



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTAGALA"

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
SUBUNIDAD BETA DE GONADOTROPINA
CORIONICA HUMANA**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a:

Porfirio Javier Tamayo Duarte

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de tesis profesional fué realizado en el Laboratorio de Inmunoquímica del Departamento de Bioquímica Aplicada de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Bajo la dirección del Q.B.p Bulmaro E. - Correa Meza y del Q.F.B. Luis Iglesias Saavedra.

Este trabajo se llevo a cabo con la ayuda económica del - Conacyt a la beca con registro 52032.

Agradecimientos:

Agradezco infinitamente al Dr. Gustavo Acosta Altamirano y al Dr. Eleazar Lara Padilla, por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Agradezco al Q.F.B. Luis Iglesias s., Q.F.B. Saúl Torres A., Dr. Arturo Berber; Dr. Juan - Manuel Cortes, Q.F.p Bulmaro E. Correa y al - Dr. Rafael Campos por su valiosa ayuda y consejos para la mejor realización de este trabajo.

Agradezco también al Lic. en Diseño Gráfico -- Roberto Jerezcano por la realización de los -- esquemas y gráficas y a Vicky por la transcripción de este trabajo.

Con Amor y Respeto

A mis Padres:

Porfirio Tamayo y María Duarte, que me brindaron amor,
confianza y apoyo incondicional.

A mis Hermanas:

Miriam, Alejandra, Rosa, Guadalupe, Teresa y Beatriz,
por su Amor y comprensión.

A mis Tíos:

Teresa Duarte y Adolfo Nava, Por su apoyo y confianza.

A mis:

Abuelos, Primos, Cuñados, Sobrinos, y amigos de la calle
cinco (5).

A Marcela,

Por su gran cariño, apoyo y confianza.

A Bruno y Tania

A Alberto.

A la Memoria de;

Mi Abuelita Luisa y Baltazar.

A mis compañeros del:

LABORATORIO DE BIOQUIMICA APLICADA.

A la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

"PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA SUBUNIDAD BETA DE LA GONADO

TROPINA CORIONICA HUMANA"

I N D I C E

PAGINAS

Abreviaturas	1
Introducción	2
Antecedentes	10
Justificación	12
Objetivos	13
Materiales y Métodos	14
Resultados	39
Análisis de Resultados	51
Conclusiones	55
Apéndice	57
Bibliografía	62

ABREVIATURAS

HCG	Gonadotropina Coriónica Humana
U I	Unidades Internacionales
mU I	miliunidades Internacionales
Kd	Kilodaltones
Hrs	horas
min	minutos
°C	grados centígrados
ASB	Albúmina sérica bovina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
Abs	Absorbancia
D O	Densidad óptica
nm	nanometros
g	gramos
ug	microgramos
l	litro
ul	microlitro
M	Molar
SNC-ASB	suero normal de conejo-albúmina sérica bovina.
PBS-Tween	Amortiguador salino de fosfatos -- Tween 20.
rpm	revoluciones por minuto
ELISA	Ensayo inmuno enzimático.

INTRODUCCION

La presencia de gonadotropinas placentarias es bien conocida - para primates y equinos (34), pero proteínas muy parecidas a las -- gonadotropinas coriónicas, en otros animales se han reportado poco. Gonadotropinas biológicamente activas con perfiles similares a gonadotropinas semejantes a la HCG y sus subunidades están presentes en placenta de rata, ratón y hamster (Wide y Hobson, 1978 citados en -- 34), también en la implantación del blastocisto de ratón se sintetiza y se secreta una glicoproteína parecida a la gonadotropina coriónica (Fishel y Surani, 1980 citados en 34).

Bambra en 1981. (10), utilizando técnicas inmunohistoquímicas en la cual involucra antisueros contra la subunidad beta de la HCG, han demostrado la presencia de un material parecido a la HCG en placenta de cobayo en los días 16, 21, 31 y 46 de gestación. Estudios de - microscopía electrónica sugieren que este material probablemente sea sintetizado por el sincitiotrofoblasto.

FUNCION DE LA HCG. La menstruación en humanos suele ocurrir 14 - días después de la ovulación, en el momento en que la mayor parte del endometrio secretor del útero se desprende de la pared uterina y es expulsado al exterior, si esto ocurriese después de haberse implantado el huevo, el embarazo se interrumpiría. La secreción de gonadotropina coriónica evita indirectamente que así acontezca. En el momento de la penetración trofoblástica del endometrio por parte del blastocisto en desarrollo, las células trofoblásticas secretan HCG hacia la

circulación materna. La función de la HCG es semejante a la de la -- hormona luteinizante de la hipófisis anterior, su mayor importancia estriba en que impide la involución del cuerpo amarillo al fin del - ciclo menstrual y permite que este cuerpo amarillo produzca grandes cantidades de hormonas como progesterona y estrógenos, a su vez és-- tas hormonas hacen que el endometrio uterino siga creciendo y alma-- cenando grandes cantidades de elementos nutritivos. (21).

ESTRUCTURA DE LA HCG. La HCG es una glicoproteína con un peso - molecular aproximado de 39 Kd y con un contenido de carbohidratos - del 30% (tabla A). (31). La HCG es bioquímicamente similar a otras - hormonas secretadas por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria como: hormona luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y estimu-- lante de la tiroides (TSH). Cada una consiste de una subunidad alfa y otra beta, las dos cadenas polipeptídicas están unidas en forma no covalente. (16, 21, 30, 31, 34). La subunidad alfa de la HCG consis-- te de 96 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 15 Kd, y es enteramente similar en estructura a la misma subunidad de las hormo-- nas pituitarias, excepto por el contenido de beta galactosa y ácido siálico. (31). Existen sin embargo, diferencias químicas en la es--- tructura de las subunidades beta de todas éstas hormonas; mientras - que las cadenas beta de la FSH son muy similares, la cadena beta de la LH y la beta de la HCG poseen 94 (85%) de los primeros 110 aminoá-- cidos en común. No obstante, 121 aminoácidos constituyentes de la -- cadena beta de la LH, mientras que la cadena beta de la HCG está con

formada por 145 aminoácidos. Excepto por las 2 posiciones entre los residuos 111 y 121, los 35 aminoácidos finales de la región carboxi-lo terminal del péptido de la cadena beta de la HCG, no están representados en la cadena beta de la LH. (figura A). Esta región del --peptido de los 110-145 aminoácidos le confieren a la subunidad beta de la HCG propiedades antigénicas, capaz de inducir la producción de anticuerpos con máxima especificidad para la HCG. (34).

Ninguna de las subunidades de la HCG posee actividad biológica por separado, en sistemas de ensayo convencional, ni se unen in vi--tro a las células o a las membranas, una parte de la actividad bio--lógica es restaurada cuando se lleva a cabo la renaturalización de - las cadenas alfa y beta de la HCG. (31).

IMPORTANCIA DE LA HCG. La HCG es una glicoproteína secretada - inicialmente por las células trofoblásticas del blastocisto en desarrollo y después por las células del sincisiotrofoblasto de la pla--centa. Su patrón de secreción durante el embarazo normal se caracte--riza por presentar una elevación importante (cenit) entre las sema--nas octava a duodécima de la gestación, para luego disminuir y con--servarse en un nadir a partir de las semanas 14 a 16, hasta el tér--mino del embarazo (figura B) (5, 18, 21, 26, 35, 36). Es por ésto -- que la confirmación del embarazo se basa en la determinación "clási--ca" de HCG en los comienzos del embarazo. (18).

Los niveles de HCG fluctúan también en algunos procesos patoló--gicos al igual que en el embarazo. En el embarazo ectopico, los nive--les de HCG urinarios con frecuencia descienden por debajo de 1 U I -

/ml y muchas veces se sitúan por debajo de los 0.3 U I/ml, ya que para niveles por debajo de 1 U I/ml no son detectables por las pruebas usuales (24), por lo que es necesario la aplicación de otras técnicas más sensibles como los radioinmunoensayos con subunidad beta, y más específicamente, con la región carboxiloterminale que alcanza sensibilidades de hasta 5.0 mUI/ml (5).

Durante el primer trimestre, la prueba cuantitativa de HCG puede ser útil como guía para el pronóstico de un posible aborto. Tal como se indicó antes, los niveles máximos de HCG se alcanzan normalmente hacia las 10 semanas de gestación, y durante el embarazo normal puede esperarse "niveles elevados" de HCG empezando en la 7a semana (49 días de gestación) y continuando hasta la 13a (91 días de gestación). Durante éste tiempo una cantidad inferior a 3000 UI por 24 hrs en la orina se asocia con un aborto espontáneo inevitable --- (39). Si en lugar de una muestra de orina de las 24 hrs se emplea la muestra de orina de la mañana, los niveles de HCG por debajo de los 5×10^3 UI/l sugieren una gestación no viable.

En algunos casos, la prueba cuantitativa de HCG ha resultado -- valiosa en el diagnóstico de la mola hidatidiforme. A pesar de que algunos pacientes con dicha mola presentan niveles de HCG en la -- orina extremadamente elevados (hasta 6×10^6 UI/l), la mayoría muestran valores correspondientes al embarazo normal y algunos relativamente -- niveles bajos de HCG (5 UI/ml) (18).

El diagnóstico diferencial basado en los niveles de HCG resulta -- fácil por el hecho de que, durante el embarazo, las pruebas secuenc-

les tienden a seguir la curva normal de éste, mientras que la enfermedad trofoblástica, las pruebas repetidas a lo largo de varias semanas muestran fluctuaciones irregulares (39). Una vez que se ha realizado el diagnóstico de la enfermedad trofoblástica, los niveles urinarios de HCG proporcionan un indicador excelente de la respuesta al tratamiento (5).

En los coriocarcinomas tanto de hombres como de mujeres, los niveles de HCG también son elevados e irregulares.

La medición de HCG también ha sido aplicada en la predicción de gestación múltiple, en la detección de tumores uterinos, cervicales, en tumores de páncreas, estómago, pulmón y riñón. (13).

TABLA A.

Composición de carbohidratos de la HCG* (30)

CARBOHIDRATO	HCG-alfa	HCG-beta
Manosa	6.6	3
Galactosa	3.2	6.3
Fucosa	N.D.**	huellas
Glucosamina	8.5	7.0
Galactosamina	N.D.**	2.5
Acido siálico	3.5	7.3

* g/100 g (peso seco)

** N.D. = No detectable.

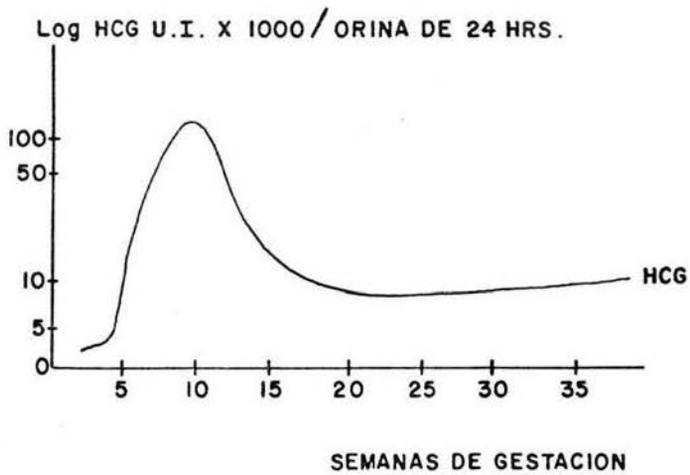


Fig. B.- Niveles urinarios de gonadotropina coriónica humana (HCG) durante el embarazo. (21).

ANTECEDENTES

Las primeras preparaciones de HCG purificada fueron obtenidas en la década de los 1940's, mediante la adsorción de la HCG presente en orina de mujeres embarazadas sobre ácido benzoico, realizando posteriormente extracciones con etanol al 50% y desnaturalizando selectivamente las proteínas contaminantes por agitación en cloroformo. Igualmente por estas fechas la HCG se adsorbe sobre permutita, eluyendo la hormona con acetato de amonio al 10% en etanol al 38% (17).

A principios de los 1950's se logra cristalización de la HCG con una solución de fosfatos a pH 3.5 que contenía etanol al 5% y m - cresol al 60% (17).

En los 20 años siguientes la química de la HCG, así como los procedimientos para su purificación no se mejoraron marcadamente.

En la década de los 1960's se reporta un esquema de purificación de HCG realizando pasos previos a los procedimientos ya reportados anteriormente. La hormona fue adsorbida de orina de mujeres embarazadas sobre ácido benzoico realizando extracciones con amortiguador de acetato 5M pH 4.5 y precipitando con acetona. El precipitado fue extraído con etanol al 50% en amortiguador de acetato pH 4.5 conteniendo 0.015M de Ca^{++} y la "actividad" la precipitaron con etanol pH 3 (17).

Posteriormente se desarrollaron mejores técnicas para el estudio y purificación de la HCG, en las cuales se utilizaron principalmente: fraccionamiento con etanol, cromatografía de intercam-

bio iónico, filtración en gel y precipitación isoeléctrica (16). Para la separación de las subunidades de la HCG se utilizó fundamentalmente: disociación con urea 8M, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis en poliacrilamida (13).

La adecuada separación de las subunidades de la HCG a permitido elucidar la secuencia de aminoácidos y composición química de las mismas.

JUSTIFICACION

El estudio de las gonadotropinas cobró impulso de 15 años a la fecha, su importancia radica en el mantenimiento de la homeostasis y reproducción del organismo. En éste trabajo se pretende desarrollar una metodología que permita purificar la cadena beta de la gonadotropina coriónica humana. lo que servirá a su vez para desarrollar métodos inmunológicos que detecten la hormona en suero.

OBJETIVO:

Desarrollar una metodología propia para la purificación de la HCG y obtención de la subunidad beta a partir de orina de mujeres embarazadas.

METAS:

--Purificación de la HCG por medio de cromatografía de afinidad.

--Obtención de la subunidad beta de la HCG por medio de cromatografía de intercambio iónico.

--Identificación de la subunidad beta obtenida por pruebas inmunológicas de tipo ELISA.

Materiales y Métodos

- I. Inmunización de animales.
- II. Precipitación de la fracción gamma globulina.
- III. Cuantificación de proteínas.
- IV. Titulación de anticuerpos.
- V. Preparación del inmunoadsorbente con glutaraldehído.
- VI. Preparación del inmunoadsorbente con sefarosa AH 4b.
- VII. Tratamiento de las muestras.
- VIII. Purificación de la HCG por cromatografía de afinidad.
- IX. Inmunolectroforésis en agar.
- X. Electroforésis en geles de poliacrilamida.
- XI. Disociación y separación de la subunidad beta de la HCG.
- XII. Determinación inmunoenzimática de la HCG y subunidad beta.

I. Inmunización de animales.

Se conoce como inmunización al proceso mediante el cual, se -- induce una respuesta inmunológica en un individuo inmunocompetente, a consecuencia del contacto con un antígeno en forma natural o arti ficial. La respuesta inmune obtenida puede ser humoral o celular o ambas dependiendo del tipo de antígeno y de la dosis (8. 35).

En el caso de la respuesta humoral, el suero con un alto con tenido de anticuerpos se conoce como antisuero o suero hiperinmune.

Procedimiento:

Se inmunizaron 3 conejos Nueva Zelanda de 3 meses de edad, ba jo el siguiente esquema de inmunización:

Inyección	Día	Procedimiento
1	1	5mg de HCG comercial (Gonadotrotyl-C, Russell) disueltos en 1ml solución sa lina + 1ml de adjuvante completo de -- Freund. Vía intradérmica en sitios mul tiples.
2	15	Igual que la anterior, pero usando aho ra adjuvante incompleto.
3	30	0.250mg de HCG disueltos en solución - salina 1ml vía intravenosa.
4	31	0.500mg de HCG disueltos en 1ml de so lución salina vía intravenosa.
Sangrar	39	

II. Precipitación de la fracción gamma globulina anti-HCG con sulfato de amonio.

La precipitación de la gamma globulina por este método se debe al fenómeno de "precipitación salina" el cuál consiste en que -- las moléculas de agua que solvatan a la molécula del anticuerpo son desplazadas por los iones sulfato y amonio, que además neutralizan los grupos cargados de la proteína, la cual llega a su punto isoe-- léctrico y precipita. (22).

Por lo general son suficientes 3 precipitaciones con una con-- centración final de sulfato de amonio al 33% de saturación.

Procedimiento:

1. A un volumen de suero se adiciona gota a gota solución de sulfato de amonio saturado pH 7.8, hasta alcanzar igual volumen del suero original (concentración final 50% de saturación).
2. Una vez que esta bien agitado, se centrifuga a 3 500 rpm 15 min.
3. El precipitado se disuelve en solución salina pH 7.8 hasta al--- canzár el volumen del suero original.
4. Se repiten los pasos 1, 2, 3, sólo que ahora la concentración fi-- nal deberá ser de 33% de saturación, es decir se adicionará la - mital de sulfato de amonio saturado con respecto al volumen de - suero original.
5. El último precipitado se disuelve en solución salina amortiguadora de boratos* hasta alcanzar la mitad del volumen del suero ori

ginal.

6. Se dializa contra solución salina amortiguadora de boratos a --
4°C durante 3 días realizando 2 cambios diarios.
7. La muestra una vez dializada se centrifuga a 3 500 rpm por 30 min
para la eliminación de cualquier agregado.

*Ver apendice.

III. Cuantificación de proteínas. Por el método de Lowry. (29)

1. Se mezclarón 50 ml de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N con 0.5 ml de CuSO_4 al 1% y 0.5 ml de tartrato de Na y K al 2% (v/v). La mezcla se preparó al momento de usarse.
2. En tubos de ensaye de 13X100 se colocarón por duplicado 0.1 ml de la muestra problema y del patrón (400ug de albúmina sérica -- bovina por ml). Se ajustó el volumen de cada muestra a 1 ml con solución salina y se adicionó con agitación 3ml de la mezcla de reactivos (paso 1), dejándose en reposo 15 min. En la serie se incluyó por duplicado 1 ml de solución salina como control de reactivos.
3. Después de éste tiempo se adicionó a cada tubo 0.1 ml del reactivo de Folin Cicolteau y se agitaron inmediatamente dejándose reposar 30 min a temperatura ambiente.
4. Al término de este tiempo se determinó la absorbancia de cada tubo a 680 nm ajustando el aparato a cero con el control de reactivos.
5. Para conocer la concentración de proteínas de la muestra, la absorbancia se interpoló en una curva standar que abarca un rango de concentraciones desde 20 a 200 ug de proteína por 1 ml.

IV. Titulación de anticuerpos por hemaglutinación pasiva.

Las técnicas de aglutinación han llegado a ser métodos muy eficaces para el descubrimiento de cantidades pequeñas de anticuerpo, desde que se demostró que los eritrocitos podían absorber polisacáridos, y que los glóbulos rojos que se tratan con ácido tánico pueden recubrirse con antígenos proteicos, estos eritrocitos revestidos son aglutinados por los anticuerpos específicos para el antígeno que ha sido adsorbido (hemaglutinación pasiva). (20, 35).

Procedimiento:

La hemaglutinación se realizó en una placa de poliestireno para microhemaglutinación, de 96 pozos de fondo en "U".

1. Se prepararon diluciones de la gamma globulina anti-HCG de la manera siguiente: a 12 pozos se adicionaron 50 ul de SNC-ASB agregando después al pozo número 1 50 ul de gamma anti-HCG mezclando perfectamente, con la misma punta de la micropipeta se transfieren 50 ul del pozo 1 al pozo 2 y así sucesivamente a todos los pozos desechando los últimos 50 ul del pozo 12.
2. Se adicionaron 50 ul de eritrocitos recubiertos de HCG (laboratorios Lafón) al 2% en PBS*.
3. En los pozos 13, 14 y 15 se mezclaron 50 ul de SNC-ASB con 50 ul de eritrocitos recubiertos con HCG. Estos pozos son testigo de los eritrocitos.
4. A los pozos 16, 17 y 18 se mezclaron 50 ul de la gamma-globulina anti-HCG con 50 ul de eritrocitos normales de conejo. Estos

fueron testigo de la gamma-globulina.

5. Se incubo la placa a 37°C durante 60 min.
6. Se observó la presencia de aglutinación del pozo.

El título de la gamma-globulina anti-HCG se reporta como la re
cíproca de la máxima dilución en la cual aún se observó aglutina---
ción.

* Ver apendice.

V. Preparación del inmunoadsorbente con glutaraldehído. (4).

El uso de inmunoadsorbentes ha resultado el problema que se -- presenta frecuentemente, cuando se requiere purificar antígenos o -- anticuerpos, que se encuentran mezclados con otros componentes. Una forma de prepararlos es insolubilizando los anticuerpos con gluta-- raldehído (4).

Procedimiento:

1. A 10 ml de la fracción gamma-globulina anti-HCG que previamente se dializó contra PBS, se adicionaron 2 ml de glutaraldehído al 25% en agua destilada, gota a gota y agitando constantemente.
2. Se refrigeró toda la noche a 4°C para lograr una gelificación -- completa.
3. Se adiciono 5 ml de PBS y fraccionar el gel formado con un homogenizador Potter (de ajuste suave).
4. Centrifugar a 3000 rpm por 15 min y leer el sobrenadante a 280nm
5. Repetir el paso 4.
6. Suspender la proteína insoluble en 30 ml de regulador de glicina HCl*pH 2.8.
7. Centrifugar a 3000 rpm 15 min y determinar la absorbancia del -- sobrenadante a 280 nm. Repetir los pasos 5 y 6 hasta que la ab-- sorbancia sea menor a 0.020.
8. Suspender la proteína insoluble en 30 ml de PBS Dejar reposar 1 hr. Eliminar el sobrenadante para retirar partículas pequeñas - Repetir este paso.

9. Preparar la columna, empacando la proteína insolubilizada en una jeringa de 10 ml que previamente se tapó con lana de vidrio para evitar la salida del gel.
10. Guardar la columna a 4°C con mertiolate al 0.01% en PBS.

* Ver apendice.

VI. Preparación del inmunoadsorbente acoplado los anticuerpos anti
-HCG a sefarosa AH 4B.

Parath introdujo el uso de la sefarosa para preparar conjuga-- dos proteicos insolubles. Estas preparaciones son útiles para la pu rificación de alguna protefna que se une específicamente al conjuga do anticuerpo-sefarosa. Por otra parte la protefna también puede - conjugarse a la sefarosa y el absorbente obtenido puede utilizarse para la separación del anticuerpo correspondiente.

La sefarosa 4b AH, es una sefarosa con un brazo espaciador de 6 carbonos al cual se une el ligando facilitando la unión con la -- protefna por absorber. Los ligandos se unen mediante carbodimida a través de un enlace peptídico o amida. La sefarosa AH 4b tiene gru pos amino libres. El brazo espaciador es importante para ligandos + pequeños con multiples subunidades y para protefnas de muy alto pe so molecular (28).

Procedimiento:

1. 2.5 gr de sefarosa AH 4b en polvo se hidrato en NaCl 0.5M hasta formar 10ml de gel.
2. El gel hidratado se lavó con 200 ml/gr NaCl 0.5M.
3. Se lavó el gel con agua destilada pH 4.5 (50 ml/gr).
4. Para la unión de los ligandos se utilizó carbodimida (1 etil, 3 dimetil aminopropil carbodimida) EDC o ciclo hexil (2-morfil- -- inoetil) carbodimida.

El EDC se disolvio en agua destilada pH 4.5. La concentración

de ser más alta que la de los grupos espaciadores; 6-10 $\mu\text{m}/\text{ml}$ del gel hidratado de sefarosa AH 4b.

En general se utilizan 10mg de EDC por 1 ml de gel hidratado.

5. El acoplamiento se llevó acabo en medio ácido pH 4.5, pero se tiene que ajustar con NaOH 0.1M o HCl 0.1M según sea el caso.
6. El ligando (10ml de la fracción gamma-globulina-anti-HCG) se dializó previamente contra agua destilada pH 4.5
7. El gel se dejó sedimentar y se desecha el agua de pH 4.5
8. Se mezcló en 1ml de agua pH 4.5 la proteína ligando con los 10mg de carbodimida con una pipeta pasteur y se adicionó al gel de sefarosa inmediatamente.
9. La mezcla se dejó toda la noche a 4°C con agitación lenta.
10. Los grupos libres de la sefarosa se bloquearon con ácido acético 0.1M, lavando con aproximadamente 200 ml.
11. Se lavó el inmunoadsorbente con agua destilada pH 4.5 hasta que el sobrenadante de una lectura de absorbancia a 280 nm menor a 0.020.
12. El gel se empaco en una columna (jeringa de 10ml) la cual previamente se tapo con lana de vidrio para evitar la salida del gel.
13. La columna se lavó con aproximadamente 200ml de PBS y se guardó a 4°C con mertiolate al 0.01% en PBS.

VII. Tratamiento de las muestras.

La orina fué colectada en el primer trimestre de gestación que es en este momento cuando la HCG alcanza su punto máximo de secreción (1, 16, 18, 19, 36). A la orina primeramente se le práctico la prueba de presencia de HCG (prenatest de Lafón y Mercktest de Merck) y las que fueron positivas se centrifugarón para la eliminación de sedimento para posteriormente formar un banco y conservarlas a -20°C hasta su uso.

Se buscaba las condiciones óptimas de la orina para la obtención máxima de HCG; para el caso del inmunoadsorbente realizado con -- glutaraldehído se hicieron los siguientes tratamientos:

- a) La orina sólo se centrifugó a 3000 rpm 15 min a temperatura ambiente.
- b) La orina se dializó contra PBS durante tres días y realizando 2 - cambios diarios.
- c) A la orina sólo se le ajusto el pH a 7.0

Para el inmunoadsorbente de sefarosa AH 4b, puesto que algunos pigmentos presentes en la orina que no fueron eliminados por el procedimiento seguido y que tapaban a este inmunoadsorbente se eliminaron de la manera siguiente:

- A) La orina se filtró en una columna de sefadex G-25 de 1.2X25 cm.
- B) Las proteínas de la orina fueron precipitadas de la manera siguiente: 20 ml de orina + 10 ml de HCl 0.5N + 80ml de acerona por -- debajo del nivel de la orina; se mezclaron perfectamente y se centrifugarón a temperatura ambiente a 5000 rpm 20 min y el precipi-

tado se resuspendió en 6ml de PBS frío (4°C) lo cual fué lo que -
pasó por el inmunoadsorbente.

VIII. Purificación de HCG por cromatografía de afinidad.

A continuación se describe el manejo de las columnas inmunoabsorbentes, utilizadas para la purificación de la HCG presente en -- orina de mujeres embarazadas. En general se sigue el mismo procedimiento para el uso de las columnas de geles inmunoabsorbentes de sefarosa-proteína, y de glutaraldehído.

Procedimiento:

1. La columna del inmunoabsorbente se lavó con PBS, utilizando un -- volumen 5 veces mayor que el volumen del gel.
2. Se pasó la muestra de orina (10ml) que previamente se trató por el inmunoabsorbente, cerrando la columna para incubar la muestra con el inmunoabsorbente por 30 min, a temperatura ambiente.
3. La columna se lavó con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm fué menor a 0.020, para que fuera eliminado lo que no fué adsorbido por el inmunoabsorbente.
4. Se pasó amortiguador de glicina-HCl pH 2.8 a través de la columna, para eluir las fracciones fijadas por el inmunoabsorbente.
5. Se colectó fracciones de 1ml en tubos de ensaye con una gota de -- NaOH 0.1 N para neutralizar el pH dado por el regulador de glicina -HCl. Se continuó eluyendo hasta que las absorbancias a 280 nm -- fueron menores a 0.020.
6. Se lavó la columna con PBS (aproximadamente 200ml) y se guardó la columna con mertiholate al 0.1% en PBS y a 4°C.

7. Fueron seleccionadas las fracciones que presentaron mayor concentración de HCG.
8. Se repitieron los pasos anteriores hasta obtener 10mg/HCG.

IX. Inmunolectroforésis en agar.

Una vez que se obtuvo la HCG, se probó su inmunoespecificidad con su anticuerpo respectivo por medio de inmunolectroforésis y además se probó también la pureza de la misma por medio de electroforésis en geles de poliacrilamida así como para la determinación de su peso molecular.

La inmunolectroforésis es una técnica que combina una separación electroforética inicial de las proteínas seguidas por inmunodifusión con la formación de arcos de precipitación, como consecuencia de la adición del antisuero específico para esas proteínas. Esta prueba es ampliamente utilizada para determinar la pureza de la sustancia antigénica. (2).

Procedimiento:

1. Para preparar los geles de agarosa para la inmunolectroforésis se utilizó agarosa al 1.2% en regulador de barbituratos pH 8.6*. La agarosa fué disuelta con calor.
2. En la solución aún caliente se sumergieron portaobjetos limpios y desengrasados, los cuales posteriormente fueron secados y colocados en un horno precalentado a 100°C hasta que se secaron por completo.
3. Los portaobjetos secos se colocaron en una superficie completamente horizontal y con la ayuda de una pipeta de punta ancha se adiciona a cada una 4 ml de agar caliente y se dejó gelificar a temperatura ambiente.

4. Con la ayuda de un "saca bocados", se practican perforaciones circulares retirando el agar residual. Igualmente se práctico un canal longitudinal paralelo al eje mayor del portaobjetos, pero sin retirar el agar residual.
5. En el recipiente de la cámara de elcetroforésis se añadió la cantidad necesaria de regulador de barbituratos. Se acomodaron los portaobjetos, se estableció el contacto entre la placa de agar y el regulador mediante tiras de papel filtro.
6. En las perforaciones del gel se colocaron 30 ul de la HCG obtenida a través del inmunoadsorbente y en el otro 30 ul de orina concentrada de mujer embarazada conteniendo azul de bromofenol como indicador.
7. Se conectó la cámara de electroforésis a la fuente de poder y se ajusta a 8-10 volts/cm de gel.
8. Una vez termiando el corrimiento electroforético, se retiro el remanente del agar del canal longitudinal y se adicionó en él -- 50ul de gamma- anti-HCG.
9. SE colocaron los portaobjetos en la cámara humeda a 4°C durante 24 Hrs.

* Ver apendice.

Tinción de Placas.

1. Los portaobjetos fueron colocados en NaCl 0.85% para lavar el -

exceso de proteínas que no formaron bandas de precipitación.

2. Se repitió el paso 1 tres veces.
3. Se lavaron los portaobjetos con agua destilada y después se secaron colocandolos en papel filtro a temperatura ambiente o 40°C.
4. Se despegó el papel filtro de los portaobjetos humedeciéndolos con agua destilada.
5. Los portaobjetos se sumergieron en azul de coomasie-ácido acético por 15 min.
6. Por último se sumergieron los portaobjetos en decolorante alcoholácido acético.
7. Se observó el número de bandas de precipitación aparecidas.

X. Electroforésis en geles de poliacrilamida.

Para conocer el grado de pureza de la HCG obtenida a través del inmunoadsorbente, así como para la determinación de su peso molecular, se procedió analizarlos mediante electroforésis en geles de poliacrilamida (EFGP).

En los soportes para electroforésis constituido, por geles, el paso de cualquier partícula depende en parte del tamaño relativo de la partícula con el de los poros del gel, por lo tanto, en los procesos electroforéticos en geles, el tamaño molecular y la carga eléctrica son factores muy importantes. En los geles formados por agarosa, el tamaño de los poros es muy grande y por ello, la influencia del tamaño molecular no es muy relevante, en cambio en los geles de poliacrilamida el tamaño molecular es determinante para la separación (2).

Procedimiento:

- 1) Gel de corrimiento: se preparó en un matraz kitasato una mezcla formada por:
 - 1.1) 12.5 ml de una solución de acrilamida-bisacrilamida* al 30.8%
 - 1.2) 7.5 ml de solución reguladora de tris-HCl* 1.5 M pH 8.8
 - 1.3) 9.55 ml de agua destilada.
 - 1.4) 0.6 ml de SDS al 10%

Esta mezcla se degasificó mediante vacío agitando suavemente durante 20min. Para celebrar la polimerización de la acrilamida se adicionó 7.5 ul de N, N, N, N, N tetrametiletildiamina (TEMED) y 50 ul de persulfato de amonio al 10%, recién preparado. Se vertió rápida-

mente en el molde de la cámara del equipo de electroforésis para obtener una superficie perfectamente horizontal del gel. Antes de que polimerizara la mezcla se colocó una capa de agua destilada de aproximadamente 2 cm de altura con la ayuda de una jeringa. Se dejó en reposo 18 hrs a temperatura ambiente.

2) Gel espaciador. Una vez asegurada la polimerización del gel del corrimiento, se eliminó la capa de agua por vaciamiento, absorbiendo el remanente con papel filtro. Sobre la superficie del gel se aplicó 6.75 ml de la mezcla del gel espaciador la cual se preparó con:

- 2.1) 1.25 ml de solución acrilamida-bisacrilamida al 30.8%.
- 2.2) 1.875 ml de solución reguladora de tris-HCl 0.5 M* pH 6.8
- 2.3) 4.275 ml de agua destilada
- 2.4) 75 μ l de SDS al 10%

Esta mezcla se degasificó mediante vacío agitando suavemente y durante 20 min y después se adicionó 3.75 μ l de TEMED y 25 μ l de persulfato de amonio al 10%. Se mezcló y de inmediato se vertió sobre el gel de corrimiento colocando antes de que polimerizara un molde (peine) para la formación de los sitios de aplicación de las muestras (canales) evitando la formación de burbujas. Una vez que el gel espaciador polimerizó se llenaron los compartimientos de la cámara con solución reguladora de corrimiento*. Así mismo, se extrajo el "peine" evitando que los canales se deformaran o quebraran. En estas condiciones se efectuaron 5 lavados a los canales con solución reguladora de corrimiento y posteriormente se realizó una preelectroforésis a 25 mA por 15 min.

3. Aplicación de las muestras:

3.1) Las muestras se mezclaron en relación 1:1 con amortiguador de muestra 2X*

Las muestras se vertieron en cada canal evitando que se mezclaran con la solución de corrimiento. En el caso de la muestra de HCG se colocaron 14 ug por cada canal; para las muestras de proteínas patrón se colocaron 6 ul. (Electrophoresis calibration Kit. Pharmacia lote 5128).

4. Corrimiento electroforético.

4.1) Para la migración de las muestras en el gel espaciador se aplicaron 15 mA por placa y una vez que el indicador penetró en el gel de corrimiento se incrementó el amperaje a 30 mA por placa. La electroforesis se suspendió hasta que el colorante se desplazó cerca de 12 cm desde el punto de aplicación.

5. Tinción de los geles.

5.1) El gel se saco de la cámara y se introdujo en una solución fijadora de colorante* durante 2 ó 3 hrs y para eliminar el excedente de colorante el gel se dializó en una solución de ácido acético-metanol-agua (1:5:5) efectuando varios cambios y cuidando que no se excediera el proceso de decoloración. Los geles se guardaron en ácido acético al 7%.

Cabe mencionar que se tomaron medidas del máximo corrimiento del indicador, así como de la migración de las proteínas para la obtención de los Rf's y así calcular el peso molecular de las proteínas problema.

* Ver apendice.

XI. Disociación y separación de la subunidad beta de la HCG obtenida por medio de cromatografía de intercambio iónico.

La disociación de la HCG se llevo a cabo por la técnica descrita por Morgan y Canfield en 1971. (31).

La cromatografía de intercambio iónico es una forma de cromatografía en la cual la separación se lleva a cabo con base en las diferencias cualitativas y cuantitativas en la carga de los solutos.

La resina es una red macromolecular mineral u organica portadora de cargas eléctricas que retienen a su alrededor por simple atracción electrostática a los iones que se van a cambiar y que pueden pasar a la solución.

La separación de la sustancia líquida se produce cuando la elución de la matriz haga disminuir la fuerza de unión. También puede obtenerse la separación con diferencias de carga muy pequeña.

Procedimiento:

1. Se disolvió 4 mg de HCG obtenida en 4 ml de urea 10M pH 4.5
2. Se incubó 1 hr a 37°C.
3. Se adicionó 1 ml de glicina 0.03M y ajustar el pH a 7.5 con NaOH 0.001 M.
4. El volumen obtenido se paso a una columna de DEAE-Trisacryl M (intercambiador aniónico con un diámetro de 40-80 μm) de 8 X 2.5 cm, la cual previamente fué equilibrada con buffer de glicina-urea pH 7.5*.
5. Se comenzó el lavado con amortiguador de glicina-urea pH 7.5, hasta que la absorbancia a 280 nm sea menor a 0.020.

6. Se cambio de amortiguador de elución a glicina-NaCl-urea pH 7.5* realizando colectas de 1 ml las cuales se acidificaron con una gota de HCl 1 N.
7. Las fracciones que presentaron las absorbancias mayores a 280 nm se dializarón contra ácido acetico al 1% por 12 hrs y después contra PBS y se refrigeraron a -20°C.

* Ver apendice.

La determinación del grado de pureza así como la determinación del peso molecular de la subunidad beta obtenida, se realizó igualmente por medio de electroforésis en geles de polacrilamida, la -- cual anteriormente fué descrita.

XIII. Determinación inmunoenzimática de la HCG y subunidad beta.

En el inmunoensayo enzimático (ELISA, enzyme linked immunosorbent assay) se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima. En estas condiciones el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción en la cual, el sustrato se transforma en un producto coloreado. Otra característica importante del sistema es la unión del antígeno o anticuerpo a una fase sólida insoluble en la cual los componentes de la reacción inmunológica son retenidos (38).

En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima. En cambio en los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo está unido contra un primer anticuerpo el cual ya reaccionó con el antígeno. (20).

Procedimiento:

El ELISA se realizó en una placa de plástico de poliestireno para ELISA, de 96 pozos de fondo plano.

1. Las muestras y el control (HCG comercial se Sigma) se diluyeron en amortiguador de recubrimiento* en diluciones seriadas.
2. Se colocaron 200 ul de las diluciones en cada pozo respectivo.
3. Se incubó toda la noche a 4°C.
4. Se retiró el líquido excedente.
5. Se adicionó 200 ul a cada pozo de PBS-tween-albumina* incubando por 1 hr a temperatura ambiente.

6. Se lavo dos veces con PBS-tween-albumina, aspirando el líquido -- excedente.
7. 200 ul del conjugado anti-subunidad beta de la HCG (comercial de ABBOT Laboratories) se adicionaron incubando por 3 hrs a temperatura ambiente.
8. Se lavo 3 veces con PBS -tween, retirando el líquido excedente.
9. Se colocaron 200 ul a cada pozo de sustrato* para la enzima que - fué peroxidasa.
10. Se incubo por 30 min y se detuvo la reacción con H_2SO_4 30 ul por pozo.
11. La lectura se realizó a 429 nm.

* Ver apendice.

RESULTADOS

El título de la fracción gamma globulina anti-HCG obtenido por medio de la hemaglutinación pasiva fué de 1:32 768 y con una concentración de proteína de 23 mg/ml (aproximadamente 20 ml), determinada por el método de Lowry (29).

El inmunoadsorbente obtenido con la insolubilización de anticuerpos anti- HCG por medio de glutaraldehído, y en donde la muestra de orina se trató de tres maneras diferentes, se observa en la gráfica 1 que se obtuvo una mejor adsorción al emplear la muestra dializada previamente contra PBS, que cuando se empleó la muestra intacta.

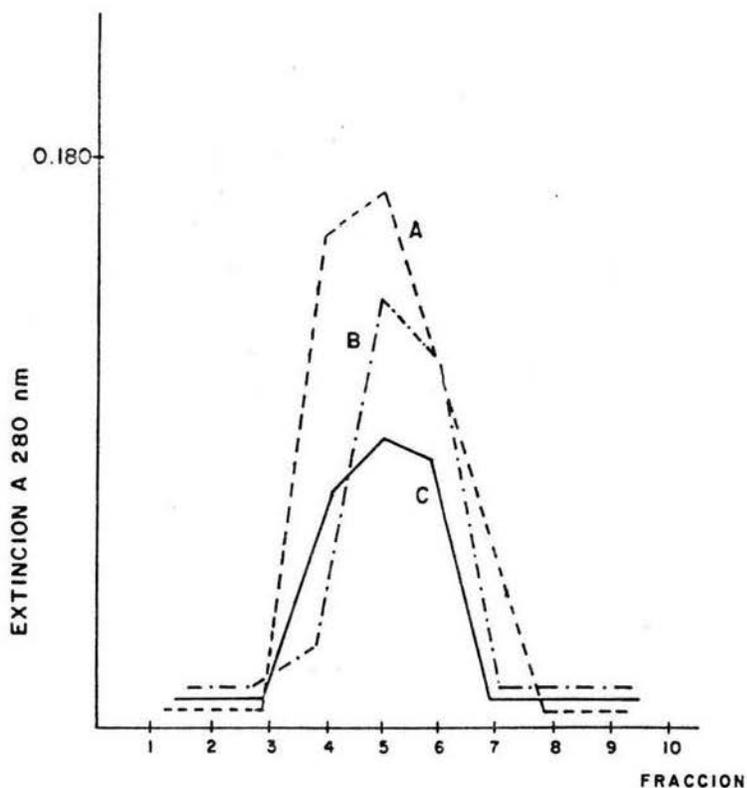
Al acoplar los anticuerpos anti-HCG a sefarosa AH 4b con carboximidida, se aprecia en la gráfica 2 que con la muestra tratada previamente con acetona se obtiene una mayor adsorción de HCG, con respecto a la muestra que se filtró en sefadex G-25.

Los resultados presentados en la gráfica 3 representan la comparación entre los dos inmunoadsorbentes obtenidos, observándose que el inmunoadsorbente de sefarosa AH 4b es más eficiente en cuanto a adsorción se refiere.

La inmunolectroforésis realizada (ver figura 1) para la proteína obtenida a partir del inmunoadsorbente de sefarosa AH 4b la HCG comercial (sigma) que se utilizó como control, se observó que aparece solamente una banda de precipitación para las dos muestras y a la misma altura al ponerlas en contacto con el suero anti-HCG.

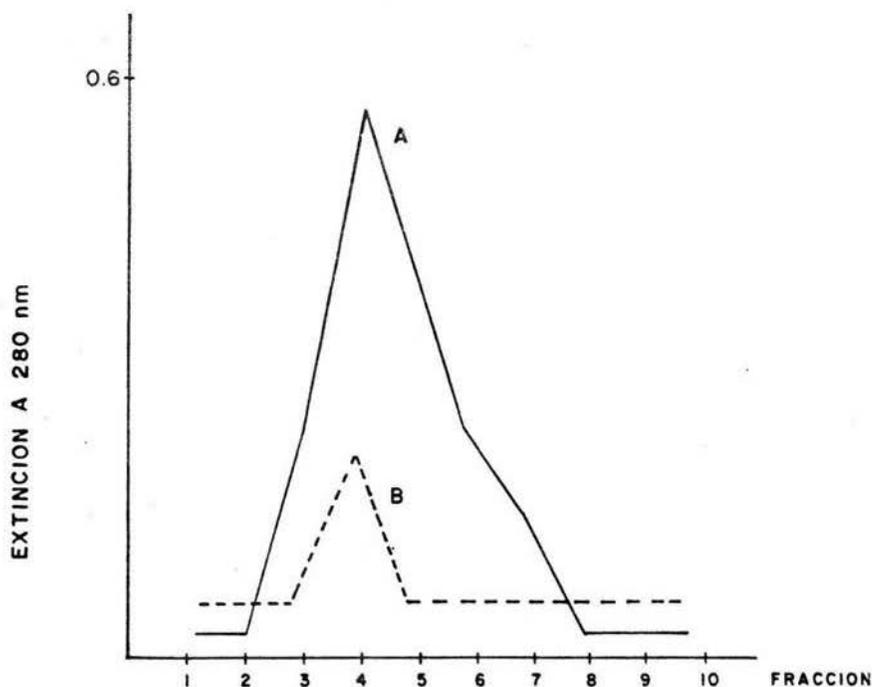
En la electroforésis en geles de poliacrilamida para la HCG ob-

Obtención de HCG por medio del inmunoadsorbente realizado con glutaraldehído con 3 tratamientos diferentes de la muestra.



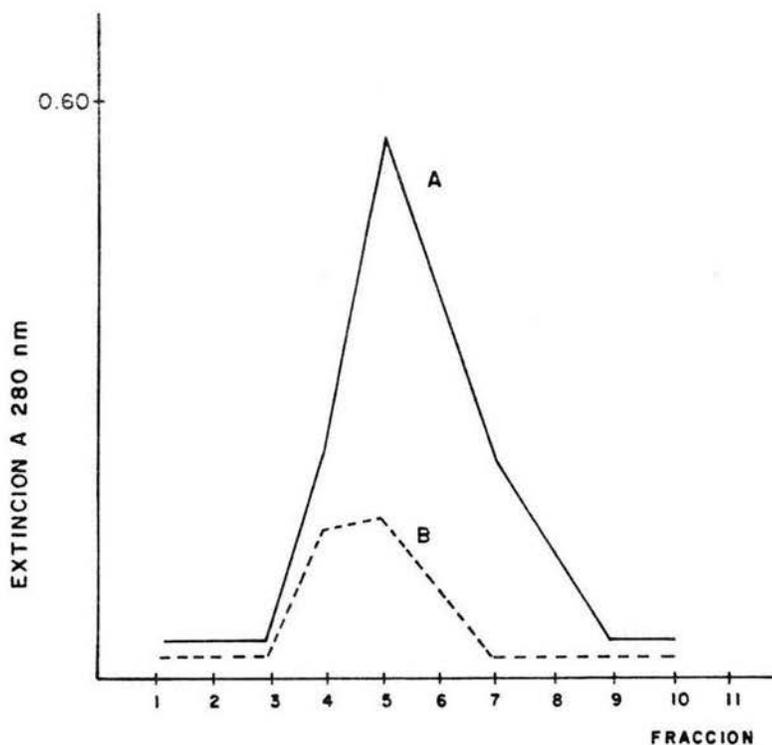
Gráfica 1.- Obtención de HCG por medio del inmunoadsorbente realizado con glutaraldehído con 3 tratamientos diferentes de la muestra. Se observa que cuando la muestra se dializó contra PBS se obtiene una mayor adsorción (A), con respecto a las muestras en donde sólo se ajustó el pH a 7.2 (B) y cuando la muestra se corrió intacta (C).

Obtención de HCG por medio del inmunoabsorbente realizado con sefarosa AH 4b acoplado los anticuerpos con carbodimida.



Gráfica 2.- Obtención de HCG por medio del inmunoabsorbente - realizado con sefarosa AH 4b acoplado los anticuerpos con carbodimida. Se aprecia que tratando la muestra previamente con acetona (A) existe una adsorción mayor en comparación con la muestra filtrada en sefadex G-25 (B).

Comparación entre los inmunoabsorbentes realizados con glutaraldhido y con sefarosa AH 4b, tratando la muestra de orina como se obtuvo la máxima adsorción.



Gráfica 3.- Comparación entre los inmunoabsorbentes para la máxima adsorción de HCG. En donde se puede apreciar que cuando la muestra de orina es pasada por el inmunoabsorbente de sefarosa AH 4b y en donde los anticuerpos se acoplaron con carbodimida se obtiene una mayor adsorción con respecto al inmunoabsorbente realizado con glutaraldehído. (B).

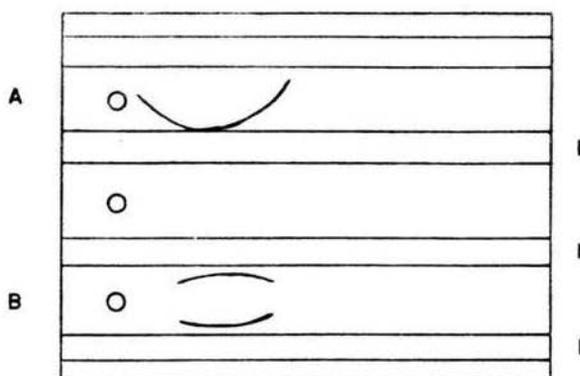


Fig. 1 Inmunolectroforésis para demostrar la rectividad de los anticuerpos anti-HCG Donde:

A. HCG de laboratorios Sigma.

B. HCG obtenida por el inmunoadsorbente de - sefarosa AH 4b.

1. Suero de conejo anti-HCG

Se aprecia la aparición de una sólo banda que es hómologa para ambas HCG.

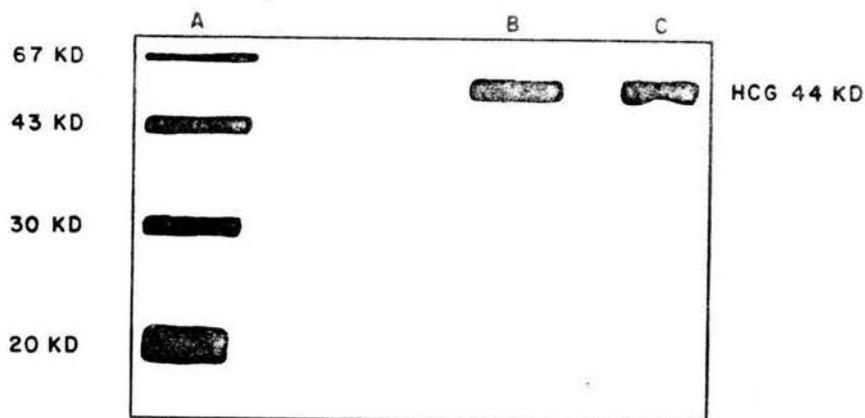
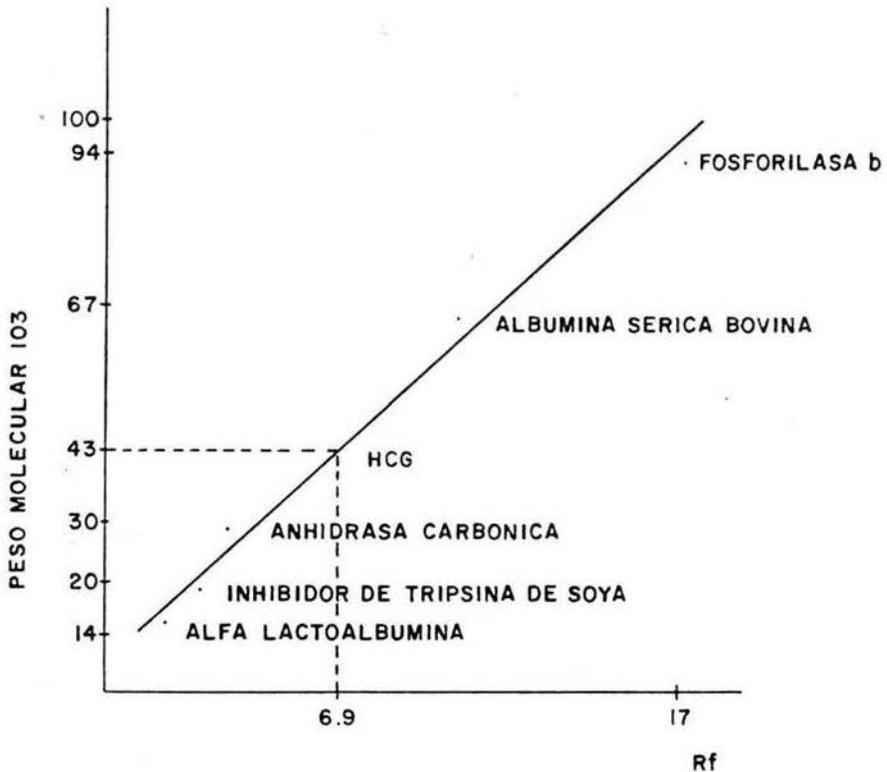


Fig. 2 Electroforésis en geles de poliacrilamida para la HCG obtenida através del in^{mu}noadsorbente de sefarosa AH 4b. Donde:

- A. Marcadores de peso molecular conocido.
- B. 20 ug de HCG obtenida por el in^{mu}noadsorbente.
- C. 30 ug de HCG obtenida por el in^{mu}noadsorbente.

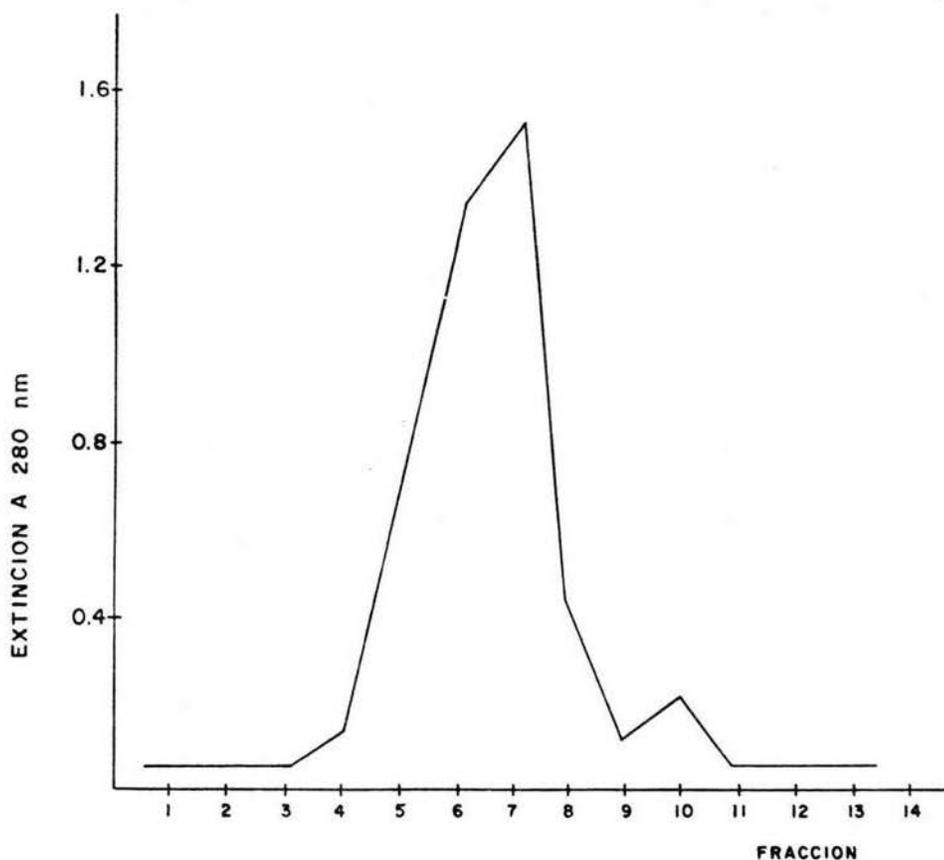
Se puede apreciar una s^ola banda para la HCG a -- dos diferentes concentraciones, lo cual es buen -- indicio de p^ureza.

Determinación del peso molecular de la HCG purificada.



Gráfica 4.- Determinación del peso molecular de la HCG purificada, observando que al ser interpolado su Rf -- (6.9) corresponde a un peso molecular de 44mil -- daltones.

Purificación de la subunidad beta de la HCG por medio de intercambio iónico.



Gráfica 5.- Purificación de la subunidad beta de la HCG obtenida, por medio de intercambio iónico (DEAE-try--sacril). La elución para la obtención de ésta subunidad se llevó a cabo con buffer de glicina 0.2 M-NaCl 1 M-urea 8 M, observandose un sólo pico de máxima absorción el cual más tarde se corroboró que pertenece a la subunidad beta de la HCG.

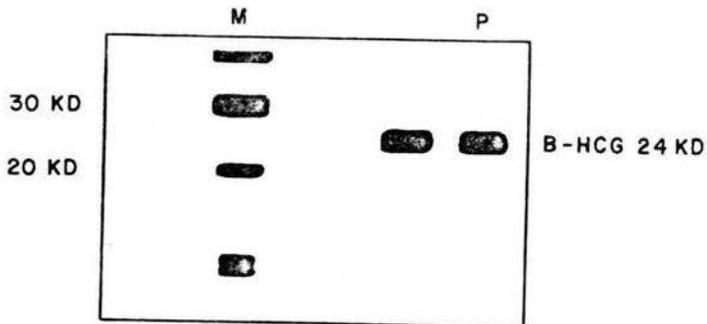


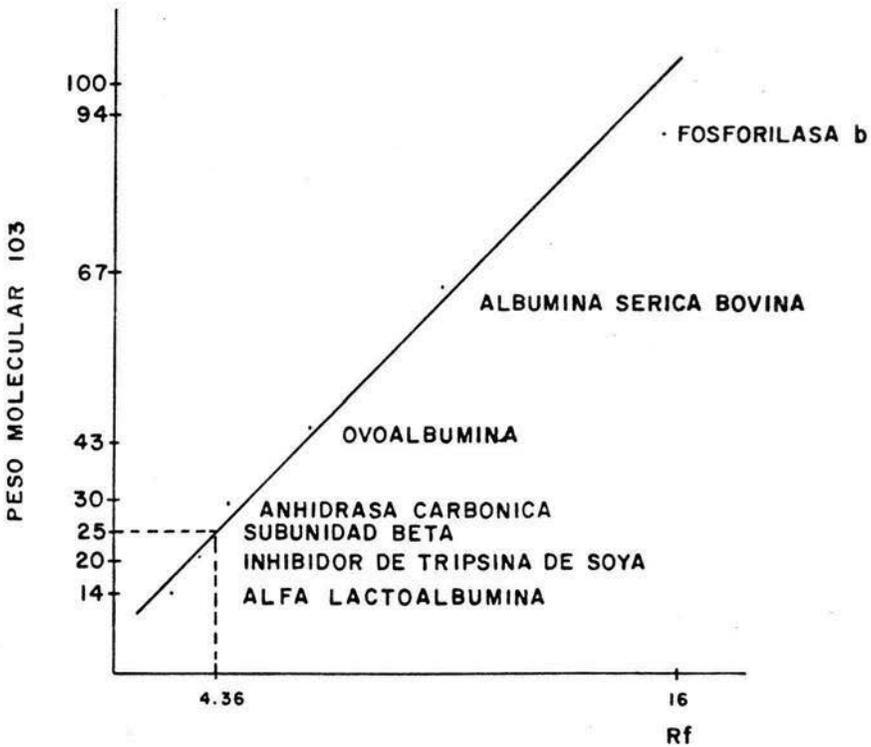
Fig. 3 Electroforésis en geles de poliacrilamida para la subunidad beta de la HCG, obtenida --- a través de intercambio iónico. Donde:

M. Marcadores de peso molecular conocido.

P. 15 ug de subunidad beta de la HCG.

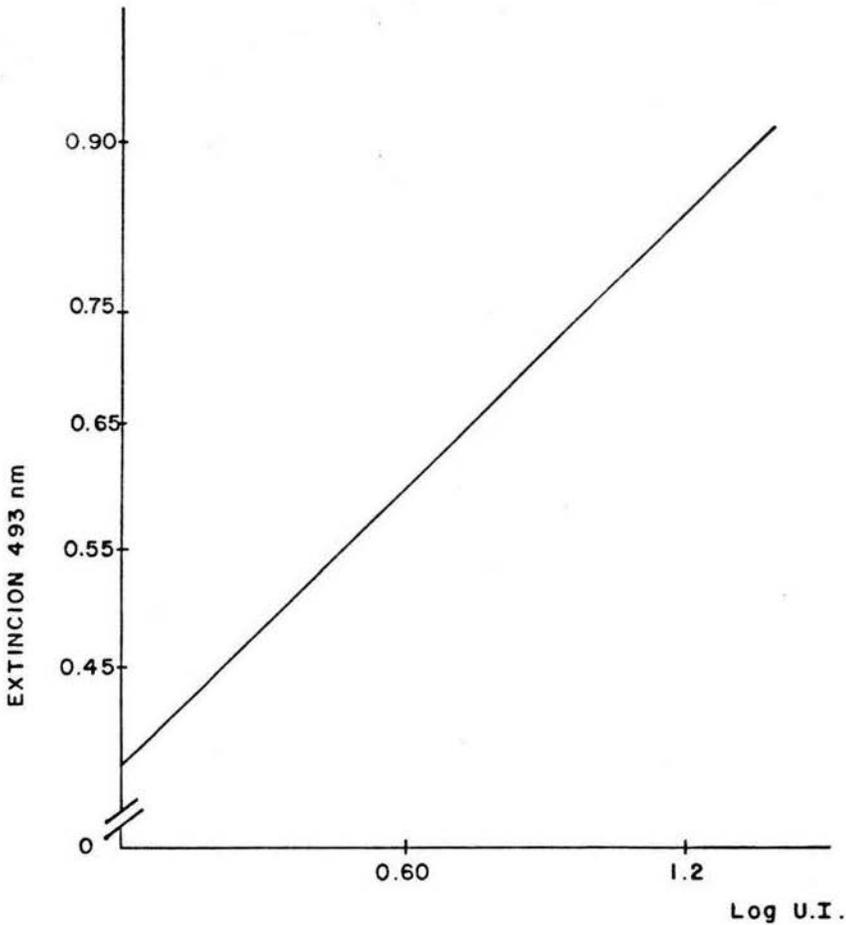
Se aprecia una sólo banda para la subunidad beta lo cual indica cierto grado de pureza. - El peso molecular correspondiente para esa banda es de 24 000 daltones.

Determinación del peso molecular de la subunidad beta de HCG purificada.



Gráfica 6.- Determinación del peso molecular de la subunidad beta de la HCG. Al ser interpolado el Rf de dicha subunidad se aprecia que corresponde a un peso molecular de 25 mil daltones.

Ensayo inmunoenzimático de la HCG y subunidad beta.



Gráfica 7.- Ensayo inmunoenzimático de la HCG y subunidad beta purificadas, en donde se aprecia que al ser interpolado la absorbancia de lug de HCG (0.539) se obtiene 2.42 U I y que la absorbancia de lug de subunidad beta (0.672) corresponden a 4.86 U I.

tenida a través del inmunoabsorbente de sefarosa AH 4b a partir de orina de mujeres embarazadas, se aprecia en la fig 2 la aparición de una sólo banda que al obtener su R_f y al ser interpolado en la curva tipo para la determinación de pesos moleculares gráfica 4), se tiene un peso molecular para esa proteína de aproximadamente 44 000 daltones.

Para la obtención de la eficiencia total del método, para la purificación de HCG por medio del inmunoabsorbente de sefarosa AH 4b se adicionó una concentración conocida de HCG (sigma) 2mg a una muestra de orina de mujer normal (6 ml), determinándose concentración de proteína en cada paso del método, y se encontró que la eficiencia total del método fue del 83% que corresponden a una captura total del inmunoabsorbente de 1.6 mg de HCG.

Una vez que se obtuvo la HCG purificada, se procedió a su disociación y separación de la subunidad beta por cromatografía de intercambio iónico. En la gráfica 5 se aprecia un sólo pico de máxima adsorción, que al pasarlo por electroforesis en geles de poliacrilamida se obtiene una sólo banda correspondiente a un peso molecular de 25 000 daltones (ver la fig 3. y gráfica 6).

Para probar la inmunoespecificidad de la subunidad beta de la HCG, se realizó un ensayo inmunoenzimático con un conjugado comercial (Abbott) anti-beta-peroxidasa, observándose en la tabla 7 gráfica 7, que 1 ug HCG comercial (sigma) corresponde a 2.42 U I, mientras que 1 ug de subunidad beta purificada corresponden a 4.86 U I.

ANALISIS DE RESULTADOS

La HCG es una glicoproteína compuesta por 2 subunidades la alfa y la beta. La primera de ellas presenta similitudes con la misma subunidad de la FSH, LH y TSH. Su especificidad en el órgano blanco y las diferencias inmunológicas potenciales vienen dadas por las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la subunidad beta, de cada hormona (5, 6, 9, 14, 34). Por lo que se planteó la realización de una metodología que permita la separación y purificación de la subunidad beta de la HCG, lo que resulta muy importante y necesaria porque en México no se realizan técnicas para la obtención de la subunidad beta, y por tanto la implementación de metodologías que permitan la cuantificación y detección de una manera específica de la HCG, resulta de suma importancia.

En nuestros resultados obtenidos para estos fines, observamos que en el inmunoadsorbente preparado con los anticuerpos de conejo dirigidos contra la HCG, y que fueron insolubilizados con glutaraldehído (según la técnica de Avrameas (4) la cual fué utilizada por ser económica y sencilla) dio una eficiencia de adsorción fué muy pobre por lo que se procedió a tratar a la muestra de orina de diferente manera para buscar en cual de ellos se obtenía una mejor adsorción.

La máxima adsorción se logró al dializar la orina contra PBS, mientras que se tiene una mejor adsorción cuando la muestras de orina se pasaron a través del inmunoadsorbente: ajustando sólo el pH -

y pasarlas intactas. Estas bajas adsorciones se pueden explicar por que al no ser dializada la orina, aún contiene urea que por su estructura, puede actuar como donadora de protones o aceptora de los mismos en la formación de enlaces por puentes de hidrógeno con la HCG (22).

Dentro de las fuerzas que mantienen la unión antígeno-anticuerpo se encuentran: fuerzas iónicas, de Vander Walls, puentes de hidrógeno e hidrofóbicas (20), por lo que al interaccionar la urea con la HCG presente en la orina de mujeres embarazadas, la afinidad de la HCG con su anticuerpo respectivo se ve disminuída.

Sin embargo, se consideró que, el inmunoadsorbente preparado con glutaraldehído era poco eficiente puesto que para tener un buen inmunoadsorbente insolubilizando los anticuerpos, se requiere de una mayor cantidad de suero anti-HCG, cosa que con los conejos no se pudo obtener. Por ello se procedio a la realización de otro inmunoadsorbente, pero esta vez acoplando los anticuerpos anti-HCG a sefaro-sa AH 4b (la que se tenía en el laboratorio) por medio de carbodimida. (28). Las muestras de orina en este caso se trataron de manera diferente ya que aún dializandolas, quedaban pigmentos que obstruían el paso del resto de la muestra a través del inmunoadsorbente, por lo que fué necesario eliminarlos. Al filtrar la muestra de orina en sefadex G-25, se logró la eliminación completa de los pigmentos, pero las adsorciones de HCG obtenidas fueron muy bajas por la dilución que sufría la muestra al ser filtrada.

Sin embargo, al tratar la muestra de orina previamente con ---

acetona, las proteínas presentes en la orina precipitaron (20) y se eliminan por igual los pigmentos que ahí se encuentran al igual que la urea. De tal forma que se tiene la opción de concentrar la muestra para la obtención de una mayor adsorción de HCG al ser pasada por el inmunoadsorbente de sefarosa AH 4b.

Al realizar la comparación de los dos inmunoadsorbentes y tratandola muestra de igual manera, se comprobó que era más eficiente el preparado con sefarosa AH 4b.

En la inmunolectroforésis realizada, se pudo comprobar la inmunoespecificidad de la HCG purificada al aparecer una banda de precipitación para esta proteína y para la HCG comercial (sigma) que se utilizó como testigo, al ser puestas en contacto con suero anti-HCG. Aunque esto nos mostraba cierto grado de pureza, fué necesario la electroforésis en poliacrilamida, puesto que podía existir una proteína contaminante que no era reconocida por los anticuerpos ahí -- presentes. En el gel de poliacrilamida se observó una sólo banda, por lo que se corroboró la pureza de la HCG obtenida y que además correspondía al rango de peso molecular reportado en la bibliografía: 44 000 daltones (9, 10, 15, 16, 34).

La eficiencia del método para la purificación de HCG, obtenida apartir de orina de mujeres embarazadas, através del inmunoadsorbente de sefarosa AH 4b, fué del 83%, es decir, el inmunoadsorbente saturado de HCG captura sólo 1.6 mg, cuando se aplican 2mg del mismo -- sin embargo esto será variable dependiendo precisamente de la concentración de HCG en orina que se esté trabajando en ese momento. Pues-

to que la concentración de HCG presente en orina de mujer embarazada depende de la semana de gestación (6, 5, 12, 18, 21, 39).

La aparición de una sólo banda electroforética en los geles de poliacrilamida, para la subunidad beta obtenida por la disociación de la HCG por medio de urea y cromatografía de intercambio iónico, nos muestra que se trata de una proteína pura y, además, que corresponde a un peso molecular de 25 000 daltones, el cual concuerda con el peso molecular reportado para la subunidad beta de la HCG en la bibliografía. (9, 10, 15, 16, 34).

Por último, se comprobó la inmunoespecificidad de la subunidad beta por medio de un ensayo inmunoenzimático, en donde se obtuvo que 1 ug de HCG correspondía a 2.42 U I y que 1 ug de subunidad beta era equivalente a 4.86 U I. Lo cual fué lógico, puesto que el ug de HCG corresponde tanto para la subunidad alfa como para la beta y, por lo tanto, al tener el conjugado específico para la subunidad beta, esperaríamos la mitad de U I, que si se tuviera el mismo ug pero sólo de subunidad beta como sucedió en nuestro caso.

CONCLUSIONES

La subunidad beta de la HCG es muy importante porque es la parte responsable de la inmunoespecificidad de esta hormona. (5, 6, 9, 23, 30, 31, 34). Es por eso que el objetivo de este trabajo de desarrollar una técnica sencilla, económica y reproducible que permita separar y purificar la subunidad beta de la HCG presente en orina de mujeres embarazadas, se cumplió, llegando además a las siguientes conclusiones:

1. El inmunoabsorbente de sefarosa AH 4b en donde los anticuerpos anti HCG se acoplaron con carbodimida, resultó ser más eficiente que el inmunoabsorbente realizado con glutaraldehído, para la adsorción de HCG presente en orina de mujeres embarazadas.
2. Es importante para la purificación de HCG a partir de orina de mujeres embarazadas, que esta sea del primer trimestre de gestación puesto que es en este momento cuando la HCG se encuentra en su punto máximo de concentración. (1, 16, 18, 19, 36).
3. El tratamiento previo con acetona de las muestras de orina de mujer embarazada, para la purificación de la HCG através del inmunoabsorbente de sefarosa AH 4b, es de suma importancia para una mayor adsorción de HCG.
4. El método descrito por Morgan y Canfield (31) para la disociación de la HCG por medio de urea y la separación de la subunidad beta por medio de cromatografía de intercambio iónico, sigue siendo efectivo y eficiente.

No existen técnicas propuestas en nuestro país que permitan la

cuantificación y detección específica de HCG, siendo que esta hormona se ha utilizado para el diagnóstico y seguimiento de embarazos -- (12, 16, 19, 18), además de ser utilizada como indicadora de algunas neoplasias del trofoblasto (5, 15, 32, 37) y de gestaciones múltiples y ectópicas (12, 24, 13, 39).

Por eso resulta fundamental tener en nuestro país técnicas que nos permitan la purificación de la HCG y la separación de la subunidad beta, que son a su vez fundamento inmunológico para la detección y cuantificación de la HCG. Además se abre un campo más en la investigación puesto que en otros países se han elaborado vacunas anti-subunidad beta en mandriles y conejos en donde no evoluciona la gestación, ya que no se logra implantar el embrión. Porque -- entre los papeles que juega la HCG es precisamente la implantación del blastocito en útero. (34).

Igualmente, se ha observado que en radioinmunoensayos realizados con la subunidad beta, se incrementa la sensibilidad para la detección de la HCG. (5).

APENDICE

REACTIVOS EMPLEADOS

A. Solución salina amortiguadora de boratos pH 8.4

Amortiguadora de boratos

Acido bórico	6.184 g.
Bórax (tetraboratos de sodio-10 H ₂ O	9.536 g.
Cloruro de sodio	4.384 g.
H ₂ O hasta aforar a	1.0 l.

Salina boratos

Mezclar 95 partes de solución salina 0.85% con 5 -
partes del amortiguador de boratos.

B. PBS (amortiguador salino de fosfatos) 0.15M pH 7.2

Cloruro de sodio	8.0 g.
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g.
Fosfato de sodio dibásico	1.1 g.
Cloruro de potasio	0.2 g.
H ₂ O hasta aforar a	1.0 l.

C. Regulador de glicina-HCl 0.1M pH 2.5

Glicina 0.1M	15.01 g.
HCl (densidad 1.185) 0.2M	85.0 ml.

Regular el pH con el HCl.

D. Regulador de barbituratos 0.1M pH 8.6

Barbiturato de sodio 0.1M 500.5 ml.
HCl (densidad 1.185) 0.1M 149.5 ml.
Agua destilada 350.0 ml.

E. Solución acrilamida-bisacrilamida al 30.8%

Acrilamida 30.0 g.
bis-acrilamida 0.8 g.
H₂O hasta aforar a 100 ml.

F. Regulador tris-HCl 0.5M pH 8.8

Tris (hidroximetil) aminometano 6 g. disol
ver en aprox. 30 ml. de H₂O destilada. Ajustar el pH con --
HCl 1N.
H₂O hasta aforar a 100 ml.

G. Regulador de tris-HCl 1.5 M pH 6.8

Tris (hidroximetil) aminometano 18.15 g. di
solver en aprox. 20 ml. de H₂O destilada. Ajustar el pH con -
HCl 1 N.
H₂O hasta aforar a 100 ml.

H. Solución de corrimiento pH 8.3

Tris (hidroximetil) aminometano 0.024M 3.0 g.
Glicina 0.191 M 14.4 g.
SDS (duodocil dulfato de sodio) 1.0 g.
H₂O hasta aforar a 1.0 l.

I. Buffer de muestra 2 X (usar tal cual)

Sol. reguladora tris-HCl pH 6.8	10 ml.
Sol. de SDS al 10%	10 ml.
2-mercaptoetanol	1 ml.
Glicerol	10 ml.
H ₂ O destilada	19 ml.

J. Solución fijadora de colorante

Azúl de Coomassie	1.25 g.
Metanol absoluto	227 ml.
Acido acetico glacial	45 ml.
H ₂ O destilada	227 ml.

K. Buffer de glicina-urea pH 7.5

Glicina 0.03 M	1.126 g.
urea 8M	240.3 g.
H ₂ O hasta aforar a	500 ml.

L. Buffer de glicina-NaCl-urea pH 7.5

Glicina 0.2 M	7.507 g.
NaCl 1M	29.22 g.
Urea 8 M	240.3 g.
Ajustar el pH a 7.5	
H ₂ O hasta aforar a	500 ml.

M. Amortiguador de recubrimiento.

Carbonato de sodio	1.59 g.
Bicarbonato de sodio	2.39 g.
NaN ₃	0.2 g.
H ₂ O hasta aforar a	1.0 l.

N. PBS-tween

PBS1 l.
Tween 200.5 ml.

O. PBS-tween-albumina

PBS-tween100 ml.
Albumina sérica bovina 6 g.

P. Sustrato para peroxidasa

Buffer de citratos pH 5 100 ml.
Ortho-fenilendiamina 40 mg.
H₂O₂ al 30% 40 ul.

GLOSARIO DE TERMINOS MEDICOS

- Carcinoma.- Crecimiento maligno de tejido epidérmico (p.ej. - - piel, membrana) y derivados como las glándulas.
- Coriocarcinoma.- Un tumor altamente maligno originándose de célu- - las coriónicas. Usualmente después de una mola hi-- datidiforme, pero puede seguir aborto o aún preñez normal. rápidamente hace metastasis especialmente - hacia los pulmones.
- Mola hidatidi--- Una condición en que el vello coriónico de placenta forme.- sufre una degeneración cística y el feto es absorbi do. Una proporción de las molas son activas y se - continúan remanentes cambios malignos pueden conti- nuar dando origen a un corioepitelioma.
- Seminoma. Un tumor maligno de los testiculos.
- Teratoma.- Un tumor de origen embrionario y compuesto de varias estructuras incluyendo tejidos tanto epitelial como conectivo, más comunmente encontrado en los overios y testiculos, la mayoría son malignos.

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta, G. , Saavedra, L. , Lara, E. , Martínez, M. , Bázan, T. 1984. Método de coaglutinación para detección de HCG subunidad beta en orina. *Acta Médica*, Vol. XX, Núms. 79-80, Págs. 51-54.
2. Andrews, A. 1981. *Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications*. Clarendon Press. Oxford.
3. Armstrong, E. , Ehrlich, P. , Birken, S. , Schlatterer, J. , Siris, E. , Hembree, W. , Canfield, R. 1984. Use of a highly sensitive and specific immunoradiometric assay for detection of human gonadotropin in urine of normal, nonpregnant, and pregnant individuals. J. Clin. Endocrinol. Metab. 59 (5): 867-74.
4. Avrameas, S. , Ternyck, T. 1969. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. Immunochemistry. Vol. 6. Págs. 53-66.
5. Ayala, A. , González, E. , Castorena, G. , Montoya, J.; 1984.; Seguimiento de neoplasias del trofoblasto mediante radioinmunoanálisis del fragmento carboxiterminal de beta-corigonadotropina (COOH-beta-HCG-RIA) en orina. Arch. Invest. Méd. (Méx.) --- 15:139.
6. Ayala, A. , Bustos, H. , Antunez, O. , González, E. 1984. Secreción pulsátil de la gonadotropina corionica humana. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 15:147.

7. Ayala, A. , Saad, A. , Vázquez, X. , Ramírez-Wella. , Díaz, D. --
1983. Human chorionic gonadotropin immunoreactivity in serum of --
patients with malignant neoplasms. Am. J. Reprod. 3:139.
8. Bach, J, 1984. *Immunología*. Ed. Limusa, Méx. Págs. 125-28, 381-85.
9. Bahl, O. , Carlsen, R. , Swaminathan, N. 1972. HCG: amino and se-
quence of the alpha and beta subunits. Biochem. Biophys. Res. --
Commun. 48:416.
10. Bamba, C. , Lynch, S. , Foxcroft, G. , Robinson, C. , Amoroso, E.
1984. Purification and characterization of guinea-pig chorionic --
gonadotrophin, J. Reprod. Fert. 71:227-233.
11. Bellet, D. , Bodart, M. , Jolivet, M. 1984. A monoclonal antibo -
dy against a synthetic peptide is specific for the native human -
chorionic gonadotrophin beta subunit. Endocrinology. 115:330.
12. Braunstein, G. , Rasor, J. , Adler, D. , Danzer, H. , Wade, M. --
1976. Serum human chorionic gonadotrophin levels throughout normal
pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 126:678-681.
13. Braunstein, G. , Vaitakatis, J. , Ross, G. , 1973. Ectopic pro-
duction of HCG by neoplasms. Ann. Inter. Med. 78:39-45.
14. Caraux, J. Chichehian, B. , Gestin, C. , Longli, B. Lee, A. , --
Powell, J. , Stevens, V. , Pourquier, A. 1985. Non- cross- reac--
tive monoclonal antibodies to human chorionic gonadotrophin gene
generated after immunization with synthetic peptide. J. Immunology.

30:373.

15. Chan, P. , Lee, A. , Ma, L. 1974. Purification and characterization of human chorionic gonadotropin in hydatidiform mole. En - Gonadotropins and gonadal function. N. R. Moodgal. Academic Press N. Y. 93.
16. Carlsen, R. , Bahl, O. Swaminathan, N. 1973. Human chorionic gonadotropin. J. Biological Chemistry. 248:6810.
17. Cole, H. 1963. Gonadotropins: their chemical and biological properties and secretory control. En the sixth animal reproductions symposium. Oregon State University Corvallis.
18. Davidsohn, I. , Bernard, H. 1979. Diagnóstico clínico para el laboratorio. Editorial Salvat, España. Cap:26:1325.
19. Foster, J. 1984. Detection of early pregnancy using immunological methods. En Immunological of Reproduction in mammals. Ed. Buher --- Worths. London. 91.
20. Glynn, L. , Steward, W. 1977. Immunochemistry: An advanced textbook. John Wiley & Sons. London. Cap: 6.
21. Guyton, C. 1971. Tratado de fisiología Médica. Cuarta edición. --- Editorial Interamericana. España. Págs. 1011.
22. Haschemeyer, R. , Haschemeyer, A. 1971. Proteins: A guide to --- study by physical and chemical methods. Hohn Wiley & Sons. London Págs. 365-368.

23. Hussa, R. 1982. Clinical utility HCG and subunitit measurements. Obst. Gynecol. 60:1-12.
24. Kerber, I. , Inclan, P. , Fowler, E. , Davis, Fish, S. 1970. -- Immunologyc test for pregnancy. Obst. Gynecol. 36:37.
25. Lamb, E. 1972. Immunologyc test. Obst. Gynecol. 39:665.
26. Lenton, A. , Grdzinskas, J. , Neal, M. , Chard, T. m Cooke, D. - 1981. Chorionic gonadotropin concentration in early human pregnancy: comparision of specific and nonspecific assays. Fertil. Steril. 35:40.
27. Leuvering, W. , Goverde, C. m Thal, P. , Schuurs, A. 1983. A -- homogeneous sol particle immunoassays for human chorionic using - monoclonal antibodies. J. Immunol. Met. 60:9.
28. Lowe, C. 1979. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: An introduction to affinity chromatography. North-Holland. Publishing. N. Y.
29. Lowry, O. , Rosenbrough, N. , Farr, A. , Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.
30. Morgan, F. , Birken, S. , Canfield, E. 1979. Chemistry of human - chorionic gonadotropin. En Gonadotropins and gonadal funtion. N. R. Moodgal Academic Press. N. Y. pág: 79.

31. Morgan, J. , Canfield, E. 1971. Nature of subunits of human --- chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 88:1045.
32. Rao, S. , Murthy, D. , Sheth, A. 1974. Gonadotropins a correlation of their biological and immunological activities. En *Gonadotropins and gonadal function*. N. R. Moogdal Academic Press -- Pág: 162.
33. Rocklin, M. , Kitzmiller, J. , Kate, M. 1979. Immunobiology of the maternal-fetal relationship. *Ann. Rev. Med.* 30:373-404.
34. Stevens, V. 1986. Current status of antifertility vaccines -- ussing gonadotropin immunogens. *Immunology Today*. 7:12.
35. Stites, D. Stobo, J. , Fudenberg, H. , Wells, J. 1985. *Inmunología básica clínica*. Quinta edición. Editorial el Manual Moderno, Méx. Capitulo:35.
36. Tortora, G. , Anagnostakos, N. 1984. *Principios de anatomia y - Fisiología*. Tercera edición. Editorial Harla,, Méx. Págs. 927-54.
37. Vaitukaitis, J. 1973. Immunological physical characterization of HCG secreted by neoplasm. *J. Endocrinol. Met.* 37:505-14.
38. Voller, A. , Bidwell, D. m Bartlett, A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplaque applications. DYNATECH LABORATORIES, INC.

39. Yashia, C. 1964. The quantitative toad test in normal and abnormal early gestation. Obst. Gynecol. 23:547.
40. Witbergex, P. , Miller, D. 1948. The male frog Rana pipens as --
new twst early pregnancy. Science. 107:198.