro y ajustar pH 7.8 con ácido clorhídrico y guardar en cuarto frío

Solución amortiguadora de TRIS-HCL (para incubación)

TRIS	10 mM
------	-------

Suero de albúmina bovina 0.1%	
-------------------------------	--

Trasyol	10 U.I.	(Bayer)
---------	---------	---------

Cloruro de calcio	1 mM	(Baker)
-------------------	------	---------

Aforar a 1 litro y ajustar el pH a 7.2 con ácido clorhídrico y guardar en cuarto frío.

Soluciones de sacarosa (para gradiente) al 50%, 40% y 30%.

## III. CUANTIFICACION DE PROTEINAS

## a) Material:

50

Tubos de vidrio de 1.5x15

3

Pipetas volumétricas de 1 ml



- 1 Balanza analítica Mettler (sensibilidad de 100 µg)
- 1 Agitador Vortex (Labline Inst. Inc.)
- 1 Incubador (J.M. Ortiz)
- 1 Reloj de alarma
- 1 Espectrofotómetro Hitachi-Perkin Elmer Coleman 124.

b) Reactivos y Soluciones

Agua deionizada

Tartrato de sodio y potasio (Merck)

Sulfato de cobre hidratado (Mallinckrodt)

Albúmina de suero bovino

fracción V de Cohn (Calbiochem)

SOLUCION "A"

Carbonato de sodio 100 gr (Baker)

Tartrato de sodio y potasio 2 gr

Hidróxido de sodio 1 N 500 ml (Merck)

Aforar a 1000 ml con agua deionizada, filtrar y se conserva en frasco de poliuretano

SOLUCION "B"

Tartrato de sodio y potasio 2 gr

Sulfato de cobre 1 gr

Hidróxido de sodio 1 N 10 ml

Aforar a 100 ml con agua deionizada, filtrar y conservar en frasco en vidrio ámbar.

## SOLUCION "C"

Reactivo de fenol según Folín y Ciocalteu 1 ml (Merck)

Agua 15 ml

Esta solución se prepara en el momento de usarla

## IV.- PURIFICACION DE GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA (hCG)

## a) Material:

5	Pipetas serológicas de 1 ml
5	Pipetas serológicas de 10 ml
1000	Tubos de vidrio de 13x100 mm
10	Micropipetas Pasteur
5	Vasos de precipitado de 10 ml
5	Vasos de precipitado de 50 ml
5	Vasos de precipitado de 100 ml
10	Bolsas de Celofán

## b) Reactivos y soluciones:

Sephadex G-15	(Pharmacia)
Carboximetil-celulosa	(Sigma Chemical)
Dietilaminoetil-celulosa	(Sigma Chemical)
Ampolletas de hCG Pregnyl (Organón) (Lote 40) de 5000 U.I.	
Solución amortiguadora de fosfatos 0.50 M pH 7.5	
Acetato de amonio	(Merck)
Hidróxido de sodio	
Acido clorhídrico	
Agua	
Glicina	(Merck)

## V.- ELECTROFORESIS

## a) Material:

Tubos de vidrio de 6x100

Parafilm

Lámpara fluorescente

Agitadores de madera

Fuente de poder de 500 volts y 125 mA

Cámara para electroforesis (Buchler)

Refrigerante Lo-temptrol-154

## b) Reactivos y soluciones:

TRIS (Tris-hidroximetil-amino-metano)

TEMED (N, N, N', N', Tetrametiletilendiamina) (Merck)

Acido clorhídrico

Acrilamida (Merck)

Bis-acrilamida (Merck)

Persulfato de amonio (Merck)

Rivoflavina (Merck)

Sacarosa

Glicina

Azul de Coomassie R-250 (Schhardt München)

Metanol (Merck)

Acido Acético (J.T. Baker)

Azul de Bromofenol (Merck)

## SOLUCION "A" (pH 8.9)

Acido clorhídrico 0.1 N

48 ml

TRIS (tris-hidroximetil-amino-metano) 36.6 g  
TEMED (N, N, N', N', tetrametiletiendiamina 0.23 ml  
Disolver el tris con el ácido clorhídrico,  
agregar el TEMED, ajustar pH con HCl y aforar  
con agua.

SOLUCION "B" (pH 6.7)

Acido clorhídrico	48.0 ml
TRIS (tris-hidroximetil-amino metano)	5.98 g
TEMED	0.46 ml
Agua	100.0 ml

SOLUCION "C"

Acrilamida	28.0 g
Bisacrilamida	0.735 g
Agua	c.b.p. 100.0 ml

SOLUCION "D"

Acrilamida	28.0 g
Bisacrilamida	2.5 g
Agua	100.0 ml

SOLUCION "E"

Rivoflavina	4.0 mg
Agua	100.0 ml

SOLUCION "F"

Sacarosa	40.0 g
Agua	100.0 ml

## Solución de trabajo I (Poros grandes)

- 1 volumen de solución B
- 2 volúmenes de solución D
- 1 volumen de solución E
- 4 volúmenes de solución F

## Solución de trabajo II

Persulfato de amonio		140 mg
Agua	c.b.p.	100 ml

La solución es estable a 4°C durante una semana

## Solución de trabajo III (Poros pequeños)

- 1 volumen de solución A
- 2 volúmenes de solución C
- 1 volumen de agua
- 4 volúmenes de solución de trabajo II

Se prepara momentos antes de emplearse y se mantiene en agitación con agitador magnético

## Solución Amortiguadora electrodo pH 8.3 (concentrado)

TRIS		6.0 g
Glicina		28.8 g
Agua	c.b.p.	100.0 ml

El pH se ajusta con HCl 0.1 N y se afora

## Solución fijadora

Acido tricloroacético	(Mallinckrod)	12.5%
-----------------------	---------------	-------

## Solución colorante

Azul brillante de Coomassie R-250 1 g

Para disolver se agita durante 30 minutos con agitador magnético, se diluye la solución 1:20 con ácido tricloroacético al 12.5% y se filtra con papel Whatman No. 42. Se prepara solo la cantidad necesaria (20 ml por gel)

#### Solución de azul de bromofenol

Azul de bromofenol 1 g

Agua c.b.p. 1000 ml

#### Solución decolorante

Acido acético 5 ml

Agua c.b.p. 100 ml

### VI.- IODINACION DE LA HORMONA LUTEINIZANTE HUMANA (hLH).

#### a) Material:

- |    |  |
|----|--|
| 10 | Tubos de vidrio de 13x100                          |
| 30 | Tubos de vidrio de 12x75                           |
| 1  | Tubo de plástico de 12x75                          |
| 2  | Pipetas serológicas de 1 ml                        |
| 2  | Pipetas serológicas de 5 ml                        |
| 2  | Pipetas serológicas de 10 ml                       |
| 2  | Micropipetas (H.E. Pedersen) de 25 $\mu$ l         |
| 1  | Micropipeta (H.E. Pedersen) de 10 $\mu$ l          |
| 1  | Micropipeta (H.E. Pedersen) de 5 $\mu$ l           |
| 1  | Micropipeta (H.E. Pedersen) de 200 $\mu$ l         |
| 4  | Tornillos de micropipetas (Succionador de pipetas) |

- |    |  |
|----|--|
| 1  | Agitador Vortex (Labline Inst. Inc.)                               |
| 1  | Contador de radiaciones gamma por centello,<br>Packard Modelo 3001 |
| 10 | Gasas  |
| 1  | Centrífuga IEC Mod PR 6  |
| 1  | Balanza Analítica (Mettler) (sensibilidad de 1 mg)                 |

b) Reactivos y soluciones:

Cloramina-T	(Merck)
Metabisulfito de Sodio	(Mallinckrodt)
Celulosa Whatman CF-11	
Hormona hLH-LER-960	
Iodo <sup>125</sup>	(Behring Institut.)
Alcohol etílico absoluto	(Merck)
Albúmina bovina (solución al 30%)	(Hyland)
Fosfato monobásico de sodio	(Merck)
Fosfato dibásico de sodio	(Merck)
Suero Normal Humano	

VII.- APLICACION DE LA TECNICA

a) Material:

200	Tubos de vidrio de 12x75
10	Tubos de vidrio de 13x100
5	Pipetas serológicas de 1 ml
5	Pipetas serológicas de 2 ml
2	Pipetas serológicas de 10 ml
2	Pipetas serológicas de 15 ml
4	Micropipetas Pasteur

- 1 Charola de hule de 34x48 cm con hielo
- 2 Gradillas de alambre 29x10 para 30 tubos c/u
- Alfucotas de receptor
- Hormona hLH marcada
- Hormona hLH ó suero problema
- 1 Agitador Vortex super mixer (Labline Inst. Inc.)
- 1 Incubadora con agitación (Dubnoff P.S.)
- 1 Centrifuga IEC-PR6
- 1 Potenciómetro (Corning modelo 7)
- 1 Balanza analítica Mettler

b) Reactivos y soluciones:

- TRIS (hidroximetil-amino-metano)
- Albúmina de suero bovino
- Cloruro de calcio
- Acido clorhídrico



### 3.- METODOS

- I.- Recolección del material biológico
- II.- Extracción y obtención de los receptores
- III.- Cuantificación de proteínas
- IV.- Purificación de Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG)
- V.- Electroforesis
- VI.- Radioiodación de la Hormona Luteinizante Humana (hLH)
- VII.- Técnicas de radioreceptor

La figura 1 corresponde a un esquema de todos los pasos de la técnica.

#### I.- Recolección del material biológico:

La recolección de los ovarios se realizó en el rastro de la ciudad, se colocaron en bolsas de plástico y se congelaron inmediatamente en hielo seco dentro de una caja de poliuretano; en el laboratorio se conservaron en congelador a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

#### II.- Extracción y obtención de los receptores:

Los receptores membranales se obtuvieron de acuerdo con el esquema de homogenización y centrifugación de B.B. Saxena et al (21) (Figura No. 2) que a continuación se describe.

- 1.- 800 a 1200 g de ovarios se depositaron en un recipiente de cristal, previamente enfriado y mantenido en hielo.
- 2.- Se disectaron los cuerpos amarillos con tijeras y bisturí y se registró su peso.
- 3.- Se homogeneizaron en 10 volúmenes de solución amortiguadora TRIS-HCL (para centrifugación) (pH 7.8) en una relación peso: volumen.
- 4.- El homogeneizado se filtró en 5 gasas superpuestas para eliminar las fracciones grandes de tejido.
- 5.- El filtrado se llevó a centrifugación a 1700 r.p.m. ( $680 \times g$ ) durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , en una centrífuga IEC Modelo PR6.
- 6.- Eliminado el precipitado, el sobrenadante se recentrifugó a 11000 r.p.m. ( $14500 \times g$ ) en centrífuga Soerval RC2-B con cabezal SS-34 de 8 plazas para tubos de 30 ml, durante 60 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

- 7.- El prècipitado de 14500 x g se diluyó 1:1 con la misma solución amortiguadora y se guardó en cuarto frío para someterse a ultracentrifugación al día siguiente. El rotor SW-25 con sus camisas, también se dejó en el cuarto frío durante toda la noche.
- 8.- Para la ultracentrifugación se hizo un gradiente discontinuo con sacarosa al 50% (10 ml), 40% (10 ml) y 30% (9 ml). El equilibrio del peso de los tubos se chechó tres veces antes de colocarlos en la centrífuga, que se ha bía enfriado previamente durante 30 minutos.
- 9.- La centrifugación se hizo a 95,000 x g durante 90 minutos en una ultracen trífuga Beckman Spinco Modelo L, con rotor SW-25 y tubos de nitrato de celulosa transparentes (2.5 x 7.5 cm).
- 10.- Las bandas obtenidas se aspiraron con jeringa de 25 ml y aguja de raquia No. 18.
- 11.- De cada banda se hicieron alícuotas de 1 ml se congelaron a -30°C.
- 12.- Las proteínas se cuantificaron en una alícuota de cada banda.

### III.- Cuantificación de Proteínas:

La determinación se realizó con la técnica de Hartree (87) que se basa en la producción de un complejo colorido que forman los grupos amino de las proteínas con los iones cobre presentes, en medio alcalino, cuyo color se intensifi ca con la presencia del reactivo de Fenol según Folín y Ciocalteau.

La cuantificación de los problemas se hizo contra una curva estandar de albúmina bovina (20 a 100 µg/ml), leídas a 500 nm, contra el blanco de reactivos.

Técnica:

Cada alícuota de 1 ml de las 7 bandas se diluyeron 1:15 con agua bidestilada y una alícuota del precipitado de 14,500 x g se diluyó 1:30; se mezclaron perfectamente con vortex y de cada una de estas soluciones se pipetearon 3 ml - que fueron repartidos en 3 tubos (1 ml de cada tubo), después se agregaron 0.9 ml de la solución A, se agitaron e incubaron en baño María a 51°C durante 10 minutos, después de lo cual se enfriaron a 4°C también durante 10 minutos, se añadió 0.1 ml de la solución B con agitación, después quedó en reposo a temperatura ambiente otros 10 minutos; finalmente se agregaron 3 ml de la solución C recién preparada y se repitieron los pasos de agitación, incubación y enfriamiento; el producto colorido se leyó en la forma ya descrita.

Este mismo método también sirvió para cuantificar la cantidad de proteínas -- contenidas en las gonadotrofinas coriónicas (hCG) purificadas en diferentes soportes cromatográficos; se pesaron 40 µg de polvo y se disolvieron en 3 ml de agua deionizada y se repartieron en 3 tubos siguiendo el mismo procedimiento.

#### IV.- Purificación de Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG):

Los métodos de extracción y purificación de proteínas se basan en el conocimiento de sus propiedades físico-químicas como son sus solubilidad, punto isoeléctrico, carga eléctrica neta, tamaño molecular, etc.

Para la purificación de la hCG se utilizaron técnicas de cromatografía de exclusión y de intercambio iónico.

Filtración en gel: es un procedimiento de exclusión molecular (88), que permite la separación de sustancias (proteínas) según su tamaño molecular; esta técnica se realiza con un soporte inerte que en nuestro procedimiento fue

Sephadex, que es un polisacárido en forma de esferas, que al estar hidratado y empaquetado en una columna, forma espacios entre las esferas y dentro de las mismas; estos espacios permiten la selección de las moléculas que son arrastradas por el eluyente (agua o solución amortiguadora), a una velocidad que depende del tamaño de las substancias retenidas por los espacios del Sephadex.

Hidratación del Sephadex: en agua bidestilada en baño María, a 40°C, durante dos horas, con agitación manual suave. Después de un reposo de 24 horas a temperatura ambiente se dejó en cuarto frío (4°C) durante otras 24 horas.

Montaje de la columna: la columna (1.5 x 15 cm) se niveló evitando la formación de burbujas de aire que pudiesen haber quedado bajo el soporte del lecho inyectando solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M, pH 7.5 con una jeringa en la salida de la columna; después de esto la suspensión de Sephadex (G-15) se deja escurrir por las paredes y cuando el gel se había sedimentado se abrió la columna para que el líquido, por arriba de la columna del gel fluyera, dejando una pequeña capa de líquido por encima de ella; después de agitar suavemente con varilla de vidrio la parte superior de la columna del gel, se continuó agregando la suspensión del Sephadex y se repitieron los mismos pasos cuantas veces fue necesario hasta obtener una columna de gel de 15 cm; la solución amortiguadora se dejó fluir a través de la columna durante 24 horas para obtener la estabilización del lecho (Sephadex hidratado y empaquetado).

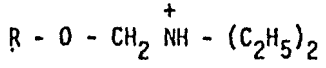
Aplicación de la muestra: la muestra de 160 mg de la hCG-Pregnyl se aplicó en un volumen de 1.5 ml de la solución amortiguadora, después de eliminar el líquido por encima de las mismas; la muestra que se dejó resbalar cuidadosamente por la pared de columna, penetró al lecho, después de lo cual, se aplicó

en la misma forma una capa eluyente (solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M, pH 7.5); la columna se conectó al recipiente del eluyente y se permitió su flujo, después de conectarla a un colector de fracciones LKB con Uvicord y graficador. Se colectaron fracciones de un ml por tubo.

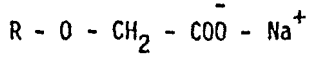
Cromatografía de intercambio iónico: es una técnica (89) de separación que - aprovecha las diferencias en las propiedades ácido-básicas de las sustancias (proteínas), con la utilización de una fase estacionaria (resina intercambiadora de iones) a la que se unen selectivamente las proteínas y una fase líquida (solución amortiguadora) que separa a su vez (por variaciones de pH o fuerza iónica) a las proteínas ya unidas a la resina.

Los dos tipos de resinas que se utilizan en este procedimiento son de tipo -- aniónico y catiónico, lo que significa que los grupos funcionales de la resina tienen estas características.

En el presente trabajo se utilizaron la DEAE-C (dietil-amino-etil-celulosa) -- que tiene como grupo funcional:



y la CM-C (carboxi-metil-celulosa) cuyo grupo funcional es:



En ambas resinas R significa la molécula de celulosa y los grupos funcionales en la ionización son:



Estas resinas requieren de un procedimiento de lavado para eliminar las impurezas y además deben activarse los grupos intercambiadores de iones.

Dicho procedimiento consiste en lo siguiente:

A 100 g de DEAE-C se agregaron 3 litros de agua y se agitó durante 15 minutos; después de una hora de sedimentación espontánea se eliminó el sobrenadante -- que contenía las pequeñas partículas.

El procedimiento se repitió cinco veces, después de lo cual se añadieron 2500 ml de ácido clorhídrico 1 M; se agitó durante 15 minutos y filtró en tela de seda. Este lavado ácido fue seguido de lavados con agua bidestilada (pH 5.8), hasta que el filtrado tuvo el mismo pH. Después se lavó con 2500 ml de hidróxido de sodio, se agitó y filtró. Finalmente la celulosa se lavó con amortiguador de bicarbonato de amonio 0.002 M, pH 7.5 hasta que se obtuvo este pH en la suspensión.

El lavado y activación de la CM-C se hizo con la misma técnica, pero se cambió el orden de las soluciones: primero hidróxido de sodio 1 M, seguido de -- agua y después el ácido clorhídrico 1 M.

El amortiguador fue en este caso acetato de amonio 0.01, pH 6.2.

Ambas resinas se conservaron a 4°C y con azida de sodio para prevenir la contaminación.

El montaje de la columna fue igual que el ya descrito para el Sephadex, pero en este caso se permitió que la columna alcanzara su equilibrio, el cual correspondió al momento en que el pH del eluyente fue igual al del amortiguador inicial que entró a la columna.

La secuencia de elución para el intercambiador catiónico (CM-C) (Columna 2.75 x 28 cm) fue la siguiente:

No. de eluyente	Nombre	Molaridad	pH	Vol.(ml)
1º	Acetato de amonio	0.004	5.5	100
2º	Acetato de amonio	1.0	6.8	100
3º	Acetato de amonio más hidróxido de sodio 0.1 N	1.0	8.6	100
4º	Hidróxido de sodio	0.1	12.0	100
5º	Agua deionizada		5.5	100
6º	Acido clorhídrico	0.1	2.5	100

Se colectaron fracciones de 5 ml por tubo.

La secuencia de elución para el intercambiador aniónico (DEAE-C) (Columna 2.75 x 28 cm) fue la siguiente:

No. de eluyente	Nombre	Molaridad	pH	Vol. (ml)
1º	Glicina	0.1	9.4	100
2º	Acetato de amonio	1.0	6.8	100
3º	Acetato de amonio	0.004	5.5	100
4º	Acido clorhídrico	0.1	2.5	100
5º	Agua deionizada		5.5	100
6º	Hidróxido de sodio	0.1	12.0	100

Las fracciones de ambas columnas fueron recogidas en volúmenes de 5 ml por tubo con un colector de fracciones y registradas a 280 nm en cuarto frío (4°C), la mayor concentración de proteínas (picos), fueron llevadas a diálisis con agua deionizada y después de 4 cambios a liofilización.

V.- Electroforesis de disco en gel poliacrilamida. (90)



La electroforesis es la técnica donde existe movimiento de partículas cargadas ó de iones macromoleculares en solución, debido a la influencia de un campo eléctrico. Dependiendo de su signo de carga, estas sustancias migran hacia el cátodo ó el ánodo; las diferencias en velocidades de migración proporcionan una técnica excelente para la separación y el análisis de sustancias que se encuentran mezcladas y que resultan de difícil separación por otros métodos.

La migración de las partículas cargadas en un campo eléctrico dependen principalmente de tres factores:

- a)- De la naturaleza de la carga y de la partícula.
- b)- De la solución amortiguadora.
- c)- Del campo eléctrico.

Cada uno de estos factores influyen en el sistema por sus propiedades: la partícula, por su tamaño, magnitud y signo de su carga neta así como también por otros parámetros moleculares, especialmente el coeficiente de fricción, la solución amortiguadora por su pH, fuerza iónica, viscosidad y ausencia de componentes que produzcan corriente alterna.

Las técnicas electroforéticas se han desarrollado en diferentes matrices, ya sean medios líquidos o geles, como la electroforesis en gel de poliacrilamida, que se utilizó en este trabajo.

Esta técnica se basa en la introducción de discontinuidades en la composición de la solución amortiguadora, pH y el tamaño del poro del gel que sirve como matriz, separando de esta manera a las moléculas por medio de un efecto de criba o tamizado, de acuerdo con el tamaño y forma de las moléculas o de la carga que presente.

### Preparación de los geles:

- 1.- Sellar con parafilm un extremo de los tubos de 10 cm x 75 mm.
- 2.- Llenar el tubo con solución de poro pequeño, hasta la altura de 60 mm.
- 3.- Estratificar el menisco con agua bidestilada con ayuda de una micropipeta.
- 4.- Polimerizar 45 minutos.
- 5.- Eliminar el agua de cada uno de los tubos.
- 6.- Lavar con solución de poro grande y escurrir.
- 7.- Agregar solución de poro grande y estratificar.
- 8.- Fotopolimerizar 20 minutos.
- 9.- Escurrir el agua y lavar con solución de poro grande.
- 10.- Poner la muestra de 100-200  $\mu\text{g}$  de proteína en polvo.
- 11.- Agregar 0.2 ml de solución de poro grande a los tubos.
- 12.- Estratificar el menisco con agua, con la ayuda de una micropipeta.
- 13.- Fotopolimerizar 20 minutos.

### Electroforesis:

- 14.- Colocar los geles en la cámara, con la muestra hacia arriba.
- 15.- Poner una o dos gotas de amortiguador electrodo en el extremo superior de los tubos de los geles, con el fin de que no haya burbujas que se pongan al paso de la corriente.
- 16.- Repartir la solución amortiguador-electrodo en los compartimientos de la cámara electroforética.
- 17.- Poner 2 ml de solución de azul de bromofenol al 0.001% en el compartimiento superior.

- 18.- Colocar la tapa de la cámara y conectar en los electrodos correspondientes, nivelar y conectar la fuente de poder; se aplica un voltaje inicial de 2 mA por tubo de gel durante 2 minutos y después se aumenta a 4 mA por tubo.
- 19.- Detener el paso de la corriente cuando el disco de bromofenol (frente de referencia), llegue a una distancia de 1 cm del extremo inferior del gel.

Fijación de proteínas:

- 20.- Colocar los geles en ácido tricloracético al 12.5%, 30 minutos.

Tinción:

- 21.- Poner los geles en 20 ml de colorante azul de Coomassie, 75 minutos.

Decoloración:

- 22.- Pasar los geles por agua y colocarlos por separado en 20 ml de ácido acético al 5%, durante 24 horas.

Montaje de Geles:

- 23.- Pasar los geles momentáneamente en formol al 2% y montar en tubos de vidrio de 10 cm x 9 mm.
- 24.- Sellar los extremos del tubo con parafilm, cuidando que no queden burbujas de aire y conservar los geles en la oscuridad.

VI.- Radioiodación de la hormona luteinizante humana (hLH).

Concepto:

Es el procedimiento para introducir átomos de Iodo radioactivo (Iodo<sup>125</sup> ó Iodo<sup>131</sup>), a la molécula de proteína en los residuos de tirosina, ya sea por métodos químicos, enzimáticos o electrolíticos (70,71,91,92), sin que modifiquen en gran medida la actividad biológica o inmunológica de dichas proteínas.

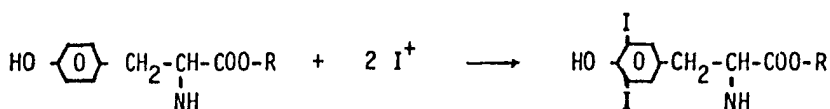
El método químico que mayor difusión ha tenido es el de la Cloroamina-T (70),

que se usa rutinariamente en este laboratorio por presentar las siguientes ventajas:

- La reacción es rápida
- Se realiza con pequeñas cantidades de reactivos y hormona
- La hormona se marca con la alta actividad específica
- Los reactivos que emplean son de fácil obtención

Tienen la desventaja de afectar la actividad biológica y la actividad inmunológica con el transcurso del tiempo.

En la Iodación el agente oxidante es el reactivo Cloramina T, (N-monocloro-p-toluen-sulfon-amida). Esta sal en solución acuosa, forma el ácido hipocloroso lo que favorece una oxidación suave del Iodo, que se ioniza ( $I-I^{(-)}-I^{(+)}$ ) y cuyo catión reacciona con los iones fenolato de los residuos de la tirosina que están expuestos en las proteínas.



La reacción es fuertemente dependiente del pH, del tiempo y de la concentración de reactantes ( $I^*$ , número de tirosinas expuestas en la molécula, etc.) y se detiene agregando un agente reductor, el metabisulfito de sodio que reduce el yodo a iodo. La mezcla de la hormona marcada y el iodo reactivo que no reaccionó se separan por medio de un intercambiador catiónico de celulosa (Whatman CF-11).

La figura 3 es un esquema de todo el procedimiento de la iodación de la hormona.

Método:

- 1.- Se pesa la cloramina (15 mg) y se disuelve en 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.5 (Solución A).

- 2.- Se pesa metabisulfito de sodio 15 mg y se disuelven 1.5 ml de la misma solución amortiguadora (Solución B).
- 3.- El Iodo<sup>125</sup> se diluye con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 7.5 (Solución C).
- 4.- En un tubo de vidrio de 13 x 100 se empaca 1.5 ml de celulosa Whatman CF-11, que se equilibra con la solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.5.
- 5.- Se pipetea 15 µl de la solución A, 15 µl de la solución B y 10 µl de la solución C y las tres micropipetas se depositan sobre un cuadro de alambre incurvado adecuadamente para no permitir el movimiento de las propipetas.
- 6.- Se saca del congelador, una alcuota de hLH, la cual contiene 2.5 µg de proteína en 25 µl de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.5, a la cual se le agregan los 10 µl de la solución C más 15 µl de solución A, esta mezcla se agita durante 60 segundos.
- 7.- Transcurrido ese tiempo se agregan los 15 µl de metabisulfito de sodio y se agita durante 30 segundos.
- 8.- Esta mezcla se aplica a la columna de celulosa y se eluye con 5 ml de solución amortiguadora. Este proceso se repite 6 veces, cambiando en cada caso los tubos de 13 x 100 mm bajo la columna, en que se recoge cada fracción. Estos 30 ml contienen el Iodo<sup>125</sup> libre, que no se incorporó a la proteína.
- 9.- El séptimo tubo, que es ahora de 12 x 75 mm, colecta la elución de 1 ml de suero normal humano, que se aplica a la columna, con lo cual se libera la hormona marcada. Esta operación se repite 6 veces, de tal modo que los tubos 7, 8, 9, 10, 11 y 12 contienen la hormona marcada.

10.- Se toman alícuotas de 0.1 ml de cada tubo, se determinan sus cpm (cuentas por minuto) y se suman para obtener los cpm totales.

+	c.p.m.	-	*I Libre
	c.p.m.	-	*H (Hormona marcada)
	c.p.m.	-	Totales

11.- El porcentaje de I\* incorporado a la hormona (6 % de eficiencia), se calcula con la relación de las cuentas de la hormona marcada y las cuentas totales.

$$\begin{aligned} &\% \text{ de I* incorporado} \\ &\text{a la hormona} = \frac{\text{c.p.m. *Hormona}}{\text{c.p.m. Totales}} \times 100 \end{aligned}$$

Se acepta como un buen marcaje cuando se tiene un porcentaje de incorporación de I\* mayor del 35%.

12.- Se procede a calcular a la actividad específica (relación de la radioactividad a la masa) de la hormona marcada lo que se hace con la relación del porcentaje obtenido, multiplicando por la radioactividad utilizada, dividido entre las cantidades de proteína (hormona) empleada.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\% \text{ de eficiencia} \times \text{mCi}}{\mu\text{g de proteína}}$$

Se considera que la actividad específica es adecuada cuando es mayor de 140  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

13.- Se grafican las cuentas de los tubos para detectar las fracciones más útiles de la hormona marcada, que generalmente corresponden a los tubos 7, 8, 9 que contienen la mayor radioactividad.

14.- Un tercer parámetro que hay que calcular es el porcentaje de proteína dañada en la marcación, para lo cual se utiliza una precipitación etanólica en la forma siguiente:

Se seleccionan los tubos con mayor número de cuentas por minuto del pico de la hormona marcada y se pipetea de cada uno de ellos 5 µl en tubos de 12 x 75 mm, por duplicado.

15.- Se les agrega a cada uno 100 µl de solución amortiguadora de fosfato al 0.01 M, pH 7.5 que contiene cloruro de sodio 0.15 M, y albúmina de suero bovino (B.S.A.) al 1%, más 1.5 ml de etanol absoluto; se agitan los tubos y se pasan a cuarto frío (4°C) durante 2 horas.

16.- Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugan a 2000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada (IEC-PR6).

17.- Se decantan cuidadosamente en tubos de 12 x 75 mm y se llevan a contar tanto el precipitado como el sobrenadante.

18.- Se saca el número de cuentas totales (c.p.m. del precipitado + c.p.m. del sobrenadante) y se hace una relación del % que representan, las c.p.m. del precipitado con relación a las cuentas totales esto es el % de proteína radioiodada.

19.- Una iodación es adecuada cuando la proteína marcada no dañada es mayor del 92%, ó la proteína dañada no excede el 8%.

VII- Técnica de radio-receptor:

Control del procedimiento:

A continuación se da el nombre, clave y contenido de los diferentes tubos que se utilizaron en la técnica:

1- Tubos control de cuentas totales (CCT) (Cuadruplicado): 600 µl de solución

amortiguadora más 100  $\mu$ l de hormona marcada (H\*). Sirven para conocer la radioactividad total por tubo y para medir la precisión del pipeteo.

- 2- Tubos de control de reacción no específica por cuadruplicado (N.S.): Son aquellos tubos que contienen 400  $\mu$ l de solución amortiguadora de TRIS-HCL pH 7.2 más 100  $\mu$ l de hormona marcada (H\*) más 100  $\mu$ l de precipitado de 14,500 x g más hormona fría en una concentración en ng 10,000 veces mayor que la de la H\*. Se supone que en estas condiciones la hormona marcada tiene escasas o ningunas oportunidades de unirse al receptor, puesto que el exceso de la hormona fría se lo impide.

Sus cuentas se restan a las totales y a los de la fracción unida.

Se considera que el NS corresponde a hormona marcada o I\* libre que quedó atrapado pero no unido al receptor o que quedaron absorbidos, a la pared del tubo.

- 3- Tubos de control de la radioactividad que absorben los tubos (RAT) (cuadruplicado): Llevan 600  $\mu$ l de solución amortiguadora más 100  $\mu$ l de hormona marcada (H\*) y sirven de control para la radioactividad total; se aspiran cuidadosamente, se cuentan de nuevo y se mantienen durante todo el procedimiento.
- 4- Tubos control 100% de unión (cuadruplicado): 500  $\mu$ l de solución amortiguadora más 100  $\mu$ l de receptor más 100  $\mu$ l de hormona marcada (H\*). La hormona fría está ausente. Aquí el receptor tiene su máxima unión con la hormona marcada (H\*).



- 5- Tubos para la curva estándar (triplicados): tubos con 400 µl de solución amortiguadora más 100 µl de hormona marcada (H\*) más 100 µl de receptor y 100 µl de solución de hormona fría con concentraciones que van de 1 ng a 3,000 ng de proteína. Este rango osciló alrededor de estas cifras, dependiendo de la concentración de proteína por mg de polvo que se ensaya.
  
- 6- Los tubos problema de sueros: tubos con 1 ml de suero que se diluyen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, por triplicado: 100 µl del suero original o diluido más 100 µl de hormona marcada (H\*) más 100 µl de receptor más 400 µl de solución amortiguadora.
  
- 7- Los tubos con polvo problemas: se pesan 100 µg y se diluye con solución amortiguadora 100 µl: 1:2, 1:4, 1:8, por triplicado.

Método

La secuencia de la técnica es la siguiente:

- En una charola de plástico de 33 x 38 cm se meten 2 gradillas de alambre con tubos numerados y a un lado el recipiente con la solución amortiguadora de TRIS-HCL; pH 7.2.
  
- Se procede a pipetear en el siguiente orden:  
  
Primero la solución amortiguadora de TRIS-HCL; después la hormona fría, y en seguida la hormona marcada y finalmente el receptor.  
  
El volumen final es de 700 µl por tubo (Tabla No. 3).

#### 4.- RESULTADOS

- I. Recolección y almacenamiento de los ovarios
- II. Obtención de los receptores
- III. Cuantificación de los receptores
- IV. Purificación de la hCG
- V. Electroforesis de la hCG
- VI. Radioiodación de la hLH
- VII. Técnica de radio-receptor

### Recolección y almacenamiento de los ovarios.

El método seguido resultó adecuado y confiable puesto que no fueron detectadas deficiencias o anomalías en el material biológico trabajado, hasta por períodos de 6 meses.

### Obtención de los receptores.

De la centrifugación diferencial se obtuvo un precipitado de 14500 x g (P<sub>2</sub>) mismo que fue ensayado como posible receptor en la técnica.

En la ultracentrifugación de 95000 x g del gradiente discontinuo se obtuvieron 6 bandas, las cuales fueron localizadas en las zonas de 30% y 40% de sacarosa y una banda muy viscosa (al parecer de sacarosa), en la zona 50%, la cual fue denominada banda 7.

### Cuantificación de proteínas de los receptores.

La cuantificación de las proteínas de las 7 bandas del gradiente discontinuo de 95000 x g así como el precipitado de 14500 x g se dan en la tabla 1 y en la gráfica No. 1.

TABLA 1

no. de banda	Número de muestras	µg proteína/ml
1	3	900
2	3	1,300
3	3	920
4	3	1,952
5	3	790
6	3	1,568
7	3	46
precipitado 14500 x g (P <sub>2</sub> )	6	12,416

El índice de precisión de la técnica de Hartree tuvo un coeficiente de variación de 4.6.

#### IV. Purificación de la hCG.

La hCG se intentó purificar por simple gel filtración en Sephadex G-15, el patrón cromatográfico se da en la gráfica No. 2, los picos I y II se llevan a liofilización y determinación de proteínas.

En la cromatografía de intercambio catiónico se obtuvieron 3 fracciones (ver gráfica No. 3) que se denominaron: hCG-CM-1,2 y 3. En la tabla 2, se dan los promedios y el contenido de proteínas de cada uno de los polvos:.

TABLA 2

Polvo (clave)	Rendimiento (mg)	Muestra 240 mg µg proteínas/mg
hCG-CM-1	25	90
hCG-CM-2	15	315
hCG-CM-3	36	67.5

De la cromatografía de intercambio aniónico se obtuvieron 4 fracciones (ver gráfica 4), que se denominaron hCG-DEAE-1,2,3 y 4; en la tabla 3, se dan los rendimientos y los contenidos de proteínas para cada polvo.

TABLA 3

Polvo (clave)	Rendimiento (mg)	Muestra: 400 $\mu$ g $\mu$ g protefnas/mg
hCG-DEAE-1	3.3	628
hCG-DEAE-2	9.5	262
hCG-DEAE-3	8.8	525
hCG-DEAE-4	71	360

#### V. Electroforesis.

La figura 4 muestra los patrones electroforéticos de hCG original (Pregnyl-40) y los de sus fracciones separadas por cromatografía de intercambio aniónico (hCG-1,2,3 y 4).

La banda de menor movilidad, con un Rf aproximado de 0.250 y presente en todos los geles, pero con diferente intensidad, corresponde a la hormona útil y que en la fracción hCG-DEAE-3 demostró ser la más activa en el sistema de radio-receptor aquí utilizado.

Las otras bandas de mayor movilidad con Rfs entre 0.357 a 0.776 tienen poca o ninguna actividad, puesto que cuando estuvieron presentes en mayor proporción (hCG-Pregnyl-40 y hCG-DEAE-2) no fueron capaces de desplazar en el sistema a la LH marcada.

#### VI. Radioiodación de la hLH.

En la gráfica No. 5 se puede observar el marcaje de una hormona hLH LER-960 estándar con  $^{125}$ I por método de la Cloramina-T con 63.9% de incorporación de  $I^*$ , y una actividad específica de 319.5 y un % de hormona dañada de 1.8%. Otras marcaciones del estándar LER-960 tuvieron una in--

corporación de 40 a 50%, con actividades específicas de 200 a 250% y con 2 a 7% de hormona dañada.

## VII. Técnica del radio-receptor.

Con la metodología ya señalada se estudió el tiempo de incubación de la técnica; las condiciones de los tres componentes del sistema: hormona marcada (dañada) fría (fracciones) y receptor (purificado y crudo); la implementación de la técnica y su aplicación a la cuantificación de LH en sueros humanos.

- El tiempo de incubación óptimo se estudió manteniendo constantes el pH y la temperatura señalados en la literatura (21).
- La necesidad de contar con una hormona no dañada con el marcaje se demostró a través de todos los experimentos y en particular, con una hormona dañada.
- La eficiencia del receptor se estudió tanto en el purificado, como en el crudo buscando la concentración adecuada de proteína del mismo, titulándola con cantidades crecientes de radioactividad.
- Como hormona fría se utilizaron las diferentes fracciones de una hCG comercial obtenida con dos procedimientos de purificación: gel-filtración (Sephadex G-15) y cromatografía de intercambio iónico (CM-celulosa y DEAE-celulosa).
- La estandarización de la técnica comprendió la reproducibilidad, la sensibilidad y la especificidad.
- Su aplicación a la clínica se demostró con la cuantificación de los niveles de LH en los sueros de mujeres de diferentes edades.

Los resultados de la fase de estudio se señalan a continuación:

En la tabla 4 se demuestra que la hLH se une al receptor y se estudia el primer parámetro que fue el tiempo de incubación con condiciones de pH y de temperatura según la mencionada técnica de Saxena.

TABLA 4

Titulación del tiempo de incubación con cantidades constantes del precipitado de 14,500 x g (P<sub>2</sub>) (105 µg prot/100 µl); la temperatura de incubación a 37°C.

Control de cuentas totales = 558,569 cpm

Tiempo de incubación (minutos)	Prom. cpm unidas (triplicados)	% $\frac{\text{prom. cpm unidas}}{\text{prom. cpm totales}}$
10	21,369	3.82
20	25,743	4.61
30	27,497	4.92
40	28,605	5.12
50	28,366	5.08
60	29,690	5.32
70	29,922	5.36
80	28,606	5.12
90	30,463	5.45
100	31,031	5.56

Se observa que conforme aumenta el tiempo de incubación, el porcentaje de la relación de la fracción unida a la total aumenta progresivamente. Cuando estos datos se grafican se obtiene una curva de tipo hiperbólico (gráfica No. 6), de la cual, se seleccionó el tiempo de 30 min para la incubación.

En la tabla 5 y gráfica 7 se presentan los resultados obtenidos con una hormona luteinizante LH-LER-960 con un % de daño muy grande (18.07), a diferentes concentraciones de receptor.

TABLA 5

Unión de la hormona luteinizante LER-960 dañada (18.07%), a cantidades progresivamente crecientes de receptor de cpm unidas/cpm totales.

Control de cuentas totales = 95,790 cpm

Receptor = precipitado 14,500 x g (P<sub>2</sub>)

Concentración de receptor ( $\mu\text{g}$ prot. en 100 $\mu\text{l}$ )	Promedio de cpm de la hormona unida	$\frac{\% \text{ cpm unida}}{\text{cpm totales}}$
19.4	11,475	11.98
38.8	12,389	12.94
77.6	11,221	11.72
155.2	10,927	11.46
310.4	11,001	11.49
602.8	11,626	12.14

Es evidente que a muy diferentes concentraciones de receptor una hormona dañada no se une al receptor. La uniformidad de los resultados sugiere que la radioactividad presente puede corresponder a la absorbida en las paredes de los tubos y a la atrapada en la proteína.

Que corresponde a lo primero se demuestra en el siguiente experimento en el que se observa la receptividad de una de las bandas de 95,000 g con una hormona marcada con poco porcentaje de daño.

Los resultados de la titulación del % de receptividad de las 6 bandas de 95,000 x g se dan en la tabla 6 y se ilustran en la gráfica 8, en las que se comparan el contenido en proteínas por ml de dichas bandas.



TABLA 6

Titulación del % de receptividad de las 6 bandas de 95,000 x g

No. Banda	µg prot/100 µl de receptor (dilución 1:2)	C.C.T.	Prom de cpm unidos	% $\frac{\text{receptividad prom cpm unido}}{\text{prom cpm total}}$
1	125	428,393	46,116	10.76
2	162	428,393	31,111	7.26
3	115	222,117	11,113	5.0
4	120.0	124,215	118,398	95.3
5	86	222,117	12,990	5.95
6	18.7	279,881	40,343	14.41

Estos resultados se obtuvieron en diferentes experimentos y a pesar de que no se utilizó la misma cantidad de radioactividad para cada banda, se puede concluir que la banda 4, que además es la más rica en proteínas, tiene la mayor receptividad que fue de 95.3%.

Sabido que la banda número 4 es la fracción "receptor", el siguiente paso fue conocer la cantidad óptima del receptor capaz de unir un buen porcentaje de cpm totales.

Los resultados de la titulación se dan en la tabla 7 y se presentan en la gráfica No. 9.

TABLA 7

Titulación de la cantidad óptima en proteína de receptor (B4)  
para unir una concentración constante de la hormona.

Control de cuentas totales = 124,215

Concentración de receptor ug prot/100 $\mu$ l	promedio cpm unidos	receptividad % $\frac{\text{prom cpm unidos}}{\text{prom cpm totales}}$
3.05	75,190	60.53
6.1	71,963	57.93
12.2	82,040	66.09
24.4	119,040	95.83
48.8	126,699	102.0
97.6	118,398	95.3

Los resultados de la tabla y los de la gráfica muestran que la concentración adecuada de proteína es la de 48.8  $\mu$ g prot/100  $\mu$ l que dió una receptividad de 102%.

La titulación del precipitado de 14,500 x g se estudió poniendo cantidades crecientes de  $\mu$ g de prot. de receptor a una cantidad constante de hormona marcada.

Los resultados se ven las tablas 8a, 8b y gráficas 10a y 10b.

TABLA 8a

Curva de saturación de los sitios receptores de P<sub>2</sub> (14,500 x g)

Control de cuentas totales = 149,260

Concentración de receptor (µg)	promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm unidos}}{\text{cpm totales}}$
1245.6	12,018	8.05
2491.2	14,092	9.44
3736.8	16,082	10.77
4982.4	16,134	10.80
6268.0	18,115	12.14

TABLA 8b

Control de cuentas totales = 76,518 cpm

1245.6	6,408	8.37 .
2491.2	7,858	10.27
3736.8	8,683	11.29
4982.4	8,792	11.49
6228	9,743	12.73

Los resultados que se observan en las tablas y sus correspondientes gráficas muestran una respuesta lineal, lo que significa que los sitios receptores no se han saturado y que deben cambiarse las condiciones de experimento: aumentando la radioactividad y diluyendo el receptor.

Para poder titular la cantidad de hormona marcada que alcanza a saturar los sitios receptores de este precipitado, se pusieron cantidades crecientes de radioactividad a diluciones seriadas de receptor; los resultados se expresan en la tabla 9 y en la gráfica No. 11.

TABLA 9

Titulación de los sitios receptores del precipitado de 14,500 x g  
con cantidades crecientes de radioactividad

C.C.T.=	11,005	23,010	47,640	95,740	210,495	437,620
Concentración de receptor $\mu\text{g}$ en 100 $\mu\text{l}$						
77.85 (1:16)	1,221	2,555	5,326	11,221	18,623	16,928
155.7 (1:8)	1,543	2,540	5,800	10,976	18,993	21,502
311.4 (1:4)	1,255	2,390	6,278	11,001	20,707	20,215
622.8 (1:2)	1,516	2,980	6,204	11,626	25,507	27,215

La tabla y la gráfica demuestran: que con 200,000 cpm se saturan los si  
tios de unión del receptor en concentración tan alta como la de 622  $\mu\text{g}/$   
100  $\mu\text{l}$  pero no da información de la concentración máxima de receptor sa-  
turable con dicha radioactividad.

Estudio HCG. Una vez establecidos los parámetros más adecuados para la  
metodología, tanto en la banda No. 4, como en el precipitado de 14,500  
x g, se estudiaron las diferentes gonadotrofinas coriónicas purificadas  
en distintos soportes cromatográficos, para conocer su capacidad de com  
petencia con la \*LH, por el sitio receptor del precipitado de 14,500 x g.

En la tabla No. 10 se dan los resultados de la competencia entre la hCG  
purificada en Sephadex G-15 -pico I y la hormona \*LH-LER-960 por el re-  
ceptor precipitado de 14,500 x g, los cuales se ilustran en la gráfica  
No. 12.

TABLA 10

Curva de desplazamiento de la \*hLH-LER-960 por hCG-Sephadex G-15-I

Receptor (P<sub>2</sub>): 622.8 ug prot/100 μl

C.C.T. = 134,617 cpm

100% = 13,026 cpm

N.S. = 5,640 cpm

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidas	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$
10.9	12,919	98.55
21.9	12,850	97.61
43.7	11,843	83.98
85.5	11,238	75.79
350	9,186	48.00
1,400	10,441	65.00
5,600	8,963	44.99

En la gráfica se puede observar que la \*hLH-LER-960 es desplazada por la hCG-Sephadex I, a pesar de que los puntos no dan una recta bien definida.

La fracción II del Sephadex no se estudió por tener una baja concentración de proteínas. Las tres fracciones de hCG obtenidas por la cromatografía de intercambio catiónico Carboximetil Celulosa denominadas hCG-CM-1, hCG-CM-2 y hCG-CM-3 se ensayaron con curvas de desplazamiento en el mismo sistema. Los resultados se dan en las tablas No. 11 a, 11 b, 11 c y en la gráfica No. 13.

TABLA 11 a

Curva de desplazamiento de la \*hLH-LER-960 por hCG-CM-1

1. Receptor (P<sub>2</sub>): 622.8 µg prt/100 µl
2. C.C.T. = 350,216 cpm
3. 100% = 19,828 cpm
4. N.S. = 12,523 cpm

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$
2.8	20,673	111.56
5.6	20,739	112.47
11.25	24,968	170.36
11.5	23,993	157.05
45	18,967	87.87
90	22,916	142.27

TABLA 11 b

Curva de desplazamiento de la \*hLH-LER-960 por hCG-CM-2

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$
6.75	19,710	98.38
12.3	21,877	128.05
24.6	18,190	77.57
49.2	19,604	96.93
98.4	16,836	59.04
196	17,591	69.38
393	17,843	72.83
787	17,643	70.09

TABLA 11 c

Curva de desplazamiento de la \*hLH-LER-960 por hCG-CM-3

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$
2.64	19,652	97.59
5.27	19,267	92.32
10.5	18,588	83.02
21.1	17,213	65.56
42.2	15,413	39.56
84.4	15,907	46.32
168.7	14,644	29.03

De la gráfica 13 se puede concluir que la hCG-CM-3 es la única fracción que desplazó a la \*H y que tuvo una muy buena sensibilidad hasta 1.6 ng.

De la cromatografía de intercambio aniónico dietilaminoetil celulosa se obtuvieron 4 fracciones, las cuales se ensayaron en la curva de desplazamiento de la \*LH. Los resultados de las dos primeras fracciones --- (hCG-DEAE-1 y 2), se dan en las tablas No. 12 a, 12 b y en la gráfica No. 14.

TABLA 12 a

Curva de desplazamiento de la \*hLH (LER-960) con HCG-DEAE-1

1. Receptor (P<sub>2</sub>): 622.8 µg prot/100 µl
2. C.C.T. = 194,185 cpm
3. 100% = 26,330 cpm
4. N.S. = 4,995 cpm

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$
6.7	20,711	73.66
13.4	13,224	38.57
26.7	11,962	32.65
53.5	7,807	13.18
107	6,497	7.04
315	7,417	11.35

TABLA 12 b

Curva de desplazamiento de la \*hLH-(LER-960) con HCG-DEAE-2

1. Receptor (P<sub>2</sub>): 622.8 µg prot/100 µl
2. C.C.T. = 194,185 cpm
3. 100% = 26,330 cpm
4. N.S. = 17,435 cpm

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$
4.1	21,480	45.57
8.2	23,622	65.54
16.4	21,431	44.92
33	22,541	47.40
65	23,122	63.93
131	24,239	76.49
262	23,046	63.08
524	25,659	92.45



En la gráfica No. 14 se observa que la hCG-DEAE-1, es la fracción que desplaza y tiene una sensibilidad en este caso de 6.7 ng.

Los resultados de las fracciones 3 y 4 se dan en las tablas No. 13 a, 13 b y en la gráfica No. 15.

TABLA 13 a

Curva de desplazamiento de la \*hLH-LER-960 por hCG-DEAE-3

1. Receptor ( $P_2$ ): 622.8  $\mu\text{g prot}/100 \mu\text{l}$
2. C.C.T. = 268,067 cpm
3. 100% = 25,235 cpm
4. N.S. = 4,134 cpm

Concentración en ng de la hormona fría	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$
33.6	21,620	82.86
67.2	20,695	78.48
134.3	19,195	71.38
268.7	15,008	51.53
537.0	11,664	35.68
1075.0	7,857	17.64
3150.0	6,590	11.64
6300.0	5,952	8.16
12600.0	4,987	4.04

TABLA 13 b

Curva de desplazamiento de la \*hLH-LER-960 por hCG-DEAE-4

1. Receptor (P<sub>2</sub>): 622.8 µg prot/100 µl
2. C.C.T. = 268,067 cpm
3. 100% = 25,235 cpm
4. N.S. = 13,679 cpm

Concentración en ng de la hormona fría	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$
50.5	24,873	96.87
101.0	24,100	90.18
202.5	24,365	92.47
405.0	23,235	82.69
810.0	19,889	53.73
1620.0	19,500	50.37
3240.0	14,997	11.40

En la gráfica No. 15 se observa que ambas fracciones de la DEAE-III y IV tienen desplazamiento pero la potencia de la hCG-DEAE-III es mayor y tiene linealidad desde 30 hasta los 12,600 ng en este caso.

Para estudiar la reproducibilidad del desplazamiento de las fracciones hCG-DEAE-1 y hCG-DEAE-3 se ensayaron ambas en otros experimentos, cuyos resultados se muestran en las tablas 14 a, 14 b y en la gráfica No. 16.

TABLA 14 a

Curva de desplazamiento de la hLH (\*LER-960) por hCG-DEAE-1

1. Receptor (P<sub>2</sub>): 622.8 µg prot/100 µl
2. C.C.T. = 294,992 cpm
3. 100% = 10,914 cpm
4. N.S. = 6,104 cpm

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidos	% cpm U-cpm N.S. cpm T-cpm N.S.
6.7	9,463	69.84
13.4	8,497	49.75
26.3	8,519	50.21
53.6	8,912	58.38
107.2	7,111	20.94
216.4	7,432	27.61
857.6	7,305	24.97
1715.2	6,554	9.36

TABLA 14 b

Curva de desplazamiento de la hLH (\*LER-960) por hCG-DEAE-3

1. Receptor (P<sub>2</sub>): 622.8 µg prot/100 µl
2. C.C.T. = 294,992 cpm
3. 100% = 10,914 cpm
4. N.S. = 5,987 cpm

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidos	% cpm U-cpm N.S. cpm T-cpm N.S.
12.3	9,952	80.42
24.6	9,782	77.02
49.2	9,773	76.84
98.4	9,438	70.04
196.8	9,083	62.83
393.7	8,275	46.44
787.5	7,144	23.48
1575.0	6,668	13.82

Aunque se conserva la tendencia a la linealidad, no se obtuvo la reproducibilidad esperada, que sí estuvo presente en subsecuentes experimentos.

De la gráfica 16 se puede observar que aunque la hCG-DEAE-1 es más potente, presenta una mayor heterogeneidad en las respuestas y que tal vez, requiera de otros pasos de purificación.

Para la hCG-DEAE-3 se observa que es más reproducible, tiene mejor linealidad y que en este experimento mostró una sensibilidad de 12.3 ng. La tabla 15 y la gráfica 17 demuestran que la técnica es sensible hasta para 3.05 ng por ml.

TABLA 15

Curva estándar de la hCG-DEAE-3 LH-\*LER-960 y  
cuantificación de los diferentes sueros problemas \*

1. Receptor (P<sub>2</sub>): 622.8 µg prot/100 µl
2. C.C.T. = 291,237 cpm
3. 100% = 39,401 cpm
4. N.S. = 20,380 cpm

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm}}{\text{cpm T-cpm}}$ $\frac{\text{N.S.}}{\text{N.S.}}$
3.05	38,237	93.88
6.1	35,915	81.67
12.3	35,493	79.45
24.6	34,748	75.54
49.2	31,713	59.58
98.4	32,864	65.63
196.8	28,108	40.63
395.7	25,669	27.81
787.0	27,238	36.05
3150.0	23,095	14.27

Que la técnica es útil para problemas clínicos, se demuestra con los datos de la tabla 16 en la que son evidentes las diferencias de los niveles de LH en los sueros de mujeres a diferentes edades. Estos mismos datos están contenidos en la gráfica 17.

TABLA 17

Suero problema (dilución)	Promedio cpm unidos	% $\frac{\text{cpm U-cpm N.S.}}{\text{cpm T-cpm N.S.}}$	Factor de dilución	Concentración en ng x ml
Post-menopáusica (1:4)	32,767	65.12	X4	212
(1:8)	34,798	75.80	X8	208
Mujer normal (1:2)	35,401	78.97	X2	36
Niña (1:2)	35,753	84.82	X2	19

Finalmente el siguiente experimento consistió en cuantificar la actividad biológica de polvos denominados SPM-CM-2 y SPM-CM-3 purificados con intercambiador catiónico.

Los resultados se dan en la tabla No. 17 y en la gráfica No. 18.

TABLA 17

Curva de desplazamiento en el sistema estudiado

1. Receptor: 622.8  $\mu\text{g prot}/100 \mu\text{l}$
2. C.C.T. = 135.225 c.p.m.
3. 100 % = 10.176 c.p.m.
4. N.S. = 5.982 c.p.m.

Concentración en ng de hormona fría	Promedio cpm unido	$\frac{\text{cpm U} - \text{cpm N.S.}}{\text{cpm T} - \text{cpm N.S.}}$
3.8	10,113	90.23
7.7	9,843	84.34
15.3	9,471	76.21
30.7	9,214	70.59
123.0	9,259	71.58
246.0	8,950	64.83
442.0	7,986	43.77
984.0	7,585	35.01
1968.0	7,159	25.70
3937.0	7,022	22.71

Los polvos SPM-CM-2 y 3 se ensayaron en dosis de 1262  $\mu\text{g}$  a 19,72  $\mu\text{g}$  de diluciones seriadas, para el primer polvo y de 1,12  $\mu\text{g}$  a 17.37  $\mu\text{g}$ , sin observarse desplazamiento aparente en la curva estandar (ver gráfica No. 18).

Con lo observado en la gráfica, se demuestra que el sistema empleado sigue siendo reproducible y que es aplicable a la cuantificación de polvos problema que se purifican en este laboratorio.

## 5- DISCUSION DE RESULTADOS

- I. Recolección y almacenamiento de los ovarios
- II. Obtención de los receptores
- III. Cuantificación de los receptores
- IV. Purificación de la hCG
- V. Electroforesis de la hCG
- VI. Radioiodación de la hLH
- VII. Técnica de radio-receptor

En el presente trabajo se estudiaron las condiciones que se requieren en el sistema de radioreceptor de hCG y hLH a virtud de la importancia de su cuantificación en estados fisiológicos normales, así como, en alteraciones clínicas en que estas hormonas se producen. Ya que este método es capaz de sustituir con amplias ventajas al bioensayo cualitativo de la hiperhemia ovárica (3) y a los inmunoensayos tradicionales.

A continuación se analizan los resultados de cada una de las técnicas empleadas para el desarrollo de la cuantificación de hCG por radioreceptor.

#### I- Recolección y almacenamiento del tejido.

El método que se siguió para la recolección, almacenamiento y posterior conservación del tejido ovárico, es adecuado y confiable ya que en las alícuotas de receptores, utilizadas hasta seis meses después de procesadas, no se detectó pérdida sustancial en su capacidad de reconocimiento a la hormona lo que está de acuerdo con lo reportado por Saxena (21), Richards (25) y Scaglia (80).

#### II- Obtención de los receptores.

Del esquema de centrifugación diferencial reportado por Saxena (21), el cual se tomó como base para la obtención de los receptores, se encontró que la banda número 4 es la que corresponde a la fracción membranosa con mayor concentración de receptores, que se comprueba con el subsiguiente estudio de cuantificación de proteínas y efecto de receptividad mostrado hacia la hLH marcada. Este dato no está reportado en la literatura consultada.

Este mismo estudio se realizó para una fracción de membranas con mayor contaminación como lo es el precipitado de  $14,500 \times g$  ( $P_2$ ) el cual presentó de acuerdo



a lo esperado un porcentaje de receptividad menor que la banda 4, (esto se discute en la parte de estudio de la técnica). Dicho  $P_2$  tiene la ventaja de obtenerse más fácilmente por lo que su aplicación en laboratorios de rutina resultaría práctica. Como subsecuentes estudios a realizar, se propone el calificar la pureza de las fracciones bajo el criterio de la microscopía electrónica, para establecer de manera definitiva el tipo y cantidad de contaminantes posible.

### III- Cuantificación de proteínas.

La técnica de Lowry-Hartree (87) que se utilizó para la cuantificación de proteínas de las bandas de la centrifugación de tejido ovárico y las diferentes fracciones de hCG purificadas, demostró ser altamente reproducible y confiable a través del tiempo en que se utilizó como prueba de rutina en este laboratorio.

### IV- Purificación de la hCG.

El perfil de elución cromatográfico de la hCG por gel filtración en Sephadex G-15 (cuyo límite de exclusión es de 1,500 de P.M.) resultó el esperado, ya que la proteína eluyó en el pico I (hCG-Seph-I) dentro del volumen externo de la columna (4.5 ml), el cual, salió perfectamente separado del segundo pico (hCG-Seph-II) en el que teóricamente se retuvieron moléculas de menor P.M., posiblemente conservadores, sales, o algunos fragmentos pequeños de proteínas. La ausencia de linealidad en la respuesta que presentó esta fracción al intentar desplazar la hLH marcada unida al receptor, posiblemente se debe a la presencia de moléculas contaminantes que de alguna manera afectaron esta capacidad. Este efecto sugirió el empleo de otros métodos de purificación.

El patrón cromatográfico obtenido de la purificación de la hCG por carboxi-metil celulosa no fue el esperado, ya que, la fracción activa hCG-CM-3 (pico 4, ver gráfi-

ca No. 3) eluyó al final de la secuencia de amortiguadores, comportándose como una molécula con alta afinidad por la matriz negativa. Según Saxena (2) su pI es de 4.5 por lo tanto, al disolverse en el primer eluyente de pH 5.5 la carga neta de esta proteína debió ser ligeramente negativa y por lo tanto, no fijarse a la resina, sin embargo, las 2 primeras fracciones que eluyeron hCG-CM-1 (pico 1) y hCG-CM-2 (pico 2) no mostraron competencia con la hLH radioiodada en la técnica. Graesslin (11) reporta que una hCG desialilataada tiene un pI de 9.5. Una hCG con estas características se supone que exhibiría un comportamiento similar a la nuestra, al someterse a la acción de este intercambiador. No podemos descartar que posibles cambios en la estructura terciaria de esta proteína modificaron su pI.

El perfil de elución en DEAE-celulosa mostró aspectos interesantes que deben analizarse:

La fracción importante no salió al pH esperado ( pH ácido 3 a 4.5 ). Al pH más ácido (2.5) eluyó una fracción con poca actividad (hCG-DEAE-4). La fracción obtenida a pH de 9.5 (hCG-DEAE-1) mostró la mayor capacidad de desplazamiento en el sistema de radioreceptor. La hCG-DEAE-3 (eluyó a pH 6.8) mostró una capacidad de desplazamiento ligeramente menor que la anterior aunque mayor linealidad en el sistema. El patrón cromatográfico fue reproducible, lo que valida las anteriores observaciones. De este análisis se concluyó que la fracción útil que debía aplicarse a la técnica era la hCG-DEAE-3 que presenta características similares a la fracción purificada por Mori (7). Lo anterior condujo a pensar en la existencia de heterogeneidad estructural en la hCG lo que se demostró al hacer el estudio electroforético. Mayor información sobre la posible heterogeneidad de la hCG se puede obtener por estudios de P.M. con técnicas analíticas en gel filtración (sephadex G-100), o en sistemas electroforéticos con S.D.S. (sodio-dodecil-sulfato) y deter

minación del pI por técnicas de isoelectroenfoque.

#### V- Electroforesis.

La hCG comercial exhibió 2 bandas, la más catódica ( $R_f = 0.22$ ) parece corresponder a la nativa como lo han reportado Mori (7), Canfield (9) y Donini (18).

Durante el proceso de purificación, los diferentes productos que se obtuvieron de la DEAE celulosa mostraron diversas bandas (ver Gráf. No. 4). La hCG-DEAE-1 y DEAE-3 tuvieron en común en sus electroforetogramas una banda con valores de  $R_f$  cercanos, intensamente teñida que no se encontró en la fracción incapaz de unirse al receptor (hCG-DEAE-2). En la hCG-DEAE-4 debió encontrarse presente en muy baja concentración. La proporción de proteína en la banda de estos tres patrones está de acuerdo con la capacidad de desplazamiento de cada una de ellas. La diversidad de bandas en los electroforetogramas de las fracciones que se unieron al receptor, confirman la composición heterogénea que ha sido ya demostrado para otras hormonas (91), con esta misma técnica. Hasta el momento estas observaciones no han sido reportadas.

#### VI- Marcación de hLH.

Los perfiles de elusión resultaron los esperados al separar la  $^{125}\text{I}$ -hLH del yodo libre. La eficiencia y actividad específica estuvieron dentro de los límites asignados; sin embargo, estos parámetros fueron altos con respecto a lo reportado por Saxena (21), Dufau (76), Scaglia (80). Estos valores no fueron un obstáculo para el adecuado funcionamiento de la técnica.

#### VI- Técnica de radioreceptor.

En datos reportados por Saxena (21), las condiciones óptimas de unión de la  $^{125}\text{I}$ -hLH

con el receptor son: pH 7.0, 37°C. En cuanto al tiempo de incubación 30 minutos fueron suficientes para alcanzar la saturación del receptor. Este valor es semejante al reportado por Scaglia (80).

El 95% de receptividad a la hLH marcada mostrado por la banda 4 (gráfica No. 8) no dejó lugar a dudas de que contiene el mayor número de receptores y su capacidad de saturación se realizó de acuerdo con lo reportado por otros autores (21, 25, 64).

La saturación de sitios de unión de los receptores del  $P_2$  con aproximadamente 2 ng de  $^{125}\text{I}$ -hLH ó 200,000 c.p.m. demostró un comportamiento análogo al de la fracción membranal altamente purificada (banda 4), como señala Scaglia en sus trabajos (80).

Una observación importante en este trabajo es señalar que la hLH modificada significativamente por efectos de la marcación ya no es reconocida ni unida por su receptor (gráfica No. 7).

La hCG-Seph-I fue capaz de unirse al receptor y desplazar a la hLH marcada pero su comportamiento llevado a graficación Logit-Log mostró variabilidad con puntos sobrepuestos, lo cual se explica por la utilización de un producto parcialmente purificado (ver Tabla 4). No obstante, el rango útil fue de 10 a 350 ng.

En cambio la hCG-CM-3 en su capacidad de desplazamiento, linealidad, pendiente y sensibilidad fueron adecuados, sin embargo, este experimento no fue reproducible probablemente por errores técnicos o bien por modificaciones de la hormona.

Las distintas fracciones eluidas de la DEAE-celulosa mostraron diferente capacidad de desplazamiento de la  $^{125}\text{I}$ -hLH. Entre ellas la hCG-DEAE-3 dió patrones de desplazamiento adecuados con una sensibilidad de 3 ng. Esta cantidad es superior que

la reportada en otros trabajos que utilizan fracciones membranales altamente purificadas (21, 80). Sin embargo, ésto no limita la utilidad de esta metodología para que su aplicación a la clínica, ya que el valor promedio en la fase folicular de hLH es de aproximadamente 3 ng y por lo tanto, al incrementarse esta hormona o la hCG al inicio del embarazo se hace más evidente su confiabilidad y practicabilidad; similamente esto ocurre en muchos casos con procesos patológicos.

Finalmente, quedó demostrada que esta técnica puede determinar la actividad biológica de hCG o hLH de polvos que en este laboratorio se purifican.

## 6- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las hormonas protéicas son substancias que se producen por glándulas endócrinas, se encuentran en muy bajas concentraciones en la sangre y juegan un papel de vital importancia para la regulación metabólica y la conducta del hombre.

Para su cuantificación se han desarrollado metodologías tales como el radioinmunoanálisis (RIA) y radioreceptor, los cuales determinan la actividad inmunológica y biológica respectivamente.

Con el fin de obtener un método sensible, rápido, reproducible y confiable se desarrolló la metodología del radioreceptor que sustituyera al bioensayo de hCG (3).

Tanto la banda 4 del gradiente discontinuo de 95,000 x g como el precipitado de 14,500 x g proporcionaron un receptor con las características deseadas.

Para el proceso de purificación de la hormona se utilizó cromatografía en gel filtración, por intercambio iónico en carboxi-metil celulosa y en dietil-aminoetil celulosa encontrándose que esta última proporcionó fracciones útiles que dieron respuestas reproducibles en el sistema. Sin embargo debe mencionarse que los electroforetogramas sugieren la presencia de formas heterogéneas de hCG en dichas fracciones, además de requerir otra etapa de purificación que posiblemente aumentaría la sensibilidad del sistema.

Para el adecuado desarrollo del sistema además de requerir hormonas purificadas se debe garantizar que el proceso de la radio-iodación de las mismas no las modifique sustancialmente, de tal forma que exista un nivel de competencia similar con la hormona nativa por el sitio receptor.

Con el presente trabajo quedó concluida la fase de estudio de la técnica, que en nuestro laboratorio detectó hasta 3 ng de hCG o hLH quedando pendiente para estudios subsecuentes la estandarización y aplicación de la misma.

**Tabla No. 1-** Algunas propiedades fisicoquímicas y métodos de purificación de la hCG

AUTOR	AÑO	ORIGEN DE hCG	METODO DE PURIFICACION	P.M.	pI	PORCIENTO DE CARBOHIDRATOS	ACTIVIDAD BIOLÓGICA (U.I./mg)	OTRAS CARACTERISTICAS
Van Hell y Goverde ( 4,5 )	1968	orina de embarazada normal	orina +adsorbente + precipitación etanólica + C.M-Sephadex + Sephadex G-100	31,000		25	18,800	Patrón electroforético con múltiples bandas
Bahl (6)	1969	Preparación comercial	DEAE-Sephadex + Sephadex G-100			31.2	12,000	
Mori (7)	1970	Preparación comercial	Sephadex G-100 + DEAE-celulosa	37,700	Afinidad catódica	29.4	12,800	
Morgan y Canfield ( 8,9 )	1971	Preparación comercial	SE-Sephadex + Bio-gel + DEAE-Sephadex	48,000 a 36,000	2.95	30	13,000 a 15,000	$\alpha$ = 18,000 $\beta$ = 30,000
Van Hall y Vaitukaitis (10)	1971	Preparación comercial	DEAE-celulosa + C.M-Sephadex				13,500	
Graesslin (11)	1973	Preparación comercial	C.M-Sephadex + Sephadex G-100	50,000	Rangos de 3.8 - 5.4 hCG-asiala = 9.5			$\alpha$ = 18,000 $\beta$ = 31,000 6 Isoformas por electroenfoque
Merz (12)	1974	Preparación comercial	SP-Sephadex C-50 DEAE-Sephadex Sephadex G-150	56,000	Rangos de 4.0 - 5.2			$\alpha$ = 21,500 $\beta$ = 34,500
Fein y Rosen (13)	1980	Extracto placentario y suero de embarazada	Sephadex G-100 en ambos casos	38,000		30		$\alpha$ = 15,000 $\beta$ = 23,000
Nishimura y Tojo (14)	1981	orina de embarazada normal, con mola hidatidiforme y con coriocarcinoma	orina +adsorbente + precipitación etanólica + DEAE-celulosa + Sephadex G-100	48,000			7,000	hCG de coriocarcinoma (act. biol. 400 U.I./mg) no se detectaron carbohidratos



TABLA 1b. 2 Descripción de varias pruebas de embarazo.

AUTOR	TIPO DE PRUEBA	FORMAS DE DETECCION	DURACION	DIA DE DETECCION DES- PUES DE LA OVULACION.	SE REALIZA EN ...
Ascheim y Zondek (1927).	Bioensayo	Luteinización en ovario de ratona.	5 días	25	orina
Friedman (1929)	Bioensayo	Ovulación en coneja	48 horas	25	orina
Kupperman (1943)	Bioensayo	Hiperhemia en ovario de rata.	2 horas	25	orina
Galli-Mainini (1947)	Bioensayo	Eyaculación de espermias en anfibio.	2 horas	25	orina
Brody y Carlstrom (1960)	Inmunoensayo	Partículas de latex en placa.	2 minutos	25	orina
Wide y Genzell (1960)	Inmunoensayo	inhibición de la hemoaglutinación.	2 horas	25	orina o suero
Wide (1969)	Radioinmunoensayo	Competencia con $^{125}\text{I}$ -hCG inmunoreactiva por anticuerpos específicos.	24 horas	12	suero
Kosasa (1974)	Radioinmunoensayo	Competencia con $^{125}\text{I}$ -hCG inmunoreactiva por anticuerpos específicos.	24 horas	7-9	suero
Saxena (1974)	Ensayo de radioreceptor	Competencia con $^{125}\text{I}$ -hCG biologicamente activa - por un receptor específico.	1 hora	6-8	suero

Tabla no. 3.

Esquema de incubación de la técnica del radio-receptor de hLH y hCG.

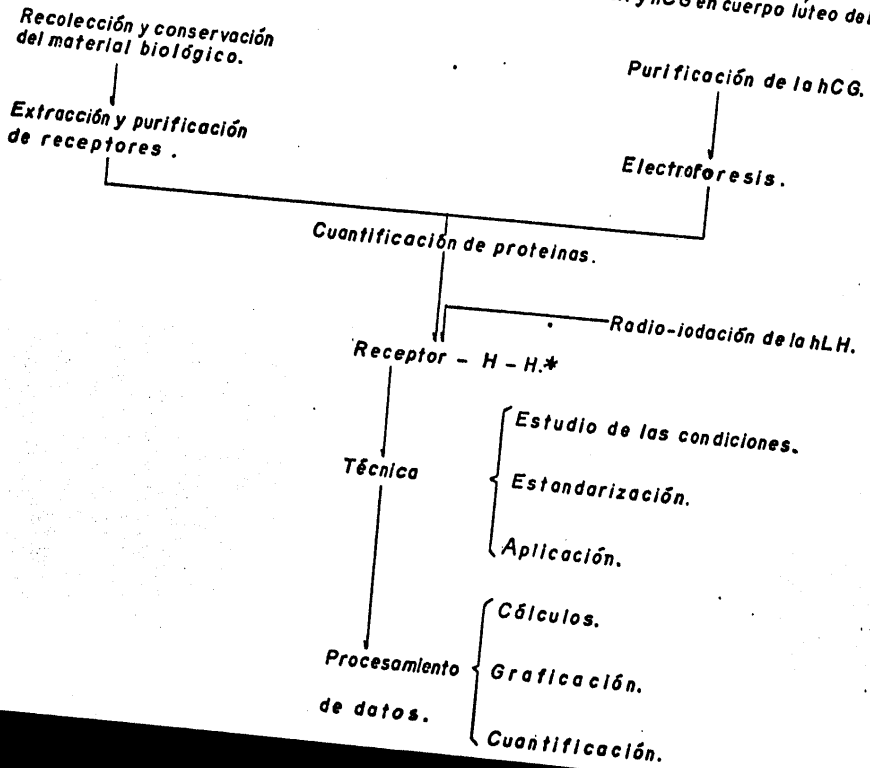
	Solución amortiguadora	Hormona	Hormona*	Receptor	Solución amortiguadora	
N. S. o 0% (Grandes cant. de H.)	400 $\mu$ l.	100 $\mu$ l.	100 $\mu$ l.	100 $\mu$ l.	1 ml.	Incubación de 60 min. a 37°C (agitación mínima).  Centrifugación a 3000 r.p.m. 30 min.  Aspirar y contar.
100% (Sin H.)	500 $\mu$ l.	—	100 $\mu$ l.	100 $\mu$ l.	1 ml.	
Curva estándar o problemas.	400 $\mu$ l.	100 $\mu$ l.	100 $\mu$ l.	100 $\mu$ l.	1 ml.	
Control de c.p.m. totales.	600 $\mu$ l.	—	100 $\mu$ l.	—	1 ml.	
						Contar Aspirar Contar.

*Tabla No 4. Cuadro comparativo de las principales características que presentan las fracciones de hCG obtenidas en este trabajo.*

<i>Clave de la hormona purif.</i>	<i>Actividad biol. en el ensayo.</i>	<i>Linearidad.</i>	<i>Sensibilidad (en ng).</i>	<i>Reproducibilidad.</i>
<i>hCG-Seph-G-15-I.</i>	<i>SI</i>	<i>No.</i>	<i>10</i>	<i>SI</i>
<i>hCG-CM-1.</i>	<i>No</i>	—	—	—
<i>hCG-CM-2.</i>	<i>No</i>	—	—	—
<i>hCG-CM-3.</i>	<i>SI</i>	<i>SI</i>	<i>1.6</i>	<i>No.</i>
<i>hCG-DEAE-1.</i>	<i>SI</i>	<i>No</i>	<i>6.7</i>	<i>SI</i>
<i>hCG-DEAE-2.</i>	<i>No</i>	—	—	—
<i>hCG-DEAE-3</i>	<i>SI</i>	<i>SI</i>	<i>3.05</i>	<i>SI</i>
<i>hCG-DEAE-4</i>	<i>SI</i>	<i>No</i>	<i>50.5</i>	<i>SI</i>

Figura no. 1.

Esquema general de trabajo del ensayo del radio-receptor de hLH y hCG en cuerpo lúteo de bovino.



## Figura no 2

Esquema de la centrifugación diferencial para la obtención de los receptores .

Cuerpo luteo bovino. (1er. trimestre).

Homogenización. (10 vol. de Tris-HCl 10mM pH 7.8).

Centrifugación (680 xg, 20 min.).



$P_2$

$S_2$

a).- Resuspender en Tris-HCl (10 mM pH 7.8).

b).- Llevar a gradiente de densidad discontinuo de sacarosa 50%, 40% y 30% .

c).- Centrifugación (95 000 xg 120 min.)

Allicuotar y congelar las bandas a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

**Figura no. 3.**

**Esquema de la radio-iodación de la hLH (Método cloramina-T.).**

**2.5 µg. de proteína (hLH) en 25 µl de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M. pH 7.5.**

**Agitación (10 seg.).**

**10 µl de NaI<sup>125</sup> en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.5.**

**Agitación (10 seg.).**

**75 µg de cloramina-T. (15 mg en 3 ml de sol. amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.5). 15 µl.**

**Agitación (60 seg.).**

**150 µg de metabisulfito de sodio. (15 mg en 1.5 ml. de sol. amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.5). 15 µl.**

**Agitación (30 seg.).**

**Columna de celulosa Whatman CF-11 aprox. 1.0 x 1.5 cm.**

**1er eluyente: Sol. amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.5: Determinar las c.p.m. de una alícuota de 100 µl para los 6 primeros tubos (con vol. de 5 ml cada uno). Donde sale el <sup>125</sup>I libre.**

**2o. eluyente: Suero normal humano: Determinar las c.p.m. de una alícuota de 100 µl para los 6 siguientes tubos (con vol. de 1 ml - cada uno). Donde sale la hormona marcada.**

**Contar el tubo de reacción y la columna.**

Figura No. 4.

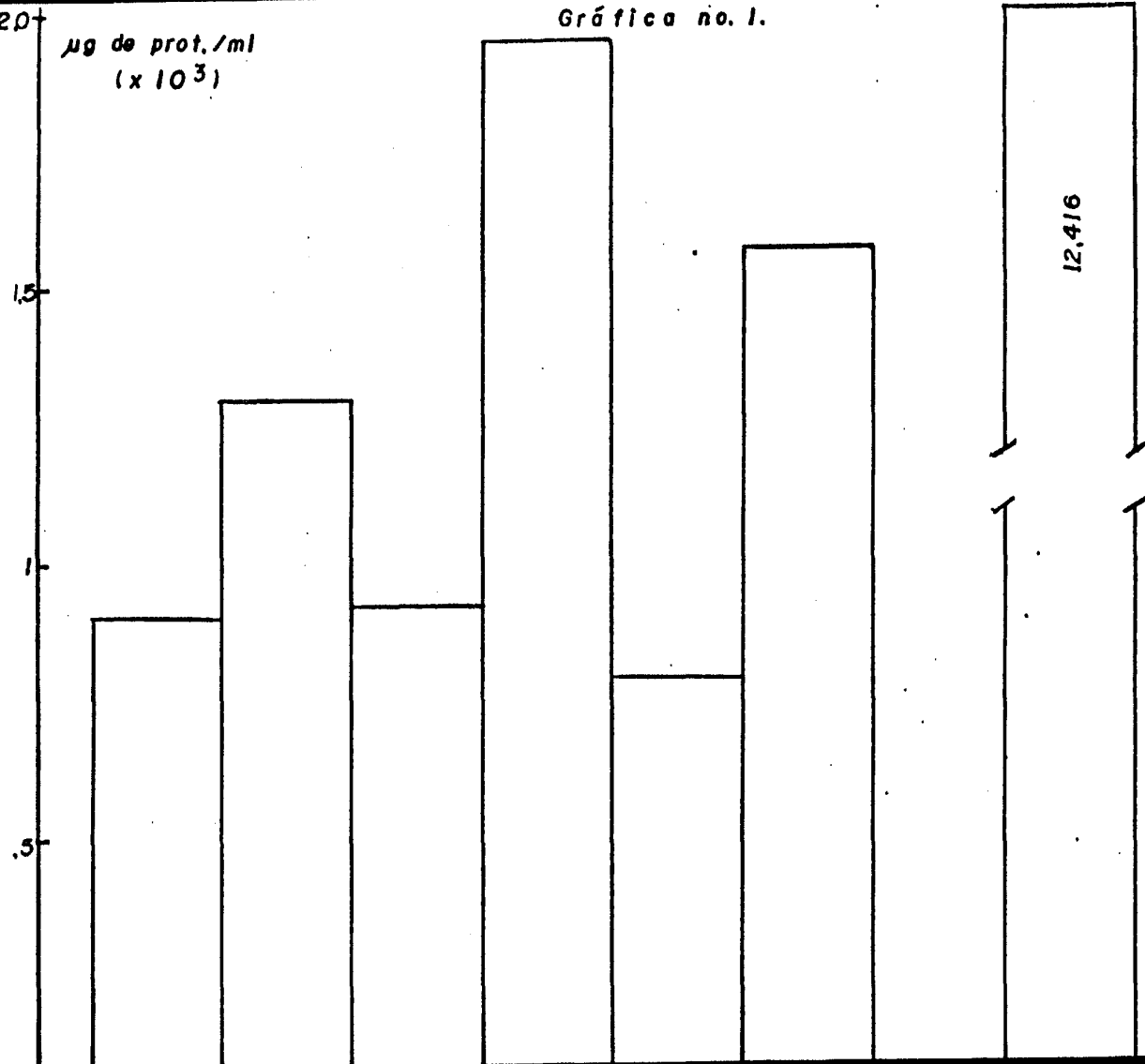
⊛

PATRONES ELECTROFORETICOS DE DIFERENTES FRACCIONES DE hCG

<u>PATRON ELECTROFORETICO</u>	<u>CLAVE</u>	<u>ACTIVIDAD</u>
<p>①</p> <p>R<sub>f</sub>: .220 .582</p>	hCG - Pregnyl-40	no activa
<p>②</p> <p>R<sub>f</sub>: .267 .483 .583</p>	hCG - DEAE-1	activa
<p>③</p> <p>R<sub>f</sub>: .184 .357 .510 .775</p>	hCG - DEAE-2	no activa
<p>④</p> <p>R<sub>f</sub>: .213 .252 .339 .553 .776</p>	hCG - DEAE-3	activa
<p>⑤</p> <p>R<sub>f</sub>: 0.301</p>	hCG - DEAE-4	poco activa

Gráfica no. 1.

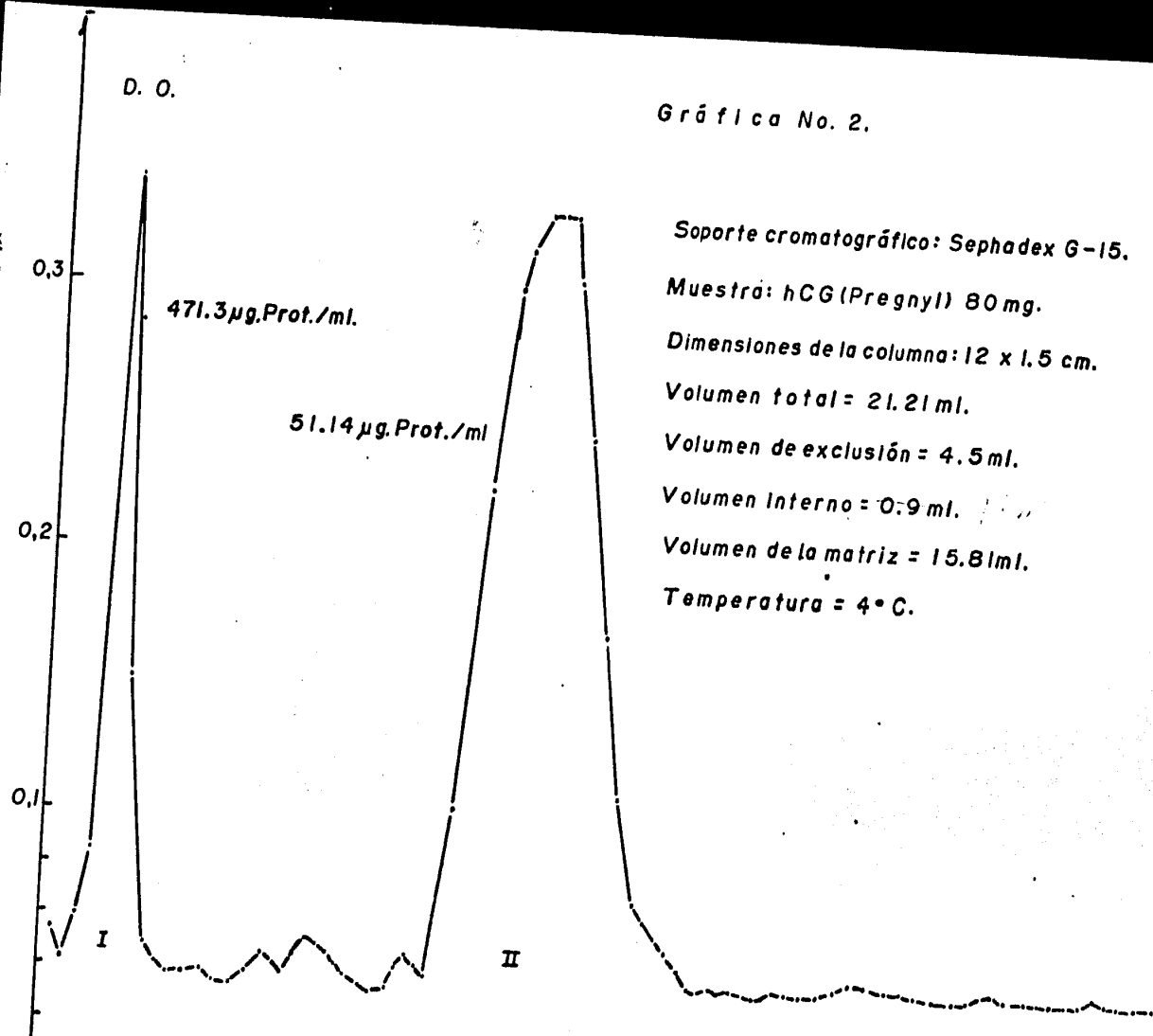
$\mu\text{g de prot./ml}$   
( $\times 10^3$ )



12.416



Gráfica No. 2.



2a. 3a. 4a. 5a. 6a.

**Gráfica no. 3.**

**Soporte cromatográfico: Carboximetil celulosa (28 x 2.75 cm.)**

**Muestra = hCG (Pregnyl) 240 mg.**

**Solución amortiguadora**

**Rendimiento.**

**Conc. de prot. x mg de polvo.**

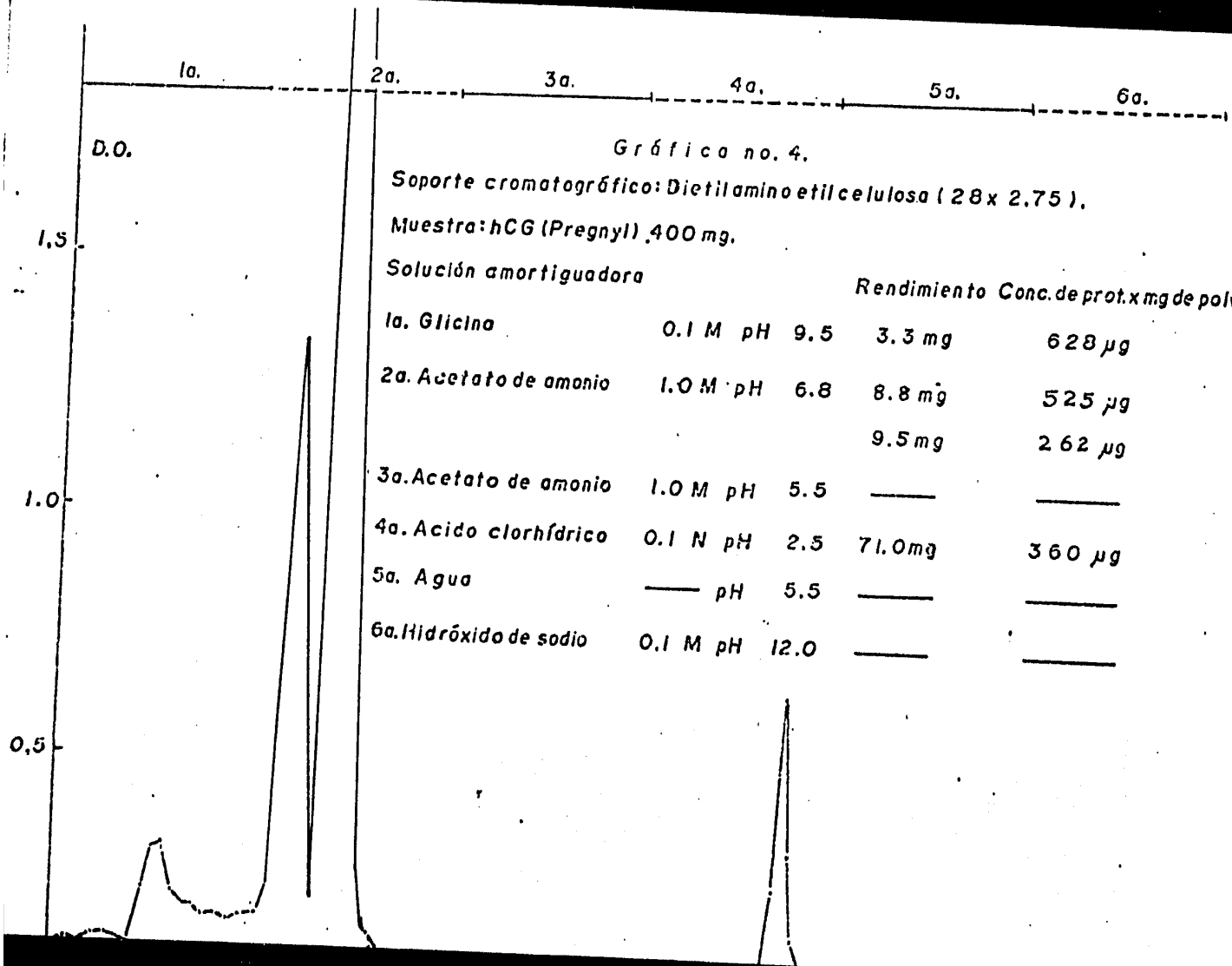
1a. Acetato de amonio	0.004 M.	pH 5.5	35 mg	90 $\mu$ g.
2a. Acetato de amonio	1.0 M.	pH 6.8	15 mg	315 $\mu$ g.
3a. Acetato de amonio	1.0 M.	pH 8.8	—	—
4a. Hidróxido de sodio	0.1 N	pH 12.0	36 mg	67.5 $\mu$ g.
5a. Agua	—	pH 5.5	—	—
6a. Acido clorhídrico	0.1 N	pH 2.5	—	—

D.0.

1,5

1,0

.5



Gráfica no. 4.

Soporte cromatográfico: Dietilamino etilcelulosa (28 x 2.75).

Muestra: hCG (Pregnyl) 400 mg.

Solución amortiguadora

Rendimiento Conc. de prot. x mg de polvo.

1a. Glicina	0.1 M pH 9.5	3.3 mg	628 $\mu$ g
2a. Acetato de amonio	1.0 M pH 6.8	8.8 mg	525 $\mu$ g
		9.5 mg	262 $\mu$ g
3a. Acetato de amonio	1.0 M pH 5.5	—	—
4a. Acido clorhídrico	0.1 N pH 2.5	71.0 mg	360 $\mu$ g
5a. Agua	— pH 5.5	—	—
6a. Hidróxido de sodio	0.1 M pH 12.0	—	—

Gráfica No. 5.

BANCO DE HORMONAS PROTEICAS.

Hormona: LER-960.  $\mu\text{g}$ : 2.0.  
 Sol.amort: Fosfatos. pH: 7.5  
 Iodo: 125 (10 $\mu\text{l}$ ). mCi: 1.0  
 Cloro-T: 25 $\mu\text{l}$ .  $\mu\text{g}$ : 75.  
 Meta-Na: 25 $\mu\text{l}$ .  $\mu\text{g}$ : 150

Hormona útil: fracciones 8 y 9.  
 Radioactividad total: 1198 005 c.p.O.l' (100 $\mu\text{l}$ ).  
 Columna: Celulosa Whatman CF-II (1.5 ml).  
 % eficiencia: 63.90  
 Actividad específica: 319.5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

No.de tubo	Vol. (ml)	c.p. O.l' (100 $\mu\text{l}$ )	Cuentas	ng. de horm.*	% de horm.* danada.
1	5		392,462		
2	P04		16,152		
3	"		8 299		
4	"		6 063		
5	"		5 116		
6	"		4 399	432 491	
7	1		23 087	50	
8	S.N.H	559513		1 460	1.8
9	"		113 615	300	0.8
10	"		31 124	80	
11	"		19 828	50	
12	"		18 347	765514	50

C. T = 1193 005

Radio-actlv.  
c.p.O.l'

300

250

200

150

100

50

559513

Fecha: Agosto-30-76.

Receptividad  
(% U/T)

Gráfica no. 6.

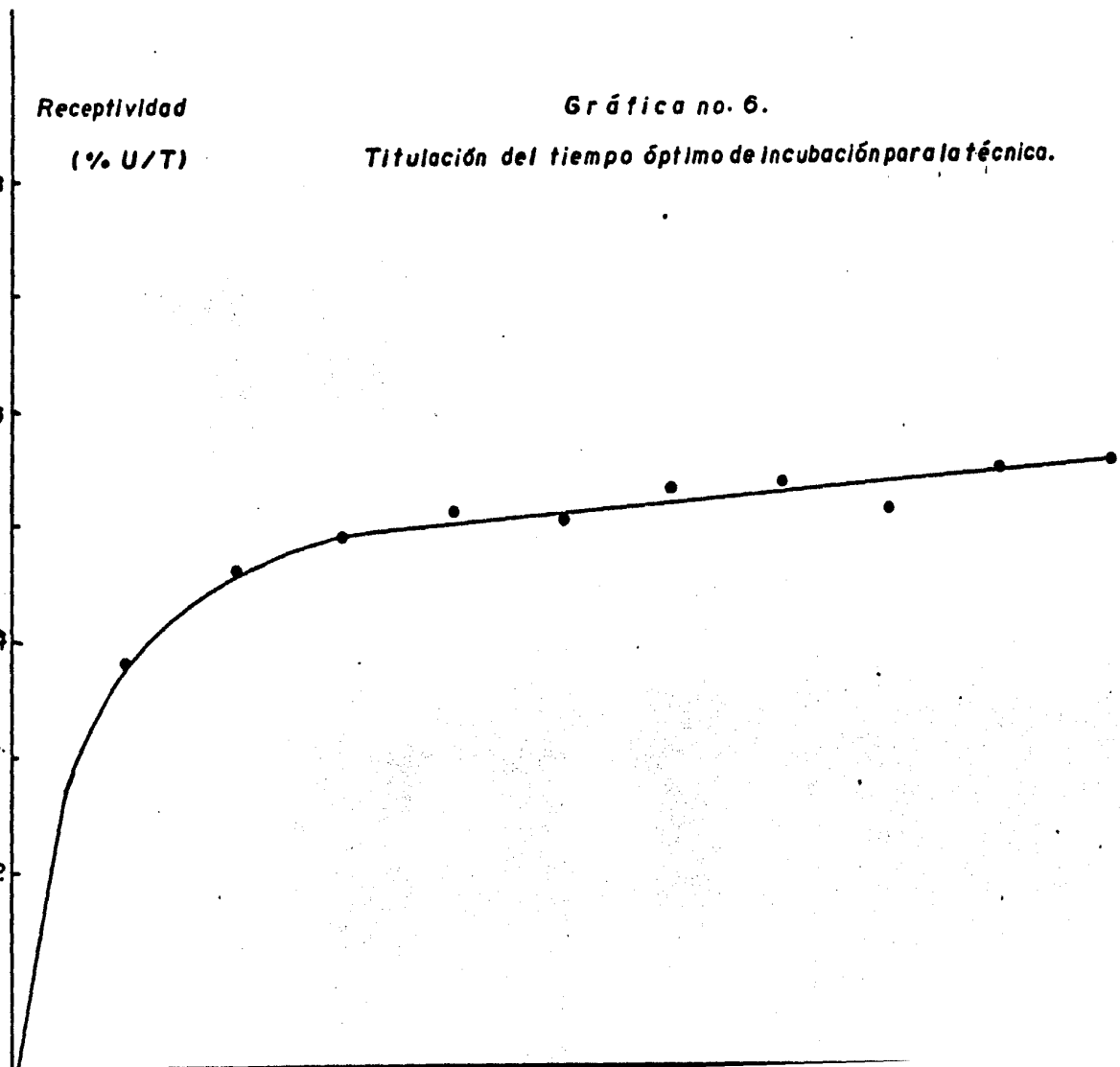
Titulación del tiempo óptimo de incubación para la técnica.

8

6

4

2

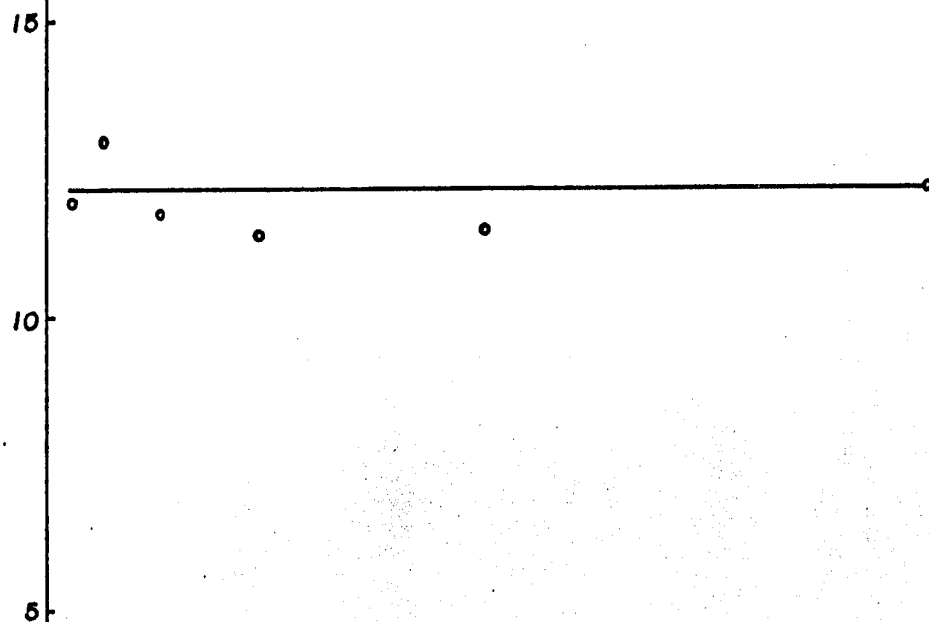


Receptividad.

Grafico no. 7.

(% U/T).

Receptividad del precipitado de 14500 (P<sub>2</sub>) por una hormona marcada dañada.

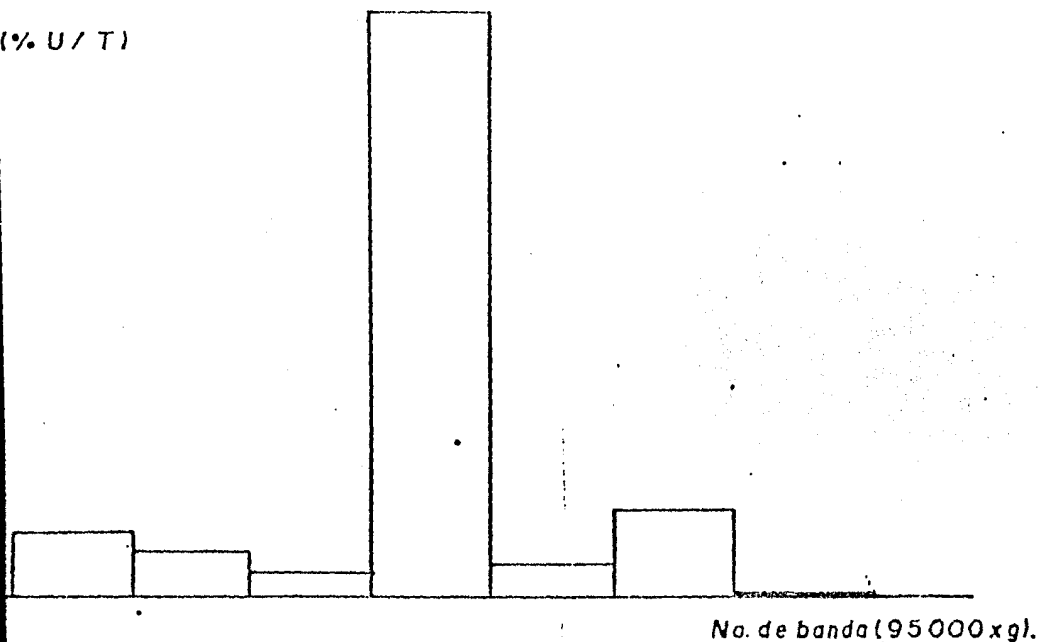


Gráfica no. 8.

Comparación entre receptividad y concentración de proteínas de las bandas de 95 000xg.

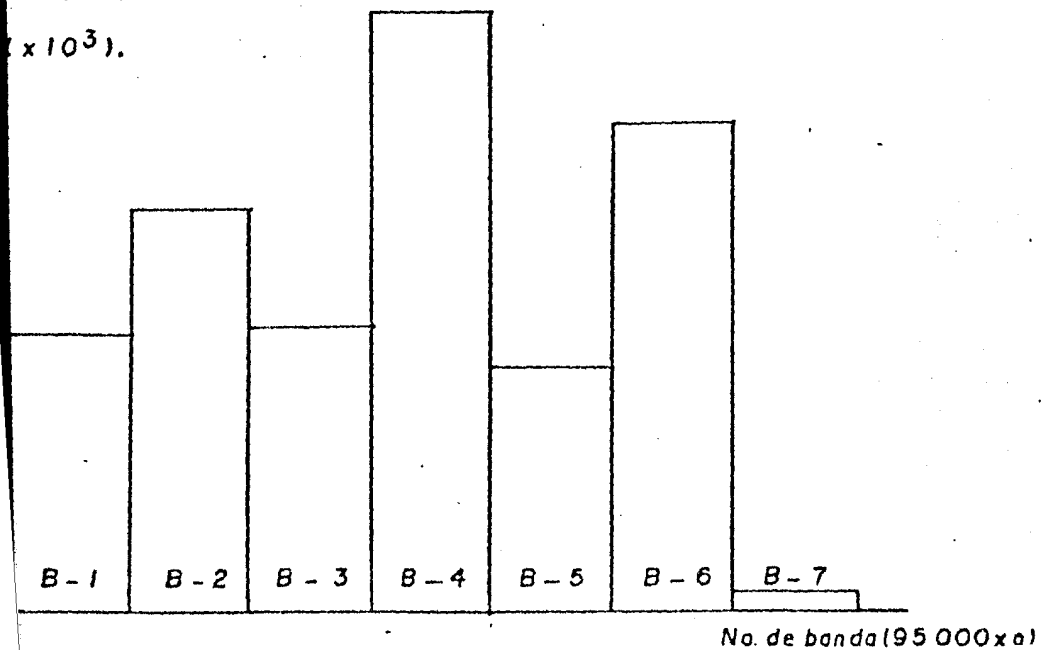
Receptividad:

(% U / T)



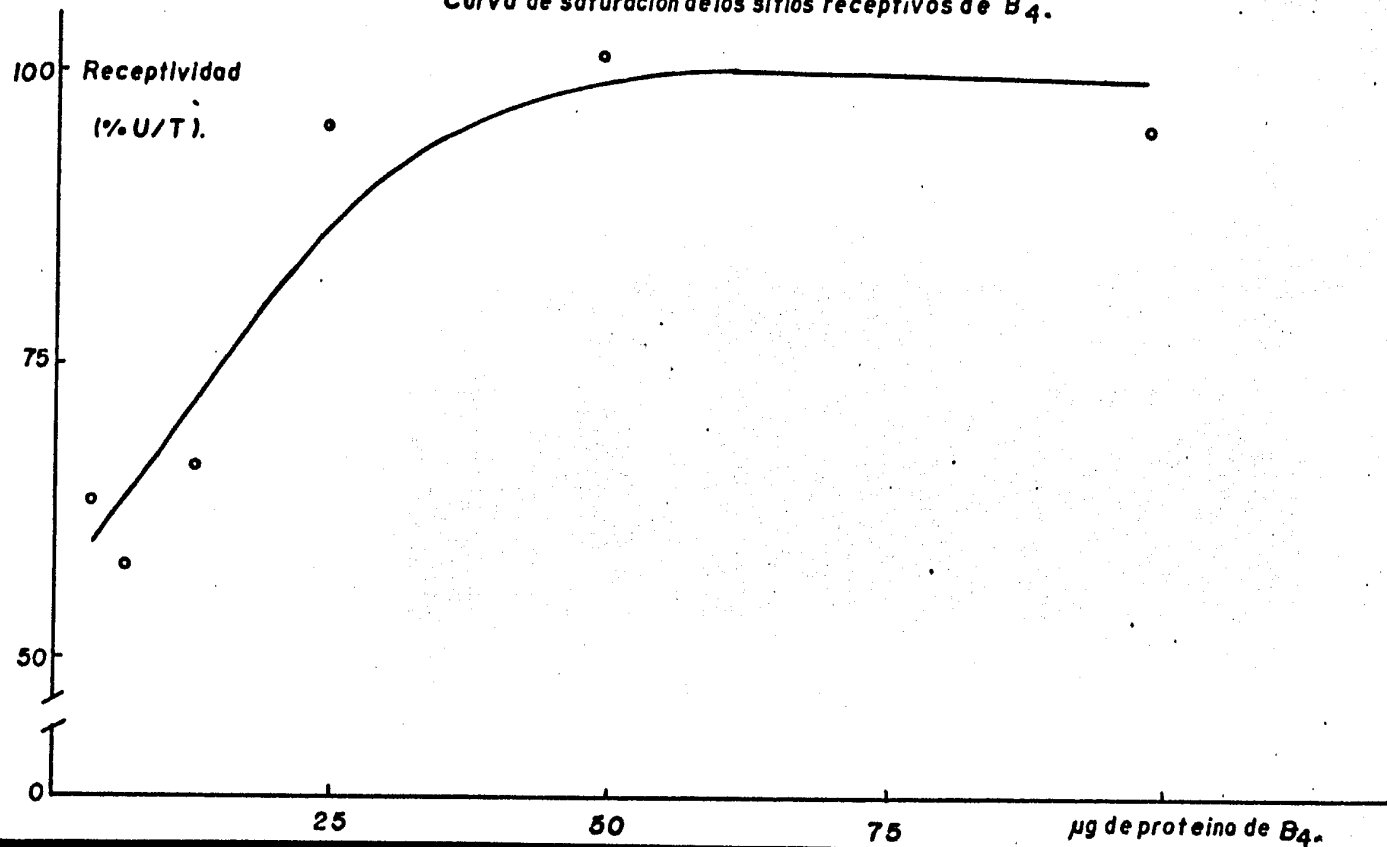
g de prot./ml:

(x 10<sup>3</sup>).

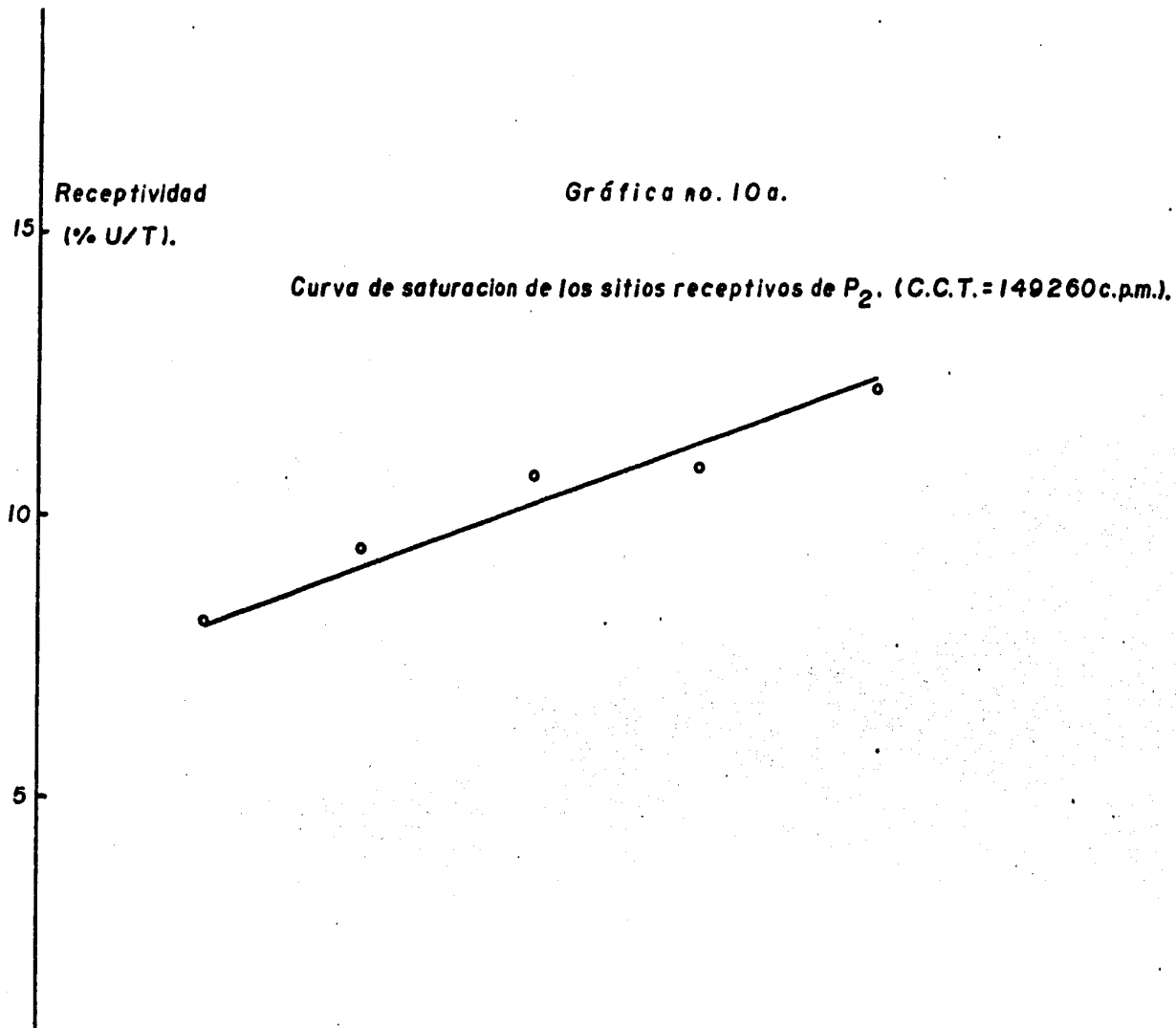


Gráfica no. 9.

Curva de saturación de los sitios receptivos de B<sub>4</sub>.







Receptividad (% U/T).

Gráfica no. 10 b.

Curva de saturación de los sitios receptivos de  $P_2$ . (C.C.T. = 76518 c.p.m.).

15

10

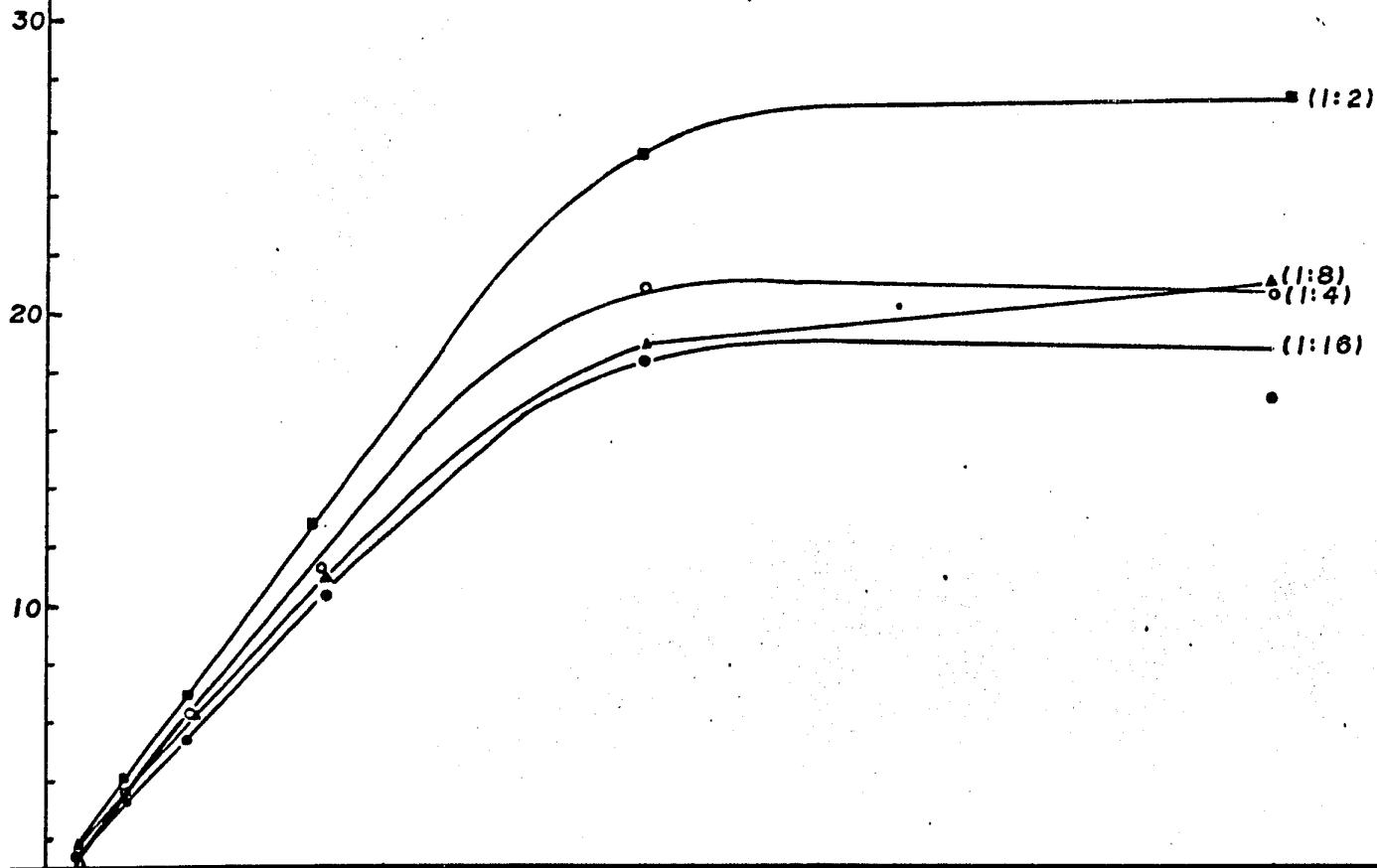
5

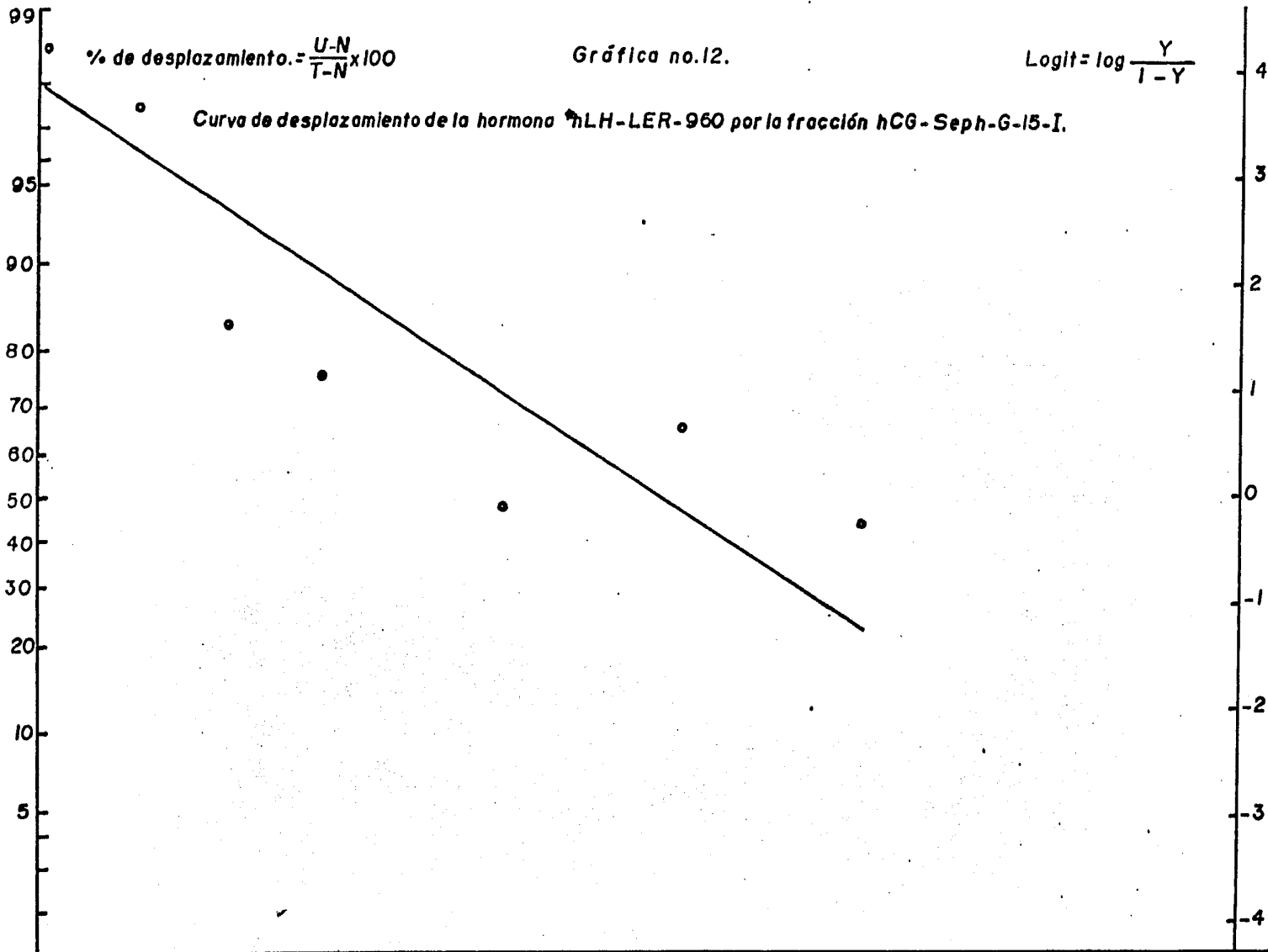


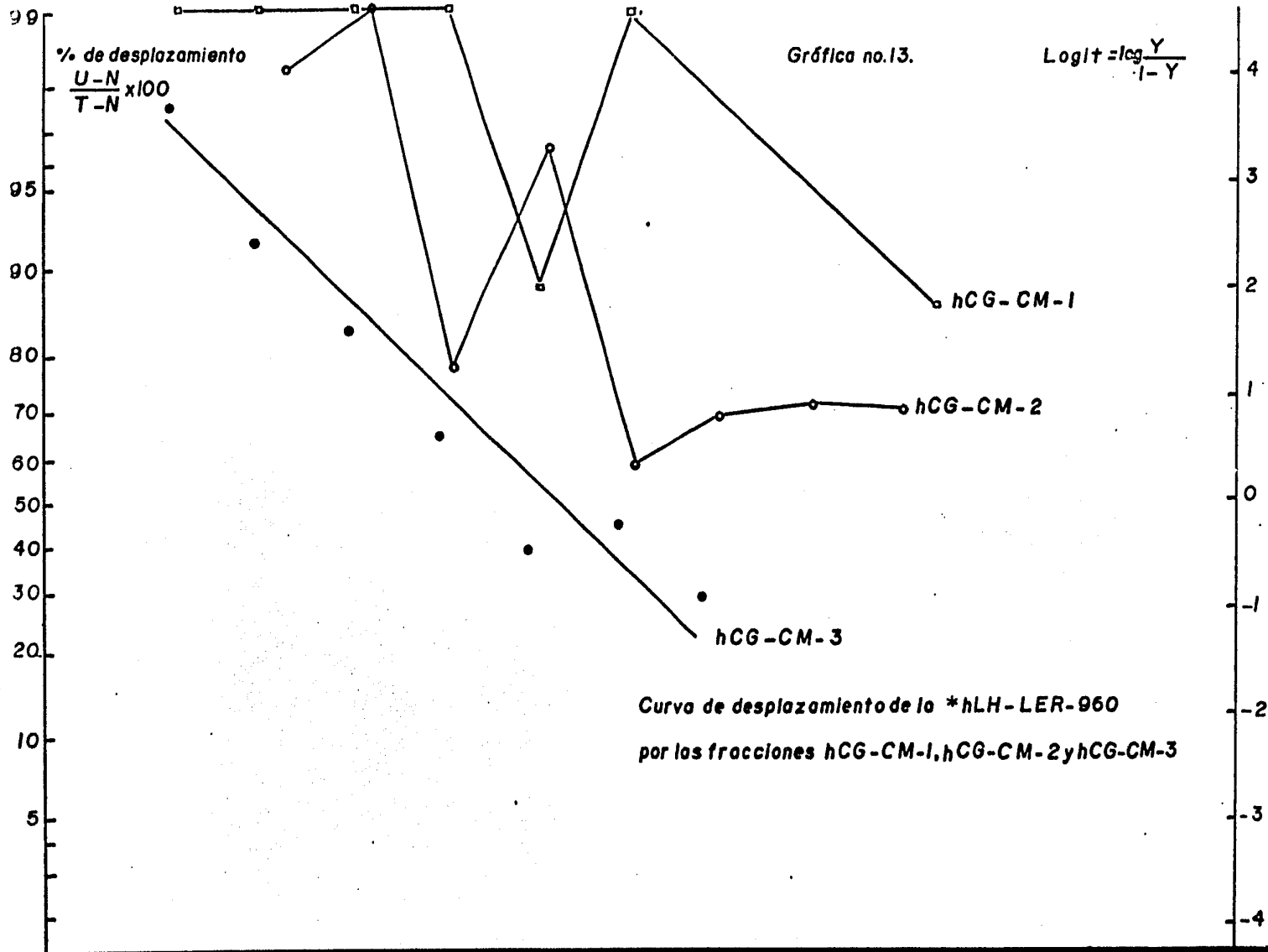
Receptividad  
(c.p.m. unidas  $\times 10^3$ ).

Gráfica no. 11.

Curvas de saturación de los sitios receptivos de  $P_2$ .





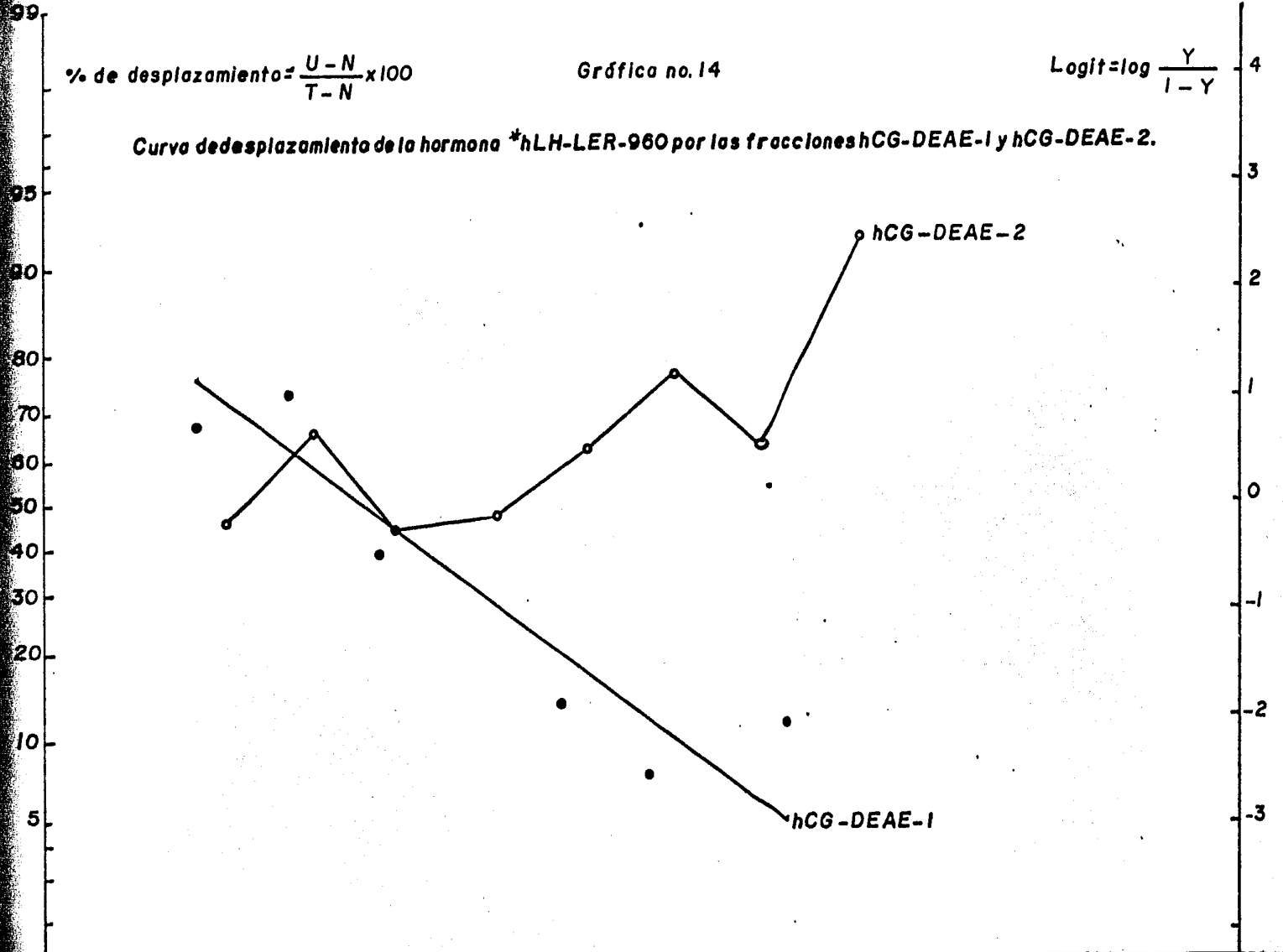


% de desplazamiento =  $\frac{U - N}{T - N} \times 100$

Gráfica no. 14

Logit =  $\log \frac{Y}{1 - Y}$

Curva de desplazamiento de la hormona \*hLH-LER-960 por las fracciones hCG-DEAE-1 y hCG-DEAE-2.



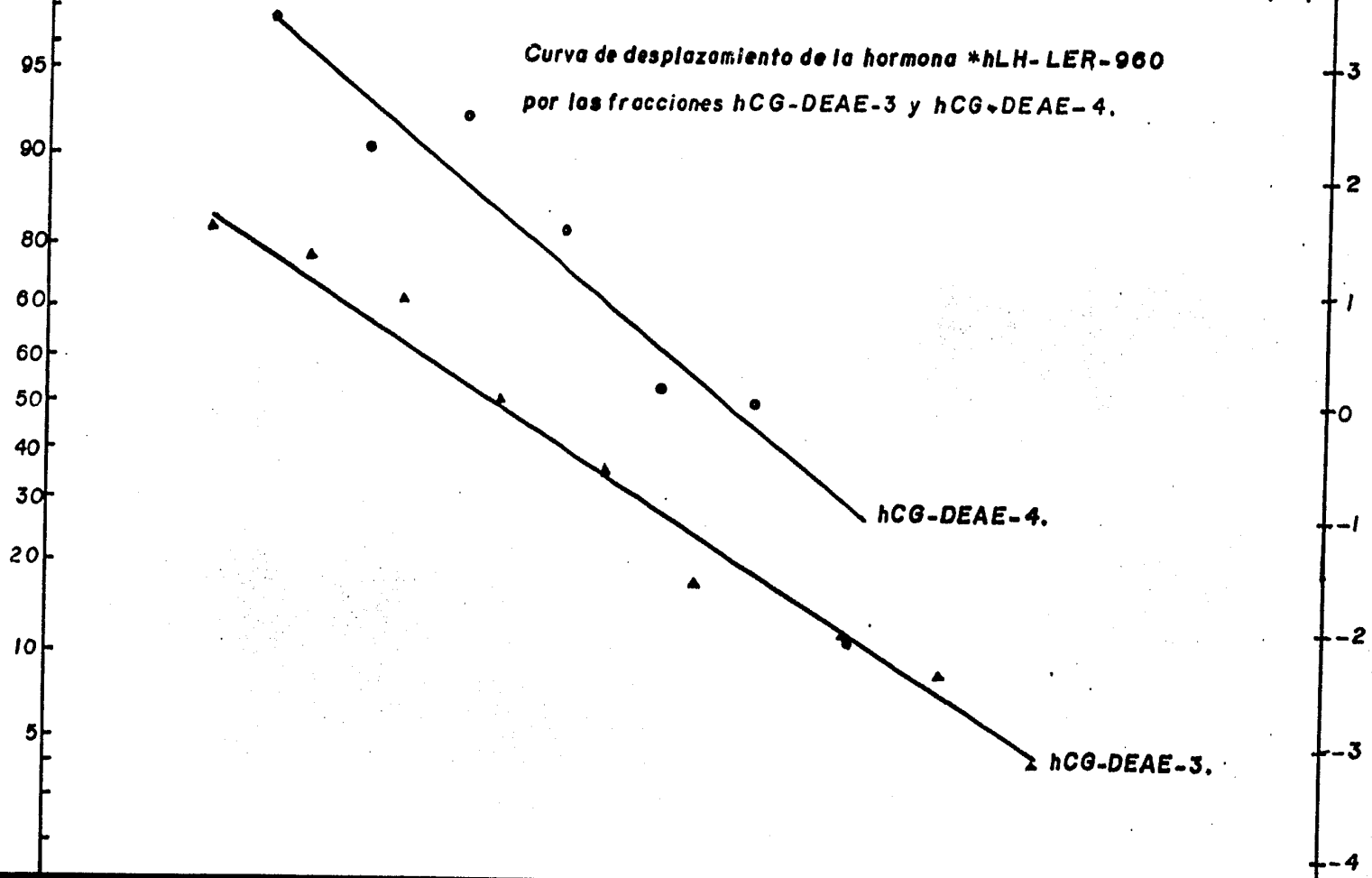
99

$\% \text{ de desplazamiento} = \frac{U-N}{T-N} \times 100$

Gráfica no. 15.

$\text{Log}t = \log \frac{Y}{1-Y}$

Curva de desplazamiento de la hormona \*hLH- LER-960 por las fracciones hCG-DEAE-3 y hCG-DEAE-4.



99  
95  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
5

$$\% \text{ de desplazamiento} = \frac{U - N}{T - N} \times 100$$

Gráfica no. 16.

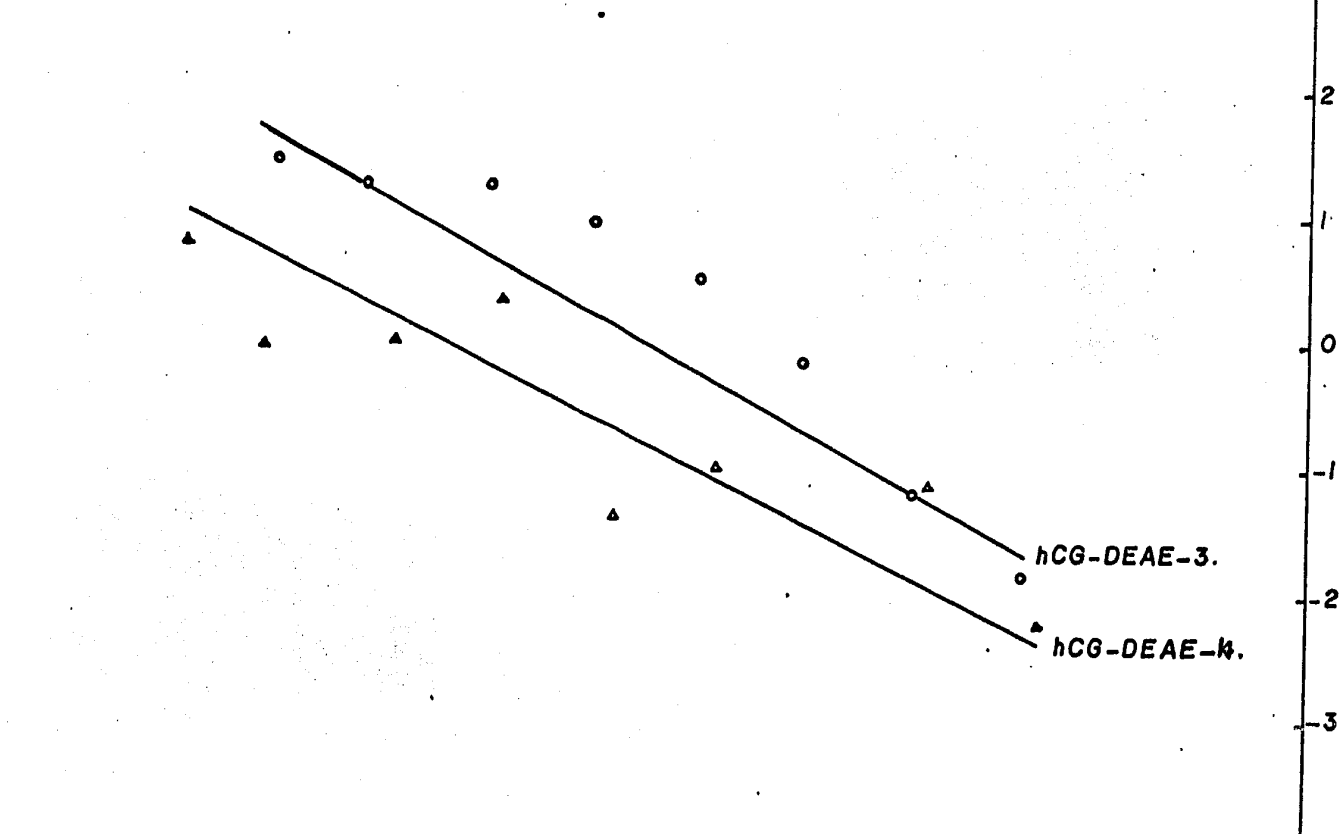
$$\text{Logit} = \log \frac{Y}{1 - Y}$$

Comparación de las curvas de desplazamiento de las fracciones biológicamente activas.

4  
3  
2  
1  
0  
-1  
-2  
-3  
-4

hCG-DEAE-3.

hCG-DEAE-4.



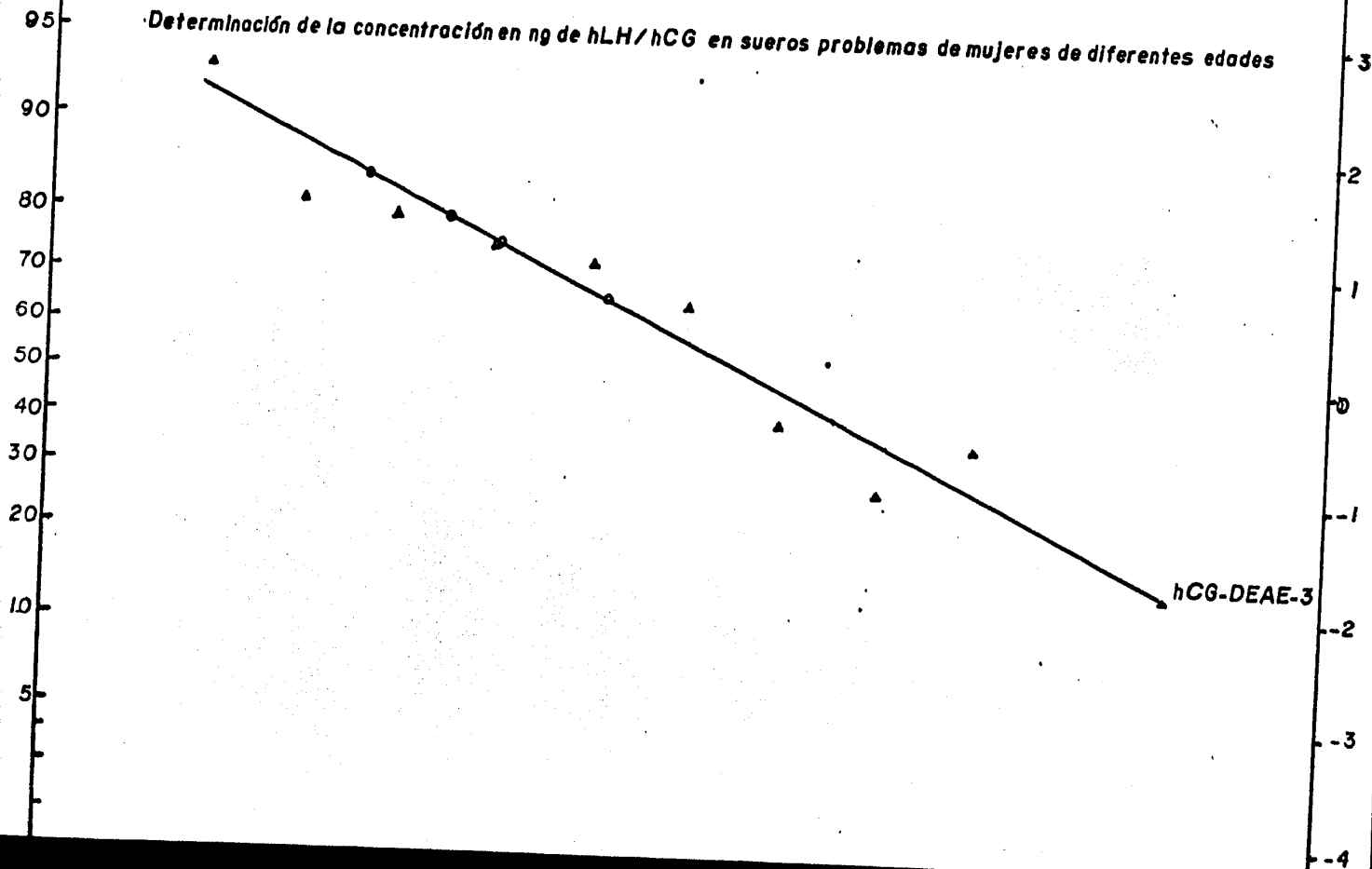


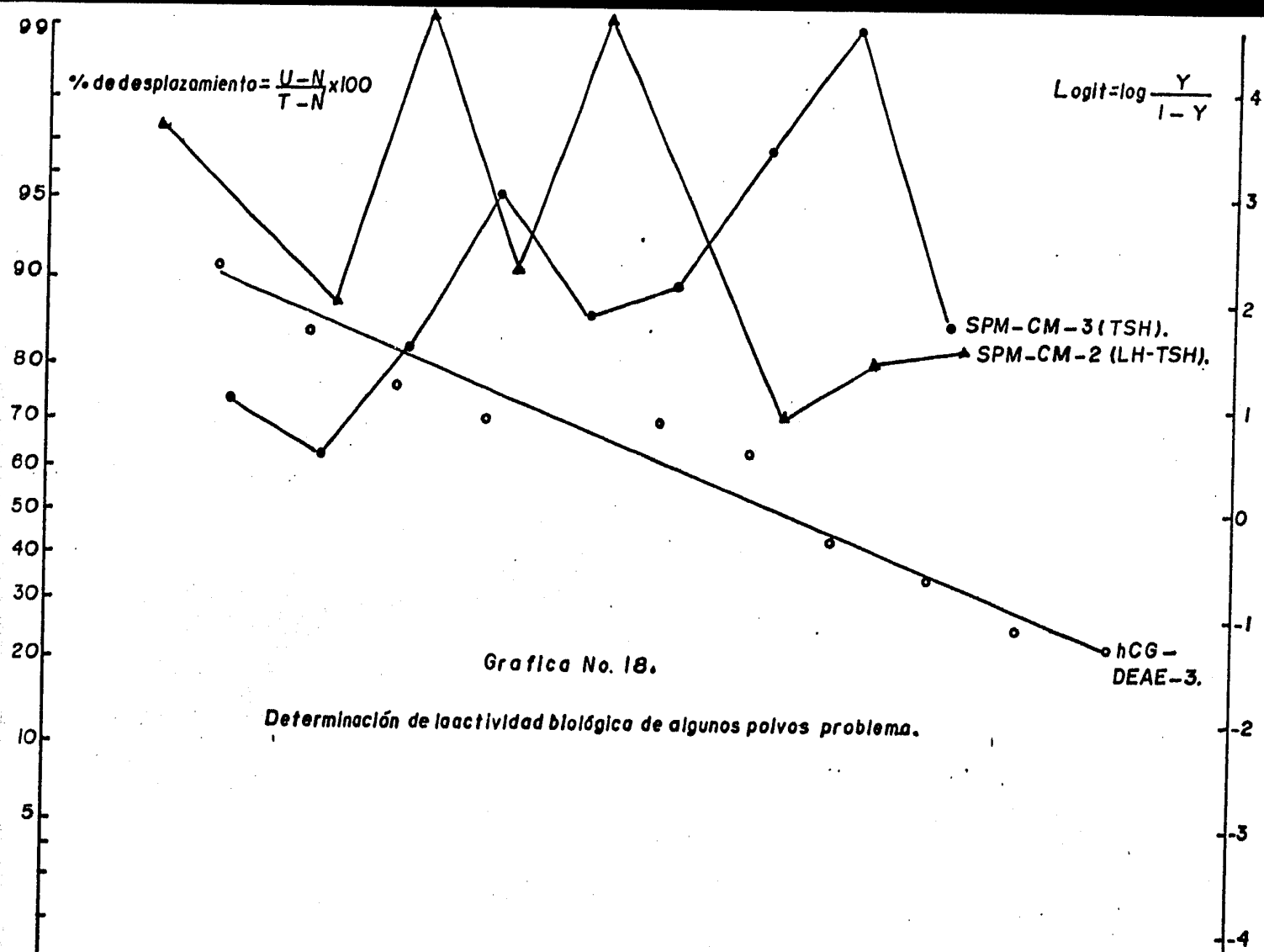
$\% \text{ de desplazamiento} = \frac{U-N}{T-N} \times 100$

Gráfica no. 17.

$Logit = \log \frac{Y}{1-Y}$

Determinación de la concentración en ng de hLH/hCG en sueros problemas de mujeres de diferentes edades





## 7- REFERENCIAS

1. Friesen, H. G.  
Placental protein and polypeptide hormones  
En: Handbook of Physiology. Endocrinology II. Part 2  
Cap. 45 pp 295, 1973
2. Saxena, B. B.  
Human chorionic gonadotropin  
En: Fuch F. y Klooper, A. Endocrinology of pregnancy  
Harper & Row publishers 3a. Ed. 1983
3. Morato, Cartagena T.  
Determinaciones hormonales en Endocrinología  
En: Malacara J. M; García Viveros y Valverde Rodríguez C.  
Fundamentos de Endocrinología Clínica 3a. Ed. pp 371-377  
Prensa Médica Mexicana 1982
4. Van Hell, H. Matthijsen R. y Homan J.D.H.  
Studies on human chorionic gonadotrophin  
I. Purification and some physico-chemical properties  
Acta Endocrinol. 59:84-104 (1968)
5. Goverde G. C.; VeenKamp, F.J.N. y Homan J. D. H.  
Studies on human chorionic gonadotrophin II. Chemical  
composition and its relation to biological activity  
Acta Endocrinol. 59:105-109 (1968)
6. Bahl, O.P.  
Human chorionic gonadotrophin II. Nature of the carbohidratos units  
J. Biol. Chem. 244:575-566 (1969)
7. Mori K. F.  
Antigenic structure of human gonadotrophins: Importance  
of protein moeity to antigenic structure of human gonadotropin  
Endocrinology 86:97-106 (1970)
8. Morgan, F.J. y Canfield R. E.  
Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin  
Endocrinology 88:1045-1053 (1971)
9. Canfield R. E; Morgan F.J; Kammerman S; Bell J.J. y Agosto G.M.  
Studies of human chorionic gonadotropin  
Rec. Prog. Hormon. Res. 27:121-163 (1971)
10. Van Hall E. V.; Vaitukaitis J.L. y Ross G.T.  
Immunological and biological activity of hCG following  
progressive desialylation  
Endocrinology 88:456-464 (1971)

11. Graesslin D., Weise H. C. y Braendle W.  
The microheterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG) reflected in the  $\beta$ -subunit  
FEBS letters. 31:2 214-216 (1983)
12. Merz W. E.; Hilgenfeldt U.; Dorner M. y Brossmer R.  
Biological, immunological and physical investigations on human chorionic gonadotropin  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355:1035-1045 (1974)
13. Fein, H. G; Rosen S.W. y Weintraub B. D.  
Increased glycosylation of serum human corionic gonadotropin and subunits from eutopic and ectopic sources: Comparison with placental and urinary forms  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 50:1111-1120 (1980)
14. Nishimura, R., Endo Y., Tanabe, K., Ashitaka Y. y Tojo S.  
The biochemical properties of urinary human chorionic gonadotropin from patients with trophoblastic diseases  
J. Endocrinol. Invest. 4:349-358 (1981)
15. Morgan, F. J. Birken, S. y Canfield R. E.  
Human chorionic gonadotropin: A proposal for the amino-acid sequence  
Molecular & Cellular Biochemistry 2:97-99 (1973)
16. Morgan, F. J., Birken, S. y Canfield R.E.  
Comparison of chorionic gonadotropin and luteinizing hormone: A note on a proposed significant structural difference in beta subunit  
FEBS Letters 31:101-103 (1973)
17. Vaitukaitis J. L.; Ross, G. T.; Braustein, G. D. y Rayford P.L.  
Gonadotropins and their subunits: Basic and clinical studies  
Recent Prog. Horm. Res. 32:289-331 (1976)
18. Donini S; Olivieri V; Ricci G. y Donini P.  
Subunits of human chorionic gonadotrophin: An immunochemical study  
Acta Endocrinologica 73:133-145 (1973)
19. Vaitukaitis J.L.  
Human chorionic gonadotropin - a hormone secreted for many reasons  
New Engl. Jour. Med. 301 (6) 324-325 (1979)
20. Haour F. y Saxena B.B.  
Detection of a gonadotropin in rabbit blastocyst before implantation  
Science 185:444-445 (1974)
21. Saxena, B. B. y Gollwitzer, K. S.  
Determination of protein hormones by radioimmuno- and radioreceptor assays in human plasma with emphasis during normal pregnancy  
En: Scholler, R.  
Exploration hormonale de la grossesse.  
Comptes Reudus du Symposium International Paris- Fresner (France) Octobre 197

22. Saxena, B.B; Hassan S. H; Haour, F. y Schmidt-Gollwitzer M.  
Radioreceptor assay of hCG. Detection of early pregnancy  
Science 148:793-795 (1974)
23. Rosal, T.P; Saxena B.B. y Landesman, R.  
Aplication of radioreceptor assay of human chorionic gonadotropin  
in the diagnosis of early abortion.  
Fertil. & Steril. 26:1105-1112 (1975)
24. Saxena, B.B. y Landesman, R.  
The use of radioreceptor assay of human chorionic gonadotropin  
for the diagnosis and management of ectopic pregnancy  
Fertil. & Steril. 26:397-404 (1975)
25. Richards J. S. y Williams J. J.  
Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and  
luteinizing hormone (LH): Regulation by LH and PRL  
Endocrinology 99:1571-1581 (1976)
26. Richards J. S.; Ireland J.; Rao M. C.; Bernath, G. A.; Midgley A. R. y  
Reichert L. E.  
Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation  
by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone  
Endocrinology 99:1562-1570 (1976)
27. Catt K.J; Dufau M. L; Neaves W. B; Walsh P. C. y Wilson J. D.  
LH-hCG receptor and testosterone content during  
differentiation of the testis in the rabbit embryo  
Endocrinology 97:1157-1165 (1975)
28. Kolena, J.  
Bindig of  $^{125}\text{I}$ -hCG by rat testis homogenates in early neonatal  
period  
Endocrinol. Exp. 10:113-118 (1976)
29. Huhtaniemi, I. T; Korenbrot, C. C. y Jaffe, R. B.  
hCG bindig and stimulation of testosterone biosynthesis  
in human fetal testis  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 44:963-967 (1977)
30. Albert A. Kobi J; Leiferman J. y Derner I.  
Purification of pituitary gonadotropin from urine of normal men  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 21:1 (1961)
31. Nishimura R. Endo Y. Tanabe K. Ashitaka Y. y Tojo S.  
The biochemical properties of urinary human chorionic  
gonadotropin from the patients with trophoblastic diseases  
J. Endocrinol. Invest. 4:349-358 (1981)
32. Vaitukaitis J. L.  
Changing placental concentrations of human chorionic  
gonadotropin and its subunits during gestation  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38:755-760 (1974)

33. Maruo T.  
Studies on in vitro synthesis and secretion of human chorionic gonadotropin and its subunits  
Endocrinol. Japon. 23:119-128 (1976)
34. Good A; Ramos-Uribe M; Ryan R. S. y Kempes R. D.  
Molecular forms of human chorionic gonadotropin in serum, urine and placental extracts  
Fert. & Steril. 28:846-850 (1977)
35. Ouchterlony, O.  
Antigen-Antibody reactions in gels. IV Types of reactions in coordinated systems of diffusion  
Acta Path. Microbiol. Scand. 32:231-240 (1953)
36. Hurry, E.  
A laboratorians view of pregnancy testing  
Am. J. Med. Technol. 48:971 (1982)
37. Landesman, R. y Saxena, B.B.  
Radioreceptor assay of human chorionic gonadotropian as aid in miniabortion  
Fert. & Steril. 25:1022-1029 (1974)
38. Brody, S. y Calstrom, G.  
Estimation of human chorionic gonadotropin in biological fluids by complement fixation  
Lancet 2:99 (1960)
39. Wide, L. y Gemzell, C.A.  
An immunological pregnancy test  
Acta Endocrinol. (Kbh) 35:261 (1960)
40. Lang, L; Reiss, A.M; Smith, L y Keber, M.  
A new more sensitive tube test for pregnancy evaluated with a selected hospital population  
Am. J. Obstet. Gynecol. 126:693-696 (1976)
41. Hodges, P. C.  
Two immunological tube test for pregnancy: A comparative study  
Med. Lab. Sci. 39:329-331 (1982)
42. Garret, P.A; Kurtz, S.R. y Hurd Jr. J.K.  
False-positive results for choriogonadotropin in serum  
Clin. Chem. 29:1871 (1983)
43. Valanis, B.G. y Perlman, C.J.  
Home pregnancy testing kits: Prevalence of use, false negative rates, and compliance with instructions  
Am. J. Public. Health 9:1034-1036 (1982)

44. Rajaniemi, H. y Vanha-Perttula, T.  
Specific receptor for LH in the rat ovary: Evidence by autoradiography and tissue fractionation  
Endocrinology 90:1-9 (1972)
45. De Kretser, D.M; Catt, K.J. y Paulsen, C.A.  
Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats  
Endocrinology 88:332-337 (1971)
46. De Kretser, D.M; Catt, K.J; Burger, H.G. y Smith, G.S.  
Radioautographic studies on the localization of  $^{125}\text{I}$ -labeled human luteinizing and growth hormone in immature rats.  
J. Endocrinol. 43:105-111 (1968)
47. Rao, Ch. V. y Saxena, B.B.  
Gonadotropin receptors in the plasma membranes of rat luteal cells  
Biochem. Biophys. Acta 313:372-289 (1973)
48. Amsterdam, A; Koch, Y; Lieberman, M. E. y Linder, H.R.  
Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the prevulatory follicle of the rat  
J. Cell Biol. 67:894-900 (1975)
49. Mizejewsky, G. J.  
Radioisotopic studies of human chorionic gonadotropin in the mouse ovary  
Experientia 31:1242-1244 (1975)
50. Hsueh, A.J.W; Dufau, M.L.; Katz, S.I. y Catt, K.J.  
Immunofluorescence labeling of gonadotropin receptors in enzyme-dispersed interstitial cells  
Nature 61:710-711 (1976)
51. Tsuruhara, T; Van Hall, E.V; Dufau, M.L. y Catt, K.J.  
Ovarian binding of intact and desialylated hCG in vivo and in vitro  
Endocrinology 91:463-469 (1972)
52. Rajaniemi, H.J; Hirshfield, A.N. y Midgley Jr, A.R.  
Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue. I. Localization of LH binding sites by fractionation of subcellular organelles  
Endocrinology 96:579-588 (1974)
53. Lee, C.Y. y Takahashi, H.  
Follicle-stimulating hormone receptors in rat ovaries: Decrease in number of binding sites associated with luteinization  
Endocrinology 101:869-875 (1977)

54. Rajaniemi, H.J; Midgley, A.R; Duncan, J.A. y Reichert Jr. L.E.  
Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue; III. Binding sites for luteinizing hormone and differentiation of granulosa cells to luteal cells  
Endocrinology 101:898-910 (1977)
55. Künzing, H.J; Potthoff, H.J. y Leidenberger, F.  
In vitro bioassay for LH/hCG (progesterone production assay) using dissociated rabbit cells  
J. Clin. Endocr. Metab. 38:721 (1974)
56. Dufau, M.L; Catt, K.J. y Tsuruhara, T.  
A sensitive gonadotropin responsive system: Radioimmunoassay of testosterone production by the rat testis in vitro  
Endocrinology 90:1032-1040 (1972)
57. Malkinson, A.M.  
Hormone action  
John Wiley and Sons. Inc. N.Y. 1975. pp 64
58. Fyhrquist, F.  
Hormone receptors research: Problems and promises  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 35:385-388 (1975)
59. Baxter, J.D. y Funder, J.W.  
Hormone receptors  
New Engl. J. Med. 301:1149-1161 (1977)
60. Lefkowitz, R.J; Wessels, M.R. y Stadel J.M.  
Hormones, receptors, and cyclic AMP: Their role in target cell refractoriness  
Current Topics in Cell. Regul. 17:205-230 (1980)
61. Ariens, E.J.  
Receptors: The materialization of concept  
Pharm. Weekbl. Scient. Edition 5:121-128 (1983)
62. Rodbell, M.  
The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction  
Nature 284:17-22 (1980)
63. Sutherland, E.W.; Oye, I.  
The action of epinephrine and the role of adenylyl-cyclase system in the hormone action  
Rec. Prog. Horm. Res. 21:623-646 (1965)
64. Catt, K.J. y Dufau, M.L.  
Peptide hormone receptors  
Ann. Rev. Physiol. 39:529-551 (1977)
65. Gottsman, M. y Werder, K.V.  
hCG-receptor protein in rabbit liver microsomes  
Acta Endocr. (Kbh) 82:40-42 (1976)



66. Rao, Ch. V; Mitra, S. y Carman Jr. F. R.  
Characterization of gonadotropin binding sites in the intracellular organelles of bovine corpora lutes and comparison with plasma membrane sites  
J. Biol. Chem. 256:2628-2634 (1981)
67. Niswender, G. D.  
Response of the corpus luteum to luteinizing hormone  
Environm. Health Persp. 38:47-50 (1981)
68. Mock, E.J. y Niswender, G.D.  
Differences in the rates of internalization of  $^{125}\text{I}$ -labeled human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, and epidermal growth factor by ovine luteal cells  
Endocrinology 113:259-264 (1983)
69. Mock, E.J; Papkoff, H. y Niswender, G.D.  
Internalization of ovine luteinizing hormone human chorionic gonadotropin recombinants: Differential effects of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits  
Endocrinology 113:265-269 (1983)
70. Hunter, W.M. y Greenwood, F.C.  
Preparation of iodine $^{131}$ -labeled growth hormone of high specific activity  
Nature 194:495-498 (1962)
71. Redshaw, M.R. y Linch, S.S.  
An improved method for the preparation of iodinated antigens for radioimmunoassay  
J. Endocr. 60:527-528 (1974)
72. Bergson, S.A.  
Insulin I $^{131}$  metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects  
J. Clin. Invest. 35:170-175 (1956)
73. Yalow, R.S. y Bergson, S.A.  
The hormones: Physiology, chemistry and applications. En: Hayes, R.L; Growitz, F.A. y Murphy, B.E.P. (ed).  
Radioisotopes in medicine: In vitro studies  
U.S. Atomic Energy Commission. Oak Ridge, Tenn. 1968, pp 177-181
74. Speland, D.H.  
Metabolism of labeled  $^{125}\text{I}$ -hCG by rat ovary  
En: Rosemberg, E. (ed). Gonadotrophins  
Los Altos, Calif. Geron-X Inc. 1968. pp 177-181
75. Dufau, M.L; Charreau, E.H. y Catt, K.J.  
Characteristics of a soluble gonadotropin receptor from rat testis  
J. Biol. Chem. 248:6973-6982 (1973)

76. Dufau, M.L; Charreau, E.H; Ryan, D. y Catt, K.J.  
Soluble gonadotropin receptors of the rat ovary  
FEBS Letters 39:149-153 (1974)
77. Haour, F. Saxena, B.B.  
Characterization and solubilization of gonadotropin receptor  
of bovine corpus luteum  
J. Biol. Chem. 219:2195-2205 (1974)
78. Catt, K.J; Dufau, M.L. y Tsuruhara, T.  
Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and chorionic  
gonadotropin  
J. Clin. Endocr. 34:123-132 (1972)
79. Schmidt-Gollwitzer, K; Schmidt-Gollwitzer, M. y Eiletz, J.  
Ovulation timing by a radioreceptor assay for human luteinizing  
hormone  
Int. J. Fertil. 22:232-237 (1977)
80. Scaglia, H.E; García, G; Vázquez, G; Larrea, F. y Pérez-Palacios, G.  
Comparative study of serum luteinizing hormone levels in human  
subjects as measured by radioimmunoassay and radioreceptorassay  
Fert. & Steril. 29:88-94 (1978)
81. Rodbard, D. y Catt, K.J.  
Mathematical theory of radioligand assays: The kinetics  
of separation of bound from free  
J. Steroid Biochem. 3:255-273 (1972)
82. Zettner, A.  
Principles of competitive binding assays (Saturation analysis)  
II. Sequential saturation  
Clin. Chem. 20:5-14 (1974)
83. Stauffer, C.E.  
Comments on "principles of competitive binding assays"  
Clinical Chemistry 20:89-90 (1974)
84. Rodbard, D.  
Statistical quality control of RIA  
J. Clin. Endocr. 28:1412-1415 (1968)
85. Rodbard, D.  
Statistical analysis of radioligand assay data  
Meth. Enzimol. 37:3-22 (1975)
86. Healy, J. R.  
Statistical analysis of radioimmunoassay data  
Biochem. J. 130:207-210 (1972)
87. Hartree, E. F.  
Determination of protein: A modification of Lowry method  
that gives a linear photometric response  
Analytical Biochem. 48:422-427 (1972)

88. Fischer, L.  
Introducción a la cromatografía en gel  
Editorial "El manual moderno" S. A. Méx. (1975)
89. Peterson, E.A.  
Intercambiadores celulósicos de iones (1a. ed)  
Editorial "El manual moderno" S. A. (1975)
90. Orstein, L. y Davis, B. J.  
Disc. electrophoresis  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404 (1964)
91. Lewis, V.J; Singh, R.N.P; Bonewald, L.F; Lewis, L.J. y Vanderlanan, W.P.  
Human growth hormone: Additional members of the complex  
Endocrinology 104:1256-1265 (1979)