



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**MÉTODOS QUÍMICOS DE EXTRACCIÓN DE GONADOTROPINA
CORIÓNICA HUMANA EN ORINA**

TRABAJO MONOGRAFICO

Que para obtener el Título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

presenta

JULIA BELLO RONQUILLO

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

I.- INTRODUCCION	5
2.- GENERALIDADES	7
2.1.- Estructura y propiedades de la Gonadotropina Coriónica Humana.	7
a) La subunidad alfa.	8
b) La subunidad beta.	10
2.2.- Relación entre la Estructura y Actividad	13
2.3.- Papel Fisiológico de la Gonadotropina Coriónica Humana.	15
3.- METODOS DE EXTRACCION	18
3.1.- Métodos de Precipitación.	20
a) Precipitación alcohólica.	20
b) Precipitación por acetona.	22
c) Precipitación por ácido tánico.	23
3.2.- Métodos de Adsorción.	24
a) Adsorción con ácido benzoico.	24
b) Adsorción de kaolín con precipitación por -- acetona'	26
c) Adsorción con hidróxido de aluminio.	27
4.- METODOS DE PURIFICACION	28
4.1.- Procedimiento de Gurin, Bachman y Wilson.	28
4.1.a) Fraccionamiento con acetona acuosa	29
4.1.b) Extracción con etanol al 50%.	30
4.2.- Procedimiento de Katzman y colaboradores.	34
4.3.- Procedimiento de Claesson y colaboradores.	34
4.4.- Método de W. R. Butt: Combinación del ácido ben- zoico-ácido tungstico.	35
4.5.- Procedimiento de Lejwa, modificado por Katzman y colaboradores.	39
4.6.- Purificación de Gonadotropinas derivadas de ori- na y de Glándula Pituitaria de Humano.	41
4.7.- Purificación por Cromatografía sobre carboxime- tilcelulosa y dietilaminoetilcelulosa y fosfato de calcio.	43

5.- METODOS APLICABLES A LA INDUSTRIA	46
5.1.- Adsorción con ácido benzoico.	46
5.2.- Adsorción con Kaolín-acetona.	46
5.3.- Adsorción por permutita.	46
6.- CUANTIFICACION DE LA HCG PURIFICADA	46
6.1.- Métodos Immunoquímicos.	47
6.2.- Métodos biológicos.	47
7.- USOS.	52
8.- CONCLUSIONES.	53
BIBLIOGRAFIA.	56

1.- INTRODUCCION.

La capacidad de la placenta para actuar como un órgano endocrino fué primero postulado por Halban, a principios de siglo, 1/; en 1927 Smith muestra claramente que la pituitaria es esencial para el desarrollo de las gónadas y concluye la existencia de las --gonadotropinas en la pituitaria anterior 2/. Las hormonas estimulantes de las gónadas son mucoproteínas, que se producen, ya sea en la pituitaria ó en la placenta, y se excretan en grandes cantidades en las gónadas de ambos sexos; ésta función es característica manifestándose tanto en animales intactos como en animales hipofisectomizados 3/.

Selye y colaboradores, reporta que en ratas hipofisectomizadas la función endocrina de la glándula pituitaria no es necesariamente indispensable para la continuación del embarazo normal y así llegar a la culminación del parto; varios investigadores 4/, 5/ y 6/, observaron que después de la hipofisectomía en el primer trimestre de gestación no hay efecto adverso a el curso de gestación en embarazos humanos; estas observaciones han sugerido que mientras las hormonas pituitarias están necesariamente en la ovulación y en la implantación próspera de el huevo fertilizado, las hormonas placentarias juegan un importante papel en el buen éxito de la continuación del embarazo.

La Gonadotropina Coriónica Humana (H.C.G.) se encuentra no solamente en la orina, sangre y tejido trofoblástico de embarazo de mujeres normales, sino que también en éstos materiales de mujeres menopausicas, mujeres con embarazos patológicos de diferentes categorías como son los a) embarazos tempranos y b) embarazos tardíos.

Los primeros comprenden: Aborto, neoplasias trofoblásticas como mola hidatidiforme, mola destructiva y coriocarcinoma.

Los embarazos tardíos incluyen: Embarazo inter alia abdominal, defectos congénitos del feto, embarazo múltiple, hipertensión, isoinmunizaciones Rh, desorden del metabolismo de carbohidratos, - embarazos prematuros y posteriores 7/.

La H.C.G. fué la primera hormona aislada de la placenta.- Ha biéndose establecido que la HCG es sintetizada por el tejido coriónico 8/.

Todos los padecimientos anteriormente mencionados, así como los estados normales de embarazo excretan grandes cantidades de HCG, eliminándose por la orina, la cual la hace un material rico en contenido de hormonas gonadotróficas. Siendo éste producto abundante, barato y de fácil adquisición; no es nada difícil tomarlo como materia prima para la producción de grandes cantidades de HCG pura. El cual es propósito de éste trabajo dar información y una guía de varios métodos químicos de extracción y de purificación de HCG, partiendo principalmente de orina y en uno ó dos métodos de glándula pituitaria, mencionando sus ventajas y desventajas así como su evaluación tanto en métodos biológicos como en inmunológicos.

2.- GENERALIDADES.

2.1.- Estructura y Propiedades de la HCG:

La Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), pertenece al grupo de hormonas glicoproteicas; las cuales son proteínas conjugadas -- que contienen grupos de carbohidratos unidos covalentemente a una cadena polipeptídica, como las que presentan hormonas pituitarias: Hormona Luteinizante (LH), Hormona Folículo Estimulante (FSH), --- Hormona Estimulante de las Células Intersticiales (ICSH) y la Hormona Estimulante de la Tirotrópina (TSH); que tienen ciertas similitudes en propiedades biológicas e inmunológicas, parte de las -- cuales son explicadas por su distribución común de la cadena alfa.

La HCG tiene un peso molecular cercano a 39,000 9/, del cual aproximadamente 30% de su peso son carbohidratos, como el ácido -- N-acetilneuráminico (NANA-ácido síalico) y fucosa en unidades terminales no reducidas 10/.

El alto contenido del ácido síalico contribuye para explicar su bajo punto isoeléctrico, que es de 2.95. Variaciones en el contenido de este ácido, las cuales han sido estudiadas 11/, 12/, 13/ y 14/, han ayudado para explicar la heterogeneidad electroforética desde el punto de vista isoeléctrico. Por lo que la heterogeneidad en HCG puede surgir de variaciones en los dos constituyentes: Carbohidratos y Aminoácidos. Llegándose a esta conclusión --- cuando se observó que al eliminar restos de ácido síalico de la -- banda paterna, así como la eliminación de carbohidratos, la cadena péptida a pesar de estas eliminaciones conserva su heterogeneidad 15/ y 16/. Amparándose éstos resultados por observaciones ---- hechas en la secuencia N-terminal de la subunidades alfa (ver la -- fórmula desarrollada en la Fig. 1).

Estudios estructurales hechos sobre la gonadotropina coriónica humana obtenida de orina de embarazos humanos, enseñan que -- consiste de dos subunidades diferentes, de enlaces no covalentes; -- llamadas subunidades alfa y beta. Que pueden ser disociadas por --

urea y han sido aisladas y purificadas 17/, 18/ y 19/.

Una importante característica de la HCG está en la composición de los aminoácidos, la cual posee un alto contenido de prolina, muy similar al que contiene la proteína colágena 20/. Una gran cantidad de serina está también presente, mientras que triptófano está ausente.

a).- La Subunidad Alfa:

La subunidad HCG-Alfa es un glicopéptido con un peso molecular de 14,900, del cual la proporción proteica representa 10,200 y los carbohidratos 4,700. La secuencia completa de aminoácidos es de 89-92 residuos, propuesta por Morgan y colaboradores 21/, 22/ y 23/.)Fig.1).

Ambos grupos de investigadores encontraron heterogeneidad en los amino terminales. Aproximadamente 30% de toda la cadena HCG-Alfa escasean los tripéptidos terminales, y otro 10% de dipéptidos terminales. El mismo tipo de heterogeneidad N-terminal ha sido reportado en la subunidad-alfa de la FSH de orina humana. Tales heterogeneidades pudieran representar moléculas precursoras en varias etapas de unión; pero puede también ser por la digestión durante la excreción urinaria ó incluso durante la purificación de la hormona.

La HCG-Alfa presenta 5 enlaces disulfuros, aunque no se han encontrado la presencia de grupos sulfidrilos libres. Parece ser que la misión de los enlaces disulfuros así como algunos de los grupos amino es permanecer fijos para ser completados.

Los carbohidratos totales de HCG-Alfa están contenidos en dos cadenas de oligosacáridos, las cuales son atacadas por enlaces N-glicosídicos, tales como los residuos de asparagina en posiciones 52 y 58.

Su estructura, designada tipo I por Bahl 24/ y 25/, se compara con el tipo II de la subunidad-beta, en la fig. 2. Las cadenas terminan en fucosa ó ácido N-acetilneuramínico, teniendo residuos galactosídicos en las posiciones subterminales 26/. La secuencia de los aminoácidos en los sitios de ataque son del tipo Asn-X-Thr comunmente asociado con las conecciones de los carbohidratos- (ver Fig.1).

NH₂-Ala-Pro-Asp-Val-Gln-Asp-Cys-Pro-Gln-Cys-Thr-Leu-Gln-
 I 5 10
 Glu-Asp-Pro-Phe-Phe-Ser-Gln-Pro-Gly-Ala-Pro-Ile-Leu-
 15 20 25
 Gln-Cys-Met-Gly-Cys-Cys-Phe-Ser-Arg-Ala-Tyr-Pro-Thr-
 30 35
 Pro-Leu-Arg-Ser-Lys-Lys-Thr-Met-Leu-Val-Gln-Lys-Asn-
 40 45 50
 Val-Thr-Ser-Gln-Ser-Thr-Cys-Cys-Val-Ala-Lys-Ser-Tyr-
 55 60 65
 Asn-Arg-Val-Thr-Val-Met-Gly-Gly-Phe-Lys-Val-Glu-Asn-
 70 75
 His-Thr-Ala-Cys-His-Cys-Ser-Thr-Cys-Tyr-His-Lys-
 80 85 90
 Ser-COOH.

Fig. I.- Secuencia lineal de aminoácidos en la subunidad HCG-alfa. Basada sobre las investigaciones de Bahl y colaboradores (1972 y Morgan y colaboradores (1975)).

-Asn-GNac-Man ^a , Man ^a , Man ^a , Man				-Asn-GNac-Man ^a , Man ^a , Man ^a , Man			
I	I	I		I	I	I	
Ib	Ib	Ib		Ib	Ib	Ib	
I	I	I		I	I	I	
GNac	GNac	GNac		GNac	GNac	GNac	
	I	I		I	I	I	

Gal	Gal
I	I
Ia	Ia
I	I
NANA	NANA

(I)

Gal	Gal	Gal
I	I	I
I	Ia	Ia
I	I	I
Fuc	NANA	NANA

(II)

-Ser-GalNac-Gal-NANA

(III)

Fig.2.- Estructura de unidades de carbohidratos de HCG. La estructura (I) muestra la secuencia de los monosacáridos de la HCG-Alfa. La estructura (II) representa la secuencia de monosacáridos en la cadena de asparagina de la HCG-beta. La estructura (III) es una secuencia de monosacáridos en la cadena serina de la HCG-beta.

b).- La Subunidad Beta:

El peso molecular de HCG-beta es aproximadamente 23,000, algunos investigadores reportan 16,000 para las proteínas y 7,000 para la porción de carbohidratos de la molécula. La secuencia lineal de aminoácidos se muestra en la figura 3, basada en estudios hechos por los grupos Ganfiel's y el grupo Bahl's 21/, 22/ y 27/. Aunque hay discrepancias de las estructuras propuestas; el primer grupo reportó 145 aminoácidos presentes, mientras que el segundo reportó 147. El primero encontró ácido glutámico, y el segundo glutamina en la posición 3; valina en lugar de leucina en la posición 55; un residuo de serina extra en la posición 138. Los del primer grupo no encontraron indentificación para el tripéptido terminal Ser-Leu-Pro descrita por el segundo grupo. Ninguno de los dos reportó una heterogeneidad N- ó C-Terminal.

En resumen éstos investigadores difieren tanto en el número como en las posiciones de ataque a los carbohidratos en la cadena polipeptídica de la HCG-beta, Bahl reporta 5 unidades de carbohidratos, 2 eslabones a asparagina en posiciones 13, y 30, y tres pequeñas cadenas (NANA-galactosa-N-acetilgalactosamina) eslabón-

La secuencia de aminoácidos adyacentes a las unidades carbohidratos eslabón-serina no es constante en HCG-beta. Sin embargo la concentración usualmente alta de prolina en la vecindad de sitio de ataque, y la secuencia Pro-X-Pro-Ser son notables.

Los residuos de HCG-beta tienen una homología cercana al 80% con la hormona Luteotrófica-beta (LH-beta) en los 115 a 119 residuos iniciales, siendo menor la homología con la TSH-beta.

La HCG-beta, como se observa en la figura 3, además de los 119 residuos tiene 30 residuos adicionales y un C-terminal, el cual no se ha encontrado en ninguna de las subunidades beta de las otras hormonas glicoproteicas. A éstos últimos residuos se les atribuye la especificidad biológica ó inmunológica de la HCG, en donde nueve de éstos residuos son prolinas, y cuatro de las serinas poseen cadenas laterales de carbohidratos; esta región es completamente resistente a la proteólisis in vitro y protege a la molécula de ataque proteolítico in vivo, cooperando posiblemente en la circulación de la HCG para prolongar la vida media de la hormona, en comparación con otras hormonas glicoproteicas.

Se ha reportado que el anti-HCG-beta del conejo reacciona completamente con la HCG en una mezcla de HCG y HLH 30/ y 29/; éstos anticuerpos probablemente reconocen la unidad estructural del C-terminal de la HCG-beta. Otros investigadores 32/ han reportado la síntesis química de un eicosapéptido relacionado a el C-terminal de la HCG-beta, que es capaz de inducir la formación de anticuerpos que pueden interactuar con la molécula completa de HCG. Esta secuencia específica ha sido usada para preparar anticuerpos para control de la fertilidad 33/. Esto sugiere que la determinación antigénica de HCG-beta reside en la región del C-terminal, (que es suficientemente accesible a la interacción con los anticuerpos directamente relacionados a las unidades determinantes).

También se ha encontrado que la HCG posee una actividad parcial de FSH 34/, y es posible que éstos residuos terminales (los cuales componen la gran diferencia entre la HLH y la HCG), sean -

los responsables para tal actividad tan discutida.

La porción de carbohidratos de HCG-beta es sustancialmente diferente de las otras hormonas glicoproteicas, debido a que sus subunidades no contienen las cadenas de unión-serina como la HCG.

2.2.- Relación entre la Estructura y la Actividad:

Dos tipos de modificaciones estructurales han sido notadas para efectos de la actividad biológica e inmunológica de la HCG:

- 1a.) Disociación subunitaria.
- 2a.) Eliminación de carbohidratos.

1a.) Disociación de las subunidades.- Es un tratamiento con urea para disociar la HCG en sus subunidades marcándolas con tritio (las cuales son las que desarrollan la actividad biológica), con Iodo₁₂₅ ó competencias en ensayos de radioreceptores in vitro-28/, 31/, 35/, 36/ y 37/. Aunque la disociación de las subunidades pueden unirse nuevamente cuando son incubadas en concentraciones equimoleculares en solución, recuperando su estructura nativa, con la misma movilidad electroforética y funcionando con un 80% de la actividad biológica original 26/, 28/, 38/, 39/, 40/ y 41/.

Esta propiedad ha sido explicada a base de experimentos de hibridización, formando glicoproteínas híbridas ó subunidades híbridas específicas de HCG; concluyéndose con los resultados obtenidos que por medio de éstas hibridizaciones se recupera la actividad biológica y encontrándose específicamente esta propiedad en la subunidad-beta, extrapolándose éstos resultados a las demás hormonas glicoproteicas.

Existen dos posibles razones para explicar la inactividad biológica in vitro (parcial, aproximadamente el 20%), al efectuarse el aislamiento de las subunidades:

- a) no sobreviven lo suficiente para alcanzar sus células --- blanco.
- b) Su unión disminuye a receptores que contienen las membranas de las células blanco.

Braunstein y colaboradores 32/ reportan una cantidad considerable de vida media de las subunidades HCG, por disociación, comparadas con la hormona sin disociar y habiéndose inyectado a ratas - hembras. La vida media inicial de la HCG-alfa en el plasma fué de seis minutos, la HCG-beta duró once minutos y la HCG intacta 141 - minutos. Otros investigadores 36/ concluyen que las subunidades no se unen a las células blanco in vitro.

2a.) Eliminación de carbohidratos. El comportamiento de la - HCG por la eliminación de sus carbohidratos se efectúa con tratamiento enzimático, por medio de la neurominidaza 24/ y 42/, 6 ---- hidrólisis ácida 42/, 43/ y 44/, afectándose también la actividad biológica de la hormona.

La especificidad biológica de preparaciones de HCG decrece - con la eliminación progresiva de ácido siálico, por lo que se presenta notable pérdida de los residuos terminales de éste ácido -- en la molécula. Con menos del uno por ciento de actividades continúa aún a pesar de haber perdido el 70% de ácido siálico, 43/, 49/, 45/, 46/, 47/ y 48/. La disminución de la actividad biológica está en relación directa con la vida media en el plasma de la hormona - sin carbohidratos. Por ejemplo se ha reportado 50/ que al eliminar el 25% del ácido siálico, la HCG disminuye un 50% su vida media -- plasmática. Además la eliminación del 62% reduce dramáticamente la vida media plasmática en menos de un minuto; esto es análogo a la disminución clara de las proteínas plasmáticas en la sangre con - relación a su vida media por consecuencia de la eliminación de sus ácidos siálicos terminales. Por lo que se sugiere que el ácido --- siálico juega un papel muy importante en la protección de la hormona en la degradación metabólica.

2.3.- Papel Fisiológico de la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG)

En una forma esquemática la figura 4 resume las funciones principales atribuidas a la HCG. Fundamentalmente la HCG desempeña un importante papel en el metabolismo de esteroides, durante el embarazo por estimulación del cuerpo lúteo para producir progesterona durante las primeras diez semanas de gestación, aunque en el inicio del embarazo, la glándula pituitaria produce gran cantidad de Hormona Luteinizante (LH), la cual estimula la secreción de la progesterona aparentemente por una depresión del factor apropiado de liberación hipotalámica de la HCG; los cuales son dependientes las siguientes funciones:

- 1) Implantación del Embrión y
- 2) Desarrollo temprano del embrión intrauterino.

La secreción dentro de la sangre materna de grandes cantidades de HCG, en el inicio del embarazo, asegura un continuo estímulo a la corporea lútea para formar progesterona hasta la unidad fetoplacentaria que va más allá de la producción de esteroides en una etapa más desarrollada del embarazo. Esto se ha demostrado por el incremento de la incorporación de ^{14}C al acetato de progesterona en una rebanada de corporea lútea incubada con HCG 51/.

Aunque la placenta posee todas las enzimas necesarias para la síntesis de acetato de progesterona se manifiesta ser más dependiente en el colesterol presente en el plasma materno como el anterior del cual la placenta hace pregnenolona, seguida por la progesterona.

La placenta carece de enzimas para convertir un C_{21} esteroide a un C_{19} andrógeno por el traslado de la cadena lateral, y en consecuencia la pregnenolona es exportada tanto en la circulación fetal, como maternal ó exportada entre la circulación fetal maternal y el propio feto; la corteza adrenal quita la cadena lateral y forma el andrógeno dehidroepiandrosterona (DHEA), que llega sulfatada en las partes adrenal y biliar del feto, sufriendo en parte el andrógeno una 16-alfa-hidroxilación.

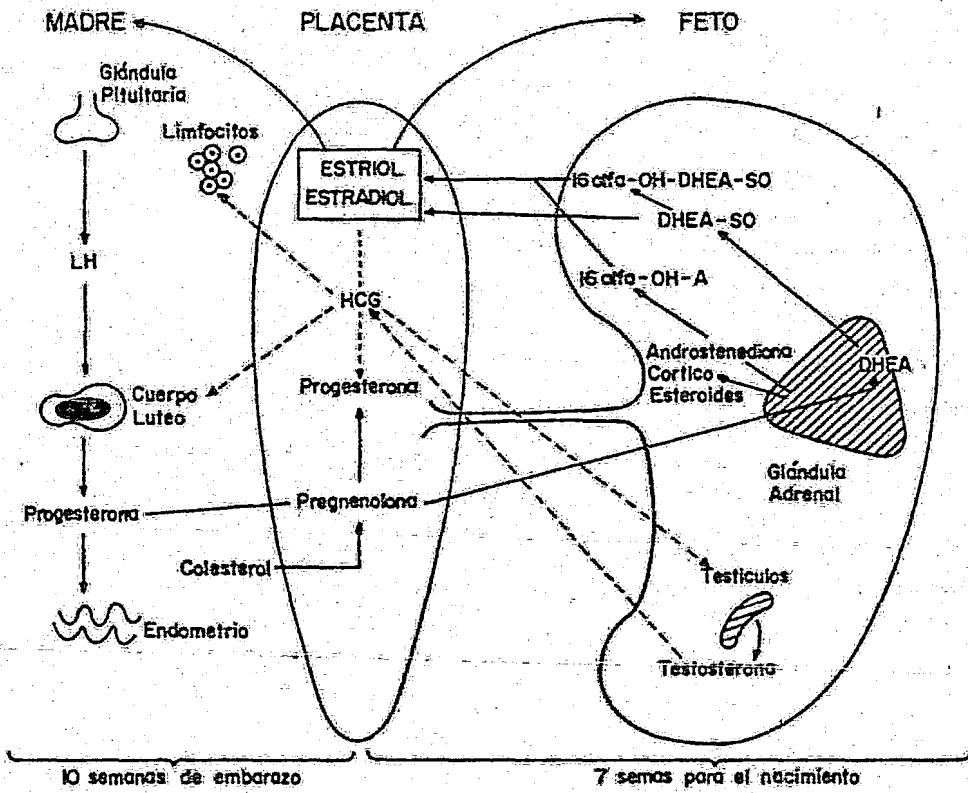


Fig. 4.- Papel fisiológico de la Gonadotropina Coriónica Humana.

Son tomados completamente por la placenta la DHEA-sulfatada y sus derivados de la 16-alfa-hidroxilación, mientras que el sulfato es trasladado ó quitado por un sistema muy activo para la aromatización del C_{19} de esteroides a C_{18} de estrógeno, convirtiéndose la DHEA y sus 16-alfa-hidroxilados a estradiol y estriol respectivamente.

Por lo que se puede resumir, que, la progesterona de la placenta es convertida por la corteza adrenal fetal a androstenediona, a glucocorticoides y mineralcorticoides. Como un resultado de la hidroxilación, la 16-alfa-hidroxiandrostenediona es también producida por la corteza adrenal del feto, y puede ser un precursor de estrógenos placentarios. La pregnenolona entra a la circulación maternal de la placenta, sufriendo una conjugación similar con sulfato y 16-alfa-hidroxilación, llegando a una segunda fuente menos importante de precursores para la producción estrogénica placentaria.

La HCG se manifiesta la promover varias fases de esteroidogénesis en la unidad fetoplacentaria:

- 1o.) Ville 51/, demostró con preparaciones de placenta humana incubada, que la HCG estimula la conversión de colestero_l a pregnenolona y progesterona 52/.
- 2o.) La síntesis de DHEA por la corteza adrenal fetal parece ser estimulada por HCG, como evidencia se ha observado que aumenta la excreción de DHEA en la orina del recién nacido, después de la administración de HCG 53/. Esto es como un simulacro de la acción de la HCG durante el embarazo, puesto que fisiológicamente hay una cantidad significativa de HCG en la circulación fetal 54/ y 55/.
- 3o.) La etapa inicial en la aromatización del anillo A de los esteroides en su conversión a estrógenos por la placenta llamada hidroxilación de el C_{19} de los andrógenos precursores, parece ser estimulada por la HCG y por la-LH, que es su hormona análoga de la glándula pituitaria

56/. Otros investigadores 57/, 58/ y 59/ dicen que la HCG promueve la formación de estradiol por la placenta, - evidente conflicto con Ryan y Ville 60/ y 61/ porque -- ellos defienden que la placenta no juega ningún papel - fuera de la 16-alfa-hidroxiación necesaria para la formación de éste estrógeno.

Hay evidencias que la HCG desempeña un papel en la diferenciación de las gónadas fetales 34/; como evidencia se observa por los bajos niveles de HCG cuando el feto es un varón y concentraciones elevadas de testosterona plasmática en fetos de 12 a 18 semanas de gestación 62/, por lo que hay una relación entre la excreción de HCG y la diferenciación morfológica de los testículos del feto con acompañamiento de hiperplasia de las células de Leyding - 63/ y 64/.

Respecto a los efectos de la HCG al desarrollo ovárico hay - incertidumbre acerca de la actividad folículo estimulante de la -- HCG, por lo que aún no ha sido comprobado un papel fisiológico de la HCG para el desarrollo ovárico 65/ y 66/.

Finalmente el papel sostenido de la HCG como un inmunosupresor durante el embarazo es controversial. Varios investigadores -- 67/, 68/, 69/, 70/ y 71/ han mostrado que la HCG inhibe la estimulación de linfocitos por fitohemaglutinina en conformidad con la - observación de que los linfocitos de mujer embarazada son los responsables de éste fenómeno, y otras dificultades evidentes de funciones inmunológicas por la HCG; aunque queda la sospecha de que - los resultados anteriores sean una contaminación de preparaciones de HCG con varios inmunosupresores.

3.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

La presencia del principio de gonadotropina en orina de señoras embarazadas fué primero reportado por Aschheim y Zondeck en 1927, 82/. Browne y Venning en 1936, 83/, encontraron que la excre-

ción urinaria de HCG llega a su máxima concentración durante el --- período que comprende el sesentavo y ochentavo días de embarazo, - siendo confirmado por otros investigadores 84/ y 85/. Aunque Gurin, Bachman y Wright 86/, recomiendan recolectar las orinas de las señoras embarazadas que se encuentran entre los cincuenta y noventa días siguientes al último período menstrual.

Para la extracción de la HCG en la orina se ha recurrido al uso de varios reactivos químicos, desde solventes hasta adsorventes. Los iniciadores de estas extracciones 87/ precipitaron el --- principio con alcohol; otros investigadores emplearon adsorventes para la adsorción directa de la hormona en la orina. El método del ácido benzoico ha sido propuesto como modelo ó uno de los métodos más efectivos y reactivos útiles 88/.

Gurin y colaboradores 86/ tuvieron éxito en preparados de -- productos de alta pureza, que al correrse en electrofóresis, ultre centrífuga y difusión corrió como una sólo sustancia.

Katzman y colaboradores 89/ obtuvieron una preparación con - la misma potencia biológica como el material de Gurin, por adsor-- ción cromatográfica sobre permutita, seguida por una elución con - acetato de amonio al 10% en solución alcohólica acuosa.

Claesson y colaboradores 90/ describieron un procedimiento - para la cristalización de un ensayo electroforético de una prepara-- ción homogénea de HCG con un resultado de 6,000-8,000 Unidades --- Internacionales por mg. (UI/mg).

W R. Butt propuso también un método de extracción cuantita-- tiva de gonadotropinas, a partir de orina de señoras embarazadas, - dependiendo de la precipitación de la gonadotropina con una mezcla de ácidos: benzoico y tungstico 91/.

Katzman, Godfrid y colaboradores modificaron el método de -- Lejwa, obteniendo un producto de alta pureza 92/.

Rigas, Paulsen y Heller propusieron un método cuyo objetivo es obtener un material purificado, no tóxico con la menor pérdida de actividad gonadotrópica, empleando para ello la precipitación-etanólica, ultrafiltración y la electroforesis para su purificación 93/.

A continuación se exponen los métodos de precipitación, adsorción y ultrafiltración a partir de orina, para obtener la Gona dotropina Coriónica Humana.

3.1.- Métodos de Precipitación.

a).- Precipitación alcohólica.- Esta Técnica con varias -- modificaciones, ha sido usada por numerosos investigadores 94/, - 95/, 96/, 97/, 98/ y 99/, etc.; el procedimiento en general es -- sencillo, comentándose en éste trabajo la técnica modificada por Heller y Heller 96/, que es la que ha reportado mejores resultados:

- 1o.- Se toman alícuotas de orina de 500 ml.
- 2o.- Se ajusta el pH de la orina a un rango de 4.0 a 6.0.
- 3o.- Se inicia la precipitación agregando 4 volúmenes de --- alcohol al 95%.
- 4o.- Se deja en el cuarto frío (temperatura aproximada a -- 5°C) durante toda la noche.
- 5o.- Al día siguiente se sifona el líquido sobrenadante (procurando no arrastrar precipitado).
- 6o.- Se centrifuga el residuo.
- 7o.- Se hacen de 3 a 4 lavados; centrifugándose con éter.
- 8o.- El extracto crudo de la HCG se seca al vacío.
- 9o.- Se lava nuevamente, pero ahora 3 veces con agua; centri fugándose la suspensión, una y otra vez, reteniéndose - el sobrenadante, el cual contiene la HCG.

100.- Se reprecipita otra vez con alcohol al 95%, se lava con éter y se seca al vacío.

En comparación con la técnica del ácido tánico (que más adelante se discute), éstos extractos crudos obtenidos son menos tóxicos a animales de laboratorio, que los extractos preparados por el método de ácido tánico.

En general, la técnica de precipitación por alcohol ha dado resultados satisfactorios, cuando se han empleado orinas de altos títulos de HCG, como el material que proviene de mujeres menopausicas y de varios tipos de fallas ováricas y testiculares. Aunque se obtienen productos bastantes tóxicos cuando se emplean orinas con títulos bajos de HCG, como son las que provienen de: hombres y mujeres con menstruaciones normales 96/. Para reducir la toxicidad del producto Heller y Chandler 100/ sugirieron el uso de sales inorgánicas, particularmente cloruro de sodio, usándolas como concentración final de contracorriente por diálisis, así disminuye la toxicidad del producto sin afectar en nada a la gonadotropina. Esta modificación ha sido experimentada en estudios clínicos en el nombre 101/, 102/, 103/, 104/ y 105/.

Aunque Varney y Koch 101/ demostraron que la extracción acuosa del producto crudo obtenido por la precipitación alcohólica, seguida de una diálisis y precipitado, causa una norma en la actividad del producto, aproximadamente en un 50%; ésta pérdida puede ser atribuida a la extracción, ó bien a la reprecipitación, por lo que los investigadores sugieren que al material crudo se le haga una extracción con alcohol al 50%, reprecipitando la gonadotropina en solución por la adición de 4 volúmenes de alcohol; purificándose mejor el producto que los extractos llevados a la diálisis con éter.

El polvo (extracto crudo de la HCG) se seca y se eluye tres veces con agua, la suspensión se centrifuga una y otra vez, rete-

niéndose el sobrenadante. Estos extractos crudos preparados por la precipitación alcohólica fueron menos tóxicos a animales de laboratorio, que los extractos preparados por el ácido tánico).

En general, la técnica de precipitación por alcohol ha dado resultados satisfactorios en títulos altos tales como los que se han encontrado en la menopausia y en varios tipos de fallas ováricas y testiculares. Sin embargo hay orinas con títulos bajos (por ejemplo verdigracia en hombres y en mujeres con menstruaciones normales).

Los extractos alcohólicos crudos son también frecuentemente, tóxicos para animales de laboratorio. Heller y Heller (1939) 96/ y Heller y Chandler (1942) 100/ sugirieron el uso de sales inorgánicas, particularmente NaCl, usándolas por diálisis como concentración final de contracorriente, de ésta forma se reduce la toxicidad del producto, sin afectar en nada a la gonadotropina. Esta modificación ha sido experimentada en estudios clínicos en el hombre (Klinefelter y col. 1943, 98/) Heller y Nelson, 1945 -- a, b, 1948, 102/, 103/, 104/, Jungek y col. 1947; 105/. Sin embargo Varney y Koch (1942) 101/, encontraron que la extracción acuosa del producto crudo obtenido por la precipitación alcohólica, seguida de una diálisis y precipitado, causa una merma en la actividad del principio activo, aproximadamente en un 50%. Esta pérdida puede ser atribuida a la extracción, ó bien a la precipitación. Las etapas de la extracción del material crudo, con alcohol al 50% y reprecipitación de la gonadotropina en solución, por la adición de 4 vol. de alcohol, es una purificación más eficiente donde mejores productos y menor toxicidad que los extractos llevados a la diálisis se obtienen.

b).- Precipitación por Acetona.- Este procedimiento ha sido empleado sobre la estimación de la H.C.G. en orina humana, excluyendo a las señoras embarazadas, por Frank y Salmón 106/ y Osterberg 107/. Investigadores de The United Kingdom prefirieron en sus ensayos usar acetona en lugar de alcohol como un agente precipi--

tante para gonadotropinas, por razones de economía (Ieraine 1949- a 108/; 1950 109/, Dekanski, 1949, 110/. La técnica de extracción es muy similar al que fué descrito por el método de alcohol. Es - estudios clínicos se han obtenido resultados satisfactorios cuando es alta extracción de gonadotropina, pero en orinas de títulos bajos se obtienen extractos gonadotróficos tóxicos para los animales de laboratorio.

c).- Precipitación con ácido Tánico.- Levin y Tindale (--- 1936) III/ reportaron que la gonadotropinas pueden ser extraídas cuantitativamente de orina humana por precipitación con ácido --- Tánico, llevando a cabo varios ensayos:

1.- En el primer ensayo el pH de la orina fue ajustado a 5.0 precipitando alicuotas de 1000 ml. con 20 ml. de solución acuosa de ácido tánico al 10% se deja sedimentar el precipitado y -- después se centrifuga. El precipitado, que es abundante, se extrae varias veces con alcohol al 90-95%, lavándose varias veces con acetona.

De cada litro de orina se obtuvieron de 100-200 mg. de "polvo de tanato crudo", conteniendo de 75-100 por ciento de la actividad gonadotrófica original. El material crudo se purificó -- por cuatro a cinco extracciones con una mezcla de acetato de bario-hidróxido de bario a pH entre 9.0 a 10.0, seguida por -- la precipitación de acetona. Finalmente el polvo fué disuelto en alcohol al 60% a un pH entre 9.0 a 10.0.

2.- El pH más tarde, fué llevado a 6.5, formándose un precipitado que se lavo varias veces con alcohol al 60% ; la solución alcohólica color café se adicionó a los lavados precipitándose con un volumen igual de acetona, el precipitado se lava con acetona y se seca al vacío. El polvo finalmente obtenido contenía de 10-15 mg./lt. de orina original, este producto fué -- completa soluble en agua, conteniendo 80-100% de la actividad gonadotrófica original, y demostró ser no tóxica al ser administrada a ratones completos y ratas hipofisectomizadas.

Las preparaciones extraídas por la precipitación con ácido tánico han sido usadas en estudios clínicos por Pederson Bjergard 112/, Rhothemich y Feltz 113/, Levin 114/, Pederson-Bjergard y Tonnesen 115/ ; Funnel y col. 116/,. Sin embargo otros investigadores no han obtenido resultados satisfactorios con ésta técnica. Heller y Heller (1939) 96/ usaron orina menopausica, y fueron incapaces de obtener productos cuantificables de gonadotropina por precipitación con ácido tánico y encontraron que el tánico crudo era también tóxico para ensayos biológicos de rutina; varias etapas de purificación no redujeron su toxicidad, por el contrario se notó que era más marcada. Estas observaciones fueron confirmadas por Varney y Koch (1942) 101/ y por Smith y col. 117/. Después de haber revisado éste método en general opinaban que es un método muy laborioso y tedioso, en comparación con el método de precipitación con alcohol ó adsorción sobre Kaolín, y por lo tanto no pudo ser recomendado como un procedimiento de rutina para la extracción de gonadotropinas de orinas de humanos no preñadas.

3.2.- Métodos de Adsorción.

a).- Adsorción con ácido Benzoico.

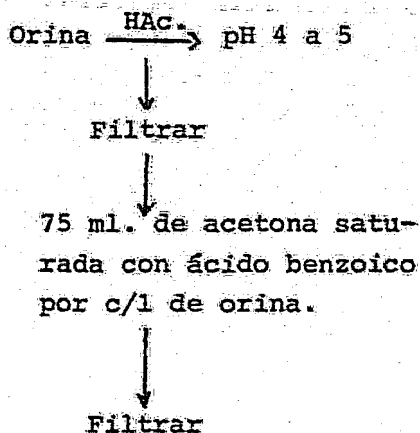
En el procedimiento descrito por Katman y Doisy (1934) 118/, la orina previa refrigerada se acidifica a pH 5.0 y por cada litro de orina se agrega 75 ml. de acetona saturada con ácido benzoico. El precipitado se colecta sobre un buchner, lavándose con solución acuosa saturada de ácido benzoico y se disuelve en acetona fría. El material insoluble en acetona, el cual contiene las gonadotropinas, se lava con acetona y se disuelve en NaOH diluido. Un poco de material insoluble se elimina por centrifugación. Más adelante los extractos se concentran agregando 10 volúmenes de acetona fría. El precipitado se seca y disuelto en un volumen de agua, como esta técnica concentra aproximadamente 200 veces más la orina.

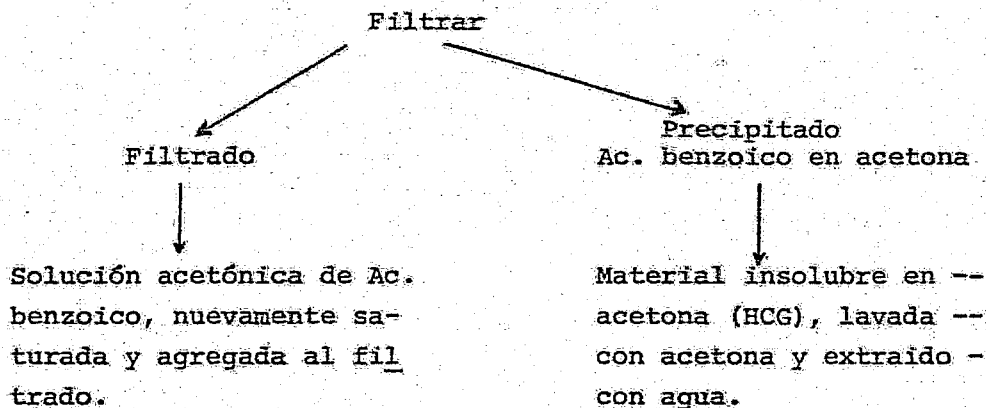
Katzman, Varney y Koch usando orina menopausica; compararon las técnicas de precipitación alcohólica y la adsorción por el -- método del ácido benzoico, encontrando que el producto de gonadotropinas obtenido por el método del ácido benzoico fué considerablemente más bajo que el obtenido por la precipitación con alcohol, debido a que la precipitación etanólica arrastra junto con el principio activo otras impurezas como estrógenos, mientras que el método del ácido benzoico da productos de mayor pureza, aunque rendimientos inferiores. Por lo que, es evidente, este procedimiento no puede ser recomendado para la extracción de gonadotropina en orina de personas no embarazadas cuando se requiere ensayos cuantitativos. El método es, sin embargo, simple y rápido y se adapta a condiciones industriales cuando se necesita obtener cantidades grandes de principio activo 88/.

Las etapas del procedimiento de Katzman son indicadas en el diagrama.

DIAGRAMA

Preparación del extracto de la estimulación-ovárica por el Método del Acido Benzoico





b).- Adsorción de Kaolín con precipitación por acetona

En 1941 Scott 119/ describe un método para la extracción de HCG, a partir de orina de señoras embarazadas. La hormona fué adsorbida sobre kaolín a pH de 4.0 y eluída por hidróxido de sodio-O.I.N. Sin embargo los extractos preparados por el método original de Kaolín, comunmente no son suficientemente concentrados -- para permitir la estimación de gonadotropina en orina de mujeres-embarazadas. Bradbury 120/, Loraine 109/ y Dekanski 110/, han precipitado las gonadotropinas por alcohol ó acetona, después de la adsorción y elución. Los preparados extraídos por las técnicas de Kaolín-Acetona ó Kaolín-alcohol han dado confianza para la administración adecuada a ratones intactos y a ratas hipofisectomizadas 121/ y 122/.

El método de Kaolín-acetona se ha investigado en varios experimentos recopilados; los cuales reportan que se agrega gonadotropina menopausica humana (H.M.G.) a un pool de orina masculina-Lorain y Brown. Los extractos fueron ensayados biológicamente por la prueba de útero de ratón; encontrándose que debe de controlarse cuidadosamente el pH, esencialmente en las etapas de adsorción y elución.

El pH crítico para la adsorción de H.M.G. fué 4.0 cuando el pH descendió a 3.5 ó ascendió a 4.5 aproximadamente el 40% del material activo no fué adsorbido. Se obtubieron pérdidas de aproximadamente 50% a pH de 10.0 y 12.0. Para las etapas que involucran precipitación con 5 volúmenes de acetona, no fué esencial el cuidadoso control del pH y se produjeron satisfactoriamente buenas cantidades de H.M.G., encontrándose el rango de pH entre 3.0 y 6.0.

En estudios subsecuentes de gonadotropinas fueron extraídas de muestras de orina masculina y de orina colectada durante las fases folicular y luteotrofica en el ciclo menstrual normal 123/; teniéndose el mismo cuidado de controlar el pH, encontrándose que los pH's óptimos para la adsorción y elución de gonadotropinas masculinas y del ciclo femenino son muy similares a las del proceso de HMG.

c).- Adsorción con Hidróxido de aluminio

Esta técnica 124/, es similar en muchos aspectos a el método de Kaolín-acetona. Las gonadotropinas urinarias fueron adsorbidas antes del bioensayo el precipitado seco se coloca en agua ó en solución salina. Van Gilse 128/ investigó el papel de la adsorción en la ultrafiltración y estimó que el 80-90% de la actividad gonadotrópica es adsorbida sobre la membrana coloidal.

Jungek y col. 129/ compararon los métodos de ultrafiltración y precipitación-diálisis alcohólica para la recuperación de gonadotropinas de orina de personas no embarazadas. Los métodos de ensayo dependen del crecimiento del ovario y útero en ratas inmaduras intactas y concluyeron que el método de la ultrafiltración es preferible que el método de precipitación-diálisis alcohólica, porque es menos compleja, menos laboriosa y más económica, los productos que se obtienen en los 2 métodos son muy similares con respecto a la actividad gonadotrópica. Kassenaar y Paesi 130/ extrajeron de muestras de orina de pacientes con el síndrome de Klinefelter y síndrome de Turner por el método de ultrafiltración y demostraron la actividad de otras hormonas que

estaban presentes como la hormona Foliculo Estimulante (F.S.H.) - y la Hormona de Estimulación de Células Intersticiales (I.C.S.H.) en sus extratos.

4.- METODOS DE PURIFICACION

Después de haber analizado los métodos empleados para la -- extracción de las gonadotropinas, a partir de varios tipos de orina (orina de hombres; mujeres en su ciclo menstrual, menopáusicas, postmenopáusicas y embarazadas; así como de hombres y mujeres enfermas, cuyas enfermedades son productoras de gonadotropinas). Se exponen los métodos de purificación de los extratos obtenidos por los métodos anteriores.

4.1.- Procedimiento de Gurin, Bachman y Wilson. 86/

En 1939, Gurin y colaboradores describen un método para la obtención de H.C.G. altamente purificada, a partir de orina de -- embarazo; con el uso de tales orinas desarrollaron un método simple, barato y bien estandarizado para la obtención de gonadotropinas altamente activas en buenos productos:

Origen del material y preparación inicial. - Las orinas de -- embarazo se colectaron entre el cincuentavo y noventavo días siguientes al último período menstrual y estas se colocaron a una -- temperatura de 0-5 °C con cloroformo, como conservador.

Para la separación inicial de hormonas, se empleo el método de Katzman y Doisy (adsorción con ácido benzoico) corriéndose --- todas las etapas en el cuarto frío de 0 a 5 °C. El precipitado -- inicial se lavó tres a cuatro veces en un Buchner con solución -- acuosa saturada de ácido benzoico frío, presionándose completamente el precipitado y después se trató con suficiente acetona para -- para disolver el ácido benzoico. El residuo insoluble se lavó y -- deshidrato con varios cambios de acetona anhidra, y el producto -- colectado se seco en vacío. A este material se llamo producto "A".

Los lavados prolongados del precipitado inicial con solución acuosa saturada de ácido benzoico no disuelven la hormona, pero -- causan peptización de la hormona, conteniendo residuos de acetona, que se usa para remover el ácido benzoico. A menos que no se tenga cuidado para la sifonación de la acetona, se puede arrastrar con -- floculo suspendido, de H.C.G. pudiendo ser difícil colectarlo, --- además por ser altamente filtrable y muy difícil de sedimentar en la centrifugación; perdiéndose una parte apreciable de la actividad original de la hormona ya que un 75% de la actividad disponible de algunas orinas han sido recobradas del sobrenadante turbio de acetona, cuando el material suspendido ha sido floculado y co-- lectado separadamente (tal material puede mostrar un incremento de la actividad hormonal como en la etapa "A" obteniéndose un aumento de 100 a 200 dme*/mg).

El residuo insoluble se seco de la manera usual, obteniéndose se aproximadamente 0.5 g + 0.2 de polvo café grisáceo por, cada -- litro de orina. El pool de orinas ensayadas contenian directamente de 10 a 50 d.m.e. por litro (la actividad recobrada en el polvo ha sido usualmente cuantitativa, como la que en contraron Katzman y -- Doisy en mezclas de orinas de embarazo). Estas preparaciones, contenian de 25 a 50 d.m.e./mg. De este material se partio para las -- siguientes purificaciones.

4.1 a).- Fraccionamiento del Producto A con Acetona Acuosa.- La -- purificación del producto "A" se pasa por precipitación fracciona-- da con acetona para este propósito una muestra se agita por varias horas con 10 vol. de agua fría y se deja en reposo durante 24 hrs. Se sifona el sobrenadante se centrifuga y extrae el residuo tres -- veces son 3 a 4 vol. de agua, encontrándose actividad en el sobre-- nadante turbio, aunque 80% del sólido original permanece insoluble

* d.m.e.= dosis mínima efectiva, propuesta por Friedman y es la -- dosis por kilo de peso corporal de conejo necesaria para causar ovulación.

(Agregando acetona fría a una concentración del 30% al material -- suspendido, y al sobrenadante claro se le agrega más acetona, al -- 70% se obtiene un producto conteniendo 250 dme/mg y más del 95% de la actividad original).

Después de centrifugar y repetir los lavados con el solvente frío, los extractos claros combinados (10 volúmenes) se trataron con acetona fría para hacer una concentración del 70%.

Después de repetir 20 veces las purificaciones de los extractos que fueron obtenidos por éste sencillo proceso se les dió aplicación a los extractos "A" a rutina de laboratorio, es decir se -- aplicaron dosis cualitativas a animales de laboratorio, observándose que los resultados de las potencias se encontraban entre el rango de 500 a 200 d.m.e./mg, siendo un rango bastante amplio, habría que hacerle ciertas variaciones al método para reducir el rango de potencia; tales variaciones fundamentalmente fueron mínimas y se -- hicieron en el aumento de volumen de acetona y en la disminución -- en el tiempo de extracción.

Los resultados obtenidos de las fracciones de purificación, -- en los ensayos biológicos rebelaron lo siguiente:

- 1.- Con las variaciones hechas al método se obtuvieron mejores potencias del producto final.
- 2.- Las actividades recuperadas son satisfactorias.
- 3.- Cuando se obtienen extractos de baja potencia, se observa que aproximadamente un 1% de la actividad se pierde, -- tal vez, a la inactivación parcial ocurrida durante el -- proceso de purificación.

4.1 b).- Extracción del Producto "A" con etanol al 50%.-- El procedimiento involucra una molienda previa del producto "A" (tomando -- aproximadamente 500 mg.), se le agrega etanol al 50% hasta alcanzar

el pH = 6. La suspensión se deja descansar 24 horas de 0-5° de preferencia en un vaso para observar la capa delgada que se forma, y entonces centrifugarla a alta velocidad. El precipitado se lava -- varias veces por agitación mecánica con un milímetro de etanol al 50%. Los extractos alcohólicos combinados (turbios) se tratan con 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar la HCG, después de enfriar por varias horas se centrifuga y el precipitado se lava con 85% de etanol. El material así precipitado se extrae 3-4 veces con agitación por 30 mins. con etanol 0.5 a 1.0 ml de buffer 0.3 M de acetato de sodio- ácido acético en etanol al 50% a pH 4.8. Después de la centrifugación, se obtiene una solución acida de las -- soluciones combinadas etanol la cual corresponde al producto B, -- esta se trata con un igual volumen de etanol absoluto frío y se -- enfría por varias horas. El precipitado que resulta se obtiene por centrifugación lavándose sucesivamente con etanol al 75-95 % y al final se lava 3 veces con acetona anhidra. Es necesario agregar -- ocasionalmente un poco de acetato de sodio durante el último lavado. Después de secar, se obtiene un producto amorfo incoloro con -- ensayos consistentes de 1000-3000 U.I/mg (correspondiendo al producto C). Los productos tienen diferencias grandes cuando son extraídos por el método de acetona al 30%.

Mejores Purificaciones Experimentales.

Cuando las soluciones acuosas de las fracciones (3000 d.m.e. /mg.) se agitan con cloroformo a pH 4.5 a 5.0, una pequeña cantidad (1 a 5%) de proteínas inertes se precipitan. Después de quitar esas impurezas la hormona no es totalmente precipitada con ácido -- tánico en presencia de ácido acético, aun que posiblemente se puede recobrar si la solución es primero acidificada con ácido sulfúrico 136/. Fracciones similares tratadas con cloroformo se encontraron que precipitaban a pH 3.0 a 4.0 con iodo en ioduro de potasio, como lo describió Meyer 137/. Tratamiento con iodo en ioduro de potasio o ácido tánico quitaron algunas trazas de proteínas con cloroformo obteniéndose preparaciones que contenían 400 dme/mg.

Solubilidad de la HCG.- Los solventes en la cual la HCG es soluble son Glicerol, etilen glicol clorohidrina etileno, y formamida. Disuelven cantidades relativamente pequeñas con los alcoholes metílico, alcohol butílico; bencaldehido, salicil aldehido, furfuraldehido, cresol, trimetilen glicol, éter metílico, etilen glicol, y b, b' dihidroxietil éter. La HCG es estable en solución de glicerol cuando se calienta a 100 °C durante 1 hora aunque con la formamida hay inactivación rápida a 0°C, en soluciones de etilen glicole moderadamente estable, y tiene una gradual inactivación en etilen clorohidrina.

Características de la H.C.G. Purificada.- Las preparaciones ensayadas a 500-2000 dme/mg son con poco color, polvo amorfo conteniendo, aproximadamente 10% de cenizas, dando las siguientes pruebas positivas: Molisch, biuret, ninhidrina, Millon, Pauli Diazo, - Sacaguchi, Hexosamina y Nitrato de Plata amoniacal (lenta reducción en el frío). Las siguientes pruebas son negativas: Tollen's, naftoresorcionol, Selliwanoff, Hoppins-cole. No se obtiene precipitado en soluciones acuosas de ácido sulfosalicílico.

Las preparaciones contienen grupos acetilos y Hexosamina así como carbohidratos, se encuentran Tirosina en ocasiones y en otras solamente en trazas. La hormona es inactivada por acoplamiento con ácido sulfanílico diazotizado a pH 9.0 en frío, como fué notado -- por Bischoff y Long 138/.

RESULTADOS BIOLÓGICOS.

El producto aislado se controló en cada etapa por ensayos -- cuantitativos de la actividad gonadotrópica en las diferentes etapas. Para este propósito se usó el método biológico de ovulaciones foliculares en conejos, el ensayo se llevó a cabo sobre conejos -- maduros y saludables, trabajándose con ellos durante 5 a 25 días y observándose que después del ensayo permanecieran saludables. El -- producto ensayado se administró en una solución recién preparada -- por una sola inyección dentro de un margen de la vena de la oreja. Los resultados se leyeron por inspección de los ovarios de 24 a -- 48 horas después, la presencia de ovulaciones foliculares frescas, se tomó a un solo criterio "reacción mínima efectiva" (d.m.e.), -- propuesta por Friedman que es la dosis por kilo de peso corporal -- de conejo necesaria para causar ovulación.

Se hizo un estudio comparativo de la d.m.e. en los conejos -- después del parto a la relación de la unidad más comunmente usada -- y recomendada por la literatura que es la "unidad rata", determi-- nándose por preparaciones de orina de embarazo por Rowe, Simond, y Nelson, quienes determinaron que una dosis mínima efectiva fué --- aproximadamente equivalente a una unidad rata y se sugirió por es-- tudiosos de la materia como el Dr. W.O. Nelson, dr. O. Kamm, etc. así como los autores que una d.m.e. equivale a 1 a 2 unidades rata luteinizante.

Por todos los resultados obtenidos tanto fisicoquímicos como biológicos de la hormona, se encontró que la hormona es una sola -- proteína que corre en electroforésis y ultracentrífuga 139/.

4.2).- Procedimiento de Katzman y Colaboradores.- El uso de la adsorción de H.C.G. proveniente de orina, sobre permutita se introdujo por Lejwa en 1932, 140/. Más tarde Katzman y colaboradores en 1943, 89/ emplearon el mismo adsorbente y obtuvieron una preparación altamente purificada de H.C.G. con un ensayo de 8500 U.I./mg. Su procedimiento es esencialmente como sigue:

La orina obtenida durante la primera mitad del embarazo se colecta, filtra y acidifica a pH 3.5 con ácido acético glacial. Después se filtra, el filtrado claro es percolado a través de una columna que contiene permutita. La adsorción es completa cuando 10 litros de orina son pasados por una hora en una columna con las siguientes dimensiones; diámetro de 4 pulgadas conteniendo 2.0 kg. de permutita. La columna entonces se lava con agua destilada fría, hasta que los lavados sean neutros y prácticamente incoloros. Entonces la hormona se eluye con etanol al 38% conteniendo acetato de amonio al 10% fraccionándose así a la hormona con precipitación alcohólica. La mayor actividad precipita a una concentración de etanol de 70-75%. La hormona así obtenida contiene una potencia de 8,500 U.I./mg.

Este método de Katzman y colaboradores parece ser muy simple, lo cual promete que en futuras preparaciones, obtener grandes cantidades de la hormona para hacer investigaciones de sus propiedades químicas y biológicas.

4.3).- Procedimiento de Claesson y colaboradores.- Un método para la obtención de H.C.G. cristalina, electroforéticamente homogénea, fue descrito por Claesson y colaboradores en 1948, 90/. Su procedimiento puede ser principalmente descrito en las etapas siguientes, las cuales se realizan en un cuarto frío a 4.0 °C.

1.- El principio activo de la orina de mujeres embarazadas (1 a 3 meses de embarazo), se adsorbe con ácido benzoico, como el método similar al de Katzman y Doisy. Después de la extracción con acetona, el residuo se lleva a un buffer de acetato 0.66 M de pH 4.8.

2.- A este extracto con pH 4.8 se le agrega etanol al 85%, y se centrifuga, el precipitado se extrae con buffer y nuevamente se precipita con etanol al 85%. Esta etapa produce de 25-30 mg. de -- H.C.G. purificado de un litro de orina, con un ensayo de 4,000 a -- 6.000 U.I./mg.

3.- 500 mg. de este material se disuelven en 50 ml. de buffer de fosfato M/75 a pH de 7.4. Después de remover el residuo insoluble se agrega una solución de protamina al 10%, gota a gota, hasta que no aparezca más precipitado. El precipitado de protamina posee una actividad biológica y se deshecha.

4.- El sobrenadante claro se ajusta a pH 3.5 llevándolo a -- una solución alcohólica al 50% con m-cresol al 5%. Después de dos horas de dejar en reposo, se incrementa la concentración etanólica al 60%. El primer precipitado hormonal se observa como una sustancia amorfa y comienza a cristalizar en capas delgadas, necesitando se dejar reposar por lo menos 24 horas.

Los productos cristalinos obtenidos no han sido sujetos a -- prueba de ultracentrifuga y pruebas de solubilidad, aunque se obtiene una cristalinidad perfecta, desde luego esto no significa pureza absoluta; por lo que la obtención de H.C.G. de Claesson y colaboradores no está exenta de impurezas contaminantes.

4.4.- Método de W.R. Butt, Combinación del ácido Benzoico-ácido -- tungstico 141/.

Las gonadotropinas de la pituitaria son comunmente extraídas de la orina por adsorción sobre Kaolín. Generalmente este procedimiento da mayores rendimientos que otros métodos rutinarios, y las extracciones obtenidas son menos tóxicas para animales de laboratorio que las preparadas por la precipitación directa con alcohol o acetona, en este método, sin embargo la elución se ve afectada -- en una concentración alcalina que desnaturaliza algunas proteínas.

Presentándose las dificultades en la evaluación, ya que disminuye la actividad de la H.C.G., causada por este motivo.

Se estudio el método del ácido benzoico 142/, porque es soluble en solventes orgánicos, no requiriéndose en alcalis fuertes y encontrándose que la extracción de H.C.G. es eficiente cuando se obtiene a partir de la orina de mujeres embarazadas, pero solamente cerca del 10% de la gonadotropina de la pituitaria (H.M.G.) se extrae de la orina de mujeres postmenopausicas 79/.

En el siguiente método se emplearon los ácidos Benzoico y Tungstico comparándose con el método de Kaolín 119/.

El material que se uso fue el de orina de hombres sanos, mujeres jóvenes y mujeres menopausicas. Los reactivos empleados son:

Benzoato de sodio 2.5 M.

Tungstato de sodio al 30%

Acido clorhídrico 6 N;

Acido acético 2 N

Acetato de amonio 0.2 M

Solución buffer de amoniaco pH = 9.5

Ethanol absoluto

Procedimiento.- A cada litro de orina se le agrega 50 ml. de benzoato de sodio y 5 ml. de tungstato. La mezcla se acidifica agregando ácido clorhídrico gradualmente con bureta hasta tener un pH ácido de 3.0 a 3.5. El precipitado se separa por filtración con papel Whatman No. 541. El ácido benzoico se disuelve completamente lavando con etanol o acetona. El residuo que queda sobre el papel-filtro se disuelve, completamente como sea posible en 3 ó 4 lavados de 20 ml. de acetato de amonio. Se agrega ácido acético hasta obtener un pH cercano a 7.0 (usando papel indicador), entonces se agrega 3 volúmenes de etanol. La solución se somete al refrigerador durante 30 min., al sacarlo se observa un precipitado el cual se centrifuga para separarlo de la solución, centrifugándose a 2,500 r.p.m. durante 5 min. Se lava una vez con etanol y éter y después se guarda seco en refrigeración.

Método comparativo Kaolín-acetona.- Se usa un kaolín de especificaciones especiales (soc. Leather trades chemists specification) (20 gr. por litro). El pH se midió con electrodo de vidrio.- La adsorción se hizo a pH=4.0 y la elución en sosa caústica a pH = 11.0 a 11.5 durante 10 a 20 min. La Gonadotropina se precipita a pH = 6.0 agregando 5 vol. de acetona.

Efecto del pH sobre el rendimiento de Gonadotropina.

Se tomaron alicuotas de 500 ml, de muestras de orinas de mujeres post-menopausicas. La cantidad de ácido clorhídrico usada se varió con forme el pH de la mezcla y se controló entre 2.3 y 4.3.- Observándose que las mejores recuperaciones fueron obtenidas entre los pH de 2.5-3.8, siendo constantes las obtenciones en este rango. Cerca de pH = 4.0 se obtiene muy poco precipitado, decreciendo la cantidad recuperada a mayor aumento de pH. Como se ve en la fig. 5

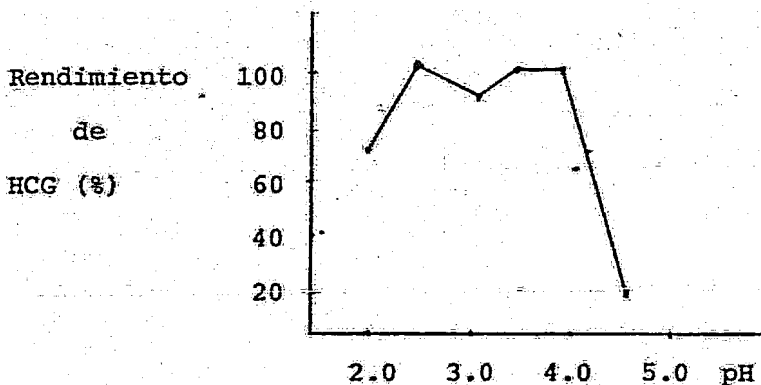


Fig. 5 Efecto del pH sobre el rendimiento de gonadotropina.

Los autores del método propuesto hicieron comparaciones de los rendimientos relativos contra el método de Kaolín, para esto corrieron 8 muestras de orina, divididas cada una en dos alicuotas, para correr una alicuota en cada método. Los productos se ensayaron por el método biológico: efecto sobre el peso de útero -

de ratón inmaduro, y sobre los ovarios de ratones inmaduros. Observándose los siguientes resultados:

1.- Siete de los ensayos fueron satisfactorios y uno no tuvo valor debido a que el animal se comportó como si no hubiera recibido dosificación.

2.- En una muestra solamente hubo mas principio activo recuperado por el método de kaolín.

3.- De 2 a 6 veces se obtuvo mas material activo por el método del ácido Benzoico-ácido Tungstico.

4.- Hubo superioridad sobre la actividad específica (actividad H.C.G./peso).

5.- Por el método del Acido Benzoico-AcidoTungstico se observaron malos rendimientos obtenidos por el método de kaolín, probablemente se deba a extracciones pobres o por la destrucción de las hormonas en la elución; por lo que gracias a este tipo de comparaciones se puede examinar la eficiencia de cada método. En lo que se refiere al método de kaolín muchos investigadores lo han usado, pero modificando las condiciones para la elución de la gonadotropina 119/, 144/, 135/, para obtener mejores rendimientos y menor toxicidad.

El problema de elución no se ha observado en éste método debido a que el ácido benzoico es soluble en etanol, liberando el complejo de ácido tungstico-H.C.G. precipitado. Solubilizándose totalmente en acetato de amonio a pH = 9.5, y el ácido tungstico es quitado subsecuentemente por la precipitación de la H.C.G. a pH = 7.0 en etanol. La contaminación estrogénica que pueda ser arrastrada junto con el producto, se quita con la precipitación de acetona como en la etapa del método de kaolín. Obteniéndose así un producto relativamente no tóxico y con una actividad específica de 1.4 a 4.0 veces mas alta que las preparaciones de kaolín.

4.5.- Procedimiento de Lejwa modificado por Katzman, Godfrid, Cain y Doisy 92/.

Se trabaja con orinas que contengan títulos altos de gonadotropina, para este propósito se colectan orinas de embarazo entre el primer mes y mes y medio; se les agrega cloroformo como conservador y se dejan en reposo durante 24 horas para que sedimente toda la materia flotante, siguiendo las siguientes extracciones se recurre al método de katzman y Doisy 118/.

Todo el proceso se trabaja a temperaturas bajas de 0 a 5°C: -
1°) Se filtra toda la materia orgánica e inorgánica que se haya precipitado durante toda la noche anterior. 2°) Se disuelve el ácido benzoico en acetona hasta saturación y se agrega lentamente a la orina filtrada para que se efectue la adsorción gonadotrópica, siempre con agitación constante y homogénea, se deja un momento con la agitación para más tarde filtrar por buchner. 3°) Se agregan 75 ml. de acetona por cada litro de orina empleada 118/, para disolver el ácido benzoico y precipitar la H.C.G. se agita perfectamente y se mete en refrigeración en reposo absoluto durante toda la noche. 4°) Se decanta el sobrenadante y se enjuaga tres veces el material insoluble con acetona, el producto obtenido se seca y se muele para la segunda extracción.

La segunda extracción se hace con una mezcla de acetato de amonio-etanol 89/, 125/, 126/. 1°) Se prepara una solución de acetato de amonio 0.2 M en etanol al 50%, realizándose tres extracciones con una hora de agitación cada una 144/, 2°) Se deja durante varias horas en cámara fría, hasta observar el sobrenadante claro, se filtra por buchner. 3°) Se agrega bifosfato de potasio acuosa y acetato de amonio 0.2 M en etanol al 75% a pH 8.7; al agregar los reactivos se debe agitar homogénea y constantemente. 4°) Se deja reposar nuevamente en cuarto frío, se filtra y los extractos así obtenidos se les agrega 4 volúmenes de etanol frío, para la precipitación total de la H.C.G. dejándola reposar toda la noche. 5°) . -

Se decanta el sobrenadante y el material insoluble se centrifuga y enjuaga con acetona y éter, 6°) Se deja secar y se obtiene un producto amorfo café con una actividad de 1,000 a 3,000 U.I./mg.

A partir de este producto se continua la fraccionación etanólica con acetato de amonio: 1°) El producto pulverizado se disuelve en una mezcla de acetato de amonio 0.13 M en etanol absoluto, 2°) Se hacen tres extracciones, con una duración de media hora cada una 3°) Los extractos se filtran por buchner, al líquido filtrado se trata con tres volúmenes de acetona, para la precipitación de la H.C.G. 4°) Se deja en reposo durante 3 horas en refrigeración, se centrifuga y separa el precipitado 5°) Se extrae nuevamente, llevando el precipitado al 2% con bifosfato de potasio, se filtra, agregándose etanol absoluto. 6°) Se deja en cámara fría toda la noche se decanta el líquido sobrenadante y el residuo se centrifuga con etanol y éter, poniéndose a secar al vacío.

Etapa Final de Purificación:

El producto obtenido de la etapa anterior (con molienda previa): 1°) Se disuelve al 2% (p/v) en agua fría, se agrega dos volúmenes de etanol al 85% precipitándose así el material. 2°) Se extrae con agitación de 30 min. con buffer de acetato de sodio 0.3 M en etanol al 50%, 3°) Se deja en cámara fría durante dos horas; se filtra y el precipitado se resuspende en una solución alcohólica al 40%, 4°) Se le agrega entonces 8% de acetato de amonio, se agita y se agrega carbonato de sodio 0.06 M al 4%, 5°) Se ajusta el pH a 8.7 con amoníaco conc., se deja en cámara fría por una hora, se filtra por buchner al líquido filtrado se precipita con cuatro volúmenes de etanol absoluto, dejándose en cámara fría durante 24 horas, 6°) Se decanta y el residuo se centrifuga y se enjuaga varias veces con etanol y al final con éter. 7°) Se coloca el precipitado bien extendido en una caja petri, en un desecador conectado al vacío, se seca, se muele bien y se manda a valorar por el método inmunológico y por el método biológico, de esta forma se obtiene una H.C.G. pura.

4.6.- Purificación de Gonadotropinas derivadas de orina y de Glándula Pituitaria de Humano:

Rigas, Alvin Paulsen y Heller, describen un método de purificación de H.C.G. de orina aplicable también a la purificación de H.C.G. de la pituitaria. Eliminándose 95-97% de las impurezas inactivas y sustancias tóxicas sin detectar pérdida de la actividad de la gonadotropina.

Los bioensayos de los productos purificados en ratas machos inmaduros hipofisectomizados y ratas hembras indican la presencia de las 3 gonadotropinas activas.

El análisis electroforético en ambas preparaciones de orina y pituitaria revelan a pH 8.6 tres componentes migratorios como aniones. Las fracciones electroforéticas y el bioensayo de estas fracciones sobre ratas machos y hembras inmaduros hipofisectomizados demostraron que cada una de las actividades gonadotrópicas -- 93/, (F.S.H., H.C.G. y la luteotrófica) fue asociado con un componente electroforético diferente, e indica que las tres pueden estar asociadas con el componente central.

Esta evidencia sugiere que las gonadotropinas humanas de orina y glándula pituitaria son similares una de la otra, teniendo un alto P.M.

Para la obtención y purificación de la H.C.G. urinaria se utilizan comunmente métodos como la precipitación alcohólica -- 96/, adsorción sobre Kaolín 119/ y ultracentrifugación. Estos métodos arrastran un sin número de impurezas que interfieren en la evaluación biológica de la actividad gonadotrópica. Este método (Rigas y colaboradores), produce de 20 a 30 veces sin pérdida -- significativa de actividad gonadotrófica. Esto permite el análisis electroforético y el ensayo biológico en ratas hipofisectomizadas sin efectos causantes tóxicos.

Origen del material y métodos usados.- Se utilizaron muestras de orina de sujetos normales de hombres y mujeres adultas ó de pacientes con fallas de prepubertad en los tubulos seminíferos (síndrome de Klinefelter's), las muestras acumuladas de cada sujeto fueron colectadas al vacío y preservadas a un grado centigrado cada 24 horas y se concentraron por ultracentrifugación. El residuo seco se conservo y guardo a 1°C. Más tarde por bioensayos y purificaciones subsecuentes, el residuo seco se extrajo con agua destilada. Cada 24 horas se tomaron alicuotas, pasando 2 ml de agua destilada por extracción. El extracto claro obtenido por centrifugación se colecto en uno solo y se le designo como extracto inicial. Las pituitarias humanas se obtubieron inmediatamente después de la muerte de mujeres y hombres adultos normales, secadas en acetona y guardadas en refrigeración a 1°C. Inmediatamente después de la extracción de las pituitarias se colocaron en acetona y los lóbulos anteriores, bien secos, pulverizados y pesados en base seca. El polvo se extrajo tres veces con solución salina isotónica (20 ml/gr.) a pH= 9.0 y los extractos del pool constituyeron el "extracto inicial" los cuales precedieron a la purificación.

Los extractos se aplicaron a animales intactos que fueron adoptados a recibir 6 ml. diarios subcutáneamente, aplicándoles 1 ml. dos veces por día durante 24 días, estos animales usados fueron ratas hembras intactas. Las 24 horas siguientes de la inyección, las ratas se sacrificaron por decapitación rápida, extirpándoles los ovarios y el útero, pesándolos rápidamente.

Los análisis electroforéticos se efectuaron con un aparato de Klett, utilizándose 11 ml. de buffer de Veronal a pH = 8.6 y una fuerza iónica de 0.1. La migración de las proteínas en la celda electroforética fueron muestreadas con dispositivos especiales 93/, ensayándose antes las fracciones en los animales descritos y ejecutándose después de 22 días. Las fracciones se aplicaron con 5% de dextrosa, de tal forma que cada rata recibiera una dosis total de 5 ml. (0.5 ml. inyectada subcutáneamente 2 veces diariamente durante 5 días). Las 48 horas siguientes a la última ----

inyección, los animales se sacrificaron por decapitación rápida -- siendo tomados inmediatamente los pesos de los ovarios, útero, -- vesículas seminales, próstata anterior y tetas.

4.7.- Obtención de gonadotropinas a partir de orina humana y glándula pituitaria, purificadas por cromatografía sobre carboximetil celulosa y dietilaminoetilcelulosa y fosfato de calcio 131/.

La gonadotropina urinaria se extrae por dos diferentes métodos: 1º). El método propuesto por Butt 141/ (método 4.4.), en el cual el material soluble en el agua se adsorbe sobre dietilaminoetilcelulosa y se eluye con acetato de amonio 0.5 M. Después se -- precipita con 3 vol. de etanol y el material se redissuelve en --- agua y se fracciona por cromatografía sobre una columna de dietilaminoetilcelulosa. El material se eluye en acetato de amonio -- 0.2 M se colecta y reciprecipita en 3 volúmenes de etanol, se --- lava con etanol y éter y se seca 132/.

El segundo método empleado para extraer el material activo de la orina es el método de Lorain y Brown, Kaolín-acetona mencionado anteriormente, al final el producto se fracciona por cromatografía sobre una columna de fosfato de calcio por el procedimiento descrito por Butt, y colaboradores 133/, excepto que el fosfato de calcio se prepara por el método descrito por Main y colaboradores 134/; de la siguiente manera el fosfato de calcio se precipita al agregar gota a gota 100 ml de cloruro de calcio 0.5 M con -- agitación a 120 ml de buffer de fosfato 0.5 M pH = 6.7, la agitación se continua durante 1 hora más, y el precipitado se lava por decantación con agua (utilizando 600 ml de agua para pasar el producto a un erlenmeyer). Se agregan 10 gotas de fenoltaleína al -- 13 en solución etanólica y se alcaliniza la solución con hidróxido de amonio, hasta una coloración rosa persistente, la mezcla se hierve durante 30 min. agregando más amoníaco si es necesario para mantener la coloración rosada. Finalmente el precipitado se -- lava fuertemente con agua, para neutralizar la solución, y se pasa a otro erlenmeyer que contenga 50 ml. de fosfato disódico 0.01M.

Gonadotropina de la glándula pituitaria.- Se hacen los extractos de las tres formas siguientes:

El polvo obtenido en el secado por acetona: en la primera etapa se extrae en solución de cloruro de potasio a $\text{pH} = 5.5$, -- haciéndose una segunda extracción según como lo indican Butt y -- colaboradores 133/: se seca nuevamente este extracto con acetona-- extrayéndose en acetato de amonio en etanol al 10% (60:40 v/v)-- precipitando el principio activo al agregarsele etanol hasta obtener una concentración del 80% (v/v). De esta etapa los pasos que siguen son los mismos para las otras preparaciones (fig. 6).

Se aplican de 100 a 200 mg. en columnas (20 cm x 1 cm) de carboximetilcelulosa en acetato de amonio 0.01 M de $\text{pH} = 6.1$, obteniéndose dos fracciones: CMI y CM2 la fracción CMI no se adsorbió bajo estas condiciones, pero si se adsorbió la fracción CM2, siendo eluida en acetato de amonio 1M $\text{pH} = 6.1$.

CMI más tarde fue fraccionada sobre una columna de dietilaminoetilcelulosa (10 cm x 1 cm) por el método propuesto por -- Butt para orina.

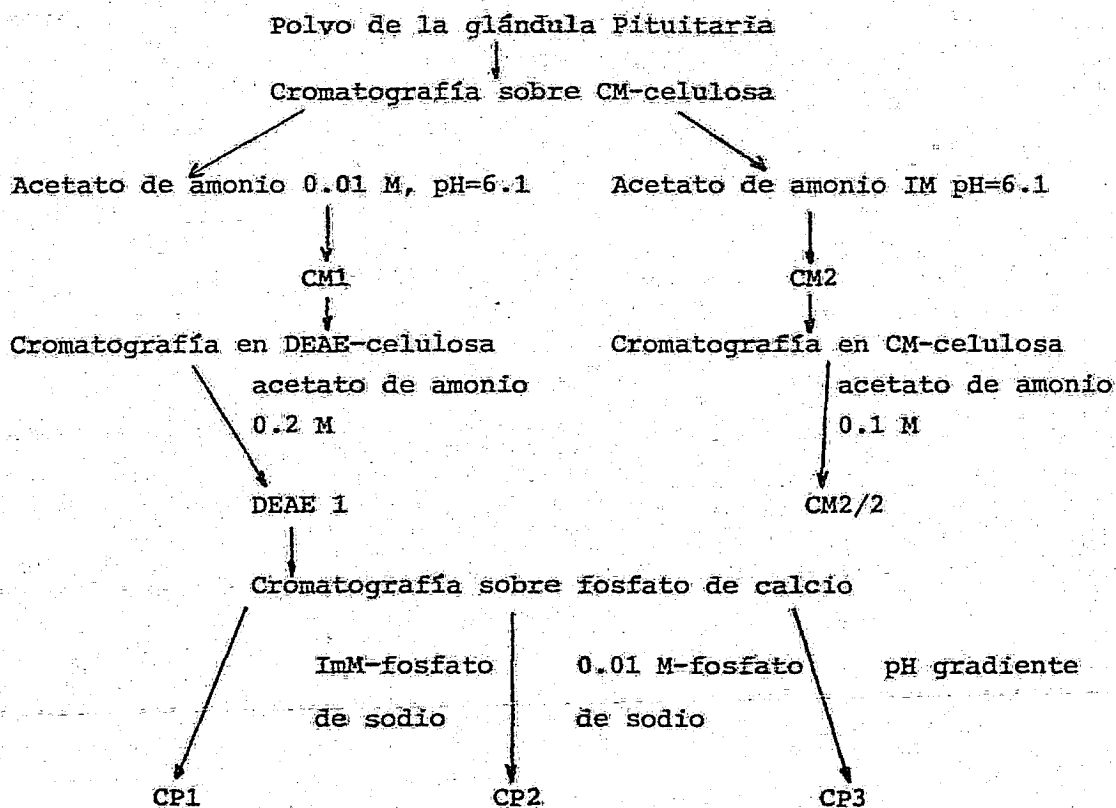
La fracción eluida en acetato de amonio 0.2 M es entonces -- colocada directamente a través de la columna de fosfato de calcio (10 cm x 1 cm) y eluidas las fracciones en fosfato disódico 1mM y 0.02 M, colectándose en esta formase dialisaron y precipitaron con 5 vol. de etanol.

La parte de CM2 se fracciona sobre carboximetilcelulosa (20 cm x 1 cm) agregando por goteo el eluyente acetato de amonio (-- 0.01-1.0 M). Las gonadotropinas fueron detectadas solamente en la fracción eluida de acetato de amonio 0.1 M.

En todos los trabajos sobre cromatografía la elución de proteínas son observadas por detección a la adsorción al ultravioleta (U.V.) de la elución a 280 m μ . en un espectrofotómetro, adecuado. En la fig. 6 se representa el esquema de la separación cromatográfica de polvos de glándula pituitaria con carboximetil (CM) --

celulosa y dietilaminoetil (DEAE) celulosa y fosfato de calcio -
(CP).

FIGURA 6



5.- Métodos aplicables a la Industria.

En general todos los métodos se pueden extrapolar para producción industrial, pero los métodos que presentan mayor número de desventajas son: La precipitación alcohólica.

La precipitación por acetona

La precipitación con ácido tánico.

Y la ultrafiltración.

Estos métodos no son recomendables a escala industrial propresentar mayores problemas en pureza y toxicidad. Los siguientes métodos son más sencillos y se obtienen mejores productos, siempre y cuando se tomen en cuenta las siguientes observaciones:

5.1.- Para el método de adsorción con ácido benzoico, se debe buscar orina de personas embarazadas; con altos títulos de HCG, pudiéndose adaptar el método a condiciones industriales, obteniéndose se grandes cantidades de material activo.

5.2.- El método de Kaolín-acetona, con un cuidadoso control del pH, es el procedimiento a escoger para la extracción diaria de la HCG en grandes cantidades de orina de humanos no embarazados - por ejemplo usar orina de mujeres menopáusicas; siendo necesario en purificaciones, poner el material crudo con tratamiento con fosfato tricalcico cuando se trabaja con orinas de títulos bajos de HCG.

5.3.- El método de adsorción por permutita, también presenta un buen panorama a escala industrial.

6.- CUANTIFICACION DE LA H.C.G. PURIFICADA.

Se han usado y discutido en varias publicaciones 81/, 72/, 73/, 74/ y 75/, métodos para cualificar y cuantificar la Gonadotropina Corionica Humana (HCG), obtenida de preparaciones de diferentes grados de homogeneidad. En el presente trabajo se resume en dos grupos los métodos empleados:

6.1.- Métodos Inmunoquímicos.

6.2.- Métodos Biológico

6.1.- Los Métodos Inmunoquímicos a su vez se dividen en: Cualitativos y Cuantitativos. Los cualitativos nos dan la homogeneidad o heterogeneidad de la HCG; mientras que los cuantitativos nos dan la potencia de la HCG. Los primeros son inmunoelectroforésis en -- gel de almidón y en agar e inmunodifusión. Los segundos son: inhibición de la hemaglutinación 73/, 77/ y 145/ y reacción de fija--- ción de complemento 78/ y 80/.

6.2.- El método biológico más usado para la cuantificación - de HCG es el peso del útero de la rata, 76/.

Para cualquier método se usa un estandar internacional de -- HCG. Los métodos que se exponen a continuación son exclusivamente los cuantitativos :

Inhibición de la hemaglutinación.- Este método fue descrito por Wide 3/, aunque algunos investigadores lo han usado con algu-- nas modificaciones 77/, tales como: durante el tratamiento de los eritrocitos con ácido tánico el pH se cambia de 6.4 a 7.2. La concentración de formaldehído es del 3%, quedando una concentración - final del ácido tánico de: .20,000.

Las preparaciones del HCG a cuantificar, se disuelven en un-- buffer de fosfatos 0.02M con pH = 7.2, conteniendo cloruro de so-- dio 0.02M, E.D T.A. al 0.2% y suero de albúmina bovina al 0.1%. -- Todo es material ó excipiente funciona para proteger la HCG de las desnaturalizaciones cuando se expone a altas diluciones.

Se pueden guardar las soluciones concentradas de HCG (mínimo 1.000 U.I./ml) a -20°C y usarlas solamente una vez después desconge-- larlas se ha observado que la actividad inmunoquímica de soluciones diluidas de HCG, preparadas diariamente y guardadas a punto de con-- gelamiento, permanecen sin cambios.

Los resultados de las estimaciones son expresados como equi-- valentes inmunoquímicos de U.I. de HCG.

Los resultados de las estimaciones son expresados como equivalentes inmunoquímicos de U.I. de HCG.

Fijación de complemento.- Este método ha sido comercializado y sale bajo las firmas de " Pregnil " de los laboratorios organon y Lafón 78/, el principio del método es el siguiente:-

En una serie de tubos que se especifican en el procedimiento se lleva a cabo la reacción de fijación de complemento al agregar a la muestra que se pretende cuantificar suero anti H.C.G. -- más entrocitos recubiertos con H.C.G., se presenta inhibición de la aglutinación, entonces se observa en el fondo del tubo un anillo claramente definido, así sucesivamente una serie de diluciones de la muestra continuará dando anillos claramente definidos, - hasta llegar a una dilución que de un anillo difuso, o un patrón-homogéneo en el fondo del tubo; tal dilución correspondera al límite de la sensibilidad de la prueba.

Procedimiento para la cuantificación.- I.- Se pesa con exactitud 2.0 mg. de la muestra a cuantificar, se lleva a un matríz aforado de 5 ml. y se afora con solución salina isotónica, - de esta dilución se toma 1.0 ml. y se lleva a 100 ml. aforándose con el mismo diluyente; se prepara una gradilla de 9 tubos para hacer las siguientes diluciones:

- a).- Colocar 0.25 ml. de solución salina isotónica en 8 tubos de ensaye pequeños.
- b).- 1. Añadir 0.25 ml. tomados del matríz de 100 ml. en el primer tubo de ensaye, mezclar bien y transferir 0.25-ml. al segundo tubo. Se continua realizando la misma-operación hasta, llegar al octavo tubo. Transferir --- 0.25 ml. del tubo 8 a un tubo limpio que será usado -- como control. Las diluciones obtenidas del tubo 1 al 8 son respectivamente: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:64, 1:128, 1:256 contenidas en un volumen de 0.25 ml.

2.- Se pone un gotero (0.25 ml.) de solución salina isotónica al tubo No. 9.

3.- Añadir un gotero de suero anti-HCG a c/u de los 8 tubos. Cuidando de no, poner en contacto directo la boca de la pipeta con las paredes de los tubos.

4.- Agitar bien los eritrocitos recubiertos con HCG y agregar una gota a cada uno de los nueve tubos. Mezclar bien y colocarlos en una gradilla durante 2 horas sin mover, ni cambiar de lugar.

La lectura se hace de acuerdo al siguiente patrón:



CONTROL



DILUCION FINAL (+)



PRIMERA DILUCION (-)

INTERPRETACION:

La dilución final es la que se encuentra entre la que inhibe totalmente la aglutinación y la que da un patrón homogéneo en el fondo del tubo.

CALCULOS:

Las U.I./ml que se encuentran en la dilución final, es el recíproco de esta.

Para conocer las U.I. de HCG/mg que se tienen en la muestra (valor aproximado a la cuantificación biológica) se aplica una fórmula empírica.

Potencia de HCG U.I./mg. = última dilución (+) por la dilución final a la que se llevó la muestra.

Para confiabilidad en el método y los reactivos siempre debe correrse una muestra de potencia conocida ó estandar.

6.2.- Método Biológico.- Aumento del útero de la rata.

Medio de Inyección.- Usar solución Salina T.S., recién preparada, conteniendo 1mg/ml. de suero de albúmina bovina y ajustar-

la a pH de 6.9 a 8.0 con hidróxido de sodio T.S.

Preparación del Estándar.- Disolver una cantidad cuidadosamente pesada de HCG U.S.P. en el medio de inyección para obtener una solución con una concentración de 10 unidades U.S.P. de HCG - en cada ml., usando el medio de inyección como diluyente. Preparar una curva estándar, tal que las concentraciones de HCG constituyan una serie geométrica tal como 1:1.2: 1.44 ó 1:2:4 en tal forma que la actividad en cada ml. se encuentre entre el rango de 0.1 a 1.0 unidades.

Preparación del Ensayo.- Siguiendo el procedimiento ya señalando para la preparación estándar, preparar soluciones de HCG de tal forma que se encuentren dentro de tres puntos de la curva estándar, que serán llamadas 3 "Soluciones Prueba" correspondiendo a concentraciones de St.

Los animales.- Seleccionar ratas hembras de 20 a 23 días de nacidas, pero restringir la selección de modo que la más pesada - no pese más que un 30% más que la más ligera. Almacenar los animales bajo condiciones uniformes de temperatura, luz alimentación - y bebida. Marcarlos para identificarlos y dividirlos al azar en grupos del mismo número pero no inferiores a 10 animales. Asignar a un grupo cada una de las tres soluciones St. y tres soluciones de prueba respectivamente.

Procedimiento.- Inyectar a cada rata subcutáneamente en el área dorsal con 0.2 ml. de la solución que se le asigno aproximadamente la misma hora cada uno de los tres días consecutivos.

En la tarde del quinto día sacrificar a los animales y disectar el útero de cada animal cortando a través de la cerviz, quitando el tejido que rodea el útero y rigurosamente a la unión del tubulo del útero. Suavemente presionar y eliminar el fluido uterino en papel adsorbente húmedo, y pesar el útero, con balanza analítica.

Cálculos.- Tabular los pesos uterinos observados para cada -
rata designado por el símbolo Y, para cada grupo de ratas "f". Com-
putar los intervalos de confianza L. Si éste es de 0.1938 el cual-
corresponde a $p = 0.95$ para límites de confianza de 80 a 125% de -
la potencia computada, se repite el ensayo hasta que los datos com-
binados de dos ó más ensayos lleguen a éste límite, 143/.

7.0.- USOS:

Las propiedades biológicas de HCG difieren de otras gonadotropinas 146/. En ratas hipofisectomizadas no causa crecimiento folicular ni maduración y produce solamente hipertrofia de células intersticiales. Así el aumento del peso ovárico en animales hipofisectomizados por estimulación de HCG es muy ligera igualmente cuando se ha probado en ratas normales inmaduras, la HCG produce solamente un aumento limitado en el peso ovárico. Los efectos de la HCG en ratas machos hipofisectomizadas se encuentra en el mantenimiento o reparación de las células intersticiales testiculares. Si el tratamiento es empezado inmediatamente después de la hipofisectomía, las estructuras tubulares también son mantenidas y continúa la espermatogénesis en una forma aproximadamente normal.

Extrapolando éstas propiedades de la HCG a los seres humanos se puede decir que el uso de la HCG en presentaciones farmacéuticas se usa para el tratamiento de esterilidad anovulatoria, debido a que la HCG induce la ovulación en las mujeres infértiles 147/, tratamiento de esterilidad masculina 148/, tratamiento de la obesidad, ya que remueve las grasas de sus depósitos anormales convirtiéndolas en ácidos grasos libres circulantes, listos para ser metabolizados; problemas derivados como hipogonadismo masculino; impotencia sexual, climaterio masculino, senilidad. Estimula fisiológicamente la producción de testosterona endógena, ayudando a la personalidad sexual porque activa las células intersticiales. En la mujer juega un papel importante en la 2oa. mitad del ciclo ovárico (luteinización del folículo). Se usa en retardo de la pubertad porque es una estimulante en el crecimiento del niño con retraso del mismo, através de la inducción de producción hipofisiaria de hormona Somatotrópica, en criptorquidia; ovarios poliquísticos y fase lútea inadecuada 149/.

8.- CONCLUSIONES.

En los métodos que se han propuesto para la obtención de la HCG de orina humana, los procedimientos difieren en naturaleza y complejidad, viéndose en ocasiones afectados de desventajas comunes, las cuales son laboriosas y tediosas, tales como son las --- pérdidas considerables de actividad gonadotrópica, que por lo regular ocurre durante el proceso de obtención y purificación, y al final de la jornada en ocasiones son productos tóxicos a animales de laboratorio.

Enseguida las ventajas y desventajas de los métodos de extracción expuestos:

a).- En general la precipitación alcohólica de resultados satisfactorios en orinas de contenido alto de HCG, tales como las que provienen de mujeres menopáusicas y de varios tipos de fallas ováricas y testiculares. Sin embargo en orinas de bajos títulos de HCG, como las que provienen de hombres o mujeres con menstruaciones normales, los extractos crudos son frecuentemente tóxicos para animales de laboratorio. Otra desventaja de este método es que se obtienen rendimientos altos, debido a que arrastra junto con el principio activo otras impurezas, como son los estrógenos, por lo que dan potencias bajas de HCG.

b).- La precipitación por Acetona, es un método con mayor ventaja que el anterior, desde el punto de vista económico, además da resultados clínicos satisfactorios cuando se usa orina con alto contenido de HCG. Al igual que la precipitación etanólica -- con orinas de potencia baja de HCG da productos tóxicos en animales experimentales.

c).- La precipitación con ácido tánico se ha visto sujeta a varias críticas en pro y en contra del método. Varios investigadores han trabajado con resultados satisfactorios con esta técnica diciendo que da buenos productos, 150/, 151/, 152/, 153/ y 154/.

Aunque otros no comparten la misma opinión, debido a que no les dió productos confiables, como los investigadores Heller y Heller 96/, los cuales usaron orina menopáusica y fueron incapaces para obtener productos cuantificables, observando que los extractos de tanato crudo son tóxicos para uso de rutina, trataron de purificarlo pero no redujeron la toxicidad del producto, esta opinión se ve apoyada por estudios de otros investigadores 155/ y 156/. La técnica es laboriosa y da resultados dudosos.

d).- El producto de HCG, obtenido por el método de adsorción del ácido benzoico da rendimientos bajos, en comparación con la precipitación etanólica, pero el producto se obtiene con mayor pureza, por lo que no se recomienda usar el método para orinas con contenido bajo de HCG. El método, sin embargo, es simple y rápido.

e).- Los polyos obtenidos por el método de Kaolín-acetona a partir de orinas de bajos títulos son algunas veces tóxicos a animales experimentales, especialmente a ratas hipofisectomizadas; debido a que contienen una cantidad relativamente grande de sustancias inactivas que son ligeramente solubles en agua. Purificaciones posteriores de éstos extractos son necesarios. Algunos investigadores 123/, mostraron que eluyendo los polyos crudos con varios volúmenes de agua a pH = 0.8 hace que toda la actividad gonadotrópica pueda ser extraída en un volumen convenientemente pequeño de agua, pudiendo ser eliminado el material voluminoso principalmente inactivo. Obteniéndose así un producto de mejor calidad. La técnica es menos tediosa y laboriosa que la mayoría de los métodos publicados, obteniéndose mejores productos de gonadotropina, en comparación a los obtenidos por los métodos del ácido tánico y del ácido benzoico. Por lo tanto podemos decir, que los productos preparados por esta técnica son generalmente menos tóxicos a animales de laboratorio que aquellos obtenidos por simple precipitación alcohólica o acetónica.

f).- En la adsorción de la HCG por Hidróxido de aluminio se obtienen productos de igual calidad que los productos obtenidos por el método de precipitación-diálisis, el método es simple y rápido.

g).- Adsorción por permutita.- El método es igualmente simple y rápido, y extrae productos altamente activos y de baja toxicidad.

h).- El método de ultrafiltración, comparandolo con la técnica de precipitación alcohólica-diálisis, es menos compleja, menos laboriosa y menos expansiva, y los productos obtenidos son muy similares.

Como se ha observado a través de cada método de este trabajo, los puntos esenciales de los reportes investigados son llegar a la obtención final de un producto de alta pureza de Gonadotropina Coriónica Humana conteniendo alta actividad biológica e inmunológica; sin tener que usar para ello tecnología sofisticada o demasiado cara como lo requieren algunos procesos industriales.

Por lo que el interés primordial, desde el punto de vista nacional, es que las personas interesadas en este tipo de trabajos inviertan un capital para obtener este valioso producto en México debido a que en la actualidad no hay laboratorio Mexicano que se haya lanzado a la producción de la HCG, además es un material biológico que en estado purificado es bastante caro y su obtención no es costosa; empezando con la materia prima que se obtiene en forma abundante y de fácil adquisición. Otro punto positivo, para iniciarse en este proyecto de gran futuro, el cual es una realidad que estamos viviendo, es el crecimiento demográfico del país, lo que facilita la obtención de la materia prima, consiguiéndose un buen número de señoras embarazadas entre el primer y tercer mes de gestación.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Halvan, j. (1905). Arch. Gynaekol. 75, 353.
- 2.- Choh Hao li. Vit. and Horm. vol. VIII; 226.
- 3.- The Gonadotropins, Albert Segaloff, (1959); 591.
- 4.- Little, B., Smith, O.W., Jessiman, A.G., Selenkow, H.A., ----
Vant't Hoff, W., Eglin j. M., and Morre, F.D. (1958). J. Clin.
Endocrinol Metabol. 18, 425.
- 5.- Kaplan, N.M. (1961). J. clin. Endocrinol. Metabol. 21, 1139.
- 6.- Wright, A.D. and Joplin, G.F. (1966), Proc. Roy. Soc. Med. --
59, 1280.
- 7.- Humbertus A. Van Leisden, Vit. and Horm. 1972; 30, 282-293.
- 8.- Badri N. Saxena; Vit. and. Horm. 1971; 29, 97.
- 9.- Got, R., and Bourrillon, R. 1960. Biochem. Biophys. Acta 42,-
505.
- 10.- Bahl, O.P. 19. 1969a. J. Biol. Chem. 244, 567.
- 11.- Bell, JJ., Canfield, R.E., and Sciarra, J.J. (1969). Endocri
no 10gy 84, 298-308.
- 12.- Maffezoilli, R.D., Kaplan, G.N., and Chrambach, A. (1972), j.
clin, Endocrinol. Metab. 34, 361-369.
- 13.- Graesslin, D., Weise, H. C., and Braendle, W. (1973). FEBS --
lett. 31. 214-216.
- 14.- Weise, H.C., Graesslin, D., and Braendle, W. (1973). Acta ---
Endocrinol (Copenhagen) Suppl. 173, 55.
- 15.- Merz, W.E., Hilgenfeldt, U., Brossmer, R., and Rehberger, G.-
(1974b). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1046-1050.
- 16.- Chatterjee, M., Baliga, B.S., and Munro, H. N. (1976). J. ---
Biol. Chem. 251, 2945-2951.
- 17.- Swaminathan, N., and Bahl, O. P. (1970). Biochem. Biophys. ---
Res. commun. 40, 422-427.

- 18.- Canfield, R.E., Agosto, G. M., and Bell, J.J. (1970). Gonadotropins ovarian dev., Proc. Workshop Meet, 1969 pp. 161-170.
- 19.- Hilgenfeldt, U., Merz, W.E., and Brossmer, R. (1974). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1051-1057.
- 20.- Morgan, F.J., Birken, S., and Canfield, R.e. (1975). J. Biol. Chem. 250, 5247-5258.
- 21.- Bahl O.P., Caelsen, R.B., Bellisario, R., and Swamithan N. -- (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 416-422.
- 22.- Bellisario R. Carsen, R.B. and Bahl, O.P. (1973). J. Biol. -- Chem 248, 6796-6809.
- 23.- Bahl, O.P. (1969). J. Biol. Chem. 244, 575-583.
- 24.- Bahl, O.P. (1972a) In "structure Activity Relationships of -- Protein and Polypeptide hormones", Int. Congr. Ser. No. 241, - 99-III. Excerpta Med. Found., Amsterdam.
- 25.- Bahl, O.P. (1972b). In Gonadotropins (B.B. Saxena, C.G. Beling and H.M. Gandy, eds.) pp. 200-210. Wiley (interscience), New-Yorck.
- 26.- Carlsen, R.B., Bahl, O.P., and Swaminathan, N. (1973). J. --- Biological Chem. 248, 6810-6827.
- 27.- Morgan, F.J., and Canfield, R.E. (1971). Endocrinology 88, -- 1045-1053.
- 28.- Ross, G.T., Vaikatis, J. L., and Robbins, J.B. (1972). In --- "Structure Activity Relationships of Protein and Polypeptide-Hormones", Int. Congr. Ser. No. 241, pp. 153-157. Excerpta --- Med. Found. Amsterdam.

- 29.- Vaitukaitis J. L., Brauns, G.D., and Ross, G.T. (1972a). Am.-
J. Obstet Gynecol 113, 751-758.
- 30.- Ryford, P.L., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T. Morgan, F.J., and
Canfield R.E. (1972) Endocrinol. 91, 144-146.
- 31.- Sheneider, C.H., Blaser, K., Pfeutti, C., and Gruden, E. ---
(1975) FEBS lett. 50, 270.
- 32.- Talwar G.P., Sharma, N.C., Dubey, S.K., Salauddin, M., Das--
C., Ramakrishnan, S., Kumar, S., and Hingorani, V. (1976) ---
Proc. Natl. Acad. Sci. U S.A. 73, 218-222.
- 33.- Albert, A. (1969). J. Clin. Endocrinol. Metab., 29, 1504.
- 34.- Braunstein, G.D., Vaitukaitis, J.L., and Ross, G.T. (1972b),-
Endocrinology 91, 1030-1036.
- 35.- Kammerman, S., and Canfield, R.e. (1972). Endocrinology 90,--
384-389.
- 36.- Catt, K.J., Dufau, M.L., and Tsuruhara, T. (1973). J. Clin. -
Endocrinology Metab. 36, 73-80.
- 37.- Canfield, R.E., Morgan, F.J., Kammerman, S., Bell, J. J., and
Agosto, G.M. (1971) Recent Prog. Horm. Res. 27, 121-164.
- 38.- Pierce, J.G., Bahl, O.P., Cornehl, J.S., and Swaminathan N. -
(1971). J. Biol. Chem. 246, 2321-2324.
- 39.- Rathanam, P., and Saxena, B. B. (1972). In "Gonadotropins", -
pp. 120-131. Wiley (intersciencia), New Yorck.
- 40.- Morgan, F.J., Canfield, R., E., Vaitukaitis, J.L., and Ross -
G.T. (1974). Endocrinology 94, 1601-1606.

- 41.- Mori, K.F. (1970) *Endocrinology* 86, 97-106.
- 42.- Goverde B.C., Veenkamp, F. J. N., and Horman, J.D.H. (1968).-
Acta Endocrinology Copenhagen 59, 105-109.
- 43.- Mori, K.F. (1968) *Endocrinology* 85, 330-336.
- 44.- Van Hell, H., and Schuurs, A.H. W.M. (1970). Gonadotrophins -
Ovarian, Dev., Proc., Workshop Meet., 1969 pp. 70-76.
- 45.- Braunstein, G.D., Reichert, L.E., Jr., Van Hahl, E. V., Vaitu-
kaitis, J. L., and Ross, G.T. (1971). *Biochem. Biophys. Res.-*
Commun., 42, 962-967.
- 46.- Brossmer, R., Dorner, M., Hilgenfeldt, N., Leidenberg, F., --
and Trude, E. (1971) *FEBS lett* 15, 33.
- 47.- Graesslin, D., Czygan, P.J. and Weise, H. C. (1972). In "Struc-
ture-Activity Relationship of Protein and Polypeptide Hormo-
nes" *Int. Congr. Ser. No. 241*, Part 2, p.p. 366-368. *Excerpta*
Med. Found., Amsterdam.
- 48.- Van Hall, E.V., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Hickman J.W., --
and ashwell, G. (1971a) *Endocrinol.* 88, 456-464.
- 49.- Van hell, H., and Schuurs, A.H.W.M. (1970) *Gonadotropins Ova-*
rian Dev. Proc. Workshop Meet., 1969 pp. 70-76.
- 50.- Ville, C., and Gabbe, S. (1971). In "Gonadotropins" (B.B. --
Saxena, C.G. Beling, and H.M. Gandy, eds.), pp. 309. *Wiley --*
(interscience), New Yorck.
- 51.- Gabbe, S.G., and Ville, C.A. (1971). *Am. J. Obstet. Gynecol.-*
110, 543-546.

- 52.- Lauritzen, C., and Lehamars, W.D. (1967). J. Endocrinol 39, -
173-182.
- 53.- Lauritzen, C., Shackleton, C.H.L., and Mitchell, F.L. (1969).
Acta Endocrinol (Copenhagen) 61, 83-88.
- 54.- Bruner, J.A. (1951). J. Clin. Endocrinol. II, 360.
- 55.- Cédard, L., Alsat, E., Ego, C., and Varangot, J. (1968) Ste-
roids II, 179-186.
- 56.- Cédard, L., Varangot, J., and Yannotti, S. (1962). C.R. Hebd,
Seances Acad. Sci. 254, 3896.
- 57.- Troen, P. (1961), J. Clin. Endocrinol. Metab. 21, 895-908.
- 58.- Varangot, J., Cédard, L., and Yannotti, S. (1965). Obstet. --
Gynecol. 92, 534-547.
- 59.- Ryan J. Date (1959) J. Biol. Chem. 234, 2006.
- 60.- Villee, D.B., Engel, L.L., Loring, J.M., and Villee, C.A. ---
(1961) Endocrinology 69, 354.
- 61.- Kaplan, S.L., Grumbach, M.M., and Aubert, M.L. (1976). Recent
Prog. Horm. Res. 32, 161-243.
- 62.- Albert, A., Underdahl, L. U., Greene, L.F., and Lorenz, N. --
(1953). Proc. Mayo Clin. 28, 409.
- 63.- Abramovich, D.R., and Rowe, P. (1973) J. Endocrinol. 56, 621
622.
- 64.- Ashitaka, Y., Mochizuki, M., and Tojo, S. (1970). Endocrinolo
gy 87, 233-244.

- 65.- Jaffe, R.B. Lee, P. A., and Midgely, A. R., Jr. (1969) J. ---
Clin. Endocrinol. Metab. 29, 1281.
- 66.- Kasakura, K. (1971) J. Immunol. 107, 1296-1301.
- 67.- Kaye, M. D., and Jones W. R. (1971) Am. J. Obstet Gynecol. --
109, 1029-1031.
- 68.- Contractor, S.F., and Davis, H. (1973) Nature (London), New -
Biol. 243-284.
- 69.- Adcock, E. W., III Teasdale, F., August, C. S. Cox. S., Mes-
chia, G., Battaglia, F. C., and Naughton, M.A. (1973), Scien-
ce 181, - 845-847.
- 70.- Teasdale, F. C., and Naughton M. A. (1973), Gynecol Invest. -
4, 263-269.
- 71.- Goverde B. C., Veenkamp. F. J. N. and Homan J. D. H. Acta En-
docrinology (Kbh) 59, 1968, 89-105.
- 72.- Wide, L. An Immunological Method for the enssay of HCG. Acta-
Endocrinol. (Kbh), 1962, 41 suppl. 70.
- 73.- Mishell, D.F., Jr., L.Wide, and C. A. Gensell Immunologic ---
determination of HCG in serum. J. Clin. Endocr. 1963, 23, 125.
- 74.- Brody, S., and G. Carlstrom. Immuno-assay of HCG in normal --
and pathology pregnancy. J. Clin. Endocr. 1962, 22, 564.
- 75.- Butt, W. R., Crooke, A. C., Cunninham, F.J. and Evans, A. J.-
(1961). Biochem. J. 79, 64.
- 76.- A. H. W. M. Schuurs, E. Jager and J. D. H. Homan Acta endocr.
(1968), 59, 120-138.

- 77.- P. G. Lusch and Herta Schwabacher; Nature 1962, 195; 246-247.
- 78.- W. R. Butt, J. Endocrinology 1957. 15, Lix.
- 79.- Brody, S., and Carlström, G (1960). Lancet 2, 99.
- 80.- Van Hell H. Matthijsen R. and Homan J. D. H. Acta Endocrinology, (Kbh). 1968, 59, 89-92.
- 81.- Aschheim, S., and B. Zondek, B. 1927. klin Wochschr. 6, 1322.
- 82.- Browne, J. S. L., and Venning, E. M. 1936. Lancet 2, 1507.
- 83.- Evans, H. M. Kohls, C. L. and Wonder, D. H. (1937). J. Am. -- Assoc. 108, 287-289.
- 84.- Smith, O. W., and Smith, G.V. (1937). Am. J. Obstet Gynecol - 33, 365.
- 85.- Gurin, S. Bachman, C., and Wilson, D.W. (1939), J. Biol. Chem. 128, 525-536.
- 86.- Zondek, B. and Ascheim, S. Klin, Woch., (1928). 7, 1453.
- 87.- Katzman, P. A. and Doisy, E. A. (1932), J. Biol. Chem. 98, -- 739-759.
- 88.- Katzman, P. A., Godgrid, M., Cain C. K., and Doisy, E. A. --- 1943, J. Biol. Chem. 148, 501-507.
- 89.- Claesson, I. Hogberg, B. Rosenburg, T. H., and Westman A. --- (1948), Acta Endocrinology I, 1-18.
- 90.- W. R. Butt, J Endocrinology (1958), 17, 143-148.

- 91.- Katzman, F. A., Godgrid, M., Cain C. K., and Doisy, E. A. ---
1944 J. Biol. Chem. 150, 101.
- 92.- Rigas, D. A., Paulsen, C. A. and Heller C. G. 1958,
- 93.- Zondek, B. 1931, Klin. Wochschr, 10, 2121-2123.
- 94.- Albright, F., Halstead, J. A. and Cloney, E. 1935, New Engl.-
J. Med. 212, 192-195.
- 95.- Heller, C. G. and Heller, E. G. 1939a Endocrinology 24, 319-
325.
- 96.- Nathanson, I. T., Towne, L. E., and Aub, J. C. 1941. Endocri-
nology 28, 851-65.
- 97.- Klinefelter, H. F., Jr., Albright, F., and Griswold, G. C. --
1943, J. Clin. Endocrinology. 3, 529-544.
- 98.- Howard, R. P., Sniffen, R., Simmons, F. A., and Albright, F.
1950, J. Clinical Endocrinology 10, 121-186.
- 99.- Heller, C. G., and Chandler, R. E. 1942. J. Clin. Endocr. 2, -
252-253.
- 100.- Varney, R. F. and Koch, F. C. 1942, Endocrinol. 30, 399.
- 101.- Heller, C. G., and Nelson, W. O. 1945a J. Clin. Endocrinol. -
5, I-12.
- 102.- Heller, C. G., and Nelson, W. O. 1945b, J. Clin. Endocrinol.
5, 27-33.
- 103.- Heller, C. G., and Nelson, W. O. 1948, J. Clin, Endocrinol. -
8, 345-366.

- 104.- Jungek, E. C., Maddock, W. O. and Heller, C. G. 1947, J. --
Clin. Endocrinol. 7, 1-10.
- 105.- Frank, R. T., and Salmon, U. J. 1935, Proc. Soc. Exptl. ---
Biol. Med. 32, 1237-1239.
- 106.- Drips, D.G., and Osterberg, A. E. 1938. Endocrinology 23, -
703-710.
- 107.- Loraine, J. A. 1949a, Ph. D. Thesis, University of Edinburgh
- 108.- Loraine, J. A. 1950a, J. Endocrinol. 6, proc. ii.
- 109.- Dekanski, J. 1949. Brit. J. Explt. Pathol. 30, 272-282.
- 110.- Levin, L. and Tydnale, H. A. 1936, Proc. Soc. Exptl. Biol.-
Med. 34, 516-518.
- 111.- Pedersen-Bjergaard, K. 1936, Zentr. Gynakol. 60, 372-375.
- 112.- Rhothemich, N. O., and Foltz, L. M. 1940. Endocrinology --
27, 37-40.
- 113.- Levin, L. 1941, Endocrinology 28, 378-387.
- 114.- Pedersen-Bjergaard, K. and Tennesen, M. 1948, Acta Endocri-
nol. I, 38-60.
- 115.- Funnell, J. W., Keaty, C. and Hellbaum, A. A. 1951, J. Clin.
Endocrinol. II, 98-102.
- 116.- Smith, P. H., Albright, F., and Dodge, F. 1943, J. Lab. ---
Clin. Med. 28, 1761-1766.
- 117.- Katzman, I. A., and Doisy, E. A. J. Biol. Chem. 106, 125; -
1934.

- 118.- Scott, L. D. 1941, Brit. J. Exptl. Pathol. 21, 320-324.
- 119.- Bradbury, J. T. Brown E., and Brown, W. E. 1949, Proc. Soc.-
Exptl. Biol. Med. 71, 228-232.
- 120.- Mc. Arthur, J. W. 1952, Endocrinology 50, 304-310.
- 121.- Prunty, F. T. G., Mc Swiney, R. R., and Clayton, B. E. 1953,
J. Clin. Endocrinol. and Metabolism. 13, 2, 1480-1501.
- 122.- Brown, J. B. and Lorain, J. A. 1955, J. Endocrinol. 13, proc.
ii-iii.
- 123.- Malburg, R. F. and Goodman, J. R. 1954, J. Clin. Endocrinol.
and Metabolism. 14, 666-71.
- 124.- Johnsen, S. G. 1955a, Acta Endocrinol. 20, 101-105.
- 125.- Johnsen, S. G. 1955b, Acta Endocrinol. 20, 106-111.
- 126.- Gorbman, A. 1945, Endocrinol. 37, 177-190.
- 127.- Van Gilse, A. A. 1955, Nature 175, 686-687.
- 128.- Jungck, E. C., Maddock, W. O., and Heller, C. G. 1947, J. --
Endocrinol. 7, 1-10.
- 129.- Kassenaar, A. Al. H. and Paesi, F. J. A. 1951, Acta Endocri-
nol. 8, 125-130.
- 130.- W. R. Butt, A. C. Crooke and F. J. Cunningham 1961, Bioch. -
J. 81, 596-605.
- 131.- W. R. Butt, A. C. Crooke and F. J. Cunningham 1959, Acta En-
docrinol., Copenhagen, 32, 509.

- 132.- Butt W. R., J. D. and Round, B. P. 1956, *Biochem. J.* 64, 26.
- 133.- Main, R. K., Wilkins, M. J. and Cole, L. J. 1959, *J. American Chem. Soc.* 81, 6490.
- 134.- Loraine, J. A. and Brown, J. B. 1954, *Acta Endocrinol. Copenhagen*, 17, 250.
- 135.- Lundin, H., and Schoderheim, J., *Biochem. Z.*, 238, I. (1931).
- 136.- Meyer, K., in Kurzrok, R., *The endocrines in obstetrics and gynecology*, Baltimore 115 (1937).
- 137.- Bischoff, F. and Long M. L., *J. Biol. Chem.* 116, 285. 1936.
- 138.- Gurin S. Bachman, C. and Wilson, D. W. 1940, *J. Biol. Chem.* 133, 467-476.
- 139.- Lejwa, A. 1932. *Biochem. Z.* 256, 236.
- 140.- W. R. Butt, *J. Endocrinology* 1958, 17, 143-148.
- 141.- Katzman, P. A. *Endocrinology*, 21, 89-95.
- 142.- *The United States Pharmacopeia Twentieth Revision Official - From July 1, 1980. Pág. 358.*
- 143.- Dekanski, J. 1949, *Brit. J. Exptl. Pathol.* 30, 272.
- 144.- Wide, L. and Gemzell, C. A. (1960), *Acta Endocr. (Copenhagen)*, 35, 262.
- 145.- Levin, L. 1944. In *The Chemistry and Physiology of Hormones American Association for the Advancement of Science, Washington, D. C.*, pág. 162.

- 146.- Taubert H. D. et al. Med. Monatsschr 31 (2), 79, 86; (1977).
- 147.- Ginekol Pol. 48 (5): 493-495; (1977).
- 148.- PLM. 21a. Edición Mexicana, Ediciones PLM. S. A. páginas: ---
218, 425, 426, 593 y 708.
- 149.- Pederson-Bjergaard, K. 1936, Zentr. Gynakol. 60, 372-375.
- 150.- Rothermich, N. O., and Foltz, L. M. 1940, Endocr. 27, 37-40.
- 151.- Levin, L. 1941. Endocrinology 28, 378-387.
- 152.- Pederson-Bjergaard, K. and Tønnesen, M. 1948, Acta Endocri--
nol, I, 38-60.
- 153.- Funnell, J. W., Keaty, C., and Hellbaum, A. A. 1951, J. Clin.
Endocrinology, ii, 98-102.
- 154.- Varney, R. F. and Kock, F. C. 1942, Endocrinology 30, 399 --
407.
- 155.- Smith, P. H. Albright, F., and Dodge, F. 1943, J. Lab. Clin.
Medical, 28, 1761-1766.