

200
209



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“HORMONA CORIONICA
GONADOTROPICA”**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

NORMA BARAJAS AVILA



MEXICO, D. F.,

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAGINAS
Capítulo I. Introducción	3
Capítulo II. Antecedentes	8
Capítulo III. Localización y Sitio de Síntesis de la Hormona.	14
Capítulo IV. Estructura Química	26
Capítulo V. Características y Propiedades de las Subunidades de la Hor- mona.	43
Capítulo VI. Regulación de la Actividad Hor- monal.	61
Capítulo VII. Aspectos Clínicos de la Acción Hormonal.	92
Capítulo VIII. Conclusiones.	156
Capítulo IX. Bibliografía.	201

CAPITULO PRIMERO

I.- INTRODUCCION .

El hombre no puede escapar a la interdependencia que existe con su medio ambiente y constantemente se ve afectado por cinco factores críticos principales - que son:

1. El crecimiento de la población.
2. La utilización irracional de los recursos naturales disponibles.
3. La desnutrición.
4. La industrialización acelerada, y
5. La contaminación.

Al analizar las variaciones de estos elementos encontramos que todos ellos muestran una íntima interdependencia y siguen un patrón matemático denominado crecimiento exponencial. Por ejemplo, en 1650 la población mundial era aproximadamente de 500 millones de habitantes y su tasa de crecimiento cercana al 0.3% anual, esta población tardó en triplicarse un período de 250 años (hasta el año de 1900). Sin embargo la población fué nuevamente triplicada de 1970 a 1980 un

período cinco veces menor al anterior. Este incremento explosivo en la población ha sido más espectacular en ciertas regiones como es el caso de los países pobres o en vías de desarrollo (1).

En las sociedades primitivas, la elevada mortalidad y el promedio de vida corto limitaban los efectos de una fecundidad alta. Sin embargo, el control de las enfermedades y los adelantos de la tecnología han reducido en forma sorprendente la mortalidad y la provisión alimentaria ha aumentado, de tal modo que resulta posible un mejor nivel de salud, de educación y de calidad de vida, siempre que el aumento de la población no sobre pase a los abastecimientos y servicios.

El número de habitantes de los países más pobres del mundo, aumentó a una velocidad mayor que el del resto de los países, por lo que una necesidad actual, muy urgente, es el de estimular a los pueblos de escasa educación para que lleven a cabo un programa de control de la población. El problema no es tan grande en las naciones más ricas, pero aún no ha sido solucionado del todo; ya que solo una fracción muy pequeña de la población mundial se interesa en la comprensión de estos problemas y en la búsqueda de soluciones a los

mismos.

Una vez que el hombre tenga conciencia de tal si tuación; será posible anticipar límites y establecer - controles de la población, como son: el control de natalidad, la restricción del uso de las tierras y el - agua, la conservación y nueva circulación de recursos, de modo que la población permanezca debajo de los lími tes peligrosos, que la conduzcan al caos.

Una de las soluciones puede ser la aplicación de métodos anticonceptivos para planear familias pequeñas con progenies bien alimentadas y recursos sociales estables, sin embargo el bajo nivel económico de gran - parte de la población ha tenido como consecuencia el - desconocimiento y la inaccesibilidad de dichos métodos.

El control de la natalidad se ha encontrado en - nuestro país, con una serie de obstáculos entre los - cuales se destacan la vigilancia de muchos patrones - culturales tradicionales que ponderan el papel pro - creativo y maternal de la mujer e inculcan que la aspi ración fundamental de toda joven debe ser el matrimo - nio y la maternidad. A ello se debe añadir el tabú - sexual que implica la poca comunicación de estos pro -

blemas y la actitud de algunos grupos, que se oponen a cualquier método que obstaculice el funcionamiento natural del organismo.

Si a estas tendencias añadimos la creencia de la superioridad masculina, valor inherente a nuestra sociedad pero acentuado en los medios de bajos recursos, el resultado final es que las mujeres pobres tienen más dificultades que aquellas que cuentan con mayores recursos económicos, para prevenir la posibilidad de un embarazo y para impedirlo fácilmente (2).

Para cumplir con esta última finalidad se requiere encontrar los métodos más eficaces para el control de la población y para ello es necesario, primeramente, el conocimiento detallado de los sistemas endocrinológicos que ocurren en ambos sexos de la especie humana.

En vista de que los mecanismos que gobiernan el control de la reproducción son muy variados, es necesario conocer todas sus interrelaciones, ya que un conocimiento inadecuado podría llevar a un desequilibrio hormonal que lejos de cumplir con su cometido causaría un efecto dañino al organismo.

Por lo tanto siendo un tema de actualidad para los países en vías de desarrollo como es el caso de México, nos parece una contribución importante analizar, hasta donde es posible, los conocimientos que tenemos sobre esa complicada maquinaria hormonal que se involucra en la biología de la reproducción.

Para ello, se describen en este trabajo algunos de los esfuerzos realizados hasta el momento y que conducen al conocimiento del control endocrinológico de la reproducción, sin querer de ninguna manera cubrir completamente este campo, ya que debido a la importancia que este fenómeno adquiere en nuestros días, la cantidad de aportaciones científicas es enorme y casi imposible de cubrir.

Por lo que tenemos la firme convicción de que este esfuerzo ofrecerá algunas ideas útiles a todos aquellos estudiosos de la reproducción.

CAPITULO SEGUNDO**I.- ANTECEDENTES.**

La historia de la endocrinología, se remonta a finales del siglo pasado, aunque podemos decir que los principales descubrimientos sobre su función en el organismo se llevaron a cabo a principios del presente siglo.

Las primeras observaciones endocrinológicas fueron puramente clínicas, a partir de síndromes cuya etiología no estaba bien definida. Pero fueron las observaciones de Claude Bernard en 1854-1885 las primeras evidencias y las de muchos otros después, las que fueron acumulando hechos relacionados con las funciones de las glándulas endocrinas, llegándose a demostrar que sus efectos no eran debidos a la glándula misma, sino a principios activos específicos originados en ellas (3).

El sistema endócrino regula a través de las hormonas, prácticamente la totalidad de las reacciones del organismo, constituyéndose así, en un sistema que le

permite adaptarse a todas las variaciones que le vienen impuestas ya sea desde el exterior o del interior.

De acuerdo con la definición de Starling, toda hormona es secretada por una glándula endocrina constituida por tejidos especializados y es transportada por la sangre hasta el tejido receptor.

A estas sustancias o principios activos específicos se les llamó " hormonas "; término sugerido por Hardy y usado por Bayliss y Starling en 1902 (4), que deriva de una raíz griega que significa " excitar o mover ".

DE LA HORMONA .

Por lo tanto podemos definir una hormona, como la sustancia química producida por las glándulas endocrinas, que regulan y coordinan las funciones biológicas del organismo. Muchas son específicas en su forma de actuar sobre ciertos tipos de células.

Es importante señalar que las hormonas incluyen diversos tipos de compuestos químicos; por ejemplo, pueden ser:

- a) Péptidos.
- b) Protefnas.
- c) Esteroides.
- d) Catecolaminas.
- e) Tipos derivados de aminoácidos.

Una forma como las hormonas péptidicas ejercen - sus efectos es por que las células sensibles a la hormona en particular, poseen receptores específicos en - su membrana, mediante los cuales " reconocen " la presencia de la hormona y gracias a los cuales se establecen una serie de reacciones dentro de la célula en respuesta a dicha hormona.

Como señalaremos más adelante, el AMP cíclico interviene en muchas de las reacciones causadas por las hormonas. Por lo menos en algunos casos, se cree que - las reacciones iniciadas por una hormona en una célula específica dependen de que algunos genes puedan entrar en actividad o, por el contrario, serán inhibidos originándose así las respuestas a la hormona en la célula afectada.

Las hormonas producidas por las glándulas endocrinas son esenciales para la vida. Algunas están encarr -

gadas del crecimiento y del desarrollo, de diferencias entre el macho y la hembra y de la mayor parte de los caracteres sexuales. Las hormonas desempeñan una función muy importante en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, y en la conservación del equilibrio hídrico y mineral. Una hormona, en general controla el ritmo metabólico de las células y además de afectar el crecimiento y la forma del individuo, afecta también el temperamento, la sensibilidad y las emociones de dicho individuo (5).

La existencia de las hormonas provenientes de la hipófisis y que muestran una acción estimulante sobre las gónadas, fué determinada en forma independiente por Smith (6) y Zondek (7) en 1926 .

Poco tiempo después en 1927 Aschheim y Zondek (8) demostraron la presencia de sustancias con actividad gonatrópica, que no tienen origen hipofisiario y que se encontraron en la orina de mujeres embarazadas, como la hormona coriónica gonadotrópica (hGC).

Los trabajos más destacados para el aislamiento y purificación de la hCG, fueron los realizados por Gurin, Bachman y Wilson (9), Katzman, Godfrid, Chain y

Doisy (10), y posteriormente Bell y colaboradores (11).

PapKoff, Sairam y Li (12) y Liu y colaboradores (13) son los primeros en reportar la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa de la hormona coriónica gonadotrópica, en ovinos. Más tarde, los grupos de Bahl (14) y Morgan (15) describieron la secuencia completa de aminoácidos de las subunidades alfa y beta de la hCG. Actualmente los estudios que se realizan con esta hormona; están enfocados principalmente a su participación clínica.

La gonadotropina coriónica es una glucoproteína producida en el organismo por los " trofoblastos " y es secretada únicamente en el embarazo normal y en padecimientos tales como la mola hidatidiforme, el coriocarcinoma y el corioadenoma uterino o bien en el hombre cuando se presenta el teratoma.

En el embarazo normal, la gonadotropina coriónica, aparece tan pronto como se desarrolla el trofoblasto en el endometrio, al séptimo día después de la fecundación. Desde entonces, su concentración aumenta en el suero, al tiempo que se incrementa la concentración

excretada por vía renal. Figura 1 (pág 159) (16).

Hacia el tercer o cuarto mes del embarazo, la can ti dad excretada en la orina alcanza su concentración - máxima, y desde ese momento desciende para estabilizar se en una meseta baja en los dos últimos trimestres - del embarazo, para desaparecer una semana después del parto.

Debido a que su presencia en la sangre u orina, - indica un embarazo normal, una mola o un tumor trofo - blástico, su detección a través de procedimientos bio - lógicos, químicos o inmunológicos constituyen una prue ba diag nóstica del embarazo, de su progreso, de los - problemas que se presentan en el transcurso de él, así como de su término. Además, como se describirán en el capítulo VII, esta hormona resulta una guía excelente del progreso de la neoplasia trofoblástica, de la efec tividad de la terapéutica empleada y una señal precisa de la destrucción total de un tumor.

OBJETIVOS .

El objetivo de llevar a cabo una revisión bibliográfica, de la hormona Coriónica Gonadotrópica, la cual consiste en su localización y sitio de síntesis, en su estructura química, purificación y aislamiento, en las características y propiedades de sus subunidades, así como la regulación de la actividad hormonal y por último los aspectos clínicos de la acción hormonal, tiene varias razones:

1. Por ser un tema de actualidad como es la sobre población que el no ser controlada puede traer como consecuencia la carencia de alimentos, aumento de la contaminación, falta de espacio, etc. Por lo que un conocimiento adecuado de la hormona, nos llevará a cubrir un campo de la Endocrinología, muy importante para aquellos estudiosos de la Reproducción, los cuales basándose en estos estudios pueden tomar tal vez medidas adecuadas para desarrollar métodos que ayuden a tener un mayor control de la reproducción.

2. Por su aspecto Patológico. Su detección en sangre u orina a través de procedimientos biológicos o inmunológicos, los cuales se describen en el Capítulo VII. Resulta una guía excelente del progreso de la neoplasia trofoblástica, de la efectividad de la terapéutica empleada y una señal precisa de la destrucción total de un tumor.

Por lo que consideramos que puede tener mucha utilidad, tanto para los estudiosos de la Reproducción, - así como para los patólogos, y en general para todos - aquellos que necesiten conocer cual quier aspecto sobre la hormona del embarazo.

CAPITULO TERCERO

SINTESIS DE LA HORMONA CORIONICA GONADOTROPICA .

La placenta, es un organo que se desarrolla durante el embarazo en el revestimiento uterino y basicamente es de origen fetal. Está considerada como autónoma en la síntesis y secreción de proteínas y hormonas esteroides (17).

Las funciones principales de la placenta son:

- 1) El intercambio de productos metabólicos y gases entre la circulación materna y fetal, sin que se mezclen ambas, y
- 2) La producción de hormonas.

La membrana divisoria entre las dos circulaciones, a menudo llamada barrera placentaria, consiste exclusivamente de tejido fetal y presenta cuatro capas a saber:

- * Revestimiento endotelial de los vasos fetales.
- * Mesodermo en el centro de las vellosidades.
- * Capa citotrofoblástica, y
- * Sincitio de revestimiento (18).

Estudios en la placenta fetal humana, muestran - que sintetiza adrenocorticotropina (ACTH) y hormo - nas hipotalámicas. También fué demostrado que puede - sintetizar grandes cantidades de hormona coriónica go - nadotrofica inmunoreactiva; y que la síntesis de la - subunidad beta puede ocurrir en el riñon y una ligera cantidad en el hígado fetal. No fué reportado que el tejido fetal pueda sintetizar a la subunidad alfa de hormonas glucoproteicas y que la hormona sintetizada es bioactiva.

Estas observaciones constituyen evidencias de que un tejido fetal no endocrino puede sintetizar un pep - tido bioactivo que es inmunológicamente idéntico a la hCG (19).

La primera descripción de la actividad de la hor - mona coriónica gonadotrofica (hCG) fué realizada por Gey, Jones y Hellman, los cuales la extrajeron de cul - tivos de citotrofoblasto del tejido placentario (20), años después Wislocki y Bennett demostraron una reac - ción PAS-Positivo en las celulas de Langhans, que in - terpretaron como la hCG (21). También Thiede y - Choate localizaron a la hCG por medio de técnicas

de inmunofluorescencia en el sincicio. Una cantidad mucho más pequeña apareció en el amnios, pero no se descubrió una fluorescencia específica en el citotrofo - blasto. Estos autores indicaban que solamente el sincicio contenía los organelos subcelulares requeridos para la síntesis de las proteínas, particularmente un retículo endoplasmático abundante y el complejo membrano - so de Golgi bien desarrollado; mientras que el citotro - foblasto ofrecía una estructura simple (22).

Basándose en las ultraestructuras, Dreskin (23) y otros consideran el sincicio como la forma diferenciada de trofoblasto, capaz de realizar la síntesis de moléculas complejas y responsable de la producción de todas las hormonas placentarias, confiriendo al citotro - foblasto un papel primario en el crecimiento y la diferenciación celular.

La hCG está compuesta de dos subunidades alfa y beta diferentes y no unidas covalentemente. Como se ve en el siguiente capítulo, la subunidad alfa es virtualmente idéntica a la subunidad alfa de otras hormo - nas glucoproteicas (la FSH, la LH y la TSH).

La beta subunidad le confiere la especificidad biológica .

Se ha determinado la composición de aminoácidos y carbohidratos, de la hormona, obtenida de la hipofisis y de preparados de orina de mujeres embarazadas.

La hCG urinaria tiene un peso molecular de 38,000 con una subunidad alfa de 15,000 y una subunidad beta de 23,000. Contiene aproximadamente el 30% de carbohidratos. Las subunidades alfa y beta de la hCG pueden ser secretadas " in vivo " en forma diferencial autópticamente por la placenta y el coriocarcinoma y ectópicamente por varios tumores no trofoblásticos. En cultivos primarios de tejido placentario normal, se han observado cantidades grandes de subunidades alfa libre, pero muy poca cantidad de subunidad beta libre. La secreción de hCG y sus subunidades libres ha sido observada " in vitro " (24).

Una línea celular clonada proveniente de coriocarcinoma, la JEG-3, ha sido extensamente estudiada por diferentes grupos de investigadores (24, 25). Estas células secretan hCG biológicamente activa, de

tamaño similar al estandar urinario. Las células JEG-3, también secretan una forma grande de la subunidad alfa libre y se ha especulado que esa especie grande puede ser un precursor de las formas pequeñas de la subunidad alfa.

Dean, Weintraub y Rosen estudiaron la secuencia en el tiempo, de la producción de novo por esa línea celular, de las subunidades alfa y beta, tanto en forma libre como en forma combinada.

Varios grupos han obtenido las formas eutópicas de la hCG en el plasma de mujeres embarazadas y en extractos de placenta, así como las formas heterogéneas de la hCG intacta y de la subunidad alfa libre.

Vaitukaitis observó en los extractos de placenta una subunidad alfa de la hCG de peso molecular mayor a la subunidad alfa que se encuentra asociada a la subunidad beta. (26).

Ella observó también formas heterogéneas de la hCG eutópica en orina de mujeres con neoplasmas trofoblásticos. En cultivos de células transformadas, SV-40, obtenidas de placenta normal en el primer trimestre, Chou observó la síntesis de las formas heterogéneas de

las subunidades alfa y beta, pero descubrió que las especies alfa y beta predominantes tenían aproximadamente el mismo tamaño que las subunidades de la hCG de la orina (27).

Los cultivos de una línea celular de coriocarcinoma (BeWo) no secretaron solamente la hCG intacta y la subunidad beta libre de tamaño normal, sino también secretaron la subunidad alfa grande libre. Husa y colaboradores observaron, también, poca cantidad almacenada de las subunidades, en las células BeWo, pero las especies intracelular fueron ligeramente más pequeñas en tamaño que los estándares . (28).

Todos estos estudios citados anteriormente, se basan en el análisis de la hCG inmunoreactiva y de las subunidades sin desnaturar o reducir.

De acuerdo a los datos mencionados se sugiere que la subunidad alfa intracelular pequeña sea un precursor de la subunidad alfa grande secretada y no viceversa.

FISIOLOGIA DE LA HORMONA EN EL EMBARAZO .

La función fisiológica de la hormona coriónica - gonadotrópica durante el embarazo no esta bien conocida, pero se sabe que la hCG exógena puede prolongar la fase lútea del ciclo de la mujer (29).

Las evidencias sugieren que la secreción de la - hCG placentaria mantiene el cuerpo lúteo durante las - primeras seis semanas del embarazo. Si el cuerpo luteo es removido en este tiempo hay gran riesgo de abortar.

La función primaria del cuerpo lúteo es la secreción de progesterona, la cual a su vez mantiene al - blastocisto recién implantado. Yoshimi y colaboradores, sugieren que la función del cuerpo lúteo, en el embarazo declina después de la cuarta semana de gestación en relación al tiempo de ovulación, y a pesar de una elevación en los niveles de la hCG. (30). Más tarde la placenta se convierte en la fuente principal de progesterona ya que la placenta no muestra actividad de - 17-hidroxilasa, los niveles plasmáticos de 17-hidroxiprogesteronona reflejan la secreción del cuerpo lúteo.

Cuatro semanas después de la ovulación, los niveles de 17-hidroxiprogesterona del plasma empiezan a decaer, reflejando una disminución de la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo.

La concentración de hCG en la circulación materna sobrepasa la concentración encontrada en la circulación fetal. En el testículo de los fetos macho hay una proliferación de células Leydig. Coincide con el pico de la hCG materna y decaen en los últimos dos trimestres del embarazo, cuando los niveles de hCG materna son los más bajos.

Estudios " in vitro " realizados por Adcock y colaboradores (31) han mostrado que la hCG inhibe la respuesta de linfocitos a fitohemaglutina. Sin embargo algunos investigadores han postulado que la hCG juega un papel inmunológico importante al permitir la implantación de el blastocito. Otras alteraciones en la función inmune han sido descritas en el embarazo. Se han observado una menor incidencia en el retardo de las pruebas cutaneas de hipersensibilidad positiva así como una sobre-vivencia mayor en los injertos de piel. Se desconoce si estas alteraciones son un efecto di -

recto de la hCG y algunos otros factores presentes durante la gestación. (32).

La hCG exógena estimula la secreción de la dehidroepiandrosterona (DHEA) en niños prematuros y neonatos. Lauritzen y Lehman han sugerido que la hCG regula la cantidad de DHEA como precursor para su conversión a estrógeno por la placenta. (33) Apparently, no hay mecanismos de retroalimentación conocidos que regulen fisiológicamente la síntesis y secreción de la hCG por la placenta. Como resultado, algunos investigadores han sugerido que el trofoblasto está " programado " para sintetizar y secretar hCG y que el patrón de secreción, observado durante el embarazo es independiente de cualquier factor de control. (34)

La velocidad de eliminación metabólica (Metabolic Clearance) ha sido determinada entre 2 y 6 ml de plasma por minuto. Wide y colaboradores observaron que la velocidad tenía un valor mayor (el doble) cuando se compara la determinación por bioensayo respecto al radioinmunoanálisis. Apparently la velocidad de eliminación no se ve afectada por la concentración plasmática. (35).

De acuerdo con Loraine (36), la velocidad metabólica renal determinada tanto por bioensayo como por radioinmunoanálisis, varía entre 0.4 y 1.0 ml por minuto. Si se suministra hCG carente de ácido siálico, a animales de laboratorio, esta forma es rápidamente eliminada tanto por el hígado como por el riñón. No existen datos experimentales que muestren que la eliminación de los residuos de ácido siálico sea un mecanismo fisiológico que pueda presentarse " in vivo ".

Chou, realizó estudios para determinar los efectos del 3', 5' adenosina 8-Bromo monofosfato (8 Brc AMP) y el dibutiril 3', 5' AMPc (Bt₂c AMP) en la síntesis de la hCG, por células de la placenta humana transformada por el virus SV40-tsA. Ambos nucleótidos indujeron significativamente la síntesis de la subunidad de la hCG, con poco efecto sobre la síntesis de la hormona completa (27).

Los glucocorticoides, son reconocidos como hormonas importantes en la diferenciación de tejidos de mamíferos durante el desarrollo fetal. Un incremento en su concentración se ha asociado con la maduración del tejido pulmonar del feto y el inicio del parto. Aunque se han demostrado receptores citoplasmáticos para glu

glucocorticoides en la placenta, el efecto de los glucocorticoides en la síntesis y secreción de las hormonas de la placenta no han sido bien estudiados.

Así, Wilson y Jawad estudiaron " in vitro " el efecto de los glucocorticoides, sobre la secreción de la hCG observando, que la secreción de la hCG es inhibida por concentraciones elevadas de esteroides. Otros esteroides endógenos quizá alteran, la síntesis y secreción de la subunidad beta de la hCG. (17).

Murphy y D'Aux han reportado que los glucocorticoides aumentan tres veces su concentración en el suero fetal y el líquido amniótico durante las seis últimas semanas de embarazo, mostrando un incremento en la secreción adrenal del feto. (37).

Harrison y asociados (38), han descrito un sistema de transporte en la membrana trofoblástica de la placenta humana, para glucocorticoides y progestinas, lo cual puede explicar los efectos competitivos de los esteroides en la secreción de hormonas.

La importancia fisiológica de el efecto de los glucocorticoides en la secreción de la hCG no es aparente, excepto en el último mes de la gestación cuando

se observa un ligero incremento de la hCG. Un incremento en la secreción materna podría reflejar un incremento en la actividad adrenal del feto. La estimulación de la secreción bajo esas condiciones no implica una función obligatoria para los glucocorticoides pero puede sugerir que sea uno de los factores que modulan la síntesis de la hormona placentaria (17).

CAPITULO CUARTO .

I.- ESTRUCTURA QUIMICA DE LA hCG .

El grupo de las hormonas gonadotrópicas está integrado por la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona coriónica gonadotrópica (hCG). Desde el punto de vista químico, estas hormonas poseen gran semejanza, ya que están constituidas de carbohidratos y proteínas - por lo que se les llama glucoproteínas. (Tabla I, - pág.183). (39, 40, 41).

La estructura de la hormona coriónica gonadotrópica (hCG), está bien estudiada en su composición - de carbohidratos, la secuencia de los aminoácidos y - la interacción de los carbohidratos con las proteínas.

CARBOHIDRATOS.

Los primeros estudios sobre la naturaleza de los carbohidratos en la hCG fue hecha por Bahl y colaboradores en 1928 (14). Después de la hidrólisis ácida de la hCG, identificaron por medio de la cromatografía en papel, el ácido siálico, la glucosamina, la galactosamina, la galactosa, la manosa y la fucosa.

Posteriormente, se llevó a cabo la estimación cuantitativa de los carbohidratos neutros por cromatografía gas-líquido (42).

El contenido de carbohidratos constituye un 33% de la molécula hormonal. Están compuestos de nueve residuos de manosa a galactosa, uno de fucosa, once de N-acetilglucosamina, tres de N-acetilgalactosamina y ocho residuos de ácido siálico, todos con un peso molecular de 27,000. La Tabla II (pág.184) nos muestra una comparación de la composición de carbohidratos de las hormonas hCG y ICSH-ovina (43,44).

Estudios por cromatografía de exclusión mostraron que la hormona está formada por dos glucopéptidos homogéneos. La composición de los carbohidratos, de estos glucopéptidos es como sigue: Fuc, Gal, Man₅, Gluc, NAC₆ y Gal₂, Man₅, Glu y NAC₅. La secuencia de los monosacáridos fue determinada por medio de enzimas específicas para cada azúcar, tales como: la beta galactosidasa, la beta-N-acetilglucosaminidasa, la alfa-manosidasa, la alfa-L fucosidasa y la sialidasa.

La Tabla III (pág.185), muestra los productos obtenidos de la acción de diferentes glucosidasas.

Por ejemplo, la alfa-L fucosidasa, liberó el 95% de fucosa de la hCG.

La cadena de carbohidratos, como lo demostró la investigación, tiene la siguiente secuencia: ác. N - acetilneuramínico-Fu alfa, gal-beta Glu-NAC-beta Man alfa. Al final la cadena puede presentar un residuo de ácido siálico o uno de fucosa.

La unidad de carbohidratos de cadena uno de los glucopéptidos mencionados arriba, está compuesta de - diversas cadenas y probablemente esté unida a la cadena de polipéptidos a través de un enlace entre una - N-acetilglucosamina y una asparagina.

Se separaron cinco fracciones con diferente composición, cuando las fracciones peptídicas fueron analizadas por cromatografía de exclusión.

La figura 2, muestra algunas características de las - fracciones separadas (pág. 160).

Cada fracción estuvo sujeta a una purificación posterior, y se determinó el peso molecular de cada glucopéptido por filtración en gel (45).

Las Tablas IV, V, muestran los pesos moleculares de los diferentes glucopéptidos, así como su composición química (pág. 186, 187).

Se demostró, tanto por cromatografía en papel como por electroforesis, que los glucopéptidos SIGP_I, SIIGP_I y SIIGP₃ fueron homogéneos mientras que SIIIGP_I era heterogéneo.

El tratamiento de los glucopéptidos SIIGP_I, con beta-galactosidasa, beta-N-acetilglucosaminidasa y alfa-manosidasa liberó 3 residuos de galactosa, 4 de N-acetilglucosamina y 4.1 de manosa por molécula de glucopéptido.

La localización del ácido siálico en una posición terminal, sugiere que las unidades de carbohidratos son estructuras ramificadas. Cuando la hCG desializada es tratada con beta-galactosidasa, N-acetilglucosaminidasa y alfa-manosidasa; cerca de ocho residuos de N-acetilglucosamina y dos de manosa fueron liberados, lo cual sugiere que los residuos de N-acetilglucosamina están unidos íntimamente a los residuos de galactosa y son probablemente seguidos por residuos de manosa. La secuencia de los monosacáridos y

la configuración anomérica de la cadena de glucopeptidos puede ser como sigue:

N-AN-Gal beta-Glu NAc beta-Man alfa .

Los residuos de fucosa fueron liberados de la hCG nativa por acción de la alfa-L fucosidasa, lo cual sugiere que una de las cadenas de carbohidratos es terminada en fucosa. Estos residuos de fucosa no fueron hidrolizados por la 1-2-alfa-L fucosidasa, lo cual indica que no están unidos a galactosa (42).

Los datos de la Tabla VI (pág.188), sugieren que la fracción SIIGP_I, consta de cinco cadenas, tres terminadas por galactosa, una terminada por fucosa y una más, terminada por residuos de N-acetilglucosamina.

La cadena de carbohidratos terminada por fucosa, parece tener un residuo de galactosa en la segunda posición y un residuo de N-acetilglucosamina en la tercera posición.

La fracción peptídica SIIGP₃, consta de cuatro cadenas de oligosacáridos, terminadas dos cadenas en galactosa y dos cadenas por residuos de N-acetilglucosamina. Todos los residuos de N-acetilglucosamina -

parecen estar seguidos por residuos de manosa (42).

Hamashige y Arguilla (46) observaron algunas - diferencias en tres lotes distintos de la hormona, su - giriendo que las diferencias en las áreas de la pro - tefna, responsables de las actividades inmunológica y biológica, son el resultado de la heterogeneidad exis - tente en la composición de los carbohidratos.

AMINOACIDOS.

El contenido de aminoácidos de las diferentes - hormonas protéicas con actividad parecida a la hCG ha sido obtenido por varios autores desde 1963 (47). Tabla VII (pág.189).

La composición de aminoácidos fue obtenida sobre las bases de tres residuos de histidina. El peso de - la unidad de polipéptidos, que fue calculado con base en la composición de los aminoácidos, fue de 18,000 - por lo que el polipéptido constituye un 66% de la mo - lécula. La Tabla VIII (pág. 190), muestra que la por - ción peptídica de la hCG tiene un elevado contenido - en prolina (12.6 moles/mol. de hCG), cisteína y se - rina. No se observaron grupos sulfhidrilo libres .

Las Tablas VII, IX y X (pág. 189, 191, 192), resumen los resultados logrados en algunos laboratorios, para la hLH, la hFSH y la hCG respectivamente. Con propósitos de comparación en la Tabla I (pág. 183), se presentan los valores promedio de las tablas anteriores.

Como puede observarse, existe gran semejanza en el contenido de aminoácidos de la hLH, la hFSH y la hCG. La hFSH muestra diferencias en el contenido de arginina, valina y prolina y diferencias menores en el contenido de ácido aspártico, treonina y serina.

Cabe notar el alto contenido de prolina mostrado por las tres hormonas (11.4%, 6.7% y 11.2% en la hLH, la hFSH y la hCG, respectivamente). Ya que este aminoácido rompe la estructura de hélice alfa, hizo pensar a algunos autores que el porcentaje de esta estructura secundaria sea muy bajo (41).

Los resultados indican que la hCG es altamente homogénea en tamaño y composición de aminoácidos, en contraste a la heterogeneidad en carga eléctrica y composición de carbohidratos (51).

Los primeros investigadores que publicaron la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa y beta de la hCG fueron Bahl et al en 1972 (14). En 1973 Bellisario y colaboradores (52) informaron de la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa y Carlsen et al (53) de la subunidad beta. Más tarde en 1975 Morgan et al (15) describen las secuencias de ambas subunidades.

Por otra parte Ward y colaboradores en 1973 (54), obtuvieron la secuencia de los primeros veintisiete residuos de la subunidad beta de la hLH. Mientras que Shome y Parlow (55), Sairam et al (56) y Closset et al (50), obtuvieron la secuencia completa.

En la Figura 3 (pág.161), se comparan las secuencias publicadas de la subunidad alfa de la hCG, en la cual hay diferencia en la colocación de los residuos 25 y 26. La Figura 4 (pág.162), muestra la secuencia obtenida de la subunidad beta de la hCG, en la cual se puede observar diferencia en los residuos 28, 30, 56 y 86; en la región de los residuos 89 al residuo 93 y en la región COOH terminal. Además en la

localización de las cadenas de carbohidratos existe - diferencia en las posiciones 28, 30, 118, 121, 126 y 137.

Debido a la controversia existente por definir - la secuencia de aminoácidos en la región COOH - terminal de la beta hCG. Birken y Canfield (57), y Keu - tmann y William (58), realizaron independientemente experimentos con esa subunidad, comprobando que la secuencia propuesta por Morgan en 1975 entre los resi - duos 115 y 145 era la correcta (15, 49).

En la Figura 5 (pág. 163), muestra la secuencia de la subunidad beta de la hLH propuestas; tomando como base la secuencia obtenida por Sairam y Li. (56)

En este caso si existen diferencias en los primeros 27 residuos principalmente en la región que co - rresponde a los residuos 8 a 10 y en los residuos 13 y 15. Las diferencias más importantes encontradas entre los grupos de Closset, Shome y Sairam se locali - zan en la región de los residuos 41, 44, 52 y 55 . En la región COOH - terminal existe una notable diferen - cia en los residuos del 110 al residuo 115.
(50, 55, 56)

II. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA HORMONA .

La hormona hCG es una glucoproteína, descubierta por Aschheim y Zondek en 1927 (8), desde entonces - ellos y varios investigadores intentaron la purificación de esta hormona de la orina de mujeres embarazadas, (9, 10).

Otros investigadores estudiaron posteriormente - su extracción, su naturaleza química y su actividad - biológica; entre ellos, conviene destacar a Browne y Vennig, (73) quienes demostraron que la excreción - de la gonadotropina coriónica a través de la orina de mujeres embarazadas, tiene su máximo valor entre los 60 y 80 días del embarazo.

Desde el primitivo método de Zondek y Aschheim - en 1928, de precipitación de la gonadotropina urina - ria con alcohol, hasta el momento actual, se han propuesto diversos métodos de preparación y purificación basados en la absorción de la hormona sobre ácido ben - zoico, permutita y otros absorbentes (10).

Partiendo de estos productos concentrados, Gurin, Bachman y Wilson (9), han conseguido preparar la - hormona pura y homogénea y posteriormente Claesson, -

Högberg, Rosenberg y Westman (74), lograron cristalizarla.

El material generalmente usado para esta preparación es la orina de mujeres embarazadas, recogida entre los 50 y los 90 días siguientes al último período menstrual, que es el momento en que la concentración de gonadotropina es extraordinariamente elevada.

En seguida se resumen los pasos seguidos en algunos métodos para lograr la purificación .

1.- METODO DE GURIN, BACHMAN Y WILSON .

Se aconseja realizar las operaciones a una temperatura no mayor de 0.5 - 1° (9), la técnica es la siguiente:

- a) Las orinas mezcladas y enfriadas se acidifican a pH 5 con ácido acético. Se puede usar como indicador una solución al 1% monosulfonato de sodio de alizarina, que a pH 5 tiene color amarillo. Se agrega entonces una solución de ácido benzoico en acetona, agitando continuamente (75 ml de solución de ácido benzoico por litro de orina), según lo aconsejan Katzman y

colaboradores (10). El precipitado que se forma se separa por filtración. Contiene la g nadotropina adsorbida.

- b) El residuo se extrae con etanol al 50% a pH 6 y de ese extracto se precipita la hormona, - agregando dos volúmenes de etanol absoluto - frío.
- c) El precipitado obtenido se extrae dos o tres veces con una solución reguladora de ácido - acético-acetato de sodio de pH 4.8 que contie ne etanol al 50%, separando cada vez la solu ción por centrifugación. El extracto obtenido se enfría y precipita por la adición de un vo lumen de alcohol absoluto frío, y enfriando - durante varias horas. El precipitado se seca y representa unos 8 mg por litro de orina.
- d) 100 mg de la hormona obtenida en c) se disuel ven en 2 ml de agua fría, se ajusta el pH a 5 y se agita durante dos horas con 0.5 ml de - cloroformo. La emulsión se lava varias veces con 0.5 ml de agua y los extractos acuosos, - claros, se dializan y secan.

Se obtienen unos 6 mg de producto muy activo, que contiene unas 6,000 unidades por miligramo.

El producto es electroforéticamente homogéneo.

2.- MODIFICACION POR KATZMAN, GODFRID, CHAIN, Y DOISY .

Utilizan para adsorber la gonadotropina de la orina de mujeres embarazadas la permutita, - acidificada a pH 3.5 con ácido acético. La - columna se lava con agua fría y posteriormente la hormona se eluye lavando la columna con una solución de etanol al 38%, conteniendo - 10% de acetato de amonio, (10) y se precipita fraccionadamente, con alcohol, obteniéndose un producto homogéneo con una actividad de 8,500 U/mg.

3.- MODIFICACION POR CLAESSEN, HOGBERG, ROSENBERG Y WESTMAN.

Obtienen la gonadotropina coriónica como una - sustancia cristalizada y electroforéticamente homogénea (74), aplicando los siguientes pasos:

- a) La gonadotropina coriónica se absorbe de la orina con ácido benzoico .
- b) El precipitado se lava con acetona y el residuo se disuelve en solución 0.066 M de solución reguladora de acetato de pH 4.8 .
- c) El extracto obtenido se filtra y se adiciona etanol hasta el 85%. Hasta aquí se obtienen unos 25 a 30 mg de gonadotropina por litro de orina, con una actividad de 4,000 a 6,000 U/mg.
- d) Se disuelven 500 mg del producto obtenido en c), en 50 ml de solución reguladora de fosfatos 0.013 M de pH 7.4. Se separa la fracción insoluble por centrifugación y al sobrenadante se le adiciona gota a gota una solución acuosa al 10% de protamina, hasta que no se forme más precipitado. El precipitado es inactivo y se descarta .
- e) La solución se ajusta a pH 3.5 y se adiciona de alcohol con 5% de metacresol, hasta tener una concentración alcohólica de 50% .

Después de dos horas se eleva la concentración alcohólica a 60%. La hormona se precipita primero en forma amorfa y después comienza a cristalizàr en agujas en las 24 horas siguientes.

III. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA hCG .

La hormona coriónica gonadotrópica humana purificada se presenta, como un polvo blanco amorfo cristalino, con bajo contenido de cenizas y es soluble en agua, en soluciones salinas, en alcohol o en acetona al 50% de concentración .

Es insoluble en disolventes orgánicos puros o de alta concentración, (superior al 70%).

En solución neutra o débilmente ácida, la hormona no precipita por los ácidos pícrico, flaviánico, - rufiánico, picrolónico o tricloroacético, pero precipita por el ácido fosfotungstico y el ácido tánico, - en presencia de pequeñas cantidades de ácidos minerales. También precipita por la adición de yodo en yoduro de potasio y por ácido fosfomolibdico (51).

Las soluciones acuosas diluidas de la gonadotropina coriónica, son inestables y se destruyen aún mantenidas a 0°C. Las soluciones más concentradas tendrían una mayor estabilidad; Katzman, Godfrid, Chafn y Doisy, establecieron que el cloruro de magnesio, la gelatina y las protefinas del suero protegen a la hor-

mona de su inactivación espontánea, en solución acuosa (10).

Las soluciones acuosas de la hormona coriónica - gonadotrópica se inactivan irreversiblemente por calentamiento y por un exceso de ácidos y de bases, aunque la resistencia es mayor en medio ácido y sobre todo por los ácidos débiles. Disuelta en glicerol, la hormona resiste el calentamiento a 100°C durante 1 hora. En estado seco la gonadotropina aislada de la orina es estable durante mucho tiempo, a diferencia de la gonadotropina del suero de la yegua. El peso molecular de la hCG ha sido estimado por diversos métodos. Por el método de filtración en gel, fue de 59,000 \pm 4,000 daltons; por su velocidad de sedimentación fué de 47,000 \pm 3,000. El peso molecular de la hCG carboximetilada y reducida fué de 30,000 \pm 2,000 daltons, determinado por filtración en gel. Tomando en cuenta su composición química, el peso molecular mínimo es de 27,000 (41). El punto isoeléctrico encontrado fué de 2.9 (51).

CAPITULO QUINTO

CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES DE LAS SUBUNIDADES DE LA HORMONA CORIONICA GONADOTROPICA

Como se mencionó anteriormente, la hormona coriónica gonadotrópica (hCG), pertenece al grupo de las gonadotropinas. Una característica de estas hormonas es la de tener dos subunidades química y estructuralmente diferentes, denominadas alfa y beta .

A partir de la observación de Li y Starman de - que la LH ovina estaba formada por dos subunidades, - se encontró que otras hormonas glucoprotéicas como la hCG (71, 49), la TSH (59), y la FSH (66), también constaban de dos subunidades.

Las subunidades alfa y beta de la hormona coriónica gonadotrópica (hCG), fueron preparadas por incubación con urea 9 M, pH 4.5. La separación de los dos subunidades fué obtenida por cromatografía en DEAE-sephadex, y la purificación fué realizada en sephadex G-100. La subunidad beta obtenida, que fué biológicamente activa, fué purificada por cromatografía de afinidad, usando como inmunoabsorbente, el anti -

cuerpo anti-subunidad beta, acoplado a sepharosa 4B. La subunidad beta si purificada, muestra una actividad biológica menor a 1 UI/mg y es la subunidad donde se localizan las cadenas de carbohidratos (75). Al parecer las diferencias en la actividad biológica e inmunológica entre las hormonas antes mencionadas reside en este péptido.

Se han realizado numerosos experimentos con el objeto de explicar la función de los carbohidratos en el comportamiento biológico e inmunológico de las hormonas glucoproteicas.

Para ello, se han eliminado enzimáticamente los residuos del ácido siálico observando, posteriormente, las alteraciones en la actividad biológica o inmunológica de las hormonas.

La remoción de diferentes cantidades de ácido siálico fué lograda empleando cantidades limitantes de la neuraminidasa de Clostridium perfringens y una separación posterior por cromatografía de afinidad. Con esto se obtuvo la separación del ácido siálico libre y del unido a la protefina. La concentración total del ácido siálico fué determinado después de digerir la fracción proteica con ácido sulfúrico 0.1 N por 1 ho-

ra a 80°C. (76)

La Figura 6 (pág. 164), muestra, que después de la eliminación del ácido siálico por la neuraminidasa, la actividad biológica de la hCG es significativamente afectada, mientras que la actividad inmunológica permanece sin alteración. (76) En cambio, si la FSH y la LH son tratadas en forma similar, se produce la pérdida de la actividad biológica y una dramática caída de la actividad inmunológica (77, 78).

Rathman y Saxena en 1971, (61) al comparar los análisis de los aminoácidos provenientes de las subunidades de la FSH (66), de la hCG (71) y de la LH (61), concluyeron que la subunidad alfa es semejante en las tres hormonas respecto a la composición de aminoácidos y a la estructura primaria mientras que la subunidad beta es la fracción que confiere especificidad.

Birken y Canfield (57), y Keutmann y William (58), realizaron en forma independiente experimentos con ambas subunidades; encontrando que el análisis de la subunidad alfa de la LH era similar al de la subunidad de la FSH y de la hCG. Sin embargo, la -

subunidad beta de la FSH posee menos arginina que las subunidades beta de la LH y de la hCG.

La hFH muestra diferencias importantes en el contenido de arginina, valina y prolina, y diferencias menores en ácido aspártico, treonina y serina.

Al comparar la composición de los aminoácidos de la cadena alfa de la hCG (71) con las cadenas de la TSH humana (59) y de la TSH bovina (79), Bahl y colaboradores (80) encontraron que la composición de las dos subunidades polipeptídicas de las hormonas humanas son semejantes. Sin embargo, la cadena de origen bovino difiere en su contenido de lisina, alanina y leucina, y probablemente de valina y serina, (Tabla XI pág. 193).

Al estudiar la secuencia de los aminoácidos de la cadena alfa de la LH y de la hCG humana, se observa que la hCG es mayor, por 28 a 30 residuos, lo cual produce efectos en la antigenicidad.

Recientes observaciones han mostrado que la FSH urinaria así como la obtenida de la pituitaria, experimenta la eliminación de los residuos de ácido siálico

co (desialización). Sin embargo, en la orina se observan algunas moléculas de la hormona que contienen algunos residuos de ácido siálico en número variable. Esto puede ser debido a que las células clonales del trofoblasto pueden secretar varias formas de la hCG - que contienen cantidades variables del ácido siálico. Cada clona muestra una actividad hormonal con características biológicas e inmunológicas específicas. (76, 77 ; 81).

Aunque, la desialización de la hCG y de la FSH - reduce marcadamente la actividad biológica de estas - hormonas la remoción del átomo de carbono exocíclico (C_8 y C_9) no afectó la actividad biológica. La terminal exocíclica del átomo de carbono, del ácido siálico, puede ser eliminada químicamente sin alterar la - estructura anular del ácido siálico ó rompiendo el enlace glicosídico presente. Si los residuos de ácido - siálico son oxidados sucesivamente con peryodato y reducidos con borohidruro, la oxidación del ácido siálico consume dos moles de peryodato con liberación de un mol de ácido fórmico y un mol de formaldehído por cada mol de ácido siálico presente. El aldehído formado, - puede ser reducido con borohidruro tritiado, ori -

ginandose una molécula marcada (82 - 84).

Cuando estos procedimientos son utilizados para -
marcar la hCG o la FSH, la actividad retenida represen -
ta el 80 y el 50% de la actividad biológica respectiva -
mente de la hormona nativa. Esta técnica permite el -
marcaje selectivo de una hormona glucoproteica en la -
parte no proteica de la molécula. Otras técnicas produ -
cen moléculas que contienen átomos radiactivos en la -
proteína, en la fracción de carbohidratos ó en ambas
(82 - 84).

Las actividades específicas obtenidas con esta -
técnica son inferiores a las actividades específicas -
logradas con las diferentes técnicas de yodacion. Las -
hormonas glucoproteicas tritiadas pueden ser emplea -
das en estudios fisiológicos " in vivo ", pero no -
son herramientas adecuadas para estudiar los mecanis -
mos hormonales preciso, ya que contienen como se men -
cionó anteriormente actividades específicas relativa -
mente bajas (85).

Las subunidades aisladas en la hCG pueden ser tritia -
das y la actividad específica refleja el contenido de
ácido sílico de cada una de ellas resultando subuni -

dades indistinguibles, inmunológica y fisiológicamente, de las subunidades sin marca. Cuando cualquiera de las subunidades de la hCG marcadas con tritio, fueron inyectadas a ratas inmaduras, ninguna de las subunidades se concentró en el ovario. Ambas subunidades fueron concentradas rápidamente en el riñon, presentandose un máximo a los 30 minutos de la inyección intravenosa (86).

COMPORTAMIENTO INMUNOLOGICO .

Las hormonas glucoproteicas, comparten una estructura cuaternaria común caracterizada, como se ha mencionado, por dos subunidades diferentes, designadas como alfa y beta. Las subunidades no se unen covalentemente y pueden ser disociadas en condiciones químicas apropiadas. Aparentemente el proceso de disociación involucra la desnaturalización reversible de las subunidades, lo cual puede ser medido por técnicas fluorométricas empleando el ácido 1, 8 anilo-naftalen sulfónico (ANS) el cual distingue entre la hCG nativa de sus subunidades (87).

La subunidad alfa tiene un peso molecular de aproximadamente 15,000 - 20,000 daltons, mientras que la subunidad beta tiene un peso molecular aproximado entre 25,000 y 30,000 daltons (88, 52; 53).

Debido a que existe gran semejanza entre las cadenas alfa de las gonadotropinas, para lograr diferenciarlas se han utilizado los anticuerpos contra las diferentes cadenas, siendo estos absorbidos con algunos antígenos que generan una reacción cruzada como sucede con la hormona coriónica gonadotrópica (hCG).

Los antisueros generados por la hormona glucoproteica intacta, frecuentemente manifiestan una reacción cruzada no específica (89 - 91). Este comportamiento inmunológico se ha atribuido, primeramente a alguna contaminación presente en las preparaciones usadas como inmunógenos. Por ejemplo, las preparaciones de FSH obtenidas de pituitaria, están frecuentemente contaminadas con pequeñas cantidades, pero significativas, de hLH y hTSH.

Con el aislamiento de las subunidades de las hormonas glucoproteicas humanas, las causas de las reacciones cruzadas entre las hormonas glucoproteicas humanas y las no humanas pueden ser analizadas ya sea como determinantes antigenicas presentes en pequeñas fracciones o como subunidades enteras. Para este efecto algunos conejos fueron inmunizados con preparaciones muy puras de las subunidades alfa o beta de la hCG (83).

La subunidad alfa de la hCG fué un inmunógeno más potente que la subunidad beta. Sin embargo en una reinmunización la subunidad beta parece ser más efectiva (83, 92). La afinidad de ambos anticuerpos fué comparable.

Cuándo fueron analizadas inmunológicamente varias preparaciones muy puras de FSH, LH y TSH, obtenidas de la hipófisis humana y la hCG de la placenta siguiendo un sistema de radioinmunoensayo para la subunidad alfa de la hCG-alfa; se observó una respuesta lineal y paralela, sugiriendo una estructura homóloga en gran parte de las subunidades (93).

Empleando un antisuero específico contra las subunidades beta de la hCG, la TSH, la FSH y la LH se ha observado reactividad cruzada con estas hormonas intactas. La Figura 7 (pág. 165), describe el sistema de radioinmunoensayo homólogo para la hTSH-beta. Los trazos de dosis-respuesta, para las hormonas glucoproteicas intactas muestra pendientes significativamente diferente, lo que refleja una reactividad cruzada incompleta aún para la subunidad beta de la propia hormona. Lo último implica que los sitios antigénicos de la hTSH-beta fueron alterados en su combinación con su subunidad alfa complementaria. Un efecto similar fué observado con la hCG y su subunidad beta, en un sistema de radioinmunoensayo homólogo para la hCG. La Figura 8 (pág. 166), muestra la relación dosis-respuesta de la hCG y de otras hormonas altamente pu-

rificadas en un sistema de radioinmunoensayo homólogo para hCG-beta. En contraste con la secuencia casi idéntica, de los aminoácidos de las subunidades alfa, la secuencia de las subunidades beta, de las hormonas glicoproteicas humanas son únicas, e indiscutiblemente son base del diferente comportamiento inmunológico en los sistemas de radioinmunoensayo homólogo para las subunidades alfa ó beta (52, 94 - 96).

Cuando se compara la secuencia de los aminoácidos de las subunidades alfa de la hCG humana, con la de hCG no humana, se observa una homología con un mínimo de 90% (97). A pesar de la gran homología no fue observada reactividad cruzada entre las subunidades alfa de la LH de ovino, bovino y de la rata, cuando se ensayaron en un sistema homólogo para la subunidad alfa humana (Figura 9, pág. 167). Observaciones posteriores parecen mostrar que las áreas homólogas están ubicadas dentro de la molécula nativa y en consecuencia fueron inaccesibles para las interacciones antígeno anticuerpo. Aunque fueron similares 77 de los 129 aminoácidos, así como las estructuras secundarias y terciarias de la lisozima de la clara de huevo y las lisozimas presentes en la orina de humanos con leucemia, -

ambas fallaron en reaccionar con los antisueros generados contra el antígeno nativo (98).

En otros trabajos, cuando las subunidades beta de la LH, de humano, bovino, ovino y rata, fueron ensayadas en un sistema homólogo para la subunidad beta de la LH humana, se observó una reactividad cruzada completa, reflejada por los trazos paralelos de la reacción dosis-respuesta. En otros sistemas se observó reactividad cruzada incompleta entre la subunidad beta de las hormonas glucoproteicas humana y con la no humana. Se requirió de 10 a 500 veces más masa de las subunidades (99).

Al parecer la reactividad cruzada entre los antígenos de las distintas especies resulta de ciertas propiedades que residen esencialmente en la subunidad beta, mientras que la reactividad cruzada dentro de la misma especie reside en la subunidad alfa. Aunque el antisuero contra la hCG-alfa, neutraliza completamente la actividad biológica de la hCG-nativa, de la hLH, de la hFSH y de la hTSH, esta falló en neutralizar la actividad biológica de la TSH bovina. Esta última observación confirma que la subunidad alfa contiene una

mayor homología inmunológica intraespecie que las subunidades alfa obtenidas de hormonas glucoproteicas de otras especies (98, 100).

El hecho de que la reactividad cruzada entre las especies reside al parecer en la subunidad-beta, puede ser utilizada por los investigadores como una prueba para ensayar una hormona dada en un sistema heterólogo. Hay varios ejemplos, de esto último, que han sido descritos por investigadores de distintos laboratorios, pero el mejor ejemplo es el ensayo para gonadotropina coriónica en el mono Rhesus, la cual claramente discrimina entre la LH Rhesus y la gonadotropina coriónica en muestras tanto de plasma como de orina. El antisuero utilizado fué generado contra la subunidad-beta de la LH ovina (101).

Por su analogía con la hCG y la hLH uno esperaría cierta reactividad cruzada con la LH del Rhesus pero no con su gonadotropina coriónica. Sin embargo se observó la condición opuesta, sugiriendo una mayor homología estructural entre la subunidad beta de la LH ovina y la gonadotropina coriónica del Rhesus más que con la LH (101).

Los antisueros específicos contra la subunidad - hCG fueron utilizados como sondas para confirmar si - las subunidades aisladas poseen una actividad biológica intrínseca significativa o si la actividad biológica observada reflejaba una contaminación de la hormona intacta con la subunidad complementaria. Un antisuero contra la subunidad alfa de la hCG se unió inmunológicamente con la hCG o con la subunidad alfa pero no con la subunidad beta. Sin embargo el antisuero contra la subunidad alfa de la hCG neutralizó completamente la - actividad biológica de las preparaciones de la subunidad beta hCG. Esto es consistente con nuestros conocimientos de que la actividad biológica observada en las preparaciones de la hCG beta reflejo una contaminación con la hormona activa, con la subunidad complementaria o con ambas (102, 98).

COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO .

Existe cierta controversia respecto a la función de los carbohidratos en las actividades biológicas e inmunológicas de las hormonas proteicas.

Aunque inicialmente Mori reportó que la actividad biológica de la LH humana no se afectaba por la remoción de los residuos del ácido siálico (81), Van Hall y colaboradores (76), demostraron, que la actividad biológica de la hCG purificada se redujó a menos del 1% debido a la desialización completa después de que la hormona se trató con neuraminidasa.

Braunstein y colaboradores (77) utilizaron este aparente efecto diferencial de la desialización sobre la actividad biológica para discriminar entre la hCG y la hLH contenida en extractos de orina.

Estos autores observaron una marcada pérdida de la actividad biológica de estas preparaciones cuando utilizaron el tratamiento con una neuraminidasa carente de actividad proteolítica. Los resultados mostraron que al obtener un 66% de desialización, el 0.78% de ácido N-acetilneuramínico permanecía unido a la proteína y cuando se lograba el 94% de la desialización, la hor -

mona contenía aún 0.14% de ácido N-acetilneuramínico.

Las subunidades en sus formas disociadas y purificadas están primordialmente libres de actividad biológica intrínseca, cuando esa actividad se determina en sistemas convencionales de bioensayo tanto in vivo como in vitro . En estudios iniciales surgió la duda de que la actividad biológica en las subunidades aisladas podría ser debida a la contaminación con la hormona nativa ó con subunidades complementarias que se hubiesen reasociado durante la incubación. Las Figuras 10 A y 10 B (pág. 168,169), muestran los perfiles de evaluación de la hCG y sus subunidades con las actividades biológicas e inmunológicas, después de una separación en Sephadex G-100. La actividad biológica observada en las subunidades fué atribuible claramente a una contaminación con la hCG intacta. La actividad inmunológica correspondió exactamente con la actividad biológica en todas las fracciones (66, 103 - 105). El hecho de que la subunidad aislada este libre de actividad biológica intrínseca no refleja efectos de desnaturalización producida por las técnicas químicas utilizadas, ya que las subunidades complementarias pueden ser recombinadas, restituyendo la actividad biológica

característica de la hormona de la cual fueron aisladas. Para la hCG al menos el 70% de la actividad biológica inicial puede ser restaurada por incubar con concentraciones equimoleculares de las subunidades completamente separadas. Solamente del 30 al 40% de la actividad biológica de la hormona nativa es restaurada cuando se mezclan concentraciones equimolares de las hormonas aisladas de la hipófisis.

La baja recuperación de la actividad biológica puede ser el producto de una desnaturalización parcial en la preparación de las subunidades hipofisiarias (106).

Aunque las subunidades alfa no parecen tener reactividad inmunológica cruzada entre las diferentes especies, las subunidades alfa no humanas pueden ser combinadas con las subunidades beta de las hormonas glucoproteicas humanas, produciendo una molécula híbrida que tiene actividad biológica característica de la hormona nativa de la cual la subunidad beta fué obtenida. Cuando las subunidades de la LH bovina son combinadas con las subunidades complementarias a la hCG, se observa un incremento de 10 a 33 veces en la actividad biológica (96, 107). Figuras 11 A y 11 B (pág. 170).

La actividad biológica observada con un híbrido de la subunidad alfa de la hCG y la subunidad beta de la LH fué mayor que la subunidad recombinada de la misma especie ovina. El contenido de ácido siálico de la subunidad alfa de la hCG es mayor que el de la molécula total de la LH bovina.

Ya que la vida media plasmática de la LH de diferentes especies esta en función de su contaminación de ácido siálico, la mayor actividad mostrada por el híbrido refleja, probablemente, una mayor vida media plasmática resultando por lo tanto un incremento en la actividad biológica " in vivo ". El comportamiento inmunológica del híbrido, respecto a las subunidades combinadas no fué alterado, lo que sugiere que los antiseros utilizados para esos estudios no dependían de la conformación que se requiere para mostrar la actividad biológica (107, 108).

CAPITULO SEXTO**I.- REGULACION DE LA ACTIVIDAD HORMONAL .**

Dentro de los mecanismos de control celular, el control a través de las hormonas es uno de los sistemas más sofisticados empleados por los seres vivos.

Se han propuesto tres patrones generales de acción hormonal.

1. Aquel que parece regir la acción de las hormonas esteroides.
2. El mecanismo aplicable a las hormonas protéicas, y
3. El asociado con el GMPC.

La transferencia de la información en cualquiera de los tipos de acción hormonal involucra tanto la comunicación inter como la intracelular.

En la comunicación intercelular, la hormona sirve como vehículo de comunicación entre la célula que la envía y la célula que la recibe, esta última reconoce a la hormona del medio ambiente a través de una proteína membranal llamada " receptor ". Figura 12

(pág. 171).

En la comunicación intracelular, el mensaje generado por la ocupación del receptor, es enviado a diferentes elementos intracelulares cada uno de los cuales, recibe y traduce la información y abre o cierra las distintas unidades del metabolismo celular, produciendo un patrón de efectos que corresponde a una respuesta adecuada al mensaje hormonal recibido Figura 13.

(pág. 172).

Goldberg (109) sugiere la existencia de una tercera forma de acción hormonal, donde el GMPc, posiblemente asociado con el Ca⁺⁺, participa como promotor de eventos celulares que en muchos casos son antagonistas a aquellos mediados por el sistema AMPc cinasa protéica.

Aún aceptando, la existencia de los tres tipos de acción hormonal, el hecho es que ciertas hormonas no se adaptan estrictamente a ninguno de los mecanismos de acción establecidos, lo cual sugiere la existencia de un mayor número de formas de acción hormonal, algunos de los cuales están por descubrirse.

El lenguaje hormonal requerido para la comunicación intercelular debe tener un alfabeto de elementos topográficos y el ordenamiento en distintos patrones de esos elementos deben constituir las palabras de ese lenguaje, palabras que por un grupo de reglas, formarán las oraciones.

Schwyzzer (110) sugirió que el intercambio de la información entre las hormonas y sus receptores son efectuados en ese " lenguaje ", y cuyo alfabeto podría corresponder a los residuos de los aminoácidos y el ordenamiento de dichos residuos constituirían las palabras de la oración.

De esta forma la información codificada entre un emisor y un receptor se lleva a cabo a través de la asociación de símbolos químicos con un significado definido. El número de mensajes que pueden ser enviados o recibidos por cada uno de estos sistemas de comunicación, dependerá del número de símbolos que se pueden manejar.

En las hormonas peptídicas existen aproximadamente veinte elementos químicos disponibles para servir como alfabeto del lenguaje, que serían las cadenas la-

terales de los aminoácidos mientras que, los grupos amino y carboxilo terminales forman un esqueleto peptídico flexible. Por el contrario, en la estructura de las hormonas esteroideas existen un número limitado de elementos químicos, cerca de cinco que pueden servir como alfabeto.

por lo tanto, el tipo de lenguaje utilizado por los sistemas que involucran a las hormonas protéicas, serán más complejos que el de las hormonas esteroideas.

El concepto de Schwyzar, se originó de las relaciones entre la estructura y la función obtenidas en trabajos realizados con hormonas peptídicas; dicha relación establece que algunas hormonas peptídicas que actúan en forma diferencial sobre los receptores de sus células blanco están estructuralmente relacionadas, ya que contienen secuencias comunes y pueden ser consideradas como miembros de una familia, por ejemplo: la oxitocina y la vasopresina y por otro lado la adrenotropina, la melanotropina y la lipotropina. En esta última, la secuencia del heptapéptido común en ellas Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly- (también llamado " core ") posee los sitios activos involucrados en la acti

vación del receptor. Sin embargo, en la familia oxitocina-vasopresina toda o casi toda la molécula es necesaria para la actividad biológica.

Siguiendo la proposición de Schwyzer la molécula - de ACTH (39 aminoácidos) puede ser considerada como - una oración de siete palabras (111), donde la secuencia de aminoácidos, denominada palabra 1, activa a los receptores del melanocito, mientras que las otras palabras 2 al 7 mejoran o modifican la actividad hormonal. Figura 14 (pág. 173).

El mismo Schwyzer clasificó a las palabras en dos tipos: continuas y discontinuas. Las palabras continuas son aquellas que muestran una - secuencia de aminoácidos interrumpido.

Debido a que las hormonas polipetídicas son es - tructuras flexibles, las palabras podrían estar formadas, al orientarse los pliegues a la molécula, ya sea en la superficie del receptor o en el medio ambiente - externo para formar una fila de residuos contiguos sin enlace covalente. A este tipo de palabras se le denomi na discontinuas. Figura 15 (pág. 174), muestra como dos pentadecapéptidos flexibles de secuencia dife -

rente, interaccionan en la superficie del receptor para formar la palabra " ACCION " .

Se ha especulado sobre la participación del Ca^{++} y los nucleótidos cíclicos en los sistemas regulados - por las hormonas, mientras no sea posible demostrar en forma definitiva su participación, los nucleótidos cíclicos actúan principalmente sobre el control de las - actividades metabólicas y biosintéticas en las células blanco, el Ca^{++} es esencial para modular la acción de estímulo-respuesta, y en el control de los procesos de contracción y secreción (112).

Después de la síntesis del AMPc, como respuesta a la ocupación del receptor por las hormonas peptídicas, la única forma reconocida para activar las respuestas de la célula blanco, es a través de la estimulación de las proteína-cinasa, enzimas que parecen estar presentes universalmente en las células de los mamíferos. Se ha propuesto que éstas enzimas aparentemente ubicuas - pueden medir los efectos del AMPc en todas las células animales a través de la fosforilación de proteínas específicas que regulan las funciones de las células - blanco (113).

Muchas de las acciones del AMPc que ocurren a -
tiempos cortos en las células eucarióticas, parecen ex-
presarse por fosforilación extranuclear de algunas pro-
teínas reguladoras. En la mayoría de los tejidos sen-
sibles a las hormonas, las proteínas-cinasas llevan a
cabo las fosforilaciones en varios ciclos dentro de la
célula: membrana plasmática, ribosomas y componentes -
nucleares.

Se sabe que los diferentes efectos de las hormonas
peptídicas sobre sus células blanco son mediados por -
una serie de eventos bioquímicos que enlazan la membra-
na plasmática con una variedad de respuestas celulares
como son: la síntesis de proteínas reguladoras especí-
ficas; la estimulación del metabolismo de lípidos y -
carbohidratos; la alteración de la permeabilidad celu-
lar y el transporte de iones, y la secreción o la libe-
ración de productos de la célula blanco, tales como,
las hormonas esteroides.

Una característica común de las moléculas hormo -
nales proteicas es su habilidad para combinarse con si-
tios receptores específicos, localizados en la membrana
plasmática de sus células blanco.

La ocupación de dichos receptores desencadena, como hemos dicho antes, una serie de respuestas celulares individuales, que van desde una alteración en la permeabilidad hasta producir crecimiento celular. La mayoría de estas respuestas parecen estar mediadas por la acción de la AMP cíclico, sintetizado por la adenilato ciclase en la superficie interna de la membrana celular (114). La actividad de la adenilato ciclase es iniciada por una señal local, generada dentro de la membrana, por la interacción específica de la hormona con el sitio receptor.

Las hormonas peptídicas actúan como enzimas reguladoras ya que se combinan con una subunidad funcional- el receptor- de un complejo enzimático membranal (adenilato ciclase). En ciertos tejidos blanco de las hormonas peptídicas como lo son el hígado, el tejido adiposo, la corteza adrenal y las gónadas-el AMPc parece funcionar como el segundo mensajero para producir respuestas bioquímicas específicas de cada hormona.

En contraste, las acciones tróficas o acciones prolongadas de las hormonas peptídicas requieren entre otras cosas, mantener la diferenciación celular y el -

control de número y tamaño celulares, puesto que parecen operar a través de cambios en la actividad nuclear y en la síntesis de proteínas celulares.

Se ha sugerido que los nucleótidos cíclicos no sólo funcionan como segundo mensajero para mediar la respuesta rápida al primer mensajero hormonal, sino que también actúan en la regulación de la actividad de la RNA polimerasa. Por ejemplo, se ha comprobado en las células hepáticas, que el AMPc estimula la síntesis de RNA nuclear y la fosforilación de proteínas no histonas de la cromatina, todo dependiente del AMPc, el cual podría participar como modulador de la transcripción del RNA mensajero (115).

Más aún, se ha observado que la subunidad catalítica de la proteína-quinasa migra a las diferentes estructuras subcelulares, incluyendo el núcleo. Esto podría indicar que el sistema adenilato ciclasa-AMPc-proteína-quinasa tuviera la capacidad de regular la síntesis proteica, tanto a nivel transcripcional como a nivel de la traducción (116, 117).

1.- RECEPTORES A LAS HORMONAS PEPTIDICAS.

Los mecanismos por los cuales las hormonas peptídicas actúan sobre sus tejidos blanco para producir - las respuestas funcionales características son iniciados por la interacción con una región muy específica de la membrana plasmática, a la que se le ha denominado receptor " hormonal ".

Los receptores a las gonadotropinas han sido identificados en los testículos y en los ovarios, empleando hormonas marcadas con yodo radiactivo.

En los testículos, los receptores a LH/HCG están limitados a las células intersticiales, y los receptores a la FSH se localizan en los túbulos seminíferos, probablemente en las células de Sertoli (118, 119).

En el ovario, los receptores a LH están presentes en el tejido intersticial y en las células de la teca de los folículos en desarrollo; en las células de la granulosa y en el cuerpo luteo de los folículos viejos. Los receptores a FSH parecen limitarse a las células de la granulosa, con cierta analogía funcional entre estas células y las de Sertoli de los testículos.

(120, 121).

Observaciones recientes del mecanismo de acción de la toxina del cólera han permitido disponer de un sistema análogo a las acciones de las hormonas peptídicas, ya que la toxina se une con gran afinidad a un componente glucolípido de la membrana celular, el monostáilgangliosido (G_{M1}), presente en la membrana plasmática de las células de la mayoría de los mamíferos, y se une tanto al toxoide colorágeno como a la toxina activa (122).

Homgren et al (122) han observado, en la mucosa intestinal, una relación entre la concentración de G_{M1} , el número de sitios de unión para la toxina y la acción biológica de la toxina. Con todo lo anterior, el gangliósido G_{M1} , se ha considerado el receptor de la toxina del cólera y se ha pensado en su posible participación como receptor a las hormonas proteicas, debido a que esta toxina estimula la actividad de la adenilato ciclasa en la mayoría de los tejidos que posee esta enzima.

La interacción de las hormonas peptídicas y las moléculas transmisoras con sus receptores específicos de la superficie celular, son un ejemplo especial de -

un fenómeno más general, donde todas las células deben reaccionar con el ambiente externo a través de sus membranas plasmáticas, por lo tanto parece probable que - las proteínas expuestas, de la membrana plasmática son la principal característica para distinguir los diferentes tipos de células.

Los intentos para definir la naturaleza de los receptores de las hormonas peptídicas se han basado en el uso de detergentes para extraer en forma soluble los sitios receptores a partir de los tejidos blanco. Los detergentes no iónicos como el Triton X-100 o Lubrol RX han mostrado ser más efectivos para la solubilización de receptores, los cuales conservan la capacidad de - unir al ligando.

En algunos casos, la actividad de la adenilato ciclase puede ser extraída con los detergentes no iónicos, en particular los de la serie Lubrol. Sin embargo, los intentos para demostrar el acoplamiento funcional o físico entre los receptores solubilizados y la adenilato ciclase no han tenido mucho éxito.

Existen algunos informes en donde ciertos fosfolípidos pueden restaurar la respuesta hormonal de la adenilato ciclase.

nilato ciclasa solubilizada del miocardio (123).

Los receptores a LH/HCG han sido purificados por cromatografía de afinidad, hasta aproximadamente el 50% de la pureza teórica del sitio de unión (124). Los receptores solubilizados por los detergentes se comportan durante los análisis físicos, como moléculas proteicas y poseen un peso molecular entre 200,000 y 300,000. Cada sitio receptor parece unir a una sola molécula del péptido regulador, y las formas purificadas pueden conservarse, algunas veces en solución aún en ausencia de los detergentes. La posibilidad de trabajar con tales receptores, permite el análisis de los factores tanto estructurales como conformacionales que determinan la unión de la hormona y los mecanismos de acoplamiento con las respuestas asociadas a la membrana.

Se piensa que los fosfolípidos puedan estar involucrados ya sea en la interacción específica de la hormona a sus receptores o en alguna etapa del proceso de unión, y en la activación de la adenilato ciclasa.

Azhar y Lavaram (125) estudiaron los efectos de la fosfolipasas A, C y D sobre la actividad del receptor para la hCG ubicado en las membranas plasmáticas del cuerpo luteo bovino. Estos autores observaron que la fosfolipasa C inhibió en 90% la unión de la hCG bovina con su receptor, al ser hidrolizado el 70% de los fosfolípidos; mientras que la fosfolipasa A inhibió - 75% de la actividad del receptor, cuando un 45 a 50% de los fosfolípidos fueron hidrolizados. Estos resultados sugieren que no sólo los grupos hidrofílicos sino que también, los hidrofóbicos puedan estar involucrados en la unión de las gonadotropinas a su receptor o en la estabilización de la actividad del receptor.

Un criterio para definir a un receptor incluye la idea de la interacción entre la hormona y el receptor como un proceso saturable. Esto es, que existe un número limitado de sitios de unión por unidad celular o tisular. ¿Cuáles son los límites y que significado tienen ?.

La idea general es que este límite es bajo. Desde el punto de vista fisiológico, esto significa el número de receptores que podría ser saturado con las concentraciones fisiológicas más altas de la hormona. Pueden

existir ciertos efectos farmacológicos que necesiten un número mayor de sitios ya sintetizados, o podrían existir receptores adicionales, para ciertas condiciones fisiológicas que necesiten efectos prolongados, como sería la secreción de la progesterona por el cuerpo luteo, la presencia de esos receptores extra, con una constante de disociación baja, podría dar ciertas ventajas.

Se debe mencionar que el número de receptores o si tios de unión calculados, es sólo una determinación funcional, ya que no permite conocer el número de moléculas receptoras presentes a menos que se conozca el número de moléculas de hormona unidas a cada molécula de receptor, y que todas las moléculas del receptor sean funcionalmente activas. Se sabe que algunas moléculas de receptores que aún estando desocupadas pueden no ser activas, sea por que estén enmascaradas o estén inhibidas.

Sin embargo, Catt y Dufau demostraron en estudios con células aisladas que los receptores a las gonadotropinas y la producción de AMPc alcanzaban valores mucho más altos que los necesarios para obtener la producción máxima de testosterona " in vitro " (126, 127).

La forma en la que los receptores están localizados en la membrana plasmática se desconoce, pero se han propuesto algunos modelos basándose en el modelo más - aceptado de la membrana plasmática. Se cree que los - componentes lípidos y proteínas de la membrana, están dispuestos como un mosaico, en el cual, algunas proteínas están unidas superficialmente a la bicapa de fosfolípidos, o bien están inmersas (embebidas) en forma total o parcial en la porción hidrofóbica de la bicapa. Al parecer, los sitios receptores están dispuestos en forma parcial en la bicapa.

Robinson y colaboradores, propusieron en 1967 un modelo compuesto por dos subunidades, en el cual el receptor se considera como una subunidad reguladora, dispuesta en la superficie extracelular de la membrana, y que además está físicamente relacionada a la subunidad catalítica, colocada en la superficie intracelular. La hormona al unirse, induce un cambio conformacional en la subunidad reguladora, cambio que modifica y activa a la subunidad catalítica para que convierta al ATP en AMP cíclico (122).

Birnbaumer et al., en 1970 modifican este modelo, interponiendo una subunidad " transductora " entre la subunidad reguladora (discriminadora) y la subunidad catalítica (amplificadora). En esta modificación, la subunidad transductora podría ser el sitio de acción - del nucleótido, el cual afectaría la unión de la hormona a la subunidad reguladora y la Km para la activación de la subunidad catalítica (129).

Estos modelos pueden considerarse catalíticos ya que las subunidades están físicamente carcanas y estacionarias, de acuerdo con estos modelos los receptores " sobrantes " no estarían físicamente asociados a las unidades de la ciclasa y por lo tanto las dos clases de receptores tendrían diferentes afinidades, y podrían encontrarse en diferentes cantidades.

Perkins en 1973 (130) y Cuatrecasas en 1974 - (131) propusieron y elaboraron respectivamente, un modelo que no se basa en las relaciones estáticas, sino en la fluidez de la matriz lipídica de la membrana. En este modelo, el receptor y las subunidades catalíticas están separadas físicamente. Así, la hormona unida al receptor induce:

- a) un movimiento de traslación del receptor hasta formar un complejo con la subunidad catalítica.
- b) un efecto a su alrededor, en el cual la estructura de la matriz lipídica es alterada y conduce a la activación de la subunidad catalítica.

Otra posibilidad interesante respecto a este último, es que después de la unión de la hormona al receptor podrían obtenerse efectos diferenciales con varias subunidades catalíticas de la adenilato ciclasa. Esto podría activar a la adenilato ciclasa o viceversa, con lo cual se lograría un mecanismo adicional para la especificidad de la respuesta hormonal. Teniendo como consecuencia, que cada ciclasa tuviese su propio receptor, o la existencia de una sola subunidad catalítica de la ciclasa cuyo sustrato específico sea determinado por la naturaleza de la hormona.

2.- ACTIVACION HORMONAL DE LA ADENILATO CICLASA.

Algunos modelos han intentado explicar la complejidad funcional del sistema de la adenilato ciclasa; como el estar constituida de por lo menos de tres sitios:

- a) El sitio del receptor hormonal.
- c) El sitio catalítico, que reacciona con el ATP que lado con el magnesio ($MgATP^{++}$), y
- c) Un sitio regulador para los nucleótidos, que reacciona preferentemente con ellos (132).

A partir de los estudios cinéticos, sobre el efecto de los nucleótidos de guanidina sobre la activación de la adenilato ciclasa hepática producida por el glucagón, se ha sugerido que el complejo de la adenilato ciclasa pueda existir en formas o conformaciones diversas que puedan interconvertirse, por las acciones de la hormona y del nucleótico. Este modelo contempla la posibilidad de que las distintas conformaciones tengan afinidades diferentes para el sustrato, obteniéndose diferentes grados de activación de la hormona y el nucleó-tido presente.

Se ha observado que algunos análogos sintéticos del GTP, que resisten la hidrólisis enzimática, activan algunos de los sistemas de la adenilato ciclasa, lo que sugiere que los nucleótidos de la guanidina no funcionan como donadores de grupos fosfato, sino como activadores alostéricos de la adenilato ciclasa (133).

Esto sugiere que la regulación de la interacción del nucleótido con la unidad catalítica de la adenilato ciclasa puede ser una característica general de la acción de las hormonas peptídicas. Observaciones recientes sobre la activación de la adenilato ciclasa por los nucleótidos de la guanidina han mostrado, que la regulación de la actividad enzimática por tales nucleótidos es independiente de la estructura de la membrana, con lo cual se eleva la posibilidad de que la hidrólisis de los nucleótidos pueda relacionarse al control de la actividad de la adenilato ciclasa por dichos nucleótidos (134).

3.- AMP CICLICO .

La participación del AMPc como mediador intracelular de la acción de las hormonas peptídicas ha sido apoyada por numerosas observaciones de la respuesta de los tejidos blancos a la hormona. Tal es el caso de la epinefrina, la cual estimula la glucogenólisis hepática a través de un mecanismo dependiente del AMPc.

Haynes et al (135), observaron que la ACTH incrementó el contenido del AMPc en la corteza adrenal y el AMPc exógeno estimuló la producción de corticoides en la glándula adrenal de la rata. Estas observaciones han contribuido a establecer el concepto de que el AMPc funciona como un segundo mensajero general en la acción de las hormonas peptídicas.

La participación del AMPc en la acción de las gonadotropinas sobre la esteroidogénesis, ha sido observada tanto en el ovario como en el testículo. En el cuerpo luteo, Marsh y colaboradores (136) mostraron que el AMPc estimuló la síntesis de la progesterona; que la LH estimuló no solo la acumulación del AMPc sino también la actividad de la adenilato ciclasa, además, el patrón de biosíntesis de los esteroides fue idéntico tanto en la estimulación con la LH como al

adicionar AMPc exógeno. En estos estudios, la elevación del AMPc endógeno durante la estimulación con la LH precedió a un incremento en la síntesis de progesterona.

En dosis bajas de LH, se observó un estímulo de la esteroidogénesis sin cambio apreciable en los niveles del AMPc (137).

La evidencia de la participación del AMPc en la acción de la FSH en el ovario, ha sido obtenida en las células de la granulosa de los ovarios de porcino y de la rata. Marsh ha observado que la mayor parte o todos los efectos de las gonadotropinas sobre los ovarios parecen involucrar la formación del AMPc (138).

Hay abundante evidencia de que las hormonas peptídicas controlan muchas de las actividades de sus células blanco al estimular la producción del AMPc, sin embargo, se han observado diferencias entre los niveles del AMPc y las respuestas metabólicas de los tejidos blanco.

Un ejemplo es la ACTH (139), que en concentraciones pequeñas estimula la esteroidogénesis sin cambios apreciables en la concentración del AMPc. No obstante,

concentraciones mayores de la hormona provocan un incremento paralelo en la producción de esteroides y de AMPc.

A concentraciones aún mayores de ACTH, la producción del AMPc continúa en aumento, pero no así la esteroidogénesis, la cual sólo llega a un nivel máximo.

La discrepancia entre la concentración del AMPc y la respuesta del tejido ha sido demostrada en el tejido adiposo, en el hígado y en la tiroides, al igual que en las células de Leydig de los testículos (139).

Se ha indicado que el AMPc puede funcionar como un mediador de la acción de la LH, sólo si actúa a través de incrementos pequeños o por su traslación dentro de compartimientos intracelulares pequeños. No obstante, se ha observado que la activación de la proteína-cinasa inducida por la hCG en las células de Leydig, se puede correlacionar con los cambios en la concentración del AMPc, y no con la respuesta esteroidogénica. Aún más, no ha sido posible observar un cambio en la vía de la actividad de la adenilato cilasa-proteína-cinasa durante la estimulación de la producción de testosterona

por concentraciones bajas de gonadotrofina (136).

Esto ha hecho pensar en la posibilidad de que sea un mecanismo diferente al del AMPc el que podría operar, para mediar la acción de la hormona sobre la esteroidogénesis, particularmente durante la estimulación a concentraciones bajas de la hormona trófica.

En la Figura 16 (pag. 175), se representa la - posible vía, independiente del AMPc y apoyada en la disociación observada entre la esteroideogénesis y la concentración de AMPc, a concentraciones bajas de la hormona.

A concentraciones mayores, se efectúa la vía clásica, AMPc-proteína-cinasas Marsh propone que la fosforilación debida a la proteína-cinasa puede regular la actividad de la enzima que hidroliza la cadena lateral del colesterol (139).

El aspecto de la función del receptor, sea como " receptor reserva " o " receptor sobrante ", proporciona un estímulo para la especulación y la interpre-tación. Se sabe que muchas hormonas pueden estimular - la producción de más AMPc, que el necesario para pro - ducir en la célula blanco la máxima respuesta biológi-

ca (126-139). La presencia de un exceso de receptores en la respuesta esteroideogénica de las células de Leydig a la hCG, ha mostrado que solamente el 13 de la población total de receptores necesita estar ocupado por la gonadotropina, para producir la respuesta máxima.

Sin embargo, los receptores adicionales no están de sobra en relación a la actividad de la adenilato - ciclasa, ya que su ocupación por la hormona produce un incremento en la formación de AMPc. Es probable, que el exceso de receptores, tenga una participación importante, para aumentar la sensibilidad de la célula blanco cuando circulan concentraciones bajas de la hormona, - que puede incrementarse la probabilidad de que un número suficiente de receptores estén ocupados para iniciar la respuesta de la célula blanco.

4.- FUNCION DE LAS PROTEINAS-CINASAS.

En aquellos tejidos, en los cuales ha quedado bien establecido el mecanismo por el cual el AMPc actúa, como respuesta celular a la estimulación hormonal, se ha demostrado que este nucleótido cíclico actúa estimulando la actividad de una fosfocinasa de proteínas (140).

Esta enzima se localiza en el citosol, se compone de dos subunidades cuando presenta su forma inactiva. La subunidad reguladora (R) se combina con la subunidad catalítica (C), para formar la holoenzima (RC) inactiva que puede ser estimulada por el AMPc. La unión del AMPc a la subunidad reguladora origina la disociación del complejo RC y por consiguiente la activación de la enzima.

Si se adiciona AMPc exógeno, o se eleva hormonalmente el nivel endógeno de AMPc se produce la disociación de la enzima y se inicia la fosforilación de aquellas protefnas que son sustratos de la protefna-cinasa. La activación de esta enzima parece ser el principal o quizás el único mecanismo, por el cual el AMPc funciona como segundo mensajero en la transmisión de las señales hormonales (141).

La presencia de la protefna-cinasa, dependiente del AMPc, ha sido demostrada en casi todos los tejidos animales. Sin embargo, se debe indicar que en la mayoría de los estudios realizados se han empleado histonas como sustrato para la enzima y en muy pocos casos se han demostrado los verdaderos sustratos de estas enzi-

mas, tal es el caso de la fosforilasa de la glucogeno-sintetasa y de la lipasa del tejido adiposo.

La probabilidad de que esta enzima sirva para mediar todas las acciones del AMPc en los diferentes tejidos y en los diferentes organismos (113) sugiere - la existencia de gran número de sustratos específicos localizados en los tejidos blanco, así como, formas - múltiples de esta enzima en las células animales.

La capacidad de la protefna-cinasa para fosforilar diferentes proteínas, como la caseína y las histonas, además de la fosforilasa cinasa, muestran su potencialidad para funcionar como una protefna-cinasa general y la posibilidad de que esta actividad actúe regulando las diversas funciones fisiológicas.

se ha sugerido que la fosforilación de las histonas, ricas en lisina, sea un paso preliminar en la inducción de las enzimas, ya que se ha mostrado que existe un aumento en la síntesis de proteínas como respuesta al AMPc (142).

Ruddon y Anderson (143), observaron una actividad de protefna-cinasa en los núcleos del hígado de rata, que puede ser estimulada por el AMPc.

Jungmann et al, (144) proponen que la acción de las gonadotrofinas en el cuerpo lúteo, se acompañe del transporte, del citoplasma al núcleo, de la proteína - cinasa de pendiente del AMPc, entre otros sitios intra celulares.

Sin embargo, aunque la estimulación de los procesos - biosintéticos por el AMPc sugiere que tal efecto ocurre en la transcripción del RNA mensajero, los efectos del AMPc sobre la síntesis proteica se ha encontrado - frecuentemente a nivel de traducción.

Este mecanismo ha sido observado en la síntesis - de las enzimas, que participan en la esteroideogénesis de la corteza adrenal (145) y en la síntesis de proteínas en la hipófisis de bovinos (146). La acción - del AMPc sobre los procesos de traducción, sugiere que la acción de la proteína-cinasa podría ocurrir a través de la fosforilación de las proteínas ribosomales - (146).

No obstante, la capacidad de estas cinasas activa das por el AMPc para fosforilar a los ribosomas ó las proteínas ribosomales no parecen ser un paso importante en la función ribosomal, indicando que la fosforila

ción en este sitio no constituye una función esencial de esta cinasa.

Las diversas funciones del AMPc asociadas a las funciones membranales, permeabilidad, transmisión sináptica, secreción e inhibición por contacto, sugieren que la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática tengan una participación importante en la función de las proteínas-cinasas activadas por el AMPc; esta posibilidad encuentra apoyo al demostrarse:

- a) Actividad de proteína-cinasa dependiente del AMPc en las membranas celulares del cerebro, hígado de la rata (147, 148), y de los eritrocitos humanos (149).
- b) En algunas fracciones de las membranas plasmáticas del músculo cardiaco del cerdo, se ha localizado la fosforilación de algunas proteínas, medidas por el AMPc (150).
- c) La acción de algunos neurotransmisores en la sinápsis puede ser medida por la fosforilación de una proteína específica localizada en la neurona postsináptica (151).

Todas estas observaciones sugieren que los efectos de los neurotransmisores y de las hormonas peptídicas, en procesos de permeabilidad y la secreción, pueden depender de la fosforilación de proteínas específicas localizadas en la membrana. Sin embargo, resulta difícil adscribir esta función a la acción de todas las hormonas peptídicas.

Un segundo tema de discusión, es que al tratar de revisar los diferentes datos publicados, se pueden presentar dos posibilidades:

- a) Que existan formas múltiples de la proteína-cinasa con diferente afinidad al AMPc y diferente especificidad para su sustrato, o bien.
- b) Un mismo tipo de enzima con propiedades semejantes respecto al AMPc y que pueda utilizar una amplia variedad de sustratos y por lo tanto la respuesta máxima de un tejido blanco dependería de la cantidad de proteína-cinasa disponible.

Langan, propone que todas las enzimas actúen sobre una amplia variedad de sustratos y que poseen afinidades comparables por el AMPc, con lo cual la localización de la proteína-kinasa en diferentes organelos o compartimientos intracelulares es consistente con la capacidad potencial de esta enzima para mediar las numerosas acciones del AMPc en la función celular (141).

Sin embargo, la diversidad de las respuestas celulares a un mismo nucleótido (AMPc) debe estar determinada, por la naturaleza de los sustratos de la proteína -kinasa, presentes en un " sitio crítico " de la acción del nucleótido dentro de la célula blanco.

Todo esto nos lleva a pensar, que la respuesta al AMPc, de una célula, dada, está determinada por los procesos que regulan la expresión genética y la diferenciación celular, y específicamente por la síntesis de los sustratos esenciales que confieren individualidad a la respuesta de cada célula blanco a la acción hormonal.

CAPITULO SEPTIMO**I. - ASPECTOS CLINICOS DE LA ACCION HORMONAL .****1.A. PRUEBAS DE DIAGNOSTICO CLINICO PARA EL
EMBARAZO .**

La placenta humana produce en abundancia las hormonas gonadotropina (hCG) y la somatomatropina coriónicas así como las hormonas esteroides progesterona y estrógenos.

La demostración de la gonadotropina coriónica en la orina, efectuada por Aschheim y Zondek en 1927, constituyó la base para considerar a la placenta como un órgano endocrino y la presencia de esta hormona en el plasma materno y su excreción urinaria proporciona la base para las pruebas de embarazo (8).

La identificación temprana de esta hormona en los líquidos del cuerpo, mediante una variedad de procedimientos inmunológicos y biológicos proporciona un diagnóstico muy útil del embarazo cuya precisión dependerá de la sensibilidad de los métodos utilizados (152).

A) METODOS BIOLOGICOS .

Los métodos biológicos utilizados en los últimos veinte años para la identificación y cuantificación de la hCG en mujeres embarazadas y en pacientes con tumores trofoblásticos, aprovecha la acción fisiológica de la hormona en los animales de experimentación; ratas, conejos y machos de anfibios (16).

Los métodos biológicos más importantes se resumen en la Tabla XII (pág. 194).

A continuación se hace una descripción de la técnica empleada en la rata y en la coneja, por considerarse los más representativos de esta clase de determinaciones (16).

METODO DE KUPPERMAN.

Para esta prueba se utiliza como muestra, la primera orina de la mañana, la cual se filtra y se le añde un preservativo, antes de realizar los siguientes pasos.

Ratas Wistar de 150 g son inyectadas subcutáneamente con 1.0 ml de la orina y transcurridas 24 horas de la inyección, se observan los ovarios. La prueba se considera positiva si se aprecia la reacción de hiperemia la cual deberá mostrar un color rojo brillante.

Es necesario comparar la coloración que presentan los ovarios con la de los riñones y el bazo como testigos negativos.

La principal desventaja de esta prueba es la dificultad para diferenciar un ovario ligeramente rosado (negativo) de uno enrojecido (positivo). Por lo tanto con este método se podrán obtener buenos resultados, siempre y cuando las personas que realicen las pruebas, tengan práctica y criterio para interpretar los resultados (153).

METODO DE FRIEDMAN.

El método de Friedman utiliza conejos en los que se induce la ovulación por la inyección de la hCG. El procedimiento se basa en tres principios fundamentales.

- 1) La coneja no ovula espontaneamente sin la ayuda de una copulación natural.
- 2) Los ovarios de la coneja responden rápidamente a la inyección intravenosa de sustancias que contienen a la gonadotropina coriónica con la formación de cuerpos luteos.
- 3) La presencia de grandes cantidades de la hormona en la orina de mujeres embarazadas.

Friedman demostró que hasta una mínima cantidad de 5 ml de orina obtenida de mujeres embarazadas, da como resultado cambios, en un período de 24 hr, en las características de los ovarios de la coneja.

La prueba consiste en 6 inyecciones intravenosas de 4 ml de orina por un período de 2 días. Transcurridas 48 hr de la última inyección, se observan los ovarios. La prueba se considera positiva si se aprecia - cuerpos hemorrágicos y cuerpos luteos.

La principal desventaja del método es la dificultad de realizar la inyección repetida en la vena marginal de la oreja de la coneja.

Las ventajas del método es que los cambios que se producen en los ovarios son visibles macroscópicamente y pueden ser interpretados adecuadamente por un técnico laboratorista o por un médico quién no requiere una instrucción especial. La prueba no requiere, regularmente, de más de 2 inyecciones y puede ser observada en 1 o 2 días; otras pruebas requieren de 5 días.

La simplicidad de la técnica reduce considerablemente el factor de error (154).

**B) PRUEBAS BASICAS PARA DETERMINAR LA HCG POR
METODOS INMUNOLOGICOS .**

Una de las primeras pruebas para buscar hCG en el embarazo fué realizada en 1903 por Liepman, quien inmunizo a conejos con un extracto de placenta humana y encontró que al mezclar el suero de mujeres embarazadas con el antisuero obtenido de los conejos inmunizados se obtenía un precipitado (155). Estos resultados sirvieron de base a Opitz en sus investigaciones, quien utilizó un antisuero similar al usado por Liepman, sin embargo Optiz obtuvo muchas reacciones falsas y concluyó que el antisuero no era efectivo para una prueba de diagnóstico en el embarazo (156).

Treinta años después, se determinó que cuando un extracto de orina de mujeres embarazadas es inyectado repetidamente en ratonas (157) o ratas y después de un tiempo les es administrada nuevamente, la acción del extracto sobre los ovarios de dichos animales, desaparece (158).

Esto dio lugar a que se identificara una sustancia antigonadotrópica en la sangre, impidiendo la reacción hiperémica.

Por mucho tiempo no se unificó el criterio de que esta sustancia antigonadotrópica fuera un anticuerpo (159). Sin embargo, se encontró una correlación entre la reacción de precipitación y el efecto biológico del antisuero frente al extracto de hormona gonadotrópica. Basándose en esta evidencia Twombly, concluyó - que era razonable dar por sentado que el factor antigonadotrópico era un anticuerpo (160).

Todas estas divergencias en el concepto de que si la sustancia antigonadotrópica era un anticuerpo o no dieron lugar al desarrollo de una prueba inmunológica del embarazo, usando antisueros frente a extractos de orina de mujeres embarazadas (161, 162).

En los siguientes diez años se mantuvo el concepto de que las gonadotropinas eran antígenos que daban lugar " a verdaderos anticuerpos ", cuando eran inyectadas en animales de diferentes especies (163, 165).

La insulina fué la primera hormona determinada por una técnica inmunológica (166).

El método se basaba en la aglutinación de eritrocitos recubiertos con insulina en presencia de antisero anti-insulina (Read y Bryan 1960) aplicando una reacción de inhibición de la hemaglutinación, similar a la utilizada por Berson y Yallow para la determinación de la hormona del crecimiento humano. Levy y Bourrillon - estudiaron varias preparaciones de la hCG empleando an tisueros de conejos (Antisuero hCG), (167, 168).

En 1980 fueron reportados diferentes métodos para la determinación inmunológica de hCG en la orina y en el suero.

La inhibición de la hemaglutinación de eritrocitos recubiertos de hCG, requirió la estabilización de los eritrocitos y que la hCG fuera fijada a ellos con un tratamiento previo con ácido tánico (169).

Brody y Carlstrom (170), usaron una técnica de fijación del complemento para medir la hCG en suero y, Mc Kean desarrolló una prueba de precipitación en gel para detectar la hCG en orina (171).

La reacción de aglutinación del latex fue desarrollada posteriormente por varios investigadores (172, 173).

FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS.

Una reacción inmunológica se presenta cuando una protefina extraña (antígeno) ingresa en el organismo e induce la producción de substancias específicas llamadas anticuerpos que van a combinarse entre si, mediante una reacción química.

Cuando en un tubo de ensayo, en un portaobjetos u otro soporte se ponen en contacto un antígeno con un antisuero específico, se produce una combinación de las dos substancias, de la cual resulta una sola de peso molecular mayor, que queda suspendido en el líquido y luego se precipita.

En la mayoría de las pruebas, la aglutinación no se puede observar a simple vista, por ello, para hacerla aparente al ojo humano se recurre al uso de vectores o portadores del antígeno que tengan un tamaño o un color determinado que permita reconocer si la reacción se ha verificado; por ejemplo: eritrocitos de oveja, eritrocitos de yegua, partículas de latex, etc (174).

PRINCIPALES METODOS INMUNOLOGICOS.

a) Gravindex (Ortho Pharmaceutical Col.).

Es una prueba inmunodiagnóstica del embarazo, que se hace con una laminilla de vidrio y que consiste en poner sobre ella una gota de suero anti-hCG, este vidrio se debe luego colocarse sobre un fondo negro. Al antisuero se le agrega una gota de la orina por ensayar, si contiene hCG, esta hormona neutralizará a los anticuerpos anti-hCG del suero. Si la orina no contiene hCG, entonces el antisuero queda libre para reaccionar en el siguiente paso de la prueba.

Se agregan dos gotas del antígeno (partículas de latex, recubiertas de hCG) a la mezcla antisuero-orina. Si no hay hCG, el antisuero se liga a las partículas del latex, aglutinándolas, si hay hCG esta se combinará con el antisuero dejando al latex antigénico - sin reaccionar y por tanto sin aglutinarse (174).

b) Pregonóstico (Organon Laboratories).

Pregonóstico es una prueba inmunodiagnóstica que se realiza en tubo y en el cual se emplean glóbulos rojos liofilizados.

El antisuero se encuentra liofilizado y contenido en una ampolleta de vidrio con fondo cupular, esta ampolleta al desprender la extremidad superior, se convierte en un tubo de ensayo.

A través de la abertura se deposita determinada cantidad de la orina por ensayar, misma que disuelve al antisuero liofilizado. Los glóbulos rojos contenidos en dos frascos-ampula, separados, están igualmente liofilizados. Con el equipo se proporciona un solvente especial exclusivo para hacer la suspensión de eritrocitos contenidos en uno de los frascos-ampula.

Una parte de esta suspensión reconstituida se agrega al tubo-ámpolleta que contiene la orina y el an tisuerdo donde se deja en reposo durante dos horas.

Cuando aparece la formación de un anillo, la prue ba es positiva (175).

c) U.C.G. Test.

Esta es una prueba inmunodiagnóstica en tubo de en sayo, en el cual se emplean glóbulos rojos recubiertos de hCG.

La prueba consiste en poner una determinada can - tidad de orina por ensayar en un tubo al cual se le - añade antisuerdo (6 gotas) y una gota de suspensión - de células, se agita y se deja reposar en una gradilla durante dos horas. Si en el fondo del tubo aparece un anillo la prueba es positiva, si no aparece es nega - tiva (176).

Recientemente se han realizado numerosos equipos de UCG-TEST, para el diagnóstico clínico " in vitro ", tales como: UCG Beta Slide Monoclonal, UCG-BETA Stat, UCG-Slide Test, UCG-Lyphotest, UCG-Titration SET.

Los cuales representan el último avance de la tecnología inmunológica para el diagnóstico del embarazo y - contienen anticuerpos antisubunidad beta de la gonadotropina coriónica humana, que reacciona específica y - selectivamente con la subunidad beta de la hCG presente en la orina de mujeres embarazadas.

Si una muestra carece de la subunidad beta-hCG, el antisuero no presenta reacción cruzada con la hormona luteinizante (LH) presente en la orina de mujeres - premenopausicas y menopausicas (177).

Kerber y colaboradores han comparado en fechas recientes, varias de las pruebas inmunológicas existentes en el comercio para identificar la hCG. Tabla XIII(pág. 195). Encontraron que algunos métodos, por lo menos, los que usan la técnica de inhibición de la hemaglutinación (preagnosticon tube test o UCG test), eran bastante sensibles y, por consiguiente, era muy improbable que diesen un resultado negativo falso. El procedimiento requiere unas 2 horas para completarse. Kerber y sus colaboradores encontraron que uno de los ensayos de la inhibición de látex que se realiza en portaobjetos (test Pregnosticon Accuspheres) en el cual

sólo requiere unos minutos para practicarse, ofrecía un máximo de ventajas y un mínimo de inconvenientes. Algunas de las demás pruebas existentes en el comercio que empleaban los portaobjetos para estudiar la inhibición de látex resultaron, relativamente insensibles, ya que daban un alto porcentaje de resultados falsos (178).

Es evidente que ninguna prueba inmunológica para la gonadotropina coriónica es perfecta, sobre todo a causa de la reactividad cruzada de la gonadotropina co riónica y la hormona luteinizante. No obstante, Hobson registra una precisión del 92.2% en 19.887 casos en los cuales se usó la técnica de inhibición de la hemaglutinación (Pregnosticon en tube). Para lograr este grado de precisión insiste en la necesidad de que el personal esté especialmente entrenado a fin de reconocer las reacciones atípicas y recomienda repetir la prueba siempre que resulte dudosa (179).

Kerber y colaboradores realizaron un estudio en donde ocho pruebas inmunológicas de embarazo fueron - comparadas en pacientes embarazadas y no embarazadas en las siguientes categorías: pacientes con proteinu - ria y que reciben drogas psicótropicas, mujeres que -

ingieren progestinas, mujeres postmenopausícas y pa -
cientes con hipertiroidismo. También fueron evaluadas
pacientes con gestación ectópica (178).

Fueron realizadas 1661 pruebas en muestras de ori -
na y suero de 206 pacientes. Todas las pruebas excepto
las de aglutinación directa produjeron reacciones fal -
sas negativas, durante el segundo y tercer trimestre.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación en
tubo, detectó gonadotropina coriónica en todos los tri -
mestres del embarazo, es decir no se obtuvieron resul -
tados falsos negativos. Estos reactivos, con un rango
de sensibilidad de 700 - 1000 IU/l son útiles para me -
dir la gonadotropina coriónica en el último trimestre
del embarazo, esto es cuando los niveles de hCG son ba -
jos al igual que en la primera mitad del primer trimes -
tre.

Las pruebas del tipo de inhibición de látex tie -
nen un rango de sensibilidad de 1000 a 8000 IU/l y no
siempre son útiles para detectar cantidades bajas de -
hCG.

En pacientes no embarazadas, con edades entre los 15 y 39 años de edad que recibieron agentes psicotr^opicos incluyendo combinaciones de fenotiazinas, antidepresivos, antiparkisonianos, anticonvulsantes y drogas hinopticas, las pruebas fueron positivas con todos los reactivos excepto pregnosticon slide UCG y pregnosticon Accuspheres (178).

En grupos de 37 mujeres no embarazadas de edades entre los 17 y 40 años de edad que recibieron diferentes combinaciones de progesteronas y estrogénos como anticonceptivos, todas las pruebas fueron negativas.

Wide y Gezmell observaron que el nivel de la hormona luteinizante en muestras de orina de mujeres en edad fértil fué ubicado entre 100 y 400 IU/l de hCG. Ello al parecer muestra que los reactivos DAP presentan reacción cruzada con gonadotropinas hipofisarias, de este modo se producen las reacciones falsas positivas (180).

OTRAS PRUEBAS DE EMBARAZO.

La determinación de gonadotropinas por radioinmunoanálisis, data de 1964 en que Paul Y Odell describieron un método para la hCG (152).

En 1965 Wilde y Colaboradores (181), describieron un método radioinmunológico para la dosificación de la hCG.

Estos ensayos iniciales utilizaron anticuerpos anti-hCG y I^{131} como marcador isotópico de hCG. La obtención de preparados gonadotrópicos hipofisarios, de gran pureza en LH o FSH, adecuados para el mercaje con yodo radiactivo, y el uso de anticuerpos anti-hCG que cruzaban con la LH, dio lugar a los primeros métodos radioinmunológicos para la LH descritos por Odell y col., Midgley y Franchimont (182 - 184).

La FSH fué medida en el suero o plasma por varios grupos de investigadores en el curso de 1967 y 1968. La obtención de mejor especificidad y los procedimientos para separar el complejo Ag-Ac de la hormona no unida, ha dado por resultado la descripción de numerosos métodos cuya utilidad, sensibilidad y especificidad ha ido sustituyendo gradualmente el uso de los bio

ensayos para gonadotropinas (182 - 185).

Wide, realizó una prueba sensible para diferenciar hCG de la LH, por medio de un ensayo paralelo de actividad biológica en dos sistemas radioinmunológicos (186).

La prueba se realizó en muestras de plasma y orina de dos mujeres. Las muestras fueron tomadas diariamente a partir del día de ovulación, hasta el ciclo de concepción. Una reacción positiva de embarazo fue registrada entre 8 y 10 días después de la ovulación y por lo tanto de 4 a 5 días antes de la menstruación. El día de ovulación es determinado a partir de los cambios de la LH del plasma a la mitad del ciclo, progesterona y la excreción de la LH urinaria, pregnanediol y estrogénos. Los niveles preovulatorios de la LH y la progesterona en plasma han sido estudiados por Johansson y Wide, los cuales concluyen que la ovulación ocurre de 24 a 48 hr., después de que se ha desarrollado el nivel más alto de la LH y cuando el nivel de progesterona está entre 1 y 2 ng por ml (187).

Una preparación urinaria de hCG y una de LH hipofisiaria fueron marcadas con I^{125} , las cuales pudieron ser usadas hasta por tres meses. Todas las muestras fueron ensayadas en dos sistemas paralelos: I^{125} hCG y anti-hCG: I^{125} -LH y anti-LH. Para cada muestra de plasma u orina se dió un valor por el índice de discriminación de Gaddum's. Los índices de valoración para 22 muestras cayeron entre 0.80 y 1.20 y las gráficas correspondientes para 25 muestras urinarias conteniendo LH fueron de 0.52 - 1.48.

Cuando la hCG se presenta en solución, los índices de valoración fueron más altos, 3 para hCG en plasma y 5.6 para hCG urinaria. La actividad de LH en plasma se expresó en ng/ml usando una preparación hipofisiaria de LH (Se-26-Roos) como una referencia estándar y la excreción urinaria de LH en IU.

(2a. referencia internacional para la preparación de la hCG) por 24 Hr.

La gráfica 17 (pág. 176), nos muestra un caso de embarazo normal en el cual los índices de discriminación de la gonadotropina estuvieron dentro de los límites de dos desviaciones estándar para LH, el

día +7 y para la gonadotropina plasmática, el día +9. Desde el día +8 y +10 respectivamente, los valores fueron más altos, indicando la presencia de hCG y por lo tanto de embarazo. En el día +13 el índice de valoración para la orina fué de 4.3 y para el plasma de 2.6.

La gráfica 18 (pág. 177), se obtuvo de un caso de aborto espontáneo, en el cual la relación entre el día de la ovulación y el incremento de la actividad gonadotrópica en el plasma y la orina es similar al encontrado en el caso No. 1. El nivel plasmático de la gonadotropina y la excreción urinaria declinaron después del día +19 y dos días más tarde ambas mujeres reportaron un flujo vaginal similar al sangrado menstrual (187-188).

El método usado es fácil de llevar a cabo, no hay pretratamiento en las muestras y los resultados se obtienen dentro de las 24 hrs., siguientes o aún el mismo día si es necesario. Además de una prueba que proporciona un diagnóstico anticipado del embarazo.

También sirve de ayuda para el diagnóstico de embarazos ectópicos y de otras alteraciones en que la producción y la excreción de gonadotropinas está aumentada, como ocurre en ciertas neoplasias (coriocarcinomas) o con tejido corial (188) .

1.B. SITUACION ACTUAL .

En los últimos años, varios investigadores han diseñado diferentes tipos de técnicas para mejorar el radioinmunoensayo (RIA). Algunas de estas técnicas son el: inmuno enzimo ensayo (ELISA) y el ensayo radio - inmuno metrico, han sido usadas para medir la concentración circulante de la hCG con objeto de determinar y - corroborar su concentración tanto normal como patológica (93; 189 - 194).

Vaitukaitis en 1985, estudió el radioinmunoanálisis de doble anticuerpo. El primer anticuerpo es generado al inyectar conejos u otros animales con la beta hCG. Este anticuerpo se une a la hCG y forma un complejo soluble. Para precipitar ese complejo soluble, se adiciona a la mezcla de reacción un segundo anticuerpo generado contra el conejo o contra las especies que fueron utilizadas para generar el primer anticuerpo, la concentración de este último anticuerpo se determina - en forma empírica, y es aquella concentración que produce una precipitación máxima de el complejo inicial - hCG-anticuerpo. La hormona libre puede ser separada de la hormona unida por centrifugación, ya que los com -

plejos de hCG anticuerpo-anticuerpo son insolubles. Otras técnicas de separación pueden también ser utilizadas.

Para mayor sensibilidad y precisión, las mezclas de reacción de la hormona inicial con el anticuerpo deben ser incubadas hasta que se alcance el equilibrio, antes de añadir el segundo anticuerpo. Los tiempos de incubación del ensayo dependen de la temperatura y el equilibrio es alcanzado más rápidamente a temperatura entre 25°C y 30°C que a 4°C. Sin embargo, la velocidad de disociación del complejo anticuerpo-hormona es también incrementado a temperaturas mayores disminuyendo la cantidad de la hormona que esta unida al anticuerpo.

Para generar una curva dosis-respuesta se adicionan concentraciones crecientes de hCG no marcada (frfa) a los tubos de ensayo que contienen una concentración fija de hCG marcada con I^{125} y una concentración fija de antisuero contra la beta hCG, que se una, aproximadamente, a un tercio de la radiactividad total contenida en el tubo de ensayo. La curva dosis-respuesta es entonces utilizada para determinar, por

interpolación, las concentraciones de hCG de las muestras de los tubos de ensayo.

Generalmente, el control de calidad de las muestras se incluye en cada ensayo a concentraciones bajas, intermedias y altas, para determinar la variabilidad inter e intra-ensayo (195).

Recientemente, fué reportado un ensayo específico y sensible, el inmuno ensayo colorimétrico sandwich-enzima (EIA) para hCG con suficiente sensibilidad y especificidad para su uso clínico. Las esferas del polietileno fueron cubiertas con anticuerpos específicos a la hCG dirigidos contra la porción carboxiterminal de la subunidad beta de la hCG. En este estudio utilizaron a la beta hCG-BTG como inmunogeno, ya que el antisuero resultante contenía mayores cantidades de anticuerpos específicos que los antisueros que se producían contra la molécula completa de hCG. La mayoría de los anticuerpos purificados de los sueros anti-beta hCG BTG mostraron casi la misma afinidad para el péptido carboximterminal sintético y para el péptido carboxiterminal natural que contenía algunas fracciones de carbohidrato. Por lo tanto el " sandwich " parece de -

tectar no solo la hCG normal, sino también una molécula de hCG con algunas alteraciones en los residuos de carbohidrato en el extremo C-terminal de la beta hCG, la cual se encontro en algunos pacientes que presentaron coriocarcinoma (196).

Otros investigadores han reportado también el " sandwich-EIA " para hCG utilizando la peroxidasa del rabano como un marcador (197). Davey y colaboradores (198) valoraron un estuche de Abbot hCG-EIA y encontraron que la sensibilidad del ensayo era de 0.69 mIU/ml y la reactividad cruzada con hLH era de 1 al 2%. Mehta y MacDonald (199) desarrollaron otro sandwich-EIA rápido, con microplacas el cual podia medir tan pequeñas cantidades como 1.56 mIU/ml de la hCG y que tenia una reacción cruzada de 3.3 a 4.2% con hLH. El método de Suzuki y colaboradores es 3 a 8 veces más sensible para la hCG con una reactividad cruzada 10 a 40 veces más baja con hCG que cualquiera de los métodos anteriores. Suzuki utilizó un conjugado anti-hCG Fab'-HRP el cual tiene muchas ventajas sobre otros métodos que utilizan glutaraldehido o peryodato y que permite el desarrollo de un ensayo muy sensible con unión inespecífica muy baja (196).

Además de las altas reactividades cruzadas observadas en los otros métodos pudieran ser explicadas por el hecho de que los anticuerpos anti-beta hCG no tienen una purificación posterior. Es probable que los niveles séricos normales en suero de adultos jóvenes saludables no pueden ser medidos exactamente por los métodos de Davey y Metha (198, 199), ya que los niveles circulantes están por debajo de sus límites de detección por ejemplo: 0.17 mIU/ml para los hombres y 0.16 mIU/ml para las mujeres o 46 pg/ml para los hombres, lo cual corresponde a 0.31 mIU/ml. Suzuki y colaboradores (196) observaron que los niveles de hCG en la mujer se incrementan con la edad y sus resultados concuerdan con aquellos reportados previamente por Imagawa y colaboradores (200) y Borkowski y colaboradores (201).

Chen y colaboradores estudiaron el efecto del ultrasonido sobre la cinética de unión de antígenos macromoleculares a anticuerpos unidos a una fase sólida (202).

Estos investigadores demostraron que el uso de la energía ultrasonica aumenta el transporte de la masa a través de las interfases líquido-sólido y que puede - acelerar la unión del antígeno a los anticuerpos inmovilizados. Empleando tiras que contenian la oxidasa de la glucosa y un anticuerpo específico a la subunidad - alfa de la hCG humana coinmobilizada en celulosa. Un conjugado de la peroxidasa del rabano con un anticuerpo monoclonal contra la subunidad beta de la hCG es - utilizado en la fase líquida para completar el " sandwich inmune ". El uso del ultrasonido para acelerar y mejorar la unión de la enzima elimina etapas de lavado que resultan al final de cuentas en un ahorro de tiempo.

De esta manera concentraciones de 25 UI de hCG urina - ria/l pueden ser fácilmente determinadas en menos de - 20 minutos (202).

II. IMPORTANCIA CLINICA DE LA hCG .

Como se indicó anteriormente, la placenta, que es un órgano esteroidogénico incompleto es capaz de sintetizar desde estadios muy tempranos de la gestación, algunas hormonas de naturaleza proteica.

La primera hormona proteica placentaria reconocida fue la gonadotropina coriónica humana y su cuantificación en la orina por técnicas biológicas y radioinmunológicas, ha permitido establecer su importancia clínica, tanto en el diagnóstico, manejo de embarazos normales y patológicos, así como en la terapia de diversos trastornos clínicos.

El coriocarcinoma y los teratomas que contienen células trofoblásticas, producen frecuentemente sustancias similares a la gonadotropina coriónica (hCG), - pero además existen otros tumores que, sin ser trofoblásticos, también sintetizan un material que inmunológicamente corresponde a esa misma hormona.

Una concentración excesivamente alta de estas gonadotropinas en el plasma y en la orina de estos enfermos es útil para establecer el diagnóstico. También, la determinación de otras proteínas placentarias producto -

de la secreción ectópica, es de interés práctico para el diagnóstico temprano y la valoración de las respuestas terapéuticas de estas neoplasias (203) .

EJEMPLOS DE LA APLICACION DE LAS PRUEBAS EN LA CLINICA .

EMBARAZO ECTOPICO .

Se ha establecido que la determinación temprana - de la hCG en el suero de mujeres en las cuales se sospecha de un embarazo ectópico, es una ventaja para establecer las acciones a seguir. Numerosas investigaciones han mostrado que en el 80% o más de las mujeres con embarazo ectópico, se han determinado cantidades apreciables de la hormona en sangre, empleando el método - del RIA específico para la subunidad beta de la hCG, - esto permite diagnosticar con eficacia los embarazos ectopicos si se realizan pruebas seriadas y se confirma con el uso del ultrasonido. Figura 19 (pág. 178) (203 - 206) .

Al examinar la concentración de la protefina tro - foblástica en los sueros de 51 pacientes en los que se sospecha un embarazo ectópico, este fué confirmado en

35 de esos pacientes. En otros casos el diagnóstico incluyó el embarazo intrauterino (n=5), el aborto (n=1), la endometriosis (n=1) y la patología no pelvica (n=4).

La concentración de la hCG fué evaluada en muestras de sangre y orina de cada paciente (207).

Las siguientes determinaciones cualitativas fueron realizadas: la prueba de inhibición de la aglutinación en látex para la hCG urinaria, la hCG, la PSBG, y la hPL fueron medidas por RIA y la CAP fué cuantificada por el método colorimétrico.

Las Tablas XIV y XV (pág 196,198), nos incluyen valores pronósticos de las pruebas, así como la sensibilidad de algunas de ellas.

Es claro que la eficiencia de los métodos que determinan la hCG en el suero fué superior a las medidas en el suero de PSBG, hPL y de la hCG en la orina. Por lo tanto, la eficiencia para determinar la hCG midiendo la subunidad beta por medio del RIA, es mejor que los resultados obtenidos al medir por RIA la concentración de PSBG. También se observó que las medidas de hPL

y CAP no fueron útiles para distinguir entre pacientes que tienen embarazo ectópico y los que no lo tienen.

La mujer, durante un embarazo normal, tiene una concentración normal de proteínas en suero materno, mientras que mujeres con embarazo ectópico o abortos espontáneos, presentan bajas concentraciones de esos biopolímeros (208).

Este estudio sugiere que los niveles de hCG proporcionan un índice razonable, para saber si un embarazo ectópico ha terminado o no. Niveles mayores a 2000 mIU/ml de hCG se asocian, con mucha probabilidad, con un embarazo ectópico interrumpido (valor pronóstico = 92%), por el contrario es poco probable que un embarazo ectópico interrumpido muestre niveles menores a 2000 mIU/ml, valor pronóstico = 80%). La eficiencia de la prueba es del 85%. Si bien estas observaciones están basadas en valores obtenidos empleando el método del ensayo del radioreceptor, los radioinmunoensayos para la subunidad beta de la hCG, ofrecen la misma información con una mayor sensibilidad ya que no presentan reacción cruzada con la hormona luteinizante (209).

Las diferencias en los niveles de hCG encontradas en los casos con embarazo ectópico interrumpido y terminal no puede atribuirse exclusivamente a las diferencias en la edad del embrión. La duración promedio de los embarazos fué la misma en ambos grupos. El tiempo promedio del último período menstrual fué de 6.3 ± 1.4 para los embarazos interrumpidos y de 6.4 ± 2.8 para los embarazos ectópicos terminados.

Tratando de ofrecer una explicación a los valores tan elevados encontrados en los embarazos interrumpidos, - se ha especulado lo siguiente: si el tejido ectópico coriónico es viable y activo es más probable que penetre la trompa y cause la ruptura. Siendo también probable que produzca abundante hCG. Por el contrario un tejido coriónico, menos saludable y menos activo tendrá menor capacidad para invadir la musculatura tubaria y también producir una cantidad menor de hCG. Otra posible explicación a la diferencia en los niveles de hCG es que, - muchos de los embarazos ectópicos pierden su viabili - dad en forma espontanea en un ambiente extraño. El te - jido gestacional no viable produce poca cantidad de hCG y tiene la mínima probabilidad de perforar la trompa del tubo. El grado de adsorción de la hCG desde el

tubo (embarazo ectópico terminado) comparado con el de la cavidad peritoneal (embarazo ectópico interrumpido) es aún desconocido (208).

ABORTOS ESPONTANEOS.

Para una determinada edad gestacional, los niveles sericos de la hCG tienden a ser menores en pacientes - que han tenido abortos espontaneos (203, 210 - 214), que en aquellos pacientes que mostraron embarazos a término ya que no toda la información es homogénea (210, 215, 216). Se ha sugerido la combinación del uso de la ultrasonografía con la determinación de la hCG para valorar la amenaza del aborto. Figura 20 (pág. 179) (214).

La evaluación paralela de la hCG y de la hLH, con el radioinmunoensayo mejora significativamente la capacidad de identificación de los abortos (76%) basando se en el ensayo de doble tiempo sugerido por Batzer et al (217), comparado con un 59% obtenido de una sola determinación.

Braunstein et al, observaron que las determinaciones - seriadas incrementa la certeza en la predicción de los abortos espontaneos y otros problemas tempranos del em

embarazo (203). Figura 20 y 21 (pág. 179, 180).

GESTACION MULTIPLE.

Los niveles de la hCG y de las subunidades tienden a estar en los niveles altos del intervalo de valores normales en gestación múltiple (203, 217, 218). El valor pronóstico de las determinaciones de la hCG es limitado ya que no hay una clara distinción entre los niveles de hCG de gestaciones únicas comparados con gestaciones múltiples (203).

NEOPLASIA GESTACIONAL.

Como inicialmente mostró Delfs (219), posteriormente Hertz y Colaboradores (220) y Wide y Hobson (221), la medida de los niveles de hCG es el criterio más importante para diagnosticar los tumores trofoblasticos, además de que ayudan a valorar el tratamiento que se aplica en pacientes con esa enfermedad. Las neoplasias trofoblasticas son el único caso en que la quimioterapia destruye el tumor en un elevado porcentaje de los pacientes que lo presentan y en que la producción de hormona por los tumores proporciona una

medida confiable de la actividad del tumor.

El manejo adecuado de los pacientes con embarazos molares o trofoblasticos malignos es dependiente absolutamente de la medida seriada y cuantitativa de los niveles de hCG por métodos sensibles y específicos.

Pacientes con embarazos molares producen cantidades de hCG que igualan o exceden los niveles producidos en el embarazo normal para la misma edad gestacional. Figura 22 (pág. 181) (219, 221,222).

Para utilizar los niveles de hCG para el diagnóstico es necesario la medida seriada de hCG en un período de varias semanas. En la mayoría de los pacientes con embarazo molar, los niveles de hCG caen en una meseta final del primer trimestre y/o se elevan dramáticamente en proporción al incremento de la masa celular del trofoblasto (219, 222).

Una vez que el embarazo molar es evacuado los pacientes muestran una caída progresiva y espontanea en sus títulos de hCG. La mayoría de los pacientes alcanzan sus títulos ya de remisión 15 semanas después de la remoción por histeractomía (223-225), o 13 semanas después cuando la evacuación fue hecha por succión (224,225). Las medidas exactas y cuantitativas de los niveles de la hCG permiten también identificar a 1 en 7

pacientes quienes finalmente desarrollan un tumor coriónico que requiere la terapia adicional (219, 223-225). El único medio exacto para determinar esto y valorar el potencial maligno de la mola hidatidiforme es siguiendo la regresión de los títulos de hCG a intervalos semanales. Varios laboratorios han informado de diferentes tipos de curva para la desaparición de la hCG serica después de haber evacuado la mola hidatidiforme (226, 227). La mayoría de los pacientes que mostraron curvas de regresión desviadas o diferentes durante su incremento, después de la curva de regresión post-evacuación pueden ser identificadas en 3 semanas y el 87% de ellas en 6 semanas (223). Figura 23 (pág. 182).

Esas pacientes generalmente tienen una enfermedad trofoblástica residual y son candidatos para una terapia temprana (225-227).

Por otro lado, cuándo una paciente muestra una curva de regresión que no se desvía de la curva de regresión normal postmolar o una vez reconocida la mola, el médico tiene un alto grado de certeza dentro de pocas semanas después de la evacuación de que la paciente llegará sin problemas a un título de remisión com -

pleta. Después de que los valores de hCG llegan por -
abajo de niveles no medibles durante 3 meses consecutivos las muestras de suero son analizadas mensualmente durante 6 a 12 meses, pasado ese tiempo se deberán tomar muestras cada 3 meses durante el segundo año -
(46,50).

El marcador más efectivo para cualquier cáncer es la hCG producida por el coriocarcinoma. Por más de 20 años la hCG ha sido el mejor monitor del curso de la enfermedad y respuesta a la quimioterapia (226, 230, - 231). Valorar la velocidad con que disminuyen los niveles de la hCG después de la cirugía o la quimioterapia es esencial para un manejo adecuado del coriocarcinoma (225, 226). Los niveles séricos de la hCG deben ser medidos cada semana y dependiendo del curso que muestren los niveles de hCG serán las características de la terapia que se deberá seguir; por ejemplo si se observa una disminución en los niveles de hCG dentro de las tres primeras semanas de tratamiento, esto es una disminución de 10 veces en los niveles de hCG la terapia debe ser suspendida de inmediato, una disminución menor a 10 veces garantiza la quimioterapia y si no se observa un cambio en la concentración de hCG o bien se observa

elevación, esto indica la necesidad de cambiar a una -
quimioterapia diferente. Si los niveles de hCG alcanzan
niveles no medibles durante tres semanas consecutivas
es señal suficiente para no suministrar una terapia más
y los pacientes serán seguidos cada mes durante los si-
guientes seis meses y cada mes por el resto de un año.
La relación de los niveles de hCG en suero y en líquido
cefalorraquídeo debe ser utilizado para detectar y eva-
luar metastasis cerebrales en pacientes que mostraron -
coriocarcinoma (230, 231).

TUMORES TESTICULARES.

Las determinaciones de la hCG son particularmente -
útiles en las células germinales testiculares. Hay un -
amplio acuerdo que la medida de la hCG serica, junto -
con la medida de la alfa-proteína (AFP), permiten de-
terminar en forma más precisa que otros métodos, la eta-
pa del desarrollo que se encuentra el cáncer testicu--
lar (232-236). Más tarde, los ensayos seriados de -
hCG y alfa-fetoproteína nos dan el método más sensible
de valorar la respuesta de los tumores de células germi-
nales no seminifera al tratamiento y también nos dan el
medio más temprano para detectar una recaída. Es impor-

tante que el medir los niveles tanto de hCG como de alfa-feto protefina en los pacientes con cáncer testicular ya que se han reportado algunas diferencias entre ambos marcadores (232 - 236).

También, la velocidad de desaparición de la alfa-feto protefina (vida media = 5.5 días) es más lenta que la de la hCG (vida media = 1 a 2 días), por lo que en respuesta a la terapia, cada protefina mostrara una variación diferente en su velocidad de recambio. La determinación de la hCG tanto en el suero como en el líquido cefalorraquídeo es de gran utilidad en el diagnóstico y evaluación del tratamiento de los tumores intracraneales de células germinales (236).

CRECIMIENTOS MALIGNOS NO TROFOBLASTICOS .

Hay una gran cantidad de literaturas que documentan la presencia de una sustancia inmunoreactiva semejante a la hCG en el suero de pacientes con neoplasmas no trofoblasticos.

La Tabla XVI (pág. 200), resume muchos estudios en los cuales esa sustancia inmunoreactiva semejante a hCG en el suero de pacientes con cáncer fué determina-

da por el método del radioinmunoanálisis. La incidencia total de la producción no trofoblástica de hCG - 19.5% concuerda con la incidencia reportada recientemente por Braunstein en una recopilación de un gran número de estudios (19.3%). Es evidente de los datos de esta Tabla que la frecuencia más alta de los niveles positivos de hCG se presenta en pacientes con tumores ginecológicos, del seno, pulmonares y del tracto gastrointestinal o en melanomas malignos (237).

CANCER GINECOLOGICO .

La incidencia más alta de pacientes que presentan la sustancia inmunoreactiva similar a hCG con enfermedades ginecológicas, se refiere más notablemente al carcinoma ovarico y al cervical. La mayor parte del interés generado en esos casos se refiere a la capacidad potencial de que esos tumores tuvieran como marcadores los niveles de la sustancia inmunoreactiva similar a hCG. Sin embargo la información obtenida hasta el momento refleja más bien una incertidumbre hacia este dato.

Fishman et al (238) encontraron que los incrementos progresivos de la sustancia inmunoreactiva similar a hCG se correlacionaban con la extensión de la enfermedad tanto del ovario como de otros cánceres.

Semaan et al (239) demostró la sustancia inmunoreactiva similar a hCG en 29 de 65 pacientes con cáncer ovarico (45%). Los niveles más altos encontrados fueron de 50 mIU/ml, pero la mayoría de ellos estuvieron en la zona límite de 3 a 5 mIU/ml, niveles que son poco importantes desde el punto de vista clínico.

En vista de que no se demostró una relación entre los niveles de la hCG inmunoreactiva del lactogeno placentario humano y de los antígenos carcinoembrionarios con el curso de la enfermedad los investigadores concluyeron que la determinación de esos marcadores no tienen ningún valor si se desea valorar el estado clínico de los pacientes o determinar el efecto de la terapia. Algunos investigadores han llegado a las mismas conclusiones cuando se han realizado estudios con cáncer uterino o cáncer ovarico con objeto de determinar la importancia de estos marcadores (240, 241).

Se encontró que la sustancia inmunoreactiva similar a hCG era mucho menos útil que la glucoproteína beta-1 específica del embarazo o bien el antígeno carcinoem-

brionario, y la alfa-feto protefina tenfa solamente un valor limitado, principalmente para aquellos casos en que se deseaba monitorear cáncer de mama, cáncer de tractogenital y cáncer de las vfas respiratorias. En un estudio de 80 pacientes con cáncer invasivo, no se encontro que la hCG fuera un marcador tumoral adecuado, aunque el antfgeno carcinoembrionario y la hCG fueron indicadores de una enfermedad recurrente en un pequeño porcentaje de los pacientes (242).

En contraste con los resultados antes descritos, Donaldson y colaboradores (243), encontraron que los niveles plasmaticos de la hCG era un marcador tumoral muy útil principalmente en cáncer ginecológico y particularmente cuando esas concentraciones se correlacionan con los ensayos de AFP y antfgeno carcinoembrionario. Antes de la terapia, más del 85% de los pacientes con cáncer ovarico o cervical mostraron niveles plasmaticos elevados de 1 o más de esos antfgenos; mientras que el 22% de la población con cáncer tenfa solamente positivo para hCG. Las concentraciones del material inmunoreactivo similar a hCG estuvieron elevadas en pacientes con cistadenocarcinoma seroso del ovario y en pacientes con carcinoma de las células escamosas queratinizadas

del cervix. Los niveles plasmáticos de los antígenos se correlacionaron con la diferenciación de los tumores y las etapas de la enfermedad y generalmente regresaron a sus niveles normales 2 o 3 semanas después de que se sigue la terapia. De los 3 marcadores, el de falsos positivos más bajos fué el de la hCG (3%, si se compara con 22% de la alfa-feto proteína y 18% del antígeno - carcinoembrionario).

Kurman y Norris (244, 245) han sugerido que la producción diferencial de alfa-feto proteína y de hCG podían ofrecer una forma realista de distinguir los tumores endodermicos de los carcinomas de las células embrionarias.

CANCER DE MAMA.

Los valores de la hCG sérica que sirven para realizar una predicción no han sido bien demostrados para el carcinoma mamario. Tormey et al (246) y Gucalp y Firat (247) concluyeron que los niveles de hCG séricos pueden ser de valor pronóstico en el carcinoma de mama. Franchimont et al (248) encontraron que las de terminaciones de hCG y de la subunidad beta de la hCG, cuando son utilizadas junto con otros marcadores (al-

fa-feto proteína, antígeno carconoembrionario, caseína - K), se correlacionaron con el curso del cáncer de ma ma y otros más. Por otro lado, Coombes et al (249) no encontraron utilidad a la determinación de la subunidad beta hCG en diferentes etapas del cancer de mama.

Cove y colaboradores (250), no obtuvieron eviden cias de que la hCG o la beta hCG son producidas comun - mente por el cáncer de mama, pudieran ser utilizados - como marcadores tumorales en el cáncer de la mama.

OTROS TIPOS DE CANCER.

Los niveles séricos elevados de un compuesto in - munoreactivo similar a hCG fué encontrado en pacientes con tumores de las células de los islotes pancreaticos.

El 33% de estos pacientes, tenían en su suero una can - tidad medible de hCG, sin duda la frecuencia más alta para cualquier tumor del tracto gastrointestinal (251). Sin embargo Gailani et al encontraron poca o ninguna - elevación de los compuestos inmunoreactivos similares a hCG en el plasma de pacientes con neoplasmas del tracto digestivo (252). Mackie y colaboradores (253) no - observaron valores medibles de la hCG como un marcador

para el diagnóstico del cáncer pancreático y tampoco encontraron diferencia entre los niveles sistémicos y de la porta de la hCG inmunoreactiva en pacientes con cáncer pancreático. Ruibal et al (254), encontraron que la medida del antígeno carcinoembrionario así como de la hCG no mostraron incrementos significativos en los casos positivos del cáncer del tracto digestivo que pudieran ser detectados midiendo solamente los niveles del antígeno carcinoembrionario.

La elevación de los niveles séricos de la hCG o de la subunidad beta-hCG esta bien documentado en el caso del carcinoma del pulmón y en otros cánceres no trofo - blásticos. Tabla XVI (pág. 200) (248, 249).

Se necesita realizar estudios prospectivos antes de que se pueda establecer la utilidad clínica de la hCG como un marcador del tumor. En general, los niveles séricos de el material inmunoreactivo similar a hCG en pacientes con tumores no trofoblasticos son bajos. Aún esos niveles bajos podrían tener valor diagnóstico, si marcaran los procesos malignos, pero esos niveles son menos útiles, si se desean utilizar como un medio para monitorear el curso de la enfermedad. Es posible -

también que algunas sustancias que dan reacción cruzada, pero diferentes de la hCG pueden estar presente en el suero de algunos pacientes. Este problema puede variar entre laboratorios diferentes, dependiendo del anticuerpo utilizado en el radioinmunoanálisis para hCG, y es más difícil excluirlo en aquellos que contienen niveles muy bajos del suero compuesto inmunoreactivo similar a hCG.

Algunos investigadores han informado de la presencia frecuente de resultados falso positivo con el antígeno carcinoembrionario y con el hCG y varios otros han observado la presencia de la hCG inmunoreactiva o de sus subunidades en el suero de pacientes con enfermedades gastrointestinales no neoplásicas (248).

Es más, la mayoría sí no es que todo los tejidos, contienen bajos niveles de algún compuesto inmunoreactivo similar a la hCG (255).

Esas observaciones muestran que se debe ser muy cauteloso en la interpretación de los resultados que muestren algún compuesto positivo similar a hCG para ser utilizado como un marcador del cáncer. McIntire et al (256) ha elaborado una guía resumida para el uso de

marcadores en el diagnóstico del cáncer.

Quizas con esa guía, la importancia de las determinaciones de hCG en el diagnóstico y seguimiento del cáncer no trofoblastico, diferentes del tumor de células germinales del testículo, pueden ser definida más claramente.

Se han propuesto muchas explicaciones para entender las diferencias encontradas entre el estado clínico y los niveles de hCG en pacientes con crecimientos malignos no trofoblasticos. Una posibilidad es de que los tumores esten comprendidos en una población heterogénea (Multiclonal) de células productoras de hCG y de células no productoras de hCG con diferentes velocidades de crecimiento y una susceptibilidad variable a la radiación o a la quimoterapia (257). Otra posibilidad es que el volumen de el tumor pueda ser menor que la producción de hCG, cambiando el número de células proliferativas. Algunas drogas pueden producir cambios en las velocidades de desaparición metabolica de hCG, pero no producen ningún cambio, en las células marcadoras que la producen. También puede existir una secreción reducida de hCG con un incremento en el número de metástasis o bien con un blanco nitrogenado negativo (246 - 248).

IMPORTANCIA CLINICA DE LAS DETERMINACIONES DE LA SUB -
UNIDAD ALFA .

En los últimos años, la molécula de hCG ha sido bioquímicamente caracterizada. La hormona biológicamente activa consiste de una subunidad alfa y de una subunidad beta en asociación no covalente. Aunque las subunidades alfa y beta difieren una de otra en la composición de aminoácidos, la subunidad alfa es idéntica en la composición de aminoácidos y en su secuencia a la subunidad alfa de otras hormonas glucoproteicas hipofisarias, como la hormona estimulante de la tirotropina, la hormona estimulante del folículo y la hormona luteinizante. Por lo tanto, todas las cuatro subunidades alfa son intercambiables y pueden recombinarse con cualquiera de las subunidades beta de las cuatro glucoproteínas diferentes para formar un producto con actividad biológica característica y específica de la subunidad beta.

Aunque faltan algunos detalles por ser estudiados, las principales etapas en la secreción de la hCG pueden ser resumidas como sigue. La biosíntesis de la hCG involucra la síntesis por separado de cada una de las subunidades de su mRNA respectivo .

Posteriormente, el carbohidrato se une a cada subunidad por una serie de reacciones complejas. Las subunidades completas se combinan con otras antes de ser secretadas como la hCG intacta.

En muchos casos hay también, la secreción de subunidades alfa libres, probablemente como resultado de una sobreproducción de esa subunidad en relación con la subunidad beta. Es posible que la regulación de la síntesis en el trofoblasto se realice de manera separada para la subunidad alfa y la subunidad beta, siendo las síntesis de la subunidad beta el paso limitante (255).

Existen muchos artículos en donde se refieren a la producción en forma aislada o no balanceada tanto de la hCG como de sus subunidades, por algunos tumores, con un aumento en la secreción de la subunidad alfa libre (250, 255, 258; 270). En el embarazo temprano la placenta secreta preferentemente la hCG completa, sin embargo, se puede encontrar poco de cualquiera de las subunidades. Después de las semanas 8 - 12 del embarazo en donde se observa el pico de la hCG, los niveles de la hCG completa disminuyen mientras que los de la subunidad alfa se incrementa hasta el día del parto. Muchos tejidos malignos no trofoblasticos del humano y varias

líneas celulares en cultivo de tejido secretan preferentemente la subunidad alfa de las hormonas glucoproteicas; solo pocas líneas secretan predominantemente las subunidades beta. Esas observaciones son consistentes con la hipótesis de que pueden ocurrir una secreción no balanceada de las subunidades alfa y beta. Esta secreción no balanceada ofrece una razón para medir los niveles, tanto de la subunidad alfa y de la hCG en algunas enfermedades obstétricas y ginecológicas así como marcadores tumorales en tejidos malignos no trofoblasticos.

LA SUBUNIDAD ALFA EN LAS ENFERMEDADES TROFOBASTICAS DURANTE LA GESTACION .

Dawood y colaboradores (259) observaron en pacientes que mostraban carcinoma y que eventualmente desarrollaron metastasis cerebrales, que los niveles de la subunidad alfa se incrementaron, mientras que los de la subunidad beta y de la hCG total disminuían o alcanzaban niveles no medibles. Así, sin monitorear los niveles de la subunidad alfa sola, la persistencia de la enfermedad puede ser distorsionada cuando los niveles se-

ricos de la hCG fueran normales, pero que se presentaran pequeños focos de células tumorales que producen solo la subunidad alfa. Nishimura y colaboradores (260), encontraron que la respuesta a la terapia de algunos pacientes con mola hidatidiforme o coriocarcinoma era reflejada más rápidamente por los niveles de la subunidad alfa que por los niveles de la hCG. La base de esta importante observación es indudablemente la vida media plasmática de la subunidad alfa, que es más corta si se compara con la vida media de la hCG. Quigley y colaboradores (261, 262), sugirieron que las medidas de rutina de la subunidad alfa en pacientes tratados exitosamente para las enfermedades trofoblásticas podían ayudar a identificar aquellos pacientes que requerían una quimioterapia adicional o un tratamiento más energético. Esos investigadores encontraron que la determinación de la subunidad alfa era útil en detectar la recurrencia en pacientes con remisión que presentaban coriocarcinoma siempre y cuando la secreción hipofisiaria de la gonadotropina fuera primero suprimida con anticonceptivos orales (262). Las gonadotropinas hipofisarias entrecruzan el radioinmunoanálisis, para la subunidad alfa ya que ellas contienen subunidad alfa. Quigley y colabora-

dores (262), sugirieron que se deban tomar en cuenta la medida rutinaria de la subunidad alfa en aquellos pa-
cientes que son seguidos después del tratamiento de una neoplasia trofoblastica gestacional una vez que no mues-
tren hCG (empleando un radioinmunoanálisis para la sub-
unidad beta) y recomendaron en esos pacientes el uso -
de una terapia supresora de gonadotropina hipofisaria.

DETERMINACION DE LA SUBUNIDAD ALFA EN OTRAS CONDICIONES.

Gaspard y asociados (263), midieron en la madre un incremento de los niveles sericos de la subunidad alfa y/o en la relación alfa: hCG (o subunidad alfa: subunidad beta) en pacientes con aborto inevitable, em-
barazo ectopico preclamsia o eclampsia.

Esto podría deberse a la preservación del citotrofoblas-
to más que de las células del sinciciotrofoblastico du-
rante la hipoxia (263, 264).

La evidencia inmunocitoquímica sugiere que el citotro-
foblasto es el sitio de síntesis de la subunidad alfa,
mientras que el sincitio podría ser la fuente de la sub-
unidad beta y el ensamblaje de las subunidades en la -
hCG completa (257, 263).

En estudios preliminares, Benveniste y colaboradores (265) encontraron niveles de la subunidad alfa - anormalmente elevados, pero los niveles de hCG, eran - normales en pacientes diabéticas, embarazadas y en pa - cientes en el tercer trimestre y que presentaban un re - tardo del crecimiento fetal. La subunidad alfa prevale - ce en el suero de pacientes con fallas crónicas renales (258, 266). Existe evidencia de que los niveles seri - cos de hCG y de ambas subunidades en el suero materno - durante las primeras 20 semanas del embarazo son más al - tas con feto hembra que con feto macho (267). Los ni - veles de inmunoreactividad contra la subunidad alfa son más altos en la mujer postmenopausica que en la mujer - premenopausica o en los hombres, reflejando probablemen - te una reacción cruzada en las gonadotrofinas hipofisi - as que circulan en mayor concentración en la mujer - durante la postmenopausia (268).

LA SUBUNIDAD ALFA COMO UN MARCADOR TUMORAL NO TROFO -
BLASTICO .

Los niveles séricos elevados de la subunidad alfa han sido observados en una gran variedad de enfermeda - des malignas no trofoblásticas incluyendo el cáncer del

tracto gastrointestinal, del pulmón, de la mama y otros (268, 269). La gastrina serica y la subunidad alfa parecen ser los marcadores tumorales más útiles en el manejo de pacientes con gastrinoma metastasico (268, 269).

MacFarlane y colaboradores (270) encontraron los niveles de la subunidad alfa elevados en 21 de 56 pacientes premenopausicas (38%) y 22 de los 106 pacientes postmenopausicas (21%) que mostraron cáncer primario de la mama al tiempo de presentación. Los niveles altos de la subunidad alfa fueron observados en el suero de 7 de 59 pacientes (12%) con enfermedad benigna de la mama. En ese estudio se mostro una correlación significativa entre los niveles de la subunidad alfa y el estado o etapa de la enfermedad en las pacientes premenopausicas con cáncer de mama, pero no fué así en las pacientes postmenopausicas. Así, en las pacientes premenopausicas con cáncer de mama, altos niveles de subunidad alfa al tiempo de la presentación del cáncer con el tumor primario pueden ser la indicación de una prognosis pobre. Por otro lado Cove y colaboradores (250), no observaron una diferencia significativa en los niveles del suero de la subunidad alfa entre pacientes con cáncer mamario local antes o después de la resección del

tumor, ni en pacientes con la enfermedad avanzada y con trolada.

Esos investigadores concluyeron que la subunidad alfa se encuentra en pocas ocasiones en concentraciones suficiente altas en el suero para que sean de valor como un marcador tumoral en este tipo de cáncer de mama.

Rutanen (269) analizó los niveles circulantes - de la subunidad alfa en 101 pacientes con cáncer gineco lógico y encontro que no hay diferencia con los sujetos control. Concluyó que la subunidad alfa no tiene valor como un marcador tumoral en el cáncer ginecológico no trofoblastico. Braunstein y colaboradores (268), mi - dieron los niveles de la subunidad alfa en 957 pacien - tes no embarazadas con enfermedad benigna y 683 pacien - tes con la malignidad no seleccionada.

Hubo una considerable superposición de los niveles de subunidad alfa en pacientes con la enfermedad benigna y aquellos que mostraron crecimiento maligno. Cuando los pacientes fueron agrupados de acuerdo a la etapa - de la enfermedad, no hubo diferencia evidente en la con centración serica de la subunidad alfa entre los grupos, sugiriendo que los niveles séricos de la subunidad al - fa no estan directamente relacionados al tumor. Más -

aún, los niveles de la subunidad alfa no se correlacionan con el estadio clínico. Esos autores concluyeron - que la determinación de la subunidad alfa en el suero - no es útil para discriminar pacientes con cáncer o para seguir el curso clínico de la mayoría de los cánceres.

En una serie que incluyó 532 pacientes con cáncer, Blackman y colaboradores (272) midieron los niveles séricos de las subunidades alfa y beta especialmente - cuando se miden combinadas, fueron marcadores potencialmente útiles para algunas enfermedades. Ellos enfatizaron, sin embargo que la utilidad clínica actual de esos marcadores permanece por ser establecida en estudios prospectivos (271).

III.- TRATAMIENTO .

La hCG ha sido usada en la clínica desde 1930, - unos años después de ser descubierta en la orina. Es - la gonadotropina que ha sido empleada por más tiempo y que se sabe mucho de sus efectos. Su aplicación durante la fase folicular en mujeres menstruando normalmente, mostro no tener efectos. En la fase secretora puede provocar la ruptura del folículo y la formación del cuerpo luteo; como se puede evidenciar por un aumento en los niveles de pregnandiol en la orina. En presencia de un cuerpo luteo fresco la hCG puede mostrar un efecto trofico y prolongar su vida funcional, como con secuencia se prolonga en ciclo menstrual.

En el humano, la ovulación involucra, al menos, tres proceso principales:

- 1) El crecimiento y la maduración de un folículo,
- 2) La ruptura del mismo folículo con la descarga de un ovulo, y
- 3) La formación de cuerpo luteo.

El crecimiento de un folículo que alcanza en su maduración la etapa del " antro ", marca el inicio de

cada ciclo y es controlado por la FSH. La ruptura del mismo folículo con descarga del ovulo requiere de un incremento abrupto en la secreción de la LH.

En 1938 Engle obtuvo, en monos, crecimiento del folículo y su ruptura al administrar gonadotrofina del suero de yegua embarazada, la cual contiene principalmente actividad de FSH y hCG, y esta muestra actividad de LH (272).

En 1957 Van Wagenen y Simpson (273) indujeron la hiperovulación en hembras del mono, por la administración de FSH y LH de pituitarias de oveja o bien empleando extractos de hipofisis de monos. Resultados similares fueron obtenidos por Knobil y su grupo en 1956 en monos hipofisectomizados (274).

En el hombre, la inducción de la ovulación ha sido obtenida empleando gonadotrofinas con actividad de FSH y hCG, obtenidas de la hipofisis de animales, suero de yegua embarazada y orina de mujer embarazada.

Gemzell estudió 42 mujeres con amenorrea primaria o secundaria a las cuales suministro diariamente una inyección de 6000 IU de hCG durante 6 días. Una de es

tas mujeres fué tratada regularmente durante un año con 3000 IU de hCG por 3 días con intervalos mensuales, obteniendo en cada tiempo evidencias de ovulación y menstruación. Cuando la dosis de hCG fueron disminuidas a 1500 IU/día no ocurrió la ovulación (272). Así, el principal objetivo del tratamiento fué controlar la ovulación que ocurre de 12 - 24 horas después de la primera inyección de hCG, durante los primeros 12 días de tratamiento.

La hormona pituitaria del folículo-estimulante, humana (HPFSH) y la hCG fueron administradas conjuntamente, desde el comienzo del tratamiento, la ovulación ocurrió en los 7 u 8 días posteriores al tratamiento. El crecimiento de los ovarios y la excreción elevada de estrogénos y pregnanediol sugieren que un gran número de folículos fueron estimulados. En contraste, las gonadotrofinas de origen animal, no produjeron reacciones sensibles o formación de anticuerpos y consecuentemente pudieron ser usados por un período indefinido de tiempo (272).

Garaorri y colaboradores, estudiaron el efecto de la terapia con hCG de 153 niños con criptorquidia unilateral o bilateral y que tenían edades entre 6 me-

ses y 4 años y medio. El tratamiento consistió en nueve inyecciones intramusculares de hCG durante 3 semanas o en días alternos. La edad al inicio del tratamiento fué de 6 a 11 meses en 25 pacientes, de 12 a 23 meses en 40 pacientes, de 24 a 35 meses en 34 pacientes, de 36 a 47 meses en 25 y de 48 a 59 semanas en 29 de ellos. Las dosis de hCG por inyección vario de 500 IU (70 pacientes) a 1000 IU (6 pacientes) o 1500 IU (77 pacientes). En relación a la superficie corporal, la dosis promedio fué de $2,100 \text{ IU/m}^2$.

Para valorar los resultados del tratamiento fué practicado un examen médico entre 1 y 3 meses después de la novena inyección. La posición del testículo sin descender fué clasificada como abdominal e inguinal - alta, media o baja. El tratamiento fué considerado exitoso cuando el o los testículos descendían hacia el escroto. Si descendían del abdomen o del anillo inguinal hacia la posición inguinal media o baja se consideró un éxito parcial.

Los resultados mostraron una falla en el 72% de los casos, éxito en el 12.4% y éxito parcial en 15.6%. En el 2° grupo los éxitos fueron mayores en los casos

con criptorquidia bilateral y en las fallas no hubo diferencia.

La respuesta de los pacientes a la administración de hCG fué muy variada entre los individuos. No se observó correlación entre las dosis usadas y los resultados obtenidos, por lo tanto las dosis de hCG utilizadas en este estudio no ofrecen buenos resultados para obtener la migración de los testículos criptorquidicos en niños menores de 3 años y tienen un éxito limitado en edades entre 3 y 4 años (275).

En los últimos años se ha hecho uso de la hCG humana en el tratamiento de la infertilidad del hombre.

Mehan y Chehval (276) realizaron un estudio con 128 hombres infértiles, los cuales fueron tratados con hCG humana como tratamiento. Los pacientes fueron divididos en 5 grupos:

Grupo I. Formado por 40 pacientes, los cuales fueron tratados con hCG, después de una mala respuesta al tratamiento del varicosele por la ligadura de la vena espermatica interna.

Grupo II. Incluyó 6 pacientes con varicosele y tratados con la hCG poco antes de su curación.

Grupo III. Incluyó 12 pacientes tratados con hCG en donde se observó un incremento en la hormona estimulante del folículo y una biopsia testicular que excluyera el reestablecimiento de la espermatogenesis.

Grupo IV. Formado por 23 pacientes, con oligospermia idiopática, cuya cuenta espermática era menor a 20 millones por ml.

Grupo V. Incluía 47 pacientes clasificados como normospermicos, 21 de ellos con cuenta espermática entre 20 y 50 millones por ml y 26 pacientes con valores iniciales mayores de 50 millones por ml.

De los 40 pacientes del Grupo I, 17 lograron producir un embarazo, (42.5%). En estos pacientes la cuenta espermática se incrementó con el tratamiento de 18 a 56 millones por ml y la viabilidad de los espermatozoides de 34 a 61%.

En el Grupo II, no hubo éxito con el tratamiento y sólo uno de los 6 pacientes tratados presentó cambios significativos en la concentración de espermatozoides.

De los 12 pacientes incluidos en el Grupo III, 8 observaron incremento de la hormona estimulante del foliculo y el examen histológico de 5 de los pacientes - mostró atrofia testicular o hialinización de los tubulos.

En el Grupo IV, de los 23 pacientes que fueron - tratados con hCG, sólo 7 (30.4%) lograron un embarazo y 12 muestran un incremento en el número de espermatozoides.

En los 21 pacientes con cuenta espermática entre 20 y 50 millones/ml que formaban parte del Grupo V, se observó un incremento significativo de 32.9 a 56.4 millones/ml después del tratamiento y un incremento en su viabilidad de 26 a 49%. Sin embargo, a pesar de la mejoría observada, el número de embarazos logrados fue de 14%. El incremento en la concentración de espermatozoides y su viabilidad es similar al grupo de los oligospermicos.

Otro ejemplo que muestra la aplicación clínica de la hCG es referida por Morato y Flores (152).

La administración de hCG puede ser usada en casos de pubertad retrasada, cuando el factor fertilidad es importante en un futuro cercano. Para ello se puede intentar la administración de un extracto de gonadotropinas obtenido de la orina de mujeres menopausicas - (HMG) combinada con hCG. La dosis recomendada es de 150 U.I. de HMG y 2000 a 4000 U.I., de hCG dos a tres veces por semana, durante 12 semanas. Esta terapéutica estimula el funcionamiento de las células de Leydig, produciéndose suficiente testosterona para desarrollar las características sexuales secundarias y la iniciación de la espermatogénesis. De acuerdo a los autores este tratamiento logra la fertilidad en varios casos, aunque tiene el inconveniente de que si la pubertad no continua en forma espontanea, suspender el tratamiento por un tiempo prolongado producirá la degeneración del epitelio tubular, con fibrosis y hialinización que puede ser irreversible.

Cuando el problema fundamental es, la pubertad retrasada y el tratamiento con clomifén da resultados negativos, puede intentarse la administración de hCG con

el mismo esquema anterior, durante 12 semanas. La dosis y la frecuencia de las aplicaciones por semana se determinan valorando periódicamente los niveles de la testosterona circulante (152).

C O N C L U S I O N E S .

Siendo un tema de tanta actualidad, como es la sobre población, que al no ser controlada, puede traer - como consecuencia la carencia de alimentos, aumento de la contaminación, falta de espacio, etc.

Por lo que es de importancia conocer todos los - procesos involucrados en dicho problema, y los fenóme- nos biológicos son fundamentales en la reproducción.

Por ello se realizó una revisión bibliográfica de un sistema que controla la fertilidad en ambos sexos. En especial se decidió estudiar a la hormona coriónica gonadotrópica, ya que siendo una protefina es un siste- ma complejo de controlar y resulta a la vez, un exce - lente ejemplo de la acción de todas las hormonas pro - teicas.

El control de las hormonas gonadotrópicas se lle- va acabo por dos sistemas:

- * Los de asas largas, y
- * Los de asas cortas.

Las asas largas están ejemplificadas por la acción que ejercen los esteroides gonadales, sobre la hipófisis o el hipotálamo. Concentraciones elevadas de esos productos inhiben la liberación de las gonadotropinas. Al parecer, las hormonas esteroides efectúan este efecto debido a que estimulan un grupo de proteasas, presentes en la hipófisis y en el hipotálamo, que degradan tanto a la hormona liberadora como a las gonadotropinas.

Otro tipo de regulación de asas largas la tiene la hCG solo en casos de embarazo, la cual impide la liberación de las gonadotropinas para que no se lleve a cabo la maduración de nuevos folículos.

El mecanismo de las asas cortas se ejerce en todos los tejidos a través de un control por la concentración de las hormonas circulantes, de tal forma que un exceso de la hormona producida puede afectar su propia síntesis.

A pesar de las técnicas empleadas, el mecanismo a nivel molecular de la hormona no es conocida, por lo que es un campo importante sobre el cual tienen

que trabajar en un futuro todos los investigadores de las hormonas, ayudándose de técnicas más sofisticadas.

Estudios del control de la hCG placentar de síntesis y secreción son llevados a cabo en muchos laboratorios del mundo. Los resultados de esos estudios, no nos ayudaran a entender la relación de la hCG en la fisiología del embarazo, pero de cualquier forma nos daran idea del control de la síntesis de las hormonas pituitarias glicoproteicas.

Esperamos que este trabajo sea de utilidad para aquellos que se interesan por estudiar algún aspecto de la hormona del embarazo y en general para todos los estudiosos de la reproducción.

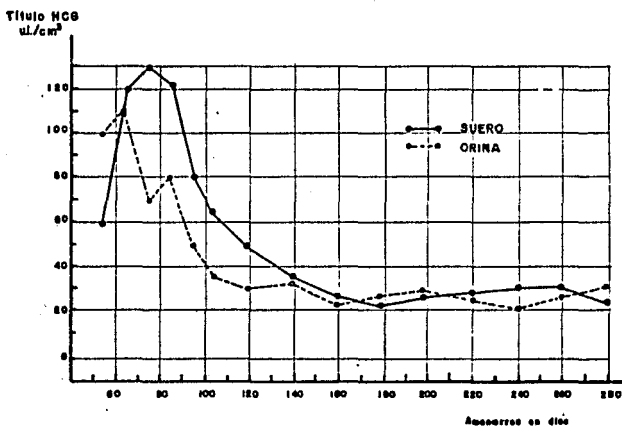


Fig. 1 - Niveles medios de gonadotropina coriónica en el suero y en la orina en 600 mujeres gestantes normales; se empleó la técnica de inhibición de la hemaglutinación. Hellman, Pritchard, Wynn. (16).

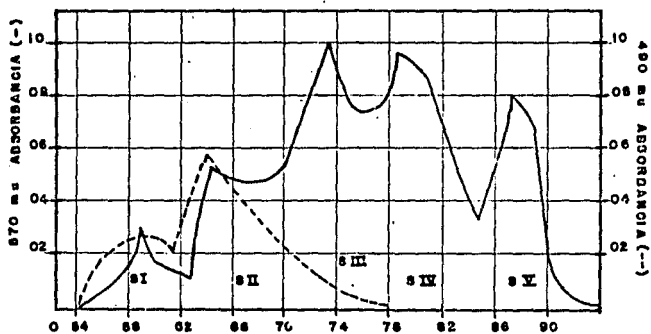
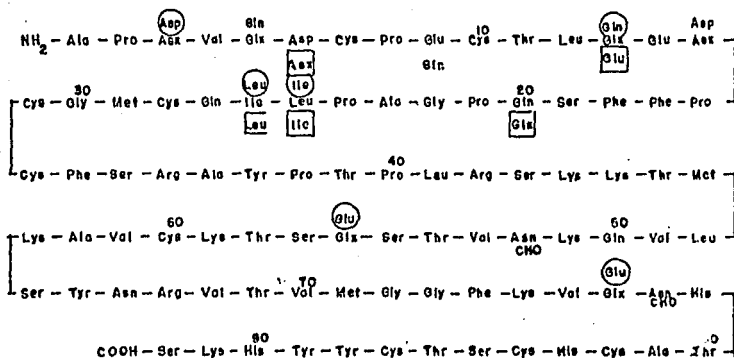


Fig. 2 - SEPARACION EN SEPHADEX G-60 DE LOS GLUCOPEPTIDOS Y PEPTIDOS OBTENIDOS DE LA HIDROLISIS CON TRIPSINA DE hCG (42).

HORMONA CORIONICA GONADOTROFICA HUMANA

SUBUNIDAD α Fig. 3.- SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA SUBUNIDAD α DE LA H.C.G.DESCRITA POR BAHL ET AL, 1972, BELLISARIO ET AL (\square)1973 y MORGAN ET AL (\circ), 1975. (14, 52, 15).

SUBUNIDAD β

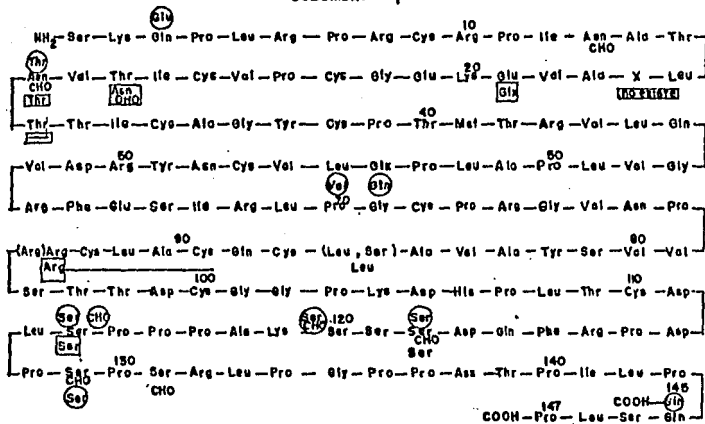


Fig. 4.- SECUENCIA DE LA SUBUNIDAD β PROPUESTA POR CARLSEN ET AL 1973 BAHL ET AL, (□) 1972, y MORGAN ET AL, (O) 1975. (63, 14, 15).

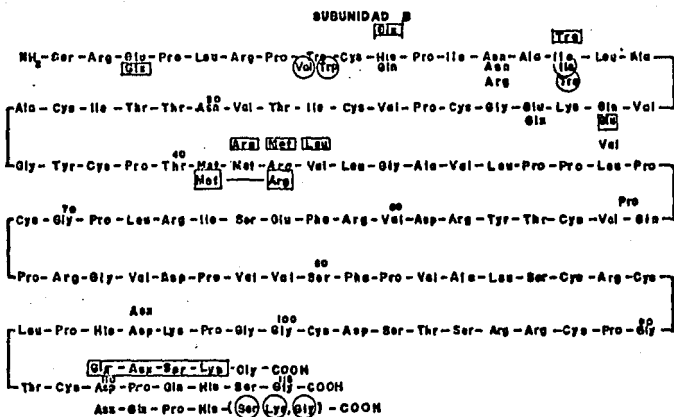


Fig. 5 - SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA SUBUNIDAD β , DE LA LH PROPUESTA POR SAIRAH ET AL, 1973, WARD ET AL (○) 1973, SHOME Y PARLOW (□) 1973, CLOSET ET AL (◻) 1973 - (72, 64, 88, 90).

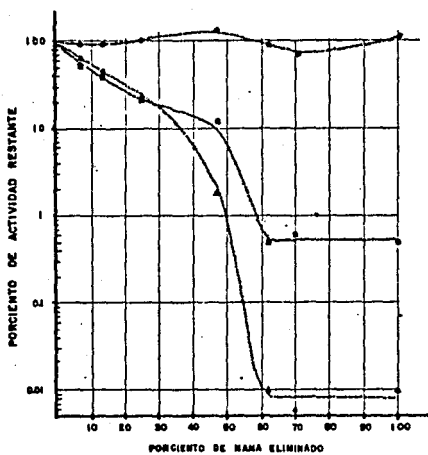


FIG. 6 EFECTO DE LA REMOCION DEL ACIDO SIALICO EN LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE LA HORMONA CORIONICA GONADOTRÓFICA HUMANA (hCG) PURIFICADA (10B).

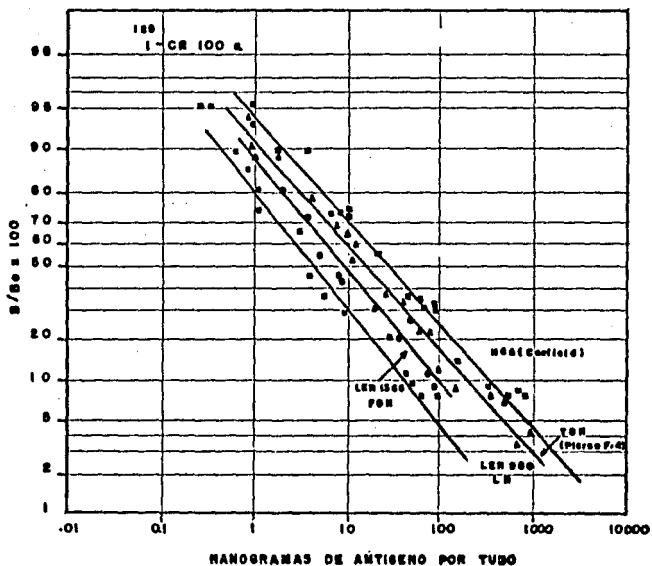


FIG. 7 GRÁFICA DE DOSES-RESPUESTA PARA LA SUBUNIDAD α DE LA HORMONA CORIONICA GONADOTROFICA DE HUMANOS, FSH, LH. (94, 82, 98, 96).

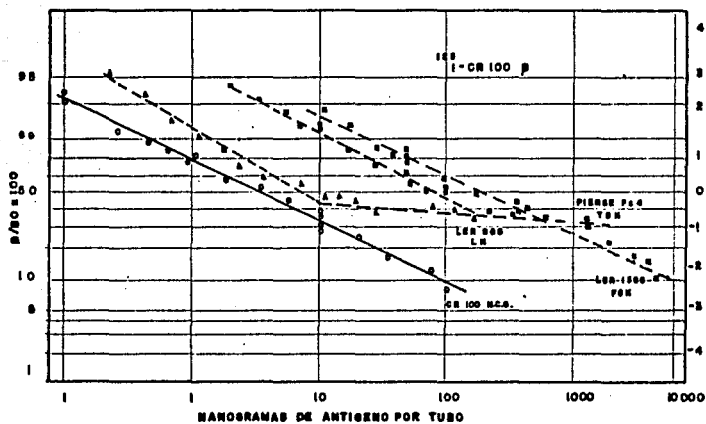


FIG. 6 CURVAS DE DOSIS-RESPUESTA PARA LA 50α , 50β , 50γ , 50δ Y LAS SUBUNIDADES β DE LA 50β EN UN SISTEMA HOMOLOGO-PARA LA SUBUNIDAD β DE 50β .

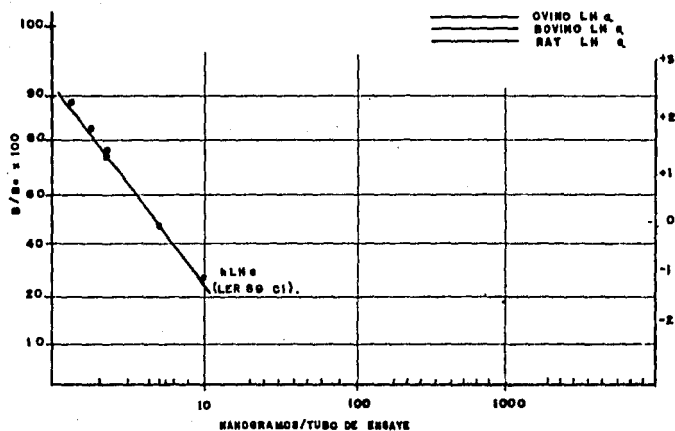
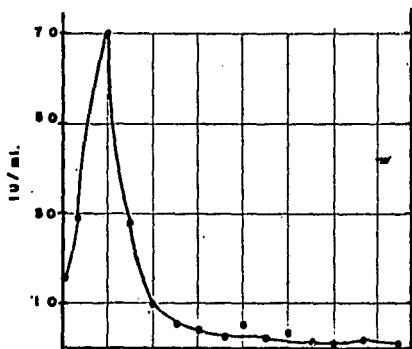
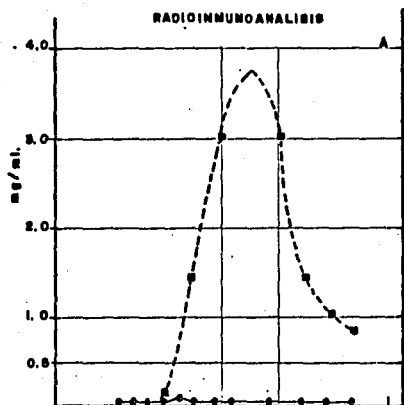


FIG. 9 CURVA DOSIS-RESPUESTA PARA LAS SUBUNIDADES Δ DE LA HORMONA LUTEINIZANTE OVINA, BOVINA Y DE LA RATA, EN UN SISTEMA HOMOLOGO CON Δ LH HUMANA.

RADIOINMUNOANALISIS

168



(ml.)
 FIG. 10A. PERFIL DE EVOLUCION EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX 8-100 DE-
 BCO DISOCIADA Y "PURIFICADA". CADA FRACCION ESTUVO SUJETA A RADIOIM-
 MUNOENSAJO. NCS A (---), NCS B (---) Y NCS B (---) (60, 102, 105).

SEPHADEX G-100

169

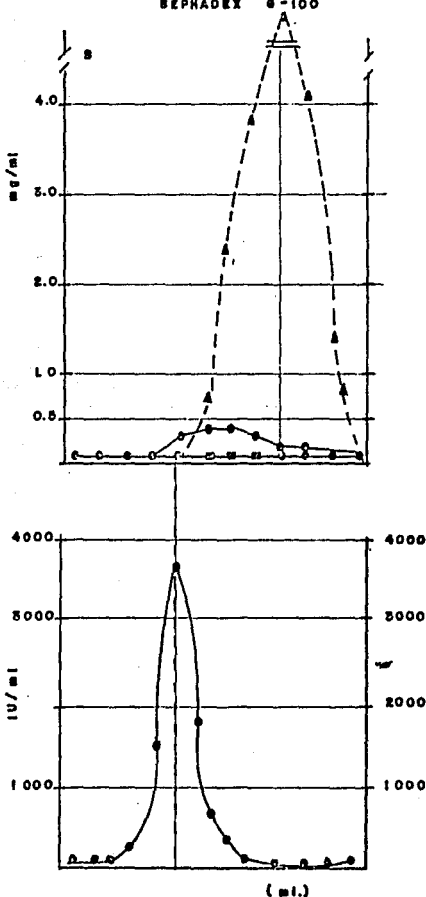


FIG. 10D. ACTIVIDAD BIOLÓGICA OBSERVADA CON UN HÍBRIDO DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LA HCO Y LA SUBUNIDAD BETA DE LA CH. (96,107).

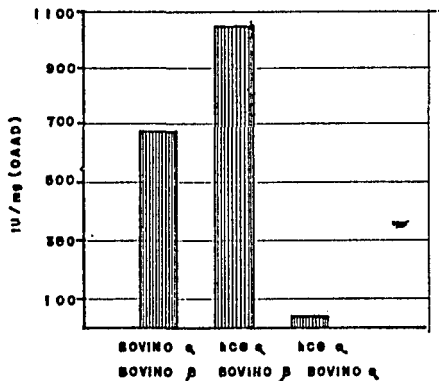
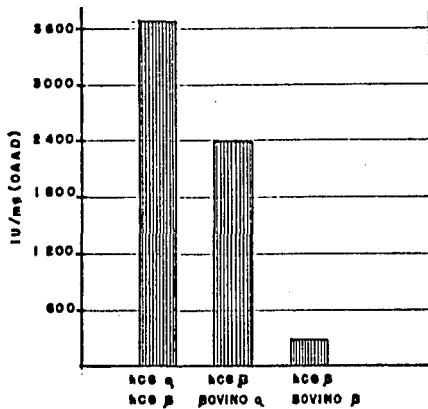
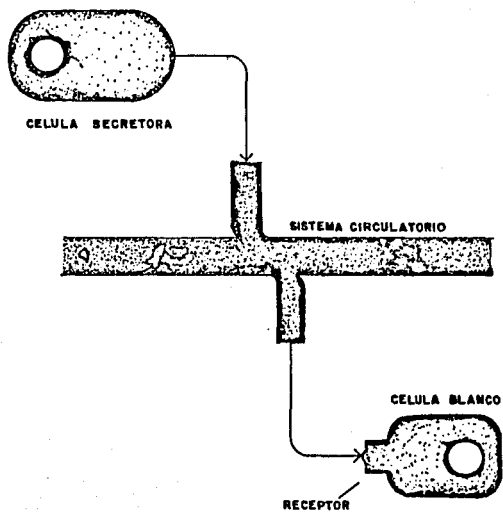


FIG 11 A,B ACTIVIDAD BIOLÓGICA DETERMINADA "IN VIVO" DE LAS SUBUNIDADES RECOMBINADAS DE LA hce Y LAS COMBINACIONES β -hce- β LH Y β -hce- β LH.

FIG. 12 COMUNICACION INTERCELULAR

La hormona es liberada de una célula [célula que la secreta] viaja através del medio intercelular y es-
ta en el receptor de una segunda célula [célula que
la recibe].



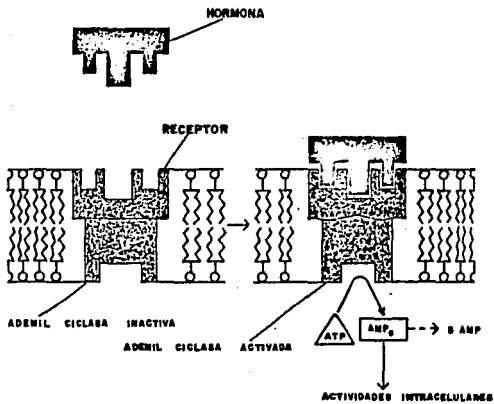


FIG. 13 COMUNICACION INTRACELULAR

La señalación celular se activa por la unión de la hormona a su receptor en la superficie celular. La unión en el enzimas convierte el ATP en AMP, el cual activa la señal en el interior de la célula.

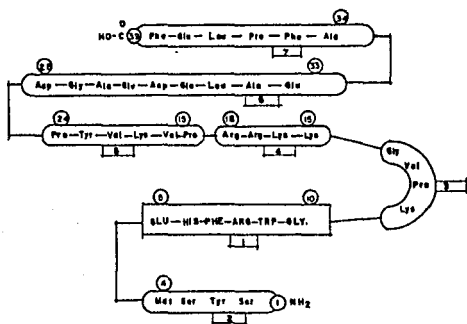


FIG. 14 Especificación funcional de las palabras en la oración ACTM (paralina) de acuerdo a Schwyzler. (1968).

Palabra 1 (ACTH¹⁻¹⁰) actúa sobre los receptores de estímulos

Palabra 2 (ACTH¹¹⁻¹⁴) y la palabra 3 (ACTH¹⁵⁻¹⁹) mejoran la actividad sobre los receptores estímulos.

Palabra 4 (ACTH²⁰⁻²⁴) adapta a las palabras 1, 2 y 3 a los receptores de la corteza adrenal y reduce la actividad sobre los receptores de los estímulos.

Palabra 5 (ACTH²⁵⁻²⁹) y palabra 7 (ACTH³⁰⁻³⁹) estabiliza a la molécula ACTH durante el transporte.

Palabra 6 (ACTH⁴⁰⁻⁴¹) marca específica de los espacios.

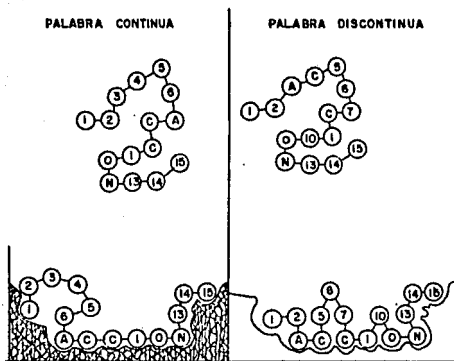


FIG. 15 Representación esquemática de las palabras continua y -
discontinua de Schwyzar.
La conformación del péptido pequeño flexible en su ambiente
acuoso no cambia en la superficie del receptor topográficamente.
sólo cambia respecto al cambio topográfico en la superficie, como
consecuencia de una zona receptiva de interacción biológica -
entre grupos complementarios del receptor y la hormona.

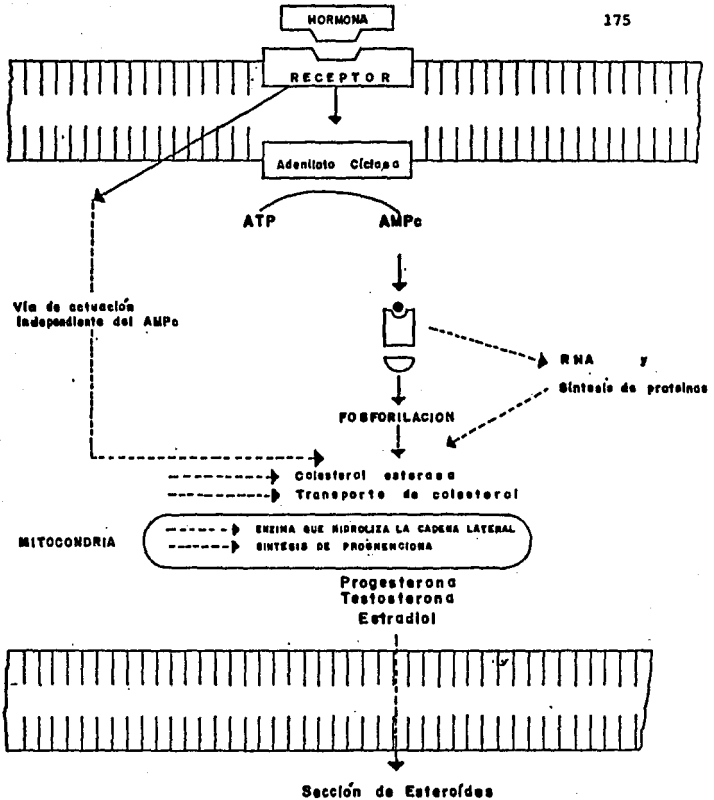


Fig. 16 - Diagramas de las vías involucradas en la regulación de la esteroidogénesis en los tejidos gonadales por la hormona luteinizante.

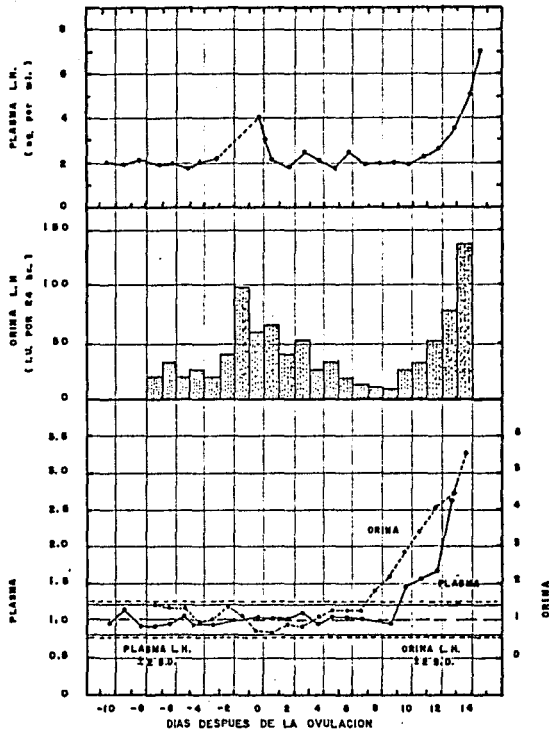


FIG.17 CASO I: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LH Y VALORES POR INDICES DE DISCRIMINACION (HCG/LH) EN MUESTRAS DE PLASMA Y ORINA TOMADAS DE UNA MUJER DIAS ANTES DE LA OVULACION, DENTRO DE UN EMBARAZO NORMAL (186/).

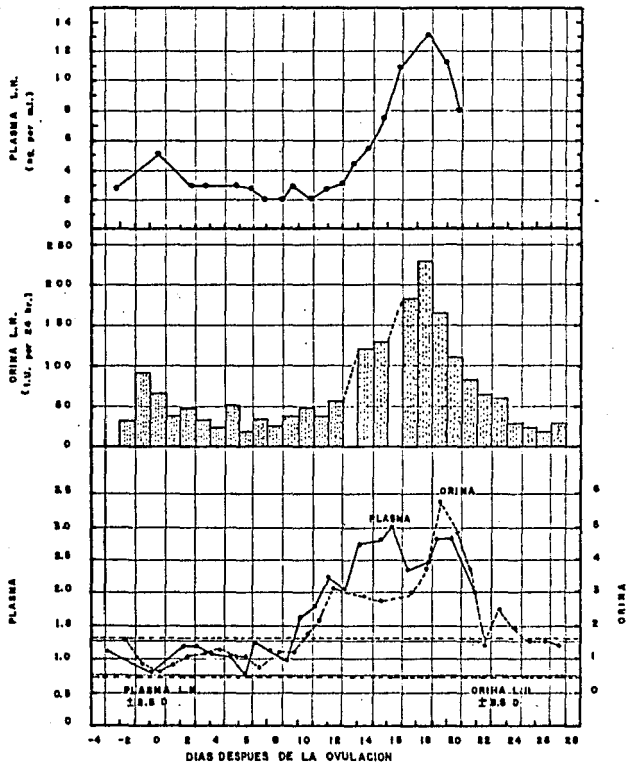


FIG 18 CASO 2: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LH Y VALORES POR EL INDICE DE DISCRIMINACION (HCG/LH) EN MUESTRAS DE PLASMA Y ORINA TOMADAS DIAS ANTES DE LA OVULACION, EN UN EMBARAZO INCOMPLETO, TERMINADO EN ABORTOS ESPONTANEOS. (1986 /)

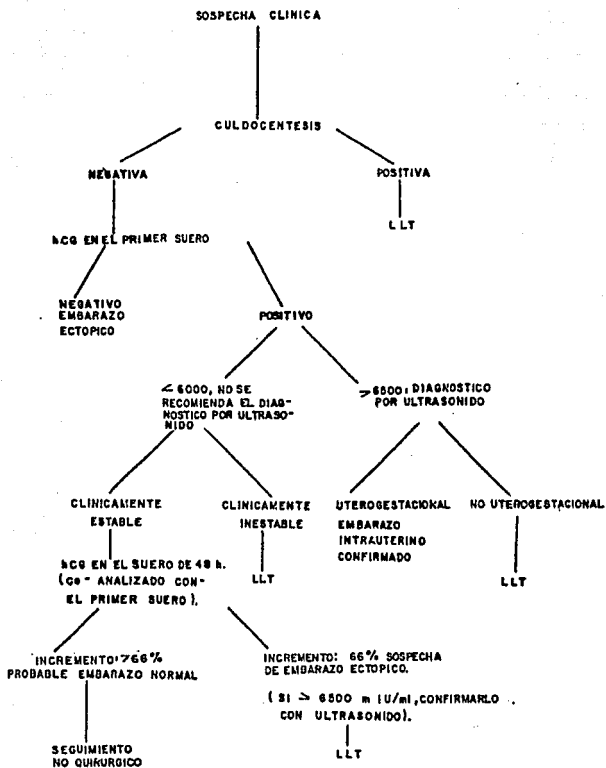


FIG. 19 Uso combinado de un radiomunoensayo sensible y cuantitativo específico para hCG y el ultrasonido en el diagnóstico de embarazos ectópicos.

LLT = Laparoscopia, laparotomía y tuboplastia si este diagnóstico está indicado. (204/).

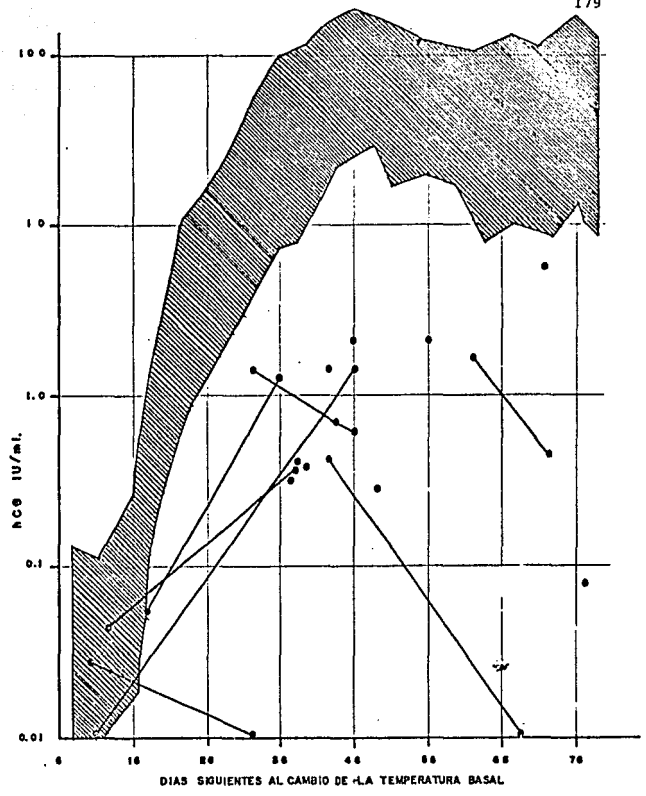


FIG. 20 EMBARAZOS ECTÓPICOS. CADA PUNTO REPRESENTA UNA MUESTRA DE SUERO. LAS MUESTRAS SERIADAS SE ENLAZAN POR LAS LINEAS SÓLIDAS. EL ÁREA SOMBRADA = LÍMITES DE TOLERANCIA 90% DE LA POBLACION NORMAL; CIRCULOS = TROMPAS; CUADRADOS = OVARIOS. (203,207/)

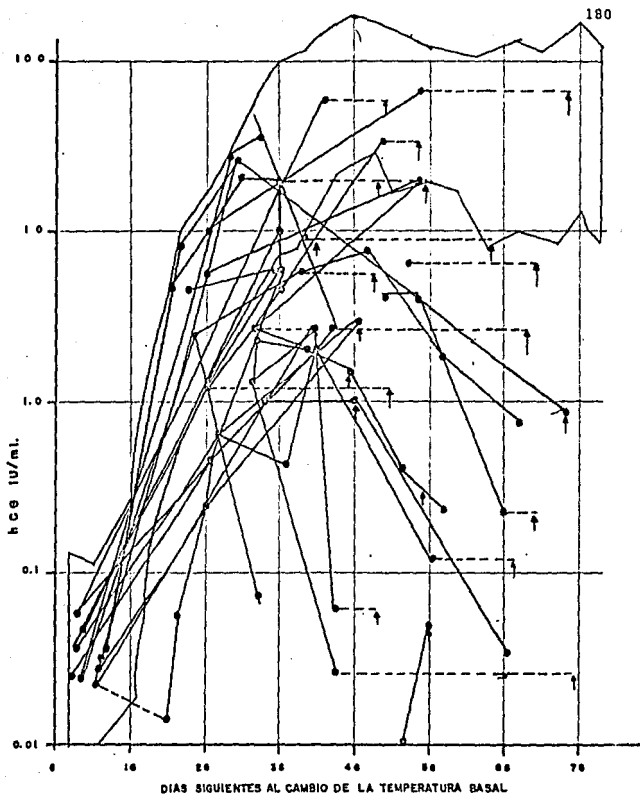


FIG 21 ABORTOS ESPONTÁNEOS DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE. LA LÍNEA SÓLIDA UNE A MUESTRAS DE SUERO DE CADA PACIENTE. LAS LÍNEAS DISCONTINUAS INDICAN EL INTERVALO ENTRE LAS ÚLTIMAS MEDIDAS DE LA HCG EN SUERO Y EL ABORTO (FLECHAS). EL ÁREA SOMBRADA REPRESENTA LOS LÍMITES NORMALES (203/).

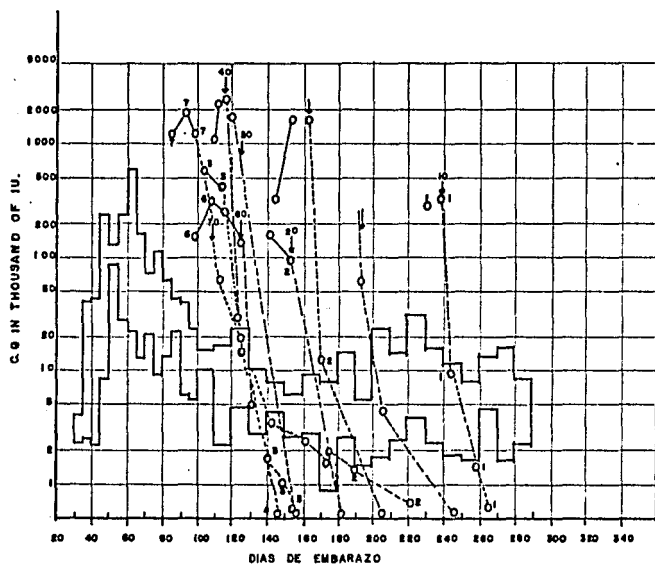


FIG. 22 DIAGNOSTICO DE MOLA HIDATIDIFORME USANDO ENSAYO CUANTITATIVOS DE hCG. EL BLOQUE AL FONDO MUESTRA EL RANGO DE LOS NIVELES DE hCG OBSERVADOS EN 24 EMBARAZOS NORMALES, DETERMINADO POR EL BIOENSAYO DEL PESO UTERINO DE LA RATA. EL DIA DE EMBARAZO ES CONTADO DESDE EL PRIMER DIA DEL ULTIMO PERIODO MENSTRUAL. LAS FLECHAS EN CADA CASO INDICAN EL PARTO DE LA MOLA CON UNA CAIDA POSTERIOR EN LOS NIVELES DE hCG. (219/).

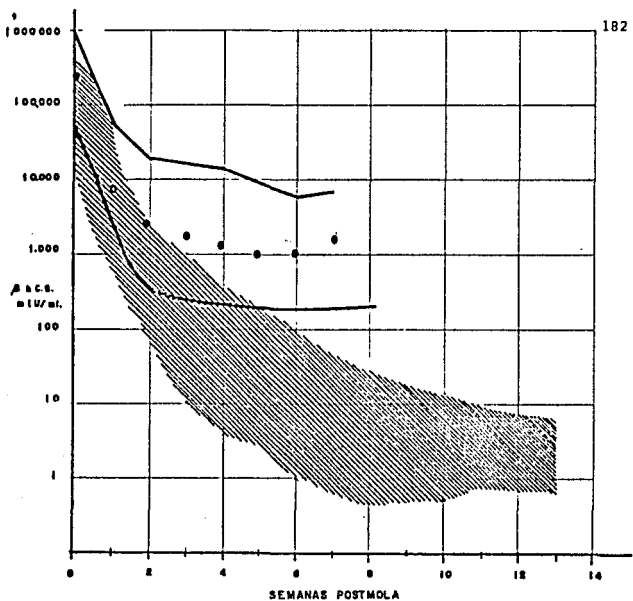


FIG. 23 LA DESVIACION DE LOS NIVELES DE LA hCG EN PACIENTES CON ENFERMEDADES TROFOBLASTICAS GESTACIONAL (30 PACIENTES, PROMEDIO Y LOS LIMITES DE 95% DE CONFIANZA, 49 PACIENTES) 223/.

TABLA I

COMPOSICION QUIMICA DE LAS HORMONAS GONADOTROFICAS			
AMINOACIDO	hLH	hFSH	hCG
Lisina	10	10	10
Histidina	8	4	4
Arginina	13	6	16
Aspartico	16	13	18
Treonina	17	13	17
Serina	15	12	17
Glutámico	20	17	19
Prolina	26	11	25
Glicina	13	10	12
Alanina	11	11	22
Cisteína 1/2	10	13	10
Valina	17	8	17
Metionina	6	6	4
Isoleucina	6	6	6
Leucina	13	10	16
Tirocina	8	7	7
Fenilalanina	8	6	6
Triptofano	-	1	-
AZUCARES NEUTROS	11.3 %	3.9 %	14.0 %
Acetil hexosamina	4.9 %	2.9 %	11.4 %
Acido siálico	2.0 %	1.4 %	10.3 %
Fucosa	-	0.4 %	0.6 %
Referencia	39	40	41

Los residuos de aminoácidos son promedio de los valores de las Tablas VII, IX, X.

TABLA II

COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS
DE HCG Y ICSH OVINO

CARBOHIDRATOS	HCG	ICSH Ovino	
		A ^a	B ^b
	g/100 g	g/100 g	
Hexosa total	11.2	5.0	(6.6 ± 0.1)
Galactosa	5.3 ± 0.3	0.8	
Manosa	5.3 ± 0.3	4.2	
Lactosa	0.6 ± 0.05	1.1	(1.4 ± 0.1)
Total de hexosamina	11.0	7.8	(7.8 ± 0.1)
N-Acetilglucosamina	8.9 ± 0.3	5.6	
N-Acetilgalactosamina	2.2 ± 0.1	2.2	
Acido Siálico	9.0 ± 0.5	0.5	(0.37 ± 0.01)
TOTAL Carbohidratos	31.3	14.4	16.00

a). Weiborg y Ward (43).

b). Papboff et al. (44).

T A B L A I I I

185

ACCION DE GLICOSIDASAS SOBRE LA HCG Y
LA HCG DESIALIZADA

ENZIMA	NUMERO DE AZUCARES LIBERADOS	
	H.C.G.	H.C.G. Desializado
	%	
1- V. Cholerae Neurominidasa.	99	
2- P. Vulgaris B Galactosidasa		76
B-acetilglucosaminidasa		78
A.niger α-mannosidasa		20
3- A.niger α-L-fucosidasa.	95	93
A-niger β-galactosidasa	25	
4- A.niger 1-2 α-L-fucosidasa.		**

a). Bohl (42)

T A B L A I V .

COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS Y AMINOACIDOS DE
GLUCOPEPTIDOS DE HCG DESIALIZADA .

CARBOHIDRATOS / AMINOACIDOS	SIGP ₁	SIIGP ₁
	Residuos a	Residuos a
Lisina	0.20	0.93 (1)
Arginina	0.95 (1)	1.30 (1)
Aspártico	1.00 (1)	1.00 (1)
Treonina	2.95 (3)	1.20 (1)
Serina	0.95 (1)	0.60 (1)
Glutámico	0.95 (1)	1.03 (1)
Prolina	2.80 (3)	1.10 (1)
Glicina	1.70 (2)	0.46
Alanina	1.05 (1)	1.80 (2)
Valina	1.70 (2)	0.93 (1)
Metionina	0.65 (1)	
Isoleucina	1.50 (1)	0.90 (1)
Leucina	0.30	0.91 (1)
Tirosina	0.65 (1)	
Cisteina	2.02 (2)	0.90 (1)
Galactosa	3.7 (4)	3.8 (4)
Manosa	5.2 (5)	5.1 (5)
Fucosa	1.3 (1)	1.1 (1)
N-Acetilglucosamina	6.1 (6)	5.6 (6)
N-Acetilgalactosamina		
Peso Molecular Mínimo ^b	5130	4150
Peso Molecular ^c		4300 + 200
Rendimiento (m Moles)	2.0	4.0
Referencia		Bahl (42)

^aValores calculados en base al residuo de Aspártico por mol del glucopeptido .

^bDe su composición Química.

^cPor Filtración en Gel.

T A B L A V .

COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS Y AMINOACIDOS DE
GLUCOPEPTIDOS DE HCG DESIALIZADA .

CARBOHIDRATOS / AMINOACIDOS .	SIIGP ₂	SIIGP ₃	SIIGP ₁
	Residuos ^a	Residuos ^a	Residuos ^a
Lisina	0.35	0.10	0.40
Histidina	0.80 (1)	0.55 (1)	1.00 (1)
Aspártico	1.00 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)
Treonina	1.30 (1)	1.50 (2)	1.10 (1)
Serina	1.10 (1)	1.50 (2)	1.70 (2)
Glutámico	1.04 (1)	1.06 (1)	1.40 (1)
Prolina	0.80 (1)	0.30	0.90 (1)
Glicina	0.45		0.90 (1)
Alanina	1.02 (1)	0.99 (1)	1.40 (1)
Valina	1.90 (2)	1.50 (2)	1.60 (2)
Leucina			0.80 (1)
Tirosina		0.30	0.80 (1)
Cisteína	0.90 (1)	0.91 (1)	1.20 (1)
Galactosa	1.9 (2)	2.1 (2)	4.0 (4)
Manosa	4.9 (5)	5.4 (5)	5.1 (5)
Fucosa			0.2
N-Acetilglucosamina	5.1 (5)	4.9 (5)	5.4 (5)
N-Acetilgalactosamina			0.7 (1)
Peso molecular mínimo ^b	3250	3340	4190
Peso molecular ^c		3300 ± 200	
Rendimiento (m moles)	2.2	4.4	2.4
Referencia		Bahl (42) .	

^aValores calculados en base a 1 residuo de Aspártico por mol del glucopeptido .

^bDe su composición química.

^cPor filtración en Gel.

T A B L A V I .
SECUENCIA DE MONOSACARIDOS EN GLUCOPEPTIDOS
SIIGP₁ Y SIIGP₃ .

E N Z I M A		SIIGP ₁	SIIGP ₃
		Residuos	Residuos
1.	-Galactosidasa	3.0	2.1
	-Acetilglucosaminidasa	4.0	3.8
	-Manosidasa	4.1	4.9
2.	-Acetilglucosaminidasa	0.9	1.7
	-Galactosidasa	3.1	1.9
	-Acetilglucosaminidasa	3.2	2.1
	-Manosidasa	4.0	4.8
	-L-Fecosidasa	1.0	
	-Galactosidasa	0.3	
3.	-Manosidasa		
	Referencia	Bahl (42).	

T A B L A V I I .

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

HUMANA * . .

AMINOACIDO	1963	1967	1968	1970	1971		1972
Lisina	10	10	10	10	10	10	10
Histidina	5	5	6	9	6	6	6
Arginina	9	10	14	13	16	16	16
Aspártico	12	13	14	18	15	16	17
Treonina	15	15	15	22	15	19	16
Serina	13	15	14	17	12	18	16
Glumático	16	18	19	21	22	24	22
Prolina	16	23	23	29	27	25	33
Glicina	11	13	14	14	7	16	16
Alanina	9	11	11	12	8	17	16
Cisteína $\frac{1}{2}$	9	8	20	16	12	22	19
Valina	13	15	18	16	13	22	22
Metionina	4	4	5	7	9	5	4
Isoleucina	5	6	6	9	12	8	9
Leucina	15	13	14	10	12	16	14
Tirosina	9	4	6	9	12	7	7
Fenilalanina	14	6	7	9	9	7	5
Triptófano	N.A.	N.A.	N.A.	1	N.A.	N.A.	N.A.
Referencia	47	39	59	60	61	48	62

* VALORES CALCULADOS EN BASE A 10 RESIDUOS DE LISINA.
N.A. NO ANALIZADO.

T A B L A V I I I .

COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS Y AMINOACIDOS
DE LA HCG .

AMINOACIDOS/ CARBOHIDRATOS	RESIDUOS DE HIDRO LISIS 24 HR.	RESIDUOS DE HIDRO LISIS 64 HR.	RESIDUOS DE HIDRO LISIS 96 HR.	NO. DE RESIDUOS AMINOACIDOS ^a Y CARBOHIDRATOS ^b
Lisina	6.95	7.30	7.30	7
Histidina	3.00	3.00	3.00	3
Arginina	10.66	10.97	10.72	11
Aspártico	12.10	12.35	11.68	12 ^c
Treonina	11.71	11.08	10.70	12 ^c
Serina	13.40	11.55	10.45	16 ^c
Glutámico	12.66	13.15	13.06	13
Prolina	19.70	20.03	20.03	20
Glicina	8.70	8.68	8.70	9
Alanina	8.70	8.86	8.70	9
Cisteína	13.89	13.49	12.90	14 ^c
Valina	11.90	13.13	2.33	13 ^d
Metionina	2.70	2.79	3.96	3 ^c
Isoleucina	3.90	4.04	10.40	4
Leucina	10.30	10.50	4.20	10
Tirosina	4.34	4.40	3.96	4
Fenilalanina	3.98	4.08		4
Triptofano				4 ^e
Galactosa				1 ^f
Manosa				9 ^f (5.3±0.3%)
Fucosa				9 ^f (5.3±0.3%)
N-Acetilglucosamina.				1 (0.6±0.05%)
N-Acetilgalactosamina.				11 (8.9±0.03%)
Acido Sialico.				3 (2.1±0.01%)
Referencia.		Bahl	(42)	8 (9.0±0.3%).

- c. Valores extrapolados a tiempos cero; el valor promedio de cisteína fué determinado independientemente del ácido cítrico.
- d. Valores calculados en 96 hr., de hidrólisis.
- e. Valores "espectrofotométricamente" y por hidrólisis alcalina.
- f. Valores por ciento incluye hidrólisis de agua.

T A B L A I X

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL
FOLICULO HUMANA * .

AMINOACIDOS	1967	1968		1969	1971	1974		1976
Lisina	10	10	10	10	10	10	10	10
Histidina	3	5	5	4	4	4	4	4
Arginina	4	7	7	6	7	7	5	7
Aspártico	13	15	12	16	11	13	14	12
Treonina	6	13	16	15	15	14	19	8
Serina	7	13	12	7	13	12	15	17
Glutámico	10	19	16	22	17	16	16	17
Prolina	7	12	10	10	11	12	13	10
Glicina	9	13	9	10	7	8	17	8
Alanina	10	12	9	9	9	9	18	9
Cisteína	8	12	11	14	11	10	18	18
Valina	1	2	2	2	15	14	13	12
Metionina	7	5	16	5	9	3	3	3
Isoleucina	3	5	6	6	3	8	7	5
Leucina	10	12	7	10	11	10	10	10
Tirosina	4	3	8	7	8	10	7	8
Fenilalanina	5	7	6	7	6	6	5	6
Triptófano	1	N.D	3	N.D	1	N.D	1	N.D
Referencia	40	63	64	65	66	67	96	68

* VALORES CALCULADOS EN BASE A 10 RESIDUOS DE LISINA .
N.D. NO DETECTABLE.

T A B L A X

192

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA HORMONA CORIONICA

GONADOTROFICA HUMANA*

AMINOACIDOS	1968	1969		1970		1971
Lisina	10	10	10	10	10	10
Histidina	5	4	4	4	5	4
Arginina	15	15	15	16	19	15
Aspártico	18	17	19	19	16	18
Treonina	18	17	17	17	16	19
Serina	19	22	19	21	14	20
Glutámico	18	18	20	17	19	18
Prolina	27	28	29	21	21	27
Glicina	14	12	14	12	6	13
Alanina	14	12	13	13	7	13
Cisteina 1/2	14	20	18	20	16	22
Valina	18	18	17	17	13	19
Metionina	43	4	2	3	4	4
Isoleucina	6	5	6	6	5	6
Leucina	15	15	16	15	13	15
Tirosina	8	6	6	6	6	6
Fenilalanina	7	5	6	7	7	6
Triptófano	-	-	-	-	-	1
Referencia	69	41	41	70	71	49

*Valores calculados en base a 10 residuos de Lisina

T A B L A **XI**

193

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS SUBUNIDADES DE LA LH A
FSH y HCG.

AMINOACIDOS	LH A		FSH		HCG	
	b	B	a	B	a	B
Lisina	5.3	3.9	5.6	6.5	7.8	3.5
Histidina	3.5	3.6	3.2	1.6	3.9	1.1
Arginina	5.3	8.0	4.0	3.0	4.2	10.7
Aspártico	6.1	6.6	6.7	6.7	7.5	2.7
Treonina	7.2	5.6	6.3	7.0	6.0	6.6
Serina	5.4	5.3	5.1	4.2	7.2	7.8
Glutámico	10.3	8.3	11.4	11.2	12.7	8.9
Prolina	6.2	14.7	7.4	10.3	6.9	13.8
Glicina	2.7	2.8	3.4	2.2	2.5	3.3
Alanina	3.6	4.1	4.8	4.6	3.3	3.9
Cisteína	6.2	5.6	5.1	12.0	9.4	7.4
Metionina	2.2	2.1	6.4	1.3	3.0	0.4
Isoleucina	4.9	5.2	3.6	4.1	0.9	2.9
Leucina	5.0	6.4	4.8	5.1	4.0	8.4
Tirosina	6.0	3.3	1.7	4.3	5.9	3.0
Fenilalanina	5.5	4.5	5.4	4.0	5.5	2.2

Comparación de las subunidades a y B de la LH A, FSH y HCG 667 g/100 g de proteína.

T A B L A X I I

MÉTODOS BIOLÓGICOS

<u>A N I M A L</u>	<u>S E X O</u>	<u>R E S P U E S T A</u>
Ratón	Hembra	Cuerpo Amarillo.
Rata	Hembra	Hiperemia Ovárica.
Conejo	Hembra	Cuerpo Amarillo.
Xenopus Laevis	Hembra	Ovulación
Rana pipiens	Macho	Espermación.
Rana esculenta	Macho	Espermación
Bufo americanus	Macho	Espermación
Rana moctezumae	Macho	Espermación
Bufo marinus	Macho	Espermación.
Bufo dufo	Macho	Espermación
Bufo arenarum	Macho	Espermación.
Bufo viridis	Macho	Espermación.
Bufo melanostictus	Macho	Espermación
Pez de la China		Dilatación de los melanocitos de - las escamas.

Ref. (16) Hellman. (pág. 246).

T A B L A X I I I

1. Pruebas en portaobjetos de inhibición de la aglutinación del látex.

NOMBRE	FUENTE	NIVELES MINIMOS DETECTABLES DE hCG/ - LITRO DE ORINA.
Test hCG	Labs. Hyland	2,000 - 8,000
Gravindex	Ortho Diagnostics	3,500
Porta objetos		
Pregnostic.	Organon Inc.	1,000 - 2,000

2. Prueba de inhibición de la hemaglutinación en tubo .

NOMBRE	FUENTE	NIVELES MINIMOS DETECTABLES DE hCG/ - LITRO DE ORINA.
UCG	Labs. Wampole	1,000
Tubo Pregnosticon.	Organon Inc.	700 - 750
Accusphotes		
Pregnosticon	Organon Inc.	750 - 1,000

3. Prueba directa en portaobjetos de la aglutinación del látex.

NOMBRE	FUENTE	NIVELES MINIMOS DETECTABLES DE hCG/ - LITRO DE ORINA.
DAP.	Labs. Wampole.	

T A B L A X I V .

PROCEDIMIENTOS CUALITATIVOS PARA LA DETECCION DE hCG .

P R U E B A	S E N S I B I L I D A D .
	EN IU/L .
PRUEBA EN TUBO.	
Biocept-G(Radioreceptorassay, Wampole Labs)	200*
Sensitex (Roche Labs).	250
UCG-Test (Wampole Labs).	500
Accusphere (Organon, Inc.).	750
Pregnostic (Organon, Inc.).	750
Pregnosis Placentex (Roche Labs).	1 000
UCG-Lyphotest (Wampole Labs).	1 250
E.P.T. (Warner-Chilcott Labs).	1 250
SLIDE TEST.	
Dri-Dot (organon, Inc.).	1 500
Pregnosis (Roche Labs).	1 500

T A B L A X I V .

PROCEDIMIENTOS CUALITATIVOS PARA LA DETECCION DE hCG .

P R U E B A	S E N S I B I L I D A D . EN IU/L .
Pregnosticon (Organon, Inc.).	1 500
UCG (Wampole Labs).	2 000
Gravindex (Ortho Pharmaceutical Corp).	3 500

* Puede también ser usada como una Prueba Semicuantitativa.

T A B L A X V

**APLICACIONES CLINICAS DE RADIOINMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS, SENSIBLE Y
ESPECIFICO PARA hCG Y SUBUNIDAD .**

CONDICION CLINICA	hCG RIA.	a - SUBUNIT RIA.
Diagnóstico de Embarazo Molar y Enf. Trofoblasticas Malignas.	Si	Si
Seguido de Coriocarcinoma Gestacional.	Si	Si
Postevacuación seguida de Mola Hidatidiforme.	Si	Si
Diagnóstico Embarazo Ectopico.	Si	Posiblemente .
Amenaza de Aborto.	Si	Si
Clasificación de Células Germinales no Seminomatosas de Tumor Testicular.	Si	No conocido .
Detección de Embarazo	Si	No
Tumor Marcado de Canceres no Trofo - blasticos.	Posiblemente.	Posiblemente.
Diagnóstico de Gestación Múltiple.	Posiblemente.	Posiblemente.

T A B L A X V

**APLICACIONES CLINICAS DE RADIOINMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS, SENSIBLES Y
ESPECIFICA PARA hCG Y SUBUNIDAD .**

CONDICION CLINICA	hCG RIA.	a - SUBUNIT RIA.
Embarazo de Diabetico	No	Posiblemente.
Diagnóstico de Tetardación de Cre- cimiento Fetal.	No	Posiblemente.

T A B L A X V I

INCIDENCIA DE hCG INMUNOREACTIVA EN SUERO DE PACIENTES

CON CANCER .

T U M O R	NO. EXAMINADO	NO. POSITIVO	PORCENTAJE
Ginecológicos	870	302	35
Ovario (Epitelial)	178	77	43
Cuello Uterino	504	183	36
Vagina	6	2	33
Endometrio	167	38	23
Vulva	15	2	13
Prostata	74	7	10
Mama	607	167	25
Gastrointestinal	703	131	19
Pancreas	60	23	38
Estomago	199	38	19
Hígado	243	41	17

T A B L A X V I
INCIDENCIA DE hCG INMUNOREACTIVA EN SUERO DE PACIENTES
CON CANCER .

T U M O R	NO. EXAMINADO	NO. POSITIVO	PORCENTAJE .
Recto	138	21	15
Estomago	31	4	13
Intestino Delgado	23	3	13
Tracto Biliar	9	1	11
Melanoma	210	40	19
Pulmón	929	140	15
Sarcoma	51	7	14
Renal	126	7	6
Hematopoiético	661	34	5
Mieloma Múltiple	116	11	10
Leucemia	262	12	5
Linfoma			
T O T A L	4291	835	19.5

BIBLIOGRAFÍA

1. Meadows, D.H., Meadows, D., Randers, J.; Behrens, W. W.: Los límites del crecimiento. 2a. reimp. Fondo de - Cultura Económica. México, 1975. Pág. 328, 426, 475.
2. Chávez, J.; Fernández, B.: Revisar las leyes antes de legalizar el aborto. Novedades 2 junio de 1978.
3. Bernard, C.: Lecons de physiologie experimentalle. Parfas, 1854. Citado por Marenzi, A. Hormonas. El ateneo. Argentina, 1957. Pág. 96.
4. Bayliss, W.M. Starling. E.H.: The mechanism of pancreatic secretion. J. Physiol. 28:325-353, 1902.
5. Ham, A.W.: Tratado de histología. Septima Edición. Interamericana, México, 1977. Pág. 729 .
6. Smith, P.E.: Hastening development of female genital system by daily homoplastic pituitary transplants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 24:131-132, 1926 .
7. Zondek, B.Z. Geburst y Gynak. 90:372, 1926 . Citado por Marenzi, A. Hormonas. El ateneo. Argentina, 1957 .

8. Aschheim, S. y Zondek, B. *Lin Wochschr.* 6:1322, 1927.
Citado por Marenzi, A. *Hormonas.* El ateneo. Argentina, 1957.
9. Gurin, S., Bachman, C.; Wilson, D.W. The gonadotropic hormone of urine of pregnancy. I. A simple method of - extraction and purification. *J. Biol. Chem.* 128:525 - 536, 1939 .
10. Katzman, P.A., Godfrid, M., Chain, C. K.; Doisy, E.A.: The preparation of chorionic gonadotropin by chromatographic adsorption. *J. Biol. Chem.* 148: 501-507, 1943 .
11. Bell, J.J., Canfield, R. E., J.J., Sciarra: purification and characterization of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.*84:298-307, 1969.
12. Papkoff, H., Sairam. M.R.: Li. C.H.: Aminoacid sequence of the subunits of ovine pituitary interstitial - cell-stimulating hormone. *J. AM. Che. Soc.* 93: 1531 - 1532, 1971..

13. Liu, W.K., Nahm, H.S.; Sweeney, C.M; Lanakin, W.M.; Baker H.N.; Ward, D.N: The primary amino acid sequence of the ovine luteinizing hormone. I. The amino acid sequence of the reduced and S-amino ethylated S-subunit (LH-6 $\frac{1}{2}$). J. Biol. Chem. 247:4351-4364, 1972.
14. Bahl, O.O., Carlsen, R.B.: Ballisario R.; Swaminathan N.: Human chorionic gonadotropin: amino acid sequence of the alpha and beta subunits. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48:416-422, 1972.
15. Morgan, F.J., Birken, S.; Canfield R.E.: The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit and beta subunit. J. Biol. Chem. 250:5247 - 5258, 1975.
16. Hellman, L.M., Pritchard, J.A.; Wynn, M.R.: Obstetricia. 6a. reimp. Salvat Editores, Barcelona, 1978, Págs. 151-152.
17. Wilson, E.A., Jawad, M.J.: Stimulation of human chorionic gonadotropin secretion by glucocorticoids. Am. J. Obstet. Gynecol. 142: 344-349, 1982.

18. Langman, J.: Embriología médica. 3a. Edición. Intera -
mericana. México, 1974. Pág. 18-33.
19. Mc Gregor, W.G., Kuhn, R.W.; Jeffe, R.B.: Biologically
active chorionic gonadotropin: synthesis by the human
retus. Science.220: 306-308, 1983.
20. Gey, G.O., Jones, G.B.S., Hellman, J.M: The production
of a gonadotrophin substance (prolan) by placental
cells in tissue culture. Science.88:306-311, 1938.
21. Wislocki, G.B.; Bennett, H.S.: The histology and anto-
logy of the human and monkey placenta with special re-
ference to the trophoblast. Amer. J. Anat.73: 335-342,
1943.
22. Thiede, H.A.; Choate, J.W.: Chorionic gonadotropin lo-
calization in the human placenta by immunofluorescent
staining. II. Demonstration of HCG in the trophoblast
and amnion epithelium of immature and mature placentas.
Obstet. Gynecol. 22: 433-443, 1963.
23. Dreskin, R.B., Spicer, S.S., Greene, W.B.: Ultrastruc-
tural localization of chorionic gonadotropin in human
term placenta. J. Histochem.Cytochem.18: 862, 1970.

24. Dean, J.D., Weintraub, B.D.; Rosen, S.W.: De Novo synthesis and secretion of heterogeneous forms of human chorionic gonadotropin and its free α -subunit in the human choriocarcinoma clonal cell line JEG-3. Endocrinology. 106: 849-858, 1980.
25. Jones-Brown, Y.R., Wu, C.Y., Weintraub, B.D.; Rosen, S.W.: Synthesis of chorionic gonadotropin subunits in human choriocarcinoma clonal cell line JEG-3: Carbohydrate differences in glycopeptides from free and combined α -subunits. Endocrinology. 115: 1439-1445, - 1984.
26. Vaitukaitis, J.L.: Changing placental concentrations of human chorionic gonadotropin and its subunits during gestation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38: 755-760, - 1974.
27. Chou, J.Y.: Effects of adenosine cyclic nucleotides - on the synthesis of human chorionic gonadotropin in - transformed human placental cells. Cancer. Res. 40: - 4025-4030, 1980 .
28. Hussa, R.O., Story, M.T.; Pattilla, R.A.: Cyclic adenosine monophosphate stimulates secretion of human cho-

- rionic gonadotropina and estrogens by human tropho -
blast in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38: 338 -
374, 1974.
29. Bradbury, J.T., Brown, W.E., Gray, L.A.: Maintenance
of the corpus luteum and physiologic actions of pro
gesterone. Recent.Prog. Horm. Res. 5: 51-59, 1950.
 30. Yoshimi, T., Stoff, C.A., Marshall, J.R., Lipsett, M.
B.: Corpus luteum function in early pregnancy. J. Clin.
Endocrinol. Metab. 24: 225-232, 1969.
 31. Adcock, E.W., Teasdale, F.A., Cox, S., Meschia, G., -
Battaglia, F.C., Naughton, M.A.: Human chorionic gona
dotropin: Its possible role in maternal lymphocyte -
suppression. Science. 181: 845-847, 1973.
 32. Barnes, E.W., Loudon, N.B., Mac Cuish, A.C., Jordan,
J.: Irvine, W.J., Phytohaemagglutinin-induced lymphocy
te transformation and circulating autoantibodies in -
women taking oral contraceptives. Lancet. 1: 898-900,
1974.
 33. Lauritzen, C., Lehman, W.D.: Leveles of chorionic gona
dotrophin in the newborn infant and their relation -
ship to adrenal dehydroepiandrosterone. Acta.Endocinol.
(Copenh) (suppl) 100: 112-117, 1965.

34. Vaitukaitis, J.L. Human chorionic gonadotropin. En F. Fritz y A. Klopper (Ed) Endocrinology of pregnancy. 2a. Edición. Harper & Row, Hagerstown, 1976, pp. 64. - 74.
35. Wide L., Porath, J.: Radioinmunoassay of proteins - with the use of sephadex-coupled antibodies. Biochim. Biophys. Acta. 180: 257-264, 1966.
36. Loraine, J.A.: The renal clearance of chorionic gonadotrophin in normal and pathologic pregnancy, Q.J. - Exp. Physiol. 36: 11-17, 1950.
37. Murphy, D.E.P., D'Aux, R.C.D.: Steroid levels in the human fetus: Cortisol and cortisone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 35: 678-684, 1972.
38. Harrison, R.W., Yeakley, J.M.: Fant, M.E.: Glucocorticoid binding to solubilized components of human placental trophoblast membranes, Life. Sci. 26: 2173 - 2182, 1980.
39. Kathan, R.H., Reichert, L.E. Jr.; Ryan, R.J.: Comparison of the carbohydrate and aminoacid composition - of bovine, ovine and human luteinizing hormone. Endocrinology. 81: 45-48, 1967.

40. PapKoff, H., Mahlmann, L; C.H. Li.: Some chemical and physical properties of human pituitary follicle-stimulating hormone. *Biochemistry*. 6: 3976-3982, 1967.
41. Bahl, O.O.: Human chorionic gonadotropin. I Purification and physicochemical properties, *J. Biol. Chem.* 244: 567-574, 1969.
42. Bahl, O.R.: Human chorionic gonadotropin. II Nature of the carbohydrate units. *J. Biol. Chem.* 244: 575 - 583, 1969.
43. Walborg, E.F., Jr.; Ward, D.N.: The carbohydrate components of ovine luteinizing hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* 78: 304-312, 1963.
44. PapKoff, H., Gospodarowicz, D., candiotti, A.; Li, C. H.: Preparation of ovine interstitial cell-stimulating hormone in high yield. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 431-438, 1965.
45. Hirs, C.H., Moore, S.W.; Stein, W.H.; Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic acid oxidized ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 219: 623-642, 1956.

46. Hamashige, S.; Arquilla, E.R.: Immunologic and biologic study of human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Invest.* 43: 1163-1174, 1964.
47. Li, C.H.: Human pituitary interstitial cell-stimulating hormone. *Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 12: 181-187, 1963.
48. Hartree, A.S., Thomas, M., Braikevitch, M., Bell, E.T., Cristie, D.W., Spaul, G.V., Taylor, R.; Pierce, C.J.: Preparation and properties of subunits of human luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* 51: 169-180, 1971.
49. Morgan, E.; Canfield, R.E.: Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 88: 1045-1053, 1971.
50. Closset, J.; Hennen, G.: Human luteinizing hormone. The amino acid sequence of the B-subunit. *FEBS. Lett.* 29: 97-100, 1973.
51. Ashitaka, Y., Tokura, Y., Tane, M., Mochizuki, M.; Tojo, S.: studies on the biochemical properties of highly purified HCG. *Endocrinology.* 87: 233-244, 1970.

52. Bellisario, R., Carlsen, R.B.; Bahl, O.O.: Human chorionic gonadotropin: Linear amino acid sequence of the α -subunit. J. Biol. Chem. 248: 6796-6809, 1973.
53. Carlsen, R.B., Bahl, O.O.; Swainathan, N.: Human chorionic gonadotropin: Linear amino acid sequence of the α -subunit. J. Biol. Chem. 248: 6810-6827, 1973.
54. Ward, D.N., Reichert, L.E., Liu, W.K., Nahm, H.S., Hsia, J., Lamkin, W.M.; Jones, N.S.: Chemical studies of luteinizing hormone from human and ovine pituitaries. Recent. Prog. Horm. Res. 29: 533-561, 1973.
55. Shome, B.; Parlow, A.F.: The primary structure of the hormone specific, beta subunit of human luteinizing hormone (hLH). J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 618-621, 1973.
56. Sairam, M.R.; Li, C.H.: Inter. Res. Comm. Syst., Biochem. Hormones (73-II), 3 - 5 - 17, Nov. citada en Bishop, W.H., Nureddin, A.; Ryan, R.J.: Pituitary luteinizing and follicle-stimulating hormones. In: Peptide hormones, Parsons, J.A., ed. pags. 273-299. University Park Press, Ltd, London; 1976.

57. Birken, S.; Canfield, R.E.: Isolation and aminoacid sequence of COOH-terminal fragments from the B subunit of human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.* 252: 5386-5392, 1977.
58. Keutmann, H.T.; William, R.M.: Human chorionic gonadotropin. Aminoacid sequence of the hormone-specific COOH-terminal region. *J. Biol. Chem.* 252: 5393-5397, 1977.
59. Shome, B., Brown, D.M. Howard, S.M.; Pierce, S.G.: Bovine, human and porcine thyrotropins: Molecular weights, amino-carboxylterminal studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 456-468, 1968.
60. Rathman, P.; Saxena, B.B.: Isolation and physicochemical characterization of luteinizing hormone from human pituitary glands. *J. Biol. Chem.* 245: 3725-3731, 1970.
61. Rathman, P.; Saxena, B.B.: Subunits of luteinizing hormone from human pituitary glands. *J. Biol. Chem.* 246: 7087-7094, 1971.

62. Closset, J., Hennen, G.; Lequin, R.: Isolation and properties of human luteinizing hormone in subunit. FEBS. Lett . . . 21: 325-329, 1972.
63. Reichert, L.E. Kathan, R.H.; Ryan, R.J.: Studies on the composition and properties of immunochemical grade human pituitary follicle-stimulating hormone. Endocrinology. 82: 109-114, 1968.
64. Ross, P.: Human follicle-stimulating hormone. Its isolation from the pituitary gland and from postmenopausal urine and a study of some chemical, physical immunological, and biological properties of the hormone from these two sources. Acta Endocrinol. (Copenh). 59 suppl. 131: 3-93, 1968.
65. Baker, S.A., Gray, C.J.; Butt, W.R.: Evaluation of human follicle-stimulating hormone preparations. J. Endocrinol. 45: 275-285, 1969.
66. Sasena, B.B.; Rathnam, P.: Dissociation phenomenon and subunit nature of follicle stimulating hormone from human pituitary glands. J. Biol. Chem. 246: 3539-3554, 1971.

67. Reichert, L.; Ward, D.N.: On the isolation and characterization of the alpha and beta subunits of human pituitary follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 94: 655-644, 1974.
68. Rathman, P.; Saxena, B.B.; Primary amino acid sequence of follicle stimulating hormone in human pituitary glands α -subunit. *J. Biol. Chem.* 250: 6735-6746, 1975.
69. Goverde, B.C., Veenkamp, F. J. N.; Homan, J. D. H.: Studies on human chorionic gonadotrophin. II. Chemical composition and its relation to biological activity. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 59: 105-119, 1968.
70. Mori, K.F.: Antigenic structure of human gonadotropins: Importance of protein moiety to the antigenic structure of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 86: 97-106, 1970.
71. Swaminathan, N.; Bahl, O.P.: Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 422-427, 1970.

72. Sairam, M.R., Papkoff, H.; Li, C.H.: Human pituitary interstitial cell stimulating hormone: primary structure of the alfa-subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 530-537, 1972.
73. Browne, J. S. L.; Venning, E. M.: Excretion of gonadotropic substances in urine during pregnancy. *Lancet.* 2: 1507-1511, 1936.
74. Claesson, L., Hogberg, B., Rosenberg, T.; Westman, A.: Crystalline human chorionic gonadotrophin and its biological action. *Acta. Endocrinol. (Copenh)* 1: 1-5, 1948.
75. Donini, S., D' Alessio, I.; Donini, P.: Subunits of human chorionic gonadotrophin: Immunological and biological studies. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*. 79: 749, 766, 1975.
76. Van Hall, E.V., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Hickman, J. W.; Aswell, G.: Immunological and biological activity of HCG following progressive desialylation. *Endocrinology.* 88: 456-464, 1971.

77. Braunstein, G.D., Reichert, L.E., Van Hall, E. V., Vaitukaitis, J.L.; Ross, G.T.: The effects of desialylation on the biologic and immunologic activity of human pituitary luteinizing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:962-967, 1971.
78. Vaitukaitis, J.L.; Ross, G.T.: Altered biologic and immunologic activities of progressively desialylated human urinary FSH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:308-311, 1971.
79. Shome, B., Liao, T. H., Howard, S. M.; Pierce, J.G.: The primary structure of bovine thyrotropin. *J. Biol. Chem.* 246:833-849, 1971.
80. Bahl, O. P., Carlsen, R., Bellisario, R.; Swaminathan, N.: Biologically active hormones prepared by recombination of the α chain of human chorionic gonadotropin and the hormone-specific chain of bovine thyrotropin or of bovine luteinizing hormone. *J. Biol. Chem.* 246:2321-2324, 1971.
81. Mori, K.F.: Antigenic structure of human gonadotropins: pituitary luteinizing hormone. *J. Endocrinol. (Copenh)* 46: 517-525, 1970.

82. Vaitukaitis, J. L., Hammond, J., Ross, G., Hickman, J.; Ashwell, G.: A new method of labeling human chorionic gonadotropin for physiologic studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32:290-293, 1971a.
83. Vaitukaitis, J. L., Robbins, J.B., Nieschlag, E.; Ross, G.T.: A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:988-991, 1971b.
84. Vaitukaitis, J.L., Sherins, R., Ross, G.T., Hickman, J.; Ashwell, G.: A method for the preparation of radioactive FSH with preservation of biologic activity. *Endocrinology.* 89:1356-1360, 1971c.
85. Means, A.R.; Vaitukaitis, J. L.: Peptide hormone "receptors": Specific binding of H-FSH to testis. *Endocrinology.* 90:39-46, 1972.
86. Braunstein, G.D., Vaitukaitis, J. L. ; Ross, G.T.: The in vivo behavior of human chorionic gonadotropin after dissociation into subunits. *Endocrinology.* 91:1030 - 1036, 1972.
87. Aloj, S.M., Edelhoeh, H., Ingham, K.C., Morgan, F. J., Canfield, R.E.; Ross, G.T.: The rates of dissociation and reassociation of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 497-504, 1973.

88. Canfield, R.E., Morgan, F.J., Kammermann, S. Bell, J. J.; Agosto, G.M.: Studies of Human chorionic gonadotropin. Recent. prog. Horm. Res. 27:121-164, 1971 b.
89. Wide, L., Ross, P.; Gemzell, C.A.: Immunological determination of human pituitary luteinizing hormone - (LH). Acta. Endocrinol. (Copenh). 37:445-449, 1961.
90. Schlaff, S., Rosen, S.W.; Roth, J.: Antibody to human follicle stimulating hormone: cross-reactivity with - three other hormones. J. Clin. Invest. 47:1722-1729, 1968.
91. Odell, W.D., Abraham, G., Randar, H. R., Swerdloff, R.S.; Fisher, D.A.: Influence of immunization procedures on the titer, affinity and specificity of antisera to glycopolypeptides. Acta. Endocrinol. (Copenh). 63 suppl. 142:54-76, 1969.
92. Vaitukaitis, J.L.; Ross, G.T.: Subunits of human glycoprotein hormones, Their immunological and biological behavior. Isr. J. Med. Sci. 10: 1280-1287, 1974.

93. Vaitukaitis, J.L., Braunstein, G.D.; Ross, G.T.: A - radioimmunoassay which specifically measures human - chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. Am. J. Obstet. Gynecol. 113:751-758, 1972 a.
94. Pierce, J. E.: Eli Lilly lecture: The subunits of pituitary tyrotropin-their relationship to other glycoprotein hormones. Endocrinology. 89:1331-1334, 1971.
95. Shome, B.; Parlow, A.F.: Human follicle stimulating - hormone (hFSH): first proposal for the amino acid - sequence of the alpha-subunit (hFSHa) and first demonstration of its identity with the alpha-subunit of human luteinizing hormone (hLHa). J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 199-202, 1972 a .
96. Shome, B.; Parlow, A.F.: Human follicle stimulating - hormone: first proposal for the amino acid sequence of the hormone-specific, beta-subunit (hFSHb). J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:203-205, 1974 b.

97. Pierce, J.G., Liao, T.H., Howard, S.M., Shome, B.; -
Cornell, I.S.: Studies on the structure of thyrotro -
pin: its relationship to luteinizing hormone. *Recent.*
Prog. Horm. Res. 27:165-212, 1971 a.
98. Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Reichert, L. E. Jr.; -
Ward, D.N.: Immunologic basis for within and between
species cross reactivity of luteinizing hormone. *Endo-*
crinology. 91:1337-1342, 1972 b.
99. Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Cornell, J.S.; Reichert,
L.E.: Generation of specific antisera with the hormo -
ne-specific beta-subunit of hTSH or hFSH. *J. Clin. -*
Endocrinol. Metab. 37:653-659, 1973 a.
100. Nisula, B.C., Kohler, P.O., Vaitukaitis, J.L. Hershman,
J.M.; Ross, G.T.: Neutralization of human thyrotropin
by antisera to subunits of glycoprotein hormones. *J.*
Clin. Endocrinol. Metab. 37:664-669, 1973.
101. Hodgen, G.D., Tullner, W.W., Vaitukaitis, J.L., Ward,
D.N.; Ross, G.T.: Specific radioimmunoassay of chorio -
nic gonadotropin during implantation in rhesus monkeys.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:457-464, 1974.

102. Rayford, P.L., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Morgan, E.; Canfield, R.E.: Use of specific antisera to characterize biologic activity of hCG-beta subunit preparations. *Endocrinology*. 91:144-146, 1972.
103. Reichert, L.E. Jr., Rasco, M.A., Ward, D.N., Niswender, G.D.; Midgley, A.R.; Jr.: Isolation and properties of subunits of bovine pituitary luteinizing hormone. *J. Biol. Chem.* 244:5110-5117, 1969.
104. Dufau, M.L., Catt, K. J.; Tsuruhara, T.: Retention of in vitro biological activities by desialylated human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44:1022-1029, 1971.
105. Catt, K.J., Dufau, M. L.; Tsuruhara, T.: Absence of intrinsic biological activity in LH and hCG subunits. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36:73-80, 1973.
106. Morgan, F.J., Canfield, R.E., Vaitukaitis, J.L.; Ross, G.T.: Properties of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 94: 1601-1606, 1974.

107. Vaitukaitis, J. L., Ross, G.T.; Reichert, L. E.:
Immunologic and biologic behavior of hCG and bovine
LH subunit hybrids. *Endocrinology*. 92:411-416, 1973 b.
108. Vaitukaitis, J. L., Ross, G.T., Braunstein, G.D.; Ray
ford, P.L.: Gonadotropins and their subunits: Basic
and clinical studies. *Recent. Prog. Horm. Res.* 32:
289-331, 1976.
109. Goldberg, N. D., Dea, R.R.O'.; Haddox, M. K.: Cyclic
GMP. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Res.* 3:155-213, 1973.
110. Schwyzer, R.: Relations hip of structure to activity
of polypeptide hormones. *Protein and polypeptide -
hormones. Excerpta medica foundation.* 2:201-206, 1968.
111. Hechter, O.; Calek, A. Jr.: Principles of hormone -
action: The problem of molecular linguistica. *Acta.
Endocrinol. (Copenh).* 77 suppl. 191:39-64, 1974.
112. Davoren P.; Sutherland, P.W.: The cellular location
of adeny cyclase in the pigeon erythrocyte. *J. Biol.
chem.* 238:3016-3023, 1963.
113. Rasmussen, H.: Cell comunication, calcium ion and -
cyclic adenosine monophosphate. *Science.* 170:404-412,
1970.

114. Kuo, J.F.; Greengard, P.: Cyclic nucleotide-dependent Protein Kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64:1349-13955, 1969.
115. Kish, V.M.; Meinsmith, L. J.: Nuclear protein Kinases: Evidence for their heterogeneity, tissue specificity, - substrates specificities and diferential responses to - cyclic adenosine 3'. 5', monophosphate. J. Biol. Chem. 249:750-760, 1974.
116. Korenman, S.G., Bhalla, R.C.; Sanborn, R.M.; Stevens, R.H.: Protein Kinase translocation as an early event in the hormonal control of uterine contraction. Science. 183:430-432, 1974.
117. Jungmann, R.A., Hiestand, P.G.; Schweppe, J.S.: Mechanism of action of gonadotropin. J. Biol. Chem. 249:5444-5451, 1974.
118. Catt, K.J., Dufau, M.L.; Tsuruhara, T.: Studies on a radioligand receptor assay sistem for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 32:860-863, 1971.

119. Schwartz, S., Bell, J., Rechnitz, R.; Rabinowitz, D.: Binding of human FSH and its subunits to rat testis. Eur. J. Clin. Invest. 3:475-481, 1973.
120. Lee, C.Y.; Ryan, R.J.: Luteinizing hormone receptors. Specific binding of human luteinizing hormone to homogenates of luteinized rat ovaries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:3520-3523, 1972.
121. Bhalla, V.K.; Reichert, L.E.: Properties of follicle-stimulating hormone receptor interactions. J. Biol. Chem. 249:43-51, 1974.
122. Holmgren, J., J., Lonroth, I.; Svennerholm, A.M.: Tissue receptor for cholera extoxin: Postulated structure from Studies with G_{MI} ganglioside and related glycolipids. J. Infect. Immunol. 8:208-214, 1972.
123. Levey, G.S., Fletcher, M.A.; Klein, L.: Glucagon and adenylate cyclase: Binding studies and requirements for activation. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol. 5, G.J. Drummond, P. Greengard and G.A. Robinson. pp. 53-65. Raven Press. Ney York, 1975.

124. Dafau, M.L., Ryan D.W.; Baukal, A.J.; Catt, K: Gona - dotropin receptors Solubilization and purification by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 250:4822-4824, 1975.
125. Azhar, S.; Jayaram, J.M.: Gonadotropin receptors in plasma membranes of bovine corpus luteum. J. Biol. - Chem. 251.7398-7412, 1976.
126. Catt, K.; Dufau, M.L.: Spare gonadotropin receptors in rat testis. Nature. (New Biology). 244:219-221, 1973.
127. Ryan, R.J.; Lee, C.Y.: The role of membrane bound receptors. Biol. Reprod. 14:16-29, 1976.
128. Robinson, G.A. Butcher; R.W.; Sutherland, E.W.: Ade - nyl cyclase as an adrenergic receptor. Ann. N.Y. Acad. Sci. 139:703-723, 1967.
129. Birnbaumer, L., Phol, S.L., Kraus, M.L.; Rodhell, M.: The action of hormones on the adenyil ciclase system. Adv. Biochem. Psychopharm. 3:185-208, 1970.
130. Perkins, J.P.: Adenyil cyclase. In: Advances in Cyclic Nucleotide Res. Vol. 3P. Greengard and G.A. Robinson, eds. Raven Press, New York, 1973.

131. Cuatrecasas, P: Membrane receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 43:169-214, 1974.
132. Rodbell, M., Lin, M.C., Salomon, Y., Londos, C., Harwood, J.P., Martin, B.R., Rendell, M.; Herman, M: Role of adenine and guanine nucleotides in the activity and response of adenylate cyclase systems to hormones. Evidence for multisite transition states. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Res.* 5:3-29, 1975.
133. Londos, C., Salomon, Y., Lin, M. C., Harwood, I.P., Rodbell, M., Scharam, M.; Wolf, J.: 5'-Guanytytinidodiphosphate, a potent activator of adenyl cyclase systems in eucaryotic cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:3087-3090, 1974.
134. Swilocki, N.I.; Tierney, J.: Activation of solubilized liver membrane adenylate cyclase by guanyl nucleotides. *Arch. Biochem. Biophys.* 168:445-462, 1975.
135. Haynes, R.C. Jr., Sutherland, E.W., Rall, T.W.; The role of cyclic adenylic acid in hormone action. *Recent. Prog. Horm. Res.* 16:121-138, 1960.
136. Marsh, J.M. Bucher, R.W., Saverd, K.; Sutherland, E. W.: Stimulatory effect of LH on adenosine 3'5-monophosphate accumulation in corpus luteum slices. *J. Biol. Chem.* 241:5436-5440, 1966.

137. Le Maire, W.J., Askari, H.; Savard, K: Steroid hormone formation in the human ovary VII. Steroids. 17:65-84, 1971.
138. Marsh, J: The role of cyclic AMP in gonadal function. Adv. Cyclic.Nucleotide. Res. 5:137-199, 1975.
139. Beall, R.J.; Sayers, G.: Isolated adrenal cells: -- Steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in response to ACTH. Arch. Biochem. Biophys. 148:70-76, - 1972.
- 139a.Catt, K.J.; Dufau, M.L.: Basic Concepts of the mechanism of peptide hormones. Biol. Reprod. 14:1-15, 1976.
140. Krebs, E.G.: Protein Kinase. Curr. Top. Cell.Regul.- 5:99-133, 1972.
141. Langan, T.A.: Protein Kinase and protein Kinase substrates. Adv. Cyclic.Nucleotide. Res. 3:3-400, 1973.
142. Langan, T.A.: Cyclic AMP and histone phosphorylation. Ann. New York. Acad. Sci. 185:166-180, 1971.

143. Ruddon, R.W.; Anderson, S.: Presence of multiple protein Kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46:1496-1508, 1972.
144. Jungmann, R.A.; Schweppe, J.S.: Mechanism of action. *Endocrinology.* 94:168-183, 1974.
145. Garren, L., Gill, G.N., Masui, H.; Walton, G.: On the mechanism of action of ACTH. *Recent. Prog. Horm. Res.* 27:433-478, 1971.
146. Barden, N.; Labrie, F.: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent phosphorylation of ribosomal proteins from bovine anterior pituitary gland. *Biochemistry.* 12:3096-3102, 1973.
147. Johnson, E.M., Heda, T., Maeno, H.; Greengard, P.: - Adenosine 3', 5' monophosphate dependent phosphorilation of a specific protein in synaptic membrane fraction from rat cerebrum. *J. Biol. Chem.* 247:5650-5652, 1972.
148. Schlatz, L.; Marinetti, G.V.: Protein Kinase mediated phosphorylation of the rat liver plasma membrane.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:51-56, 1971.

149. Rubin, C.S., Erlichman, J.; Rosen, O.M.: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein Kinase of human erythrocyte membranes. J. Biol. Chem. 247:-6135-6139, 1972.
150. Krause, E.G., Will, H., Schvipe, B.; Wollenberger; - A.: Cyclic AMP-enhanced protein phosphorylation and calcium binding in a cell-membrane-enriched fraction from myocardium. Adv. Cyclic.Nucleotide. Res. 5:473-490, 1975.
151. Greengard, P.; Kebabian, J.W.: Role of cyclic AMP -- in synaptic transmission in the mammalian peripheral-nervous system. Fed. Proc. 33:1059-1067, 1974.
152. Malacara, J.M., Viveros, M.G.; Rodríguez-Valverde, - C.: Fundamentos de Endocrinología Clínica. Segunda - Edición. La prensa médica mexicana. México, 1978. -- pág. 317-327.

153. Kupperman, H.S., Grenblatt, R.S.; Norbach, C.R.: --
Two and six-hour pregnancy test.: Preliminary report,
J. Clin. Endocrinol. Metab. 3:548-552, 1943.
154. Friedman, M.H. Lapham, M.E.: A simple, rapid proce--
dure for the laboratory diagnosis of early pregnan -
cies. Am. J. Obstet. Gynecol. 21:405-410, 1931.
155. Liepman, V.: Ptsch. med. Wschr. 29:30, 1903
Referido por: Mazer, CH.; Goldstein, L.: Clinical -
Endocrinology of the female. Primera Edición, W.B. -
Saunders Company. Philadelphia, 1932. pág. 372-389.
156. Optiz, F.: Dtsch. med. Wschr. 29:597, 1903.
Referido por: Mazer, CH; Goldstein, L.: Clinical En-
docrinology of the female. Primera Edición, W.B. --
Saunders Company. Philadelphia, 1932. pág. 372-389.
157. Zondek, B.: On the theory of the pregnancy reaction-
from the urine by demonstration of arterial pituita-
ry hormone; rapid precipitation reaction; elimína -
ting the effects of poisons from the urine. Improve-
ment of the pregnancy reaction. J. Klin. Wschr. 9:--
964-967, 1930.

158. Selye, H., Collip, J.B.; Thomson, D.L.: Loss of sensitivity to anterior pituitary like hormone of pregnancy urine. Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 31:487-488, 1934.
159. Collip, J.B.: Recent studies on anti-hormones. Ann. Int. Med. 9:150-161, 1935.
160. Twombly, G.H.: Studies of the nature of antigonadotropic substances. Endocrinology. 20:311-317, 1936.
161. Ehrlich, H.: Immunisierungsversuche mit gonadotropen Hormonen. Wien. Klin. Wschr. 47:1323-1324, 1934
162. Van den Ende, M.: Urinary gonadotrophic extracts and anaphylaxis in vitro. J. Endocrinol. 1:356-365, 1939.
163. Clase, J.H.: Serological and immunochemical studies on the gonadotrophic hormones. Yale. J. Biol. Med. 17:517-538, 1945.
164. Bussard, A.: Etude immunochimique de la gonadotrophine choriale humaine, coexistence d'anticorps precipitants et non precipitants dans L'antisérum de lapin. Ann. Inst. Pasteur. 75:130-138, 1948.

165. Shuyler, L.H.; Anderson, K., Serlow; Erickson, C.: -
Serologic study of chorionic gonadotrophin. Proc.
Soc. Exp. Biol. 75:552-555, 1950.
166. Berson, S.A.; Yallow, R.S.: Kinetics of reaction -
between insulin and insulin-binding antibody. J. -
Clin. Invest. 35:458-466, 1957.
167. Read, Ch.; Bryan, C.T.: The immunological assay of ..
human chorionic gonadotrophin. Recent. progr. Horm.
Res. 16:187-218, 1960.
168. Levy, G.Y., Bourrillon, R.; Gotr, R.: Reaction of -
human chorionic gonadotrophin. Acta. Endocrinol.
(Copenh). 31:553-558, 1959.
169. Swierczynska, Z.E., Samochowicz,; Polske.: Serologi-
cal detection of chorinic gonadotropin in urine. Its
value in the diagnosis of pregnancy. Pol. Tyg. Lek.-
15:1217-1219, 1960.
170. Brody, S.; Carlstrom, G.: Estimation of human chorio
nic gonadotropin in biological fluids by complemen-
tation. Lancet. 2:99-100, 1960.

171. McKean, C.M.: Preparation and use of antisera to human chorionic gonadotrophin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 80:595-600, 1960.
172. Keele, D., Remple, J.D.S., Bean, J.; Webster, J.A.: Immunologic reactions to human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 22:287-299, 1962.
173. Robins, J.L., Hill, A.G., Carlo, N. B., Carlquist, J.H.; Marcus, S.: Latex agglutination reactions between human chorionic gonadotropin and rabbit antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109:321-325, 1962.
174. Goldin, M.: The use of latex particles sensitized with human chorionic gonadotropin in a serologic test for pregnancy. *Techn. Bull. Regist. Med. Techn.* 32:143-146, 1962.
175. Carlsson, M.G.: The use of haemagglutination inhibition reaction for qualitative and quantitative determinations of HCG in normal and pathological pregnancies. *Acta. Endocrinol. (Copenh).* 46:142-152, 1964.
176. Little, W.A.: Slide Immunological pregnancy test. -

- JAMA. 188:530-532, 1964.
177. Rosenstein, E., Rosenstein, I. Medina, B.N. Resano, P.F. Calderon, G.P., Cerdan, M.T., Grupe, I.; Barranco, G.: Diccionario de especialidades bioquímicas. Segunda Edición, PLM. México, 1986. pág. 46.
 178. Kerber, I. J. MD, A. Inclan, P., Fowler, E.A., Davis, K.; Stewart, A.F. Immunologic Tests for Pregnancy a-comparison. Obstet. Gynecol. 36:37-43, 1970.
 179. Hobson, B.M.: An evaluation of immunological tests - for pregnancy. Practitioner. 202:388-392, 1969.
 180. Wide, L.; Gemzell, C.A. An immunological pregnancy - test. Acta. Endocrinol. 35:261-267, 1960.
 181. Wilde, C.E., Ott, A.H.; Bagshawe, K.D.: A radioimmunoassay for human chorionic gonadotropins. Nature. (Londres). 205:191-192, 1965.
 182. Odell, W.D., Ross, G.T.; Rayford, P.L.: Radioimmunoassay for luteinizing hormone in human plasma or serum: physiological studies. J. clin. Invest. 46:248-

-249, 1967.

183. Midgley, A.R. Jr.: Radioimmunoassay: a method for -- human chorionic gonadotropin and Human luteinizing - hormone. *Endocrinology*.79:10-11, 1966.
184. Franchimont, P.: Dosage radioimmunologique des hormo nes luteinizantes chorionique et hypophysaire. *Ann.- Endocrinol. (Paris)*. 27:273-274, 1966.
185. Odell, W.D., Parlow, A.F. Cargille, C.M.; Ross, G.T.: Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone: Physiological studies. *J. Clin. Invest.* 47: -- 2551-2552, 1968.
186. Wide, L.: Early diagnosis of pregnancy. *Lancet.* -- 2:863-864, 1969.
187. Johansson, E.D.B.; Wide, L.: Preovulatory levels of- plasma progesterone and luteinizing hormone in women. *Acta.Endocrinol.(Copenh)*.62:82-88, 1969.
188. Odell, W.D.: Endocrine aspects of trophoblastic neo-

- plasms. Clin. Obstet. Gynecol. 10:290-295, 1967.
189. Stenmann, U.H., Tanner, P., Rauta, T., Schroder, J.; Seppala, M.: Monoclonal antibodies to chorionic gonadotropin: use in a rapid radioimmunoassay for gynecologic emergencies. Obstet. Gynecol. 59:375-377, 1982.
190. Ehrlich, P.H., Moyle, W.R.: Cooperative immunoassays: ultrasensitive assays with mixed monoclonal antibodies. Science. 221:279-281, 1983.
191. Wada, H.G., Danisch, R.J., Baxter, S.R., Federici, M.M., Fraser, R.C., Brownmiller, L.J.; Lankford, J.C. : Enzyme immunoassay of the glycoprotein tropic hormones choriogonadotropin, lutropin, thyrotropin--with solid-phase monoclonal antibody specific for the alpha-subunit and enzyme-coupled monoclonal antibody specific for the beta-subunit. Clin. Chem. 28:1862--1866, 1982.
192. Talwar, G.P., Gaur, A., Singh, A.K.; Gupta, S.K.: - Two simple and sensitive methods for detection of pregnancy and hCG synthesizing tumours amenable to both qualitative and quantitative assays. Indian. J.

- Med. Res. 77:231-238, 1983.
193. Shimizu, S.Y., Present, W.A., Sevier, E.D., Wang, R.;
Saunders, R.L.: Choriongonadotropin measured by use -
of monoclonal antibodies in a two-site immunoradiome
tric assay (letter). Clin. Chem. 28:546-547, 1982.
194. Armstrong, E.G., Ehrlich, P.H., Birken, S., Schlatte
rer, J.P., Siris, E., Hembree, W.C.; Canfield, R.E..
Use of a highly sensitive and specific immunoradiome
tric. Assay for detection of human chorionic gonado
tropin in urine of normal, non pregnant, and preg --
nant individuals. J. Clin. Endocrinol. Metab. 59:867
-874, 1984.
195. Vaitukaitis, J.L.: Radioimmunoassay of human chorio
gonadotropin. Clin. Chem. 31:1749-1754, 1985.
196. Suzuki, N., Konishi, E., Kondo, K., Fujita, I.; --
Ishikawa, E.: A highly sensitive colorimetric san -
dwich-enzyme immunoassay for human chorionic gonado
tropin using specific antibodies against the carbo -
xy-terminal portion of the B-subunit. Clin. Chim. -
Acta. 150:247-253, 1985.

197. Kondo, K., Imagawa, M., Iwasa, S., Chieco, K., Ko -- nishi, E., Suzuki, N., Yamoto, M., Nakano, R., Yoshi take, S.; Ishikawa, E.: A specific and sensitive san dwich enzyme immunoassay for human chorionic gonado tropin using antibodies against the carboxyl termi - nal portion of the B-subunit. Clin. Chim. Acta. 138: 229-235, 1984.
198. Davey, D.D., Sample, M.M.; Oeito.: Evaluation of a - solid-phase enzyme immunoassay for human choriogona dotropin B-subunit. Clin. Chem. 29:1964-1966, 1983.
199. Mehta, H.C.; MacDonald, D.J.: A sensitive enzyme im munoassay specific for human chorionic gonadotropin - Clin. Chim. Acta. 121:245-250, 1982.
200. Imagawa, M., Yoshitake, S., Ishikawa, E., Kanoh, E.- Tsunetashi, Y., Iwasa, S., Konishi, E., Kondo, K., - Ichida, Y.; Nakajima, K.: Level of human chorionic - gonadotropin-like substance in serum of normal sub - jects. Anal.Lett. 17:575-587, 1984.
201. Borkowski, A., Puttaert, V., Gyling, M., Muquardt, - C.; Body, J.J.: Human chorionic gonadotropin-like -

- substance in plasma of normal non pregnant subjects and women with breast cancer. J. Clin. Endocrinol. - Metab. 58:1171-1178, 1984.
202. Chen, R., Weng, L., Sizto, C.N., Osorio, B., Husu, - C.J., Rodgers, R.; Litman, J.D.: Ultrasound-accelerated immunoassay, as exemplified by enzyme immunoassay of choriogonadotropin. Clin. Chem. 30:1446-1451, 1984.
203. Braunstein, G.D., Karow, W.G., Gentry, W.C., Razor, J.M., Maclyne, M.S.; Wade, M.D.: First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. Am. J. Obstet. Gynecol. 131:25-32, 1978.
204. Jouppila, P., Tapanainen, J.; Huhtaniemi, I.: Plasma hCG and ultrasound in suspected ectopic pregnancy. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 10:3-12, 1980.
205. Kadar, N., DeVore, G.; Romero, R.: The pre-operative diagnosis of ectopic pregnancy. I. The discriminatory B-hCG zone. Obstet. Gynecol. 58:156-161, 1981.

206. Kadar, N., Calwell, B.V.; Romero, R.: A method of -
screening for ectopic pregnancy and its indications.
Obstet. Gynecol. 58:162-166, 1981.
207. Braunstein, G.D., Ricardo, H.; Asch, M.D.: Predicti -
ve value analysis of measurement of human chorionic
gonadotropin, pregnancy specific B₁-glycoprotein, pla
cental lactogen, and cystine aminopeptidase for the
diagnosis of ectopic pregnancy. Fertil. Steril. 39:
62-67, 1983.
208. Ackerman, R.M.D., Deutsch, S. Ph.D.; Krumholz, B.M.D.:
Levels of human chorionic gonadotropin in unruptured
and ruptured ectopic pregnancy. J. Biol. Chem. 60: -
13-14, 1982.
209. Saxena, B.B., Landesman, R.: The use of radiorecepto -
rassay of human chorionic gonadotropin for the diag -
nosis and management of ectopic pregnancy. Fertil.
Steril. 26:381-397, 1975.
210. Batzer, F.R.: Hormonal evaluation of early pregnancy.
Fertil. Steril. 34:1-13, 1980.
211. Chartier, M., Roger, M., Barrat, J.; Michelon, B.: -

- Measurements of plasma human chorionic gonadotropin-
(hCG) and B-hCG activities in the late luteal phase:
Evidence of the occurrence of spontaneous menstrual -
abortions in infertile women. *Fertil. Steril.* 31:134-
137, 1979.
212. Jovanovic, L., Dawood, M.Y., Landesman, R.; Saxena, -
B.B.: Hormonal profile as a prognostic index of ear-
ly threatened abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130:
274-278, 1978.
213. Lorenz, R.P., Work, B.A., Menon, K.M.: A radiorecep-
tor assay for human chorionic gonadotropin in normal
and abnormal pregnancies: A clinical evaluation. *Am.*
J. Obstet. Gynecol. 134:471-476, 1979.
214. Ho Yuen, B., Livingston, J.E., Poland, B.J., Frcog, -
M.B., Berna, K., Wittmann, M.D., Lydiasy,; Cannon, -
W.: Human chorionic gonadotropin estradiol, progeste
rone, prolactin, and B-scan ultrasound monitoring of
complications in early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* -
57:207-214, 1981.

215. Belisle, S., Lehoux, J.G.; Brault, J.: Reappraisal - of the predictive value of the B-human chorionic gonadotropin assay in an infertile population. *Fertil. Steril.* 31:492-495, 1979.
216. Jouppila, P., Tapanainen, J.; Huhtaniemi, I.: Plasma HCG levels in patients with bleeding in the first and second trimesters of pregnancy. *Br. J. Obstet. - Gynecol.* 86:343-352, 1979.
217. Batzer, F.R., Schlaff, S., Goldfarb, A.F.; Corson, S.L.: Serial beta-subunit human chorionic gonadotropin doubling time as a prognosticator of pregnancy outcome in an infertile population. *Fertil. Steril.* 35:307-312, 1981.
218. Reuter, A.M., Gaspard, U.J., Deville, J.L., Vrindts-Gevaert, Y.; Franchimont, P.: Serum concentrations of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. I. During normal singleton and twin pregnancies. *Clin. Endocrinol.* 13:305-318, 1980.
219. Delfs, E.: Quantitative chorionic gonadotrophin. - Prognostic value in hydatidiform mole and chorionepi

- thelioma. *Obstet. Gynecol.* 9:1-9, 1957.
220. Hertz, R., Lewis, J. Jr.; Lipsett, M.B.: Five years' experience with the chemotherapy of metastatic choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. *Am J. Obstet. Gynecol.* 82:631-635, 1961.
221. Wide, L.; Hobson, B.: Immunological and biological activity of human chorionic gonadotrophin in urine and serum of pregnant women and women with a hydatidiform mole. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*. 54:105-112, 1967.
222. Goldstein, D.P.: Gestational neoplasms. En. LJ: DeGroot, Cahill, G.F. Jr., Odell, W.D., (Eds). *Endocrinology*. New York. 3:1629-1648, 1979.
223. Schlaerth, J.B. Morrow, C.P., Kletzky, O.A., Nalick, R.H.; D'Ablaing, G.A.: Prognostic characteristics of the serum radioimmunoassay beta subunit human chorionic gonadotropin titer regression curve following molar pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 58:478-482, 1981.
224. Ho Yuen, B.; Cannon, W.: Molar pregnancy in British-Columbia: Estimated incidence and postevacuation regression patterns of the beta subunit of human cho--

- rionic gonadotropin. Am. J. Obstet. Gynecol. 139: -
316-319, 1981.
225. Goldstein, D.P., Pastorfide, G.B.; Osathanondh, R.;
Kosasa, T.S.: A rapid solid-phase radioimmunoassay -
specific for human chorionic gonadotropin in gesta -
tional trophoblastic disease. Obstet. Gynecol. 45:-
527-530, 1975.
226. Delfs, E.: An assay method for human chorionic gona-
dotropin. Endocrinology. 28:196-201, 1941.
227. Morrow, C.P., Kletzky, O.A., DiSaia, P.L., Townsend,
D.E., Mishell, D.R.; Nakamura, R.M.: Clinical and --
laboratory correlates of molar pregnancy and tropho-
blastic disease. Am.J.Obstet. Gynecol. 128:424-430,
1977.
228. Husa, R.O., Mattingly, R.F.: Semiquantitative use -
of Biocept-G radioreceptorassay. Obstet. Gynecol. --
54:199-204, 1979.
229. Braunstein, G.D.: Use of human chorionic gonadotro--
pin as a tumor marker in cancer, Immunodiagnosis of

- cancer. Herberman, R.B., McIntire, K.R., New York, -
9:383-409, 1979.
230. Bagshawe, K.: Management of trophoblastic tumours.-
Excerpta. Med. Int. Congr. Ser. 12:576-581, 1980.
231. Soma, H., Takayama, M., Tokoro, K.: Radioimmunoassay
of hCG as an early diagnosis of cerebral metastases-
in choriocarcinoma patients. Acta. Obstet. Gynecol.
Scand. 59:445-449, 1980.
232. Bosl, G.L., Lange, P.H., Nochomovitz, L.E., Goldmann, A.,
Fraley, E.E., Rosai, J., Johnson, K.; Kennedy, B.J.: -
Tumor markers in advanced nonseminomatous testicular
cancer. Cancer. 47:572-576, 1981.
233. Bosl, G.J., Lange, P.H. Fraley, E.E., Goldman, A., -
Nochomovitz, L.E., Rosai, J., Waldmann, T.A.; Johnson,
K.: Human chorionic gonadotropin and alphafetopro --
tein in the staging of nonseminomatous testicular -
cancer. Cancer. 47:328-332, 1981.
234. Javadpour, N.: Tumor markers in urologic cancer. Uro
logy. 16:127-136, 1980.

235. Lange, P.H., Nochomovitz, L.E., Rosai, J., Fraley, E.E., Kennedy, B.J., Bols, G., Brisbane, J.; Catalona, W.J.: Serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in patients with seminoma. J. Urol. 124:472-478, 1980.
236. Thompson, D.K.; Haddow, J.E.: Serial monitoring of serum alphafetoprotein and chorionic gonadotropin - in males with germ cell tumors. Cancer. 43:1820-1829, 1979.
237. Braunstein, G.D.: Human chorionic gonadotropin in - nontrophoblastic tumors and tissues. Recent advances in reproduction and regulation of fertility. GP. - Talwar. Amsterdam, 1979. pp. 389-397.
238. Fishman, W.H., Inglis, N.R.; Vaitukaitis, J.: Regan isoenzyme and human chorionic gonadotropin in ovarian cancer. Natl. Cancer. Inst. Monogr. 42:63-69, 1975.
239. Samaan, N.A., Smith, J.P., Rutledge, F.N.; Schultz, P.N.: The significance of measurement of human placental lactogen, human chorionic gonadotropin, and-

- carcinoembryonic antigen in patients with ovarian - carcinoma. Am.J.Obstet. Gynecol. 126:186-189, 1976.
240. Carenza, L., Gregorio, R.; Mocci, C.: Ectopic human chorionic gonadotropin: Gynecological tumors and - non malignant conditions. Gynecol. Oncol. 10:32-38, 1980.
241. Stanhope, C.R., Smith, J.P., Britton, J.C.; Cros - ley, P.K.: Serial determination of marker substan - ces in ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 8:284-287, - 1979.
242. Husa, R.O.: Clinical utility of human chorionic - gonadotropin and α - subunit measurements. Obstet.- Gynecol. 60:1-12, 1982.
243. Donaldson, E.S., Van Nagell, J.R., Pursell, S., Gay, E.C., Meeker, W.R., Kashmiri, R.; Van de Voorde, J.: Multiple biochemical markers in patients with gynecologic malignancies. Cancer. 45:948-953, 1980.
244. Kurman, R.J.; Norris, H.J.: Embryonal carcinoma of - the ovary: A clinico pathologic entity distinct --

- from endodermal sinus tumor resembling embryonal - carcinoma of the adult testes. *Cancer*. 38:2420-2433 1976.
245. Kurman, R.J.; Norris, H.J.: Endodermal sinus tumor of the ovary: A clinical and pathological analysis of 71 cases. *Cancer*. 38:2404-2419, 1976.
246. Tormey, D.C., Waalkes, T.P.; Simon, R.M.: Biological markers in breast carcinoma. II. Clinical correlations with human chorionic gonadotrophin. *Cancer*. 39:2391-2396, 1977.
247. Gucalp, R.; Firat, D.: Human chorionic gonadotropin as a biological marker in breast carcinoma. *Kanser*. 10:23-32, 1980.
248. Franchimont, P., Zangerle, P.F., Nogaredo, J., Bury, J., Mloter, F., Reuter, A., Hendrick, J.C.; Collette, J.: Simultaneous assays of cancer associated antigens in various neoplastic disorders. *Cancer*. 38:2287-2295, 1976.

249. Coombes, R.C., Powles, T.J., Gazet, J.C., Ford, H.T. Nash, A.G., Sloane, J.P., Hillyard, C.J., Thomas, P. Keyser, J.W., Marcus, D., Zinberg, H., Stimson, W.H.; Neville, A.M.: A biochemical approach to the staging of human breast cancer. *Cancer*. 40:937-944, 1977.
250. Cove, D.H., Woods, K.L., Smith, S.C.: Tumour markers in breast cancer. *Br. J. Cancer*. 40:710-718, 1979.
251. Rosen, S.W., Weintraub, B.D.; Vaitukaitis, J.L.: -- Placental proteins and their subunits as tumor markers. *Ann. Int. Med.* 82:71-77, 1975.
252. Gailani, S., Chu, T.M., Nussbaum, A., Ostrander, M.; Christoff, N.: Human chorionic gonadotrophins (hCG)- in nontrophoblastic neoplasms. Assessment of abnormalities of hCG and CEA in bronchogenic and digestive neoplasms. *Cancer*. 38:1684-1686, 1976.
253. Mackie, C.R., Mocssa, A.R.; Richart, C.: Prospective-evaluation of some candidate tumor marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Dig. Dis. Sci.* 25: 161-174, 1980.

254. Ruibal, A., Moone, J.; Richart, C.: The beta subunit of chorionic gonadotropin as a marker in digestive - neoplasms. *Rev. Esp. Oncol.* 26:13-19, 1979.
255. Husa, R.O.: Biosynthesis of human chorionic gonadotropin. *Endocrine. Rev.* 1:268-272, 1980.
256. McIntire, K.P., Masseyeff, R.; Breuer, H.: Measure - ment of multiple markers in diagnosis and monitoring of therapy, *Carcino-Embryonic Proteins* Lehmann, F. G., Amsterdam, 1:517-520, 1979.
257. Muggia, F.M., Rosen.S.W., Weintraub, B.D.: Ectopic - placental proteins in nontrophoblastic tumors. Se -- rial measurements following chemotherapy. *Cancer.* -- 36:1327-1334, 1975.
258. Hagen, C., Gilby, F.D.; McNeilly, A.S.; Comparison - of circulating glycoprotein hormones and their subu nits in patients with oat cell carcinoma of the lung and uraemic patients on chronic dialysis. *Acta. Endo crinol.* (Copenh). 83:26-35, 1976.
259. Dawood, N.Y., Saxena, B.B., Landesman, R.: Human cho

- rionic gonadotropin and its subunits in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Obstet, Gynecol.* 50:172-181, 1977.
260. Nishimura, R., Ashitaka, Y.; Tojo, S.: The clinical - evaluation of the simultaneous measurements of human - chorionic gonadotropin (hCG) and its alpha-subunit in sera of patients with trophoblastic diseases. *Endo - crinol. Jap.* 26:575-582, 1979.
261. Quigley, M.M., Tyrey, L., Hammond, C.B.: α - subunit in sera of choriocarcinoma patients in remission. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50:98-102, 1980.
262. Quigley, M.M., Tyrey, L., Hammond, C.B.: Utility of - assay of alpha subunit of human chorionic gonadotropin in management of gestational, 'trophoblastic ma - lignancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 138:545-549, - 1980.
263. Gaspard, U.J., Hustin, J., Reuter, A.M., Lambotte, - R.; Franchimont, P.: Immunofluorescent localization of placental lactogen, chorionic gonadotrophin and - its alpha and beta subunits in organ cultures of hu -

- man placenta. *Placenta*. 1:135-144, 1980.
264. Fox, H.: Effect of hypoxia on trophoblast in organ-culture. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 107:1058-1064, 1970.
265. Benveniste, R., Barnea, E.; Ulep, E.: Measurement of chorionic gonadotropin (hCG) alpha-subunit in normal and pathological pregnancy. *Endocrinology. (Suppl)*. - 108:283-292, 1981.
266. Blackman, M.R., Weintraub, B.D., Kourides, I.A. Solano, J.T., Santner, T.; Rosen, S.W.: Discordant elevation of the common α - subunit of the glycoprotein - hormones in serum of uremic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53:39-48, 1981.
267. Deville, J.L., Gaspard, U., Reuter, A.M., et. al.: - Taux' eriques maternels de la choriogonadotrophine- et de ses sous-unit' es libres alpha et beta en fonction du sexe foetal. Etude préliminaire. *Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris)*. 174:365-374 , 1980.
268. Braunstein, G.D., Forsythe, A.B., Rasor, J.L., Van - Scoy Mosher, M.B.; Thompson, R.W.; Wade, N.E.: Se -

- rum glycoprotein hormone alpha subunit levels in patients with cancer. *Cancer*. 44:1644-1651, 1979.
269. Rutanen, E.M.: The circulating alpha subunit of human chorionic gonadotrophin in gynaecologic tumours. *Int. J. Cancer*. 22:413-421, 1978.
270. MacFarlane, I.A., Barnes, D.; Howatj. M.: Serum glycoprotein hormone alpha subunit, hormone receptors and disease stage in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer*. 42:645-653, 1980.
271. Blackman, M.R., Weintraub, B.D.; Rosen, S.W.: Human-placental and pituitary glycoprotein hormones, and their subunits as tumor markers: A quantitative assessment. *J. Natl. Cancer Inst.* 65:81-92, 1980.
272. Gemzell, C.: III. Pituitary Hormones. *Recent. Prog. Horm. Res.* 21:179-198, 1965.
273. Van, Wagenen, G; Simpson, E.M.: Induction of multiple ovulation in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 61:316-318, 1957.

274. Knobil, E., Kostyo, J.L.; Greep, R.O.: Production of ovulation in the hypophysectomized rhesus monkey. -- Endocrinology. 65:487-493, 1956.
275. Garagorri, J.M., Job, C.J., Canlorbe, P.; Chaussain, J.L.: Results of early treatment of cryptorchidism - with human chorionic gonadotropin. J. Pediatr. 101:-923-927, 1982.
276. Mehan, J.D.; Chehval, M.J.: Human chorionic gonadotropin in the treatment of the infertile man. J. - Urol. 128:60-63, 1982.