

20/10



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

"Zaragoza"

**DESARROLLO DE UNA PRUEBA PARA EL
DIAGNOSTICO DE EMBARAZO**

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

Beatríz González Alvarado

Ma. Elena González Climaco



México, D. F.

1986



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 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

CAPITULO I

Resumen	1
Introducción	2
Generalidades	7

CAPITULO II

Objetivo	17
Hipótesis	18

CAPITULO III

Diseño Experimental	19
-Precipitación de GCH	20
-Purificación de GCH	21
-Producción de anticuerpos	24
-Acoplamiento de GCH a eritrocitos	26
-Estandarización	27

CAPITULO IV

Resultados	28
----------------------	----

CAPITULO V

Discusión y Conclusiones	45
------------------------------------	----

CAPITULO VI

Soluciones	50
Bibliografía	52

R E S U M E N

La necesidad de contar con un equipo desarrollado en México para diagnóstico de embarazo, fué el motivo que impulsó la realización de este proyecto.

Hemos montado un inmunoensayo basado en la inhibición de la hemaglutinación indirecta, partiendo para ello desde la obtención de las materias primas.

El procedimiento involucra: purificación de hormona gonadotropina coriónica humana (GCH) a partir de orina de mujeres gestantes a través de Sephadex G-50, producción de sueros anti-GCH, acoplamiento covalente de la misma hormona a eritrocitos de carnero, y estandarización de la prueba.

Utilizando nuestra prueba bajo las condiciones que hemos -- considerado óptimas, se probaron un total de 169 muestras de orina, 84 positivas y 85 negativas, obteniéndose una confiabilidad del 95.9% y una sensibilidad de 3 UI de GCH/ml de orina.

I N T R O D U C C I O N

La reproducción es un proceso normal con estrictas limitaciones de tiempo dadas por el lapso necesario para que el embrión se desarrolle lo suficiente para sobrevivir después del parto; entonces el tiempo disponible para un contacto físico entre la madre y su descendiente es limitado. Durante este intervalo, en la madre se manifiestan cambios fisiológicos sorprendentes necesarios para que el embarazo llegue a término.

La presencia y crecimiento de un feto, añade una carga fisiológica extra a la madre, la cual responde con una serie de cambios funcionales encaminados a solucionar esta carga.

Durante las últimas fases del embarazo, fluyen aproximadamente 650 ml de sangre materna por la placenta cada minuto, lo cual decremente la resistencia total periférica de la circulación materna con la consiguiente disminución del retorno venoso al corazón; aunado a esto hay cambios metabólicos que incrementan la frecuencia cardíaca en cerca de 30 a 40% por arriba de lo normal, esto sucede por la 27ava. semana del embarazo, para luego regresar a valores normales, por razones todavía desconocidas, durante las 8 semanas anteriores al parto.

Debemos mencionar que la respuesta de la madre frente al embarazo depende, en parte, de las hormonas producidas por la placenta o por las glándulas endócrinas. A este respecto diremos que los estrógenos y la progesterona durante el embarazo aumentan decenas de veces comparativamente a la producción diaria a mitad del ciclo men

sual normal; estas hormonas están relacionadas íntimamente con el desarrollo del embarazo y causan cambios en los órganos sexuales que permiten el progreso del embarazo, parto y lactancia. Además éstas hormonas producen cambios en otras glándulas, tales como la hipófisis anterior, en donde disminuye la producción de hormona folículo estimulante y luteinizante, mientras que aumenta la producción de hormonas como corticotropina, tirotropina, y probablemente también la hormona del crecimiento. Por otra parte aumenta también la producción de glucocorticoides, cuya función en el embarazo no está todavía plenamente dilucidada, pero es posible que ayuden a la movilización de aminoácidos de la madre para su utilización por el feto. Así mismo puede aumentar la producción de aldosterona, que junto con los estrógenos y progesterona crean una tendencia importante a resorber del túbulo renal concentraciones aumentadas de sodio con lo cual también se retiene agua; parte de este líquido se retiene en el sistema circulatorio por lo que el hematocrito puede disminuir en la primera etapa del embarazo, pero hacia el final del mismo aumenta la actividad de la médula ósea por lo que la madre posee al final uno o dos litros de sangre extra, lo que constituye para ella un sistema de seguridad considerable, ya que normalmente durante el parto sólo pierde una cuarta parte de este volumen extra de sangre.

Como se mencionó anteriormente, se produce mayor cantidad de hormona tirotrópica por la hipófisis anterior aumentando por lo consiguiente la concentración de la hormona tiroxina. También hay aumento de la hormona paratiroidea, que ocasiona resorción de calcio de los huesos de la madre para ser utilizados por el feto y poder mante

ner una concentración normal en sangre materna de calcio iónico, es to es más evidente sobre todo cuando la dieta materna es deficiente en calcio.

El aumento de peso registrado durante el embarazo normal es de 12 Kg, de los cuales 5.5 corresponden al feto y al líquido amniótico. El metabolismo basal de la madre se incrementa en aproximadamente un 15% en la segunda mitad del embarazo, debido al aumento en la secreción de diferentes hormonas como tiroxina, hormonas adrenocorticales y hormonas sexuales. Debido a todos estos cambios anteriormente citados la madre necesita alimentos suplementarios que incluyen en especial proteínas, vitaminas y minerales para suplir las necesidades del feto. Aún cuando algunos órganos del feto continúan creciendo normalmente con carencias en la alimentación materna, algunos otros pueden sufrir alteraciones por deficiencia, por otro lado, en los últimos meses la madre no puede absorber las suficientes proteínas, calcio, fósforo y hierro para suministrarlo al feto y -- por lo tanto utilizará los almacenados durante los primeros meses del embarazo y en dado caso que no existan en cantidad suficiente, los depósitos normales de la madre tenderán a verse afectados por el aprovechamiento que de estos elementos pueda hacer el feto (25, 33, 41).

Habitualmente los cambios observados en todo embarazo regresan espontáneamente a la normalidad después del parto.

El diagnóstico rápido del embarazo puede emitirse con razonable exactitud a través de un cuidadoso historial y examen físico -- realizado dos semanas después de la primera falta de menstruación,--

por ejemplo a las seis semanas de gestación. Dicho diagnóstico pocas veces presenta dificultad después de diez semanas. A pesar de los -- síntomas iniciales del embarazo (náuseas matutinas, frecuencia urina ria, flaccidez de las mamas y amenorrea), pueden resultar equívocos. Ciertos signos clínicos tienen un valor definido. Con frecuencia la dilatación de las venas superficiales de las mamas es la señal que a parece en primer lugar y de ordinario se presenta entre las 6-8 sema nas de gestación. Aproximadamente en el mismo tiempo, la congestión de los vasos sanguíneos superficiales provoca un aspecto azulado del epitelio de la vagina y cuello uterino. El útero y el cuello uterino se reblandecen y agrandan (lo cual inicialmente puede ser asimétrico) en forma progresiva. Se observa también una pulsación en los ligamen tos laterales debido a la dilatación y tortuosidad de las arterias u terinas (16).

Mediante el diagnóstico temprano del embarazo en casos normales, se puede establecer un régimen alimenticio adecuado que permita te - ner los nutrientes necesarios para la madre y el feto. El diagnósti - co quizá tenga una importancia mayor en los casos en que se involu - cran estados patológicos, como pueden ser amenaza de aborto, embara - zo ectópico, enfermedades trofoblásticas, mola hidatiforme o corio - carcinoma.

En las mujeres con antecedentes de aborto, las determinaciones seriadas durante el primer trimestre son especialmente útiles cuando se producen pequeñas hemorragias vaginales (16). Si los niveles de - GCH permanecen altos durante un período de hemorragia es probable -- que el embarazo continúe.

Como regla, se excreta menos GCH en los embarazos ectópicos -- que en los normales (10, 16, 35). Sólo las dos terceras partes de -- las mujeres con embarazo ectópico tienen prueba positiva de embara-- zo, en éstas su título es relativamente bajo. Los niveles de GCH -- con frecuencia descienden por debajo de 1 UI/ml y muchas veces se -- sitúan por debajo de 0.3 UI/ml.

En las mujeres con mola hidatiforme es valiosa la determina -- ción cuantitativa de GCH (16, 29, 27). A pesar de que algunas pa -- cientes con dicha mola presentan niveles de GCH en orina extremada-- mente elevados (60,000 UI/ml), la mayoría muestra los valores rela-- tivamente bajos (5 UI/ml). El diagnóstico diferencial en niveles e-- levados de GCH puede resultar facilitado por el hecho que, durante el embarazo, las pruebas secuenciales tienden a seguir la curva nor -- mal de éste, mientras que en las enfermedades trofoblásticas, las -- pruebas repetidas a lo largo de varias semanas mostrarán fluctuacio -- nes irregulares. En las mujeres con mola hidatiforme o coriocarcino -- ma las valoraciones repetidas de GCH pueden indicar el éxito del -- tratamiento o la existencia de una recidiva.

Como hemos visto, es de gran utilidad la prueba para diagnósti -- co de embarazo; asimismo, la frecuencia con que se le utiliza es -- muy alta. Sabemos que los equipos que se utilizan en los laborato -- rios clínicos, provienen de laboratorios extranjeros ya que no se -- cuenta con una prueba nacional.

Pensando en la posibilidad de contar con un ensayo producido -- en México con materias primas propias, se desarrolló este proyecto, de tal manera que se evite su importación y disminuya el costo.

GENERALIDADES

Desde el descubrimiento de la gonadotropina coriónica humana - (GCH) en orina de mujeres embarazadas, se han diseñado varios métodos para su detección, ya que su presencia se interpreta como una prueba positiva de embarazo.

Hasta la fecha, se han utilizado diferentes pruebas para diagnosticar el embarazo, todas ellas basadas en la detección de (GCH) - (1, 4, 11, 16). A continuación describimos algunas de ellas, que en términos generales podemos clasificar en dos grupos:

- a).- Biológicas
- b).- Inmunológicas

Entre los bioensayos se encuentran los siguientes:

1.- Aschheim y Zondek (1928)

Fué el primer bioensayo fiable para demostración de GCH.

Cinco ratas jóvenes de aproximadamente 21 días de edad reciben inyecciones múltiples de orina, espaciadas por un período de dos días. Cuatro días después de la primera inyección todos los animales se sacrifican y se examinan sus ovarios para la detección de la formación del cuerpo amarillo.

2.- Friedman (1932)

Se inyecta orina a un conejo hembra adulto por vía intravenosa y a las 48 horas se examina los ovarios en busca del cuerpo amarillo y folículos hemorrágicos.

3.- Frank y Perman (1941)

Se administran dos inyecciones de orina o suero a dos ratas in maduras de 45-60 gramos de peso, las cuales se sacrifican 24 horas después, mediante CO y se observa hiperemia de ovarios.

4.- Galli-Mainini (1948)

Se utiliza el sapo macho Bufo arenarum, mientras que Weltbergr y Miller comunicaron resultados parecidos con la rana macho Rana pipiens. Estos animales liberan espermatozoides de 4-6 horas después de haber recibido una inyección de GCH, los cuales pueden ser detectados microscópicamente.

Estas pruebas brindan buenos resultados, no obstante presentan ciertas desventajas, como son:

- Se requiere un bioterio especializado para reproducción de las especies a utilizarse.
- Estricto control de manejo de animales.
- La necesidad de contar con personal que posea amplia experiencia en la apreciación de los efectos que se presentan en cada caso.
- Largo tiempo que se requiere para poder emitir resultados.
- Dadas todas estas condiciones, el costo de la prueba resulta elevado.

A partir de ello surgió la necesidad de crear nuevos métodos que permitieran: realizar múltiples ensayos, disminuir los costos, mayor rapidez en el diagnóstico y mantener la confiabilidad de resultados.

Es así como surgen las pruebas inmunológicas, que esencialmen-

te se basan en la presencia de GCH en la orina y suero de mujeres embarazadas, y en la capacidad de la misma hormona para estimular la -producción de antisueros. Entre los inmunoensayos (16) se encuentran los siguientes:

1.- Wampole y Mochida (1971)

Es una prueba basada en la aglutinación de partículas de látex recubiertas con anti-GCH. Al incubar una muestra de orina de mujer -embarazada con partículas de látex. se observa aglutinación'

2.- Pregnosticon Dri-Dot (1972)

Prueba basada en la inhibición de la aglutinación de partículas de látex recubiertas con GCH. Se incuba orina con anti-GCH y luego -se añaden partículas de látex; es prueba positiva si la aglutinación se inhibe, y es negativa si se observa aglutinación (Figura # 1).

3.- Organon (1970)

Prueba basada en la inhibición de aglutinación de eritrocitos -sensibilizados con GCH (Figura # 1).

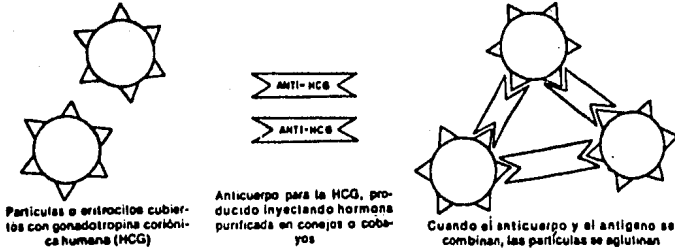
4.- Radioinmunoensayo (1972)

En esta prueba se identifica la subunidad beta de la GCH, no o-curriendo reacción cruzada con la hormona luteinizante. Es una prue-ba muy específica y sensible, requiere de aproximadamente 36 horas y tiene precisión de 6-10 mUI/ml (2, 4, 62).

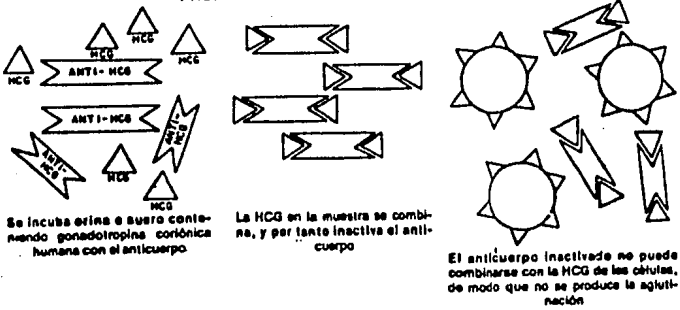
5.- Fisher Diagnostics Pregna Clone (1980)

Esta prueba se basa en la inhibición de aglutinación de partícu-las de látex (Figura # 1). Utiliza anticuerpos monoclonales dirigi -dos contra la subunidad beta de la gonadotropina para detectar nive-les muy bajos sin interferencia con los niveles fisiológicos de LH. Su sensibilidad es de aproximadamente 0.3 UI/ml.

PRINCIPIO DE LAS PRUEBAS DE INHIBICION DE LA AGLUTINACION



PRUEBA POSITIVA DEL EMBARAZO



PRUEBA NEGATIVA DEL EMBARAZO

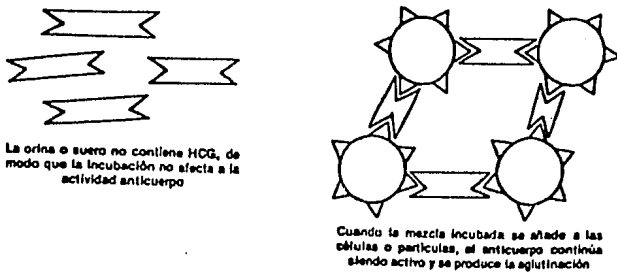


Fig. # 1

ENDOCRINOLOGIA DEL EMBARAZO

Después de la fertilización, el óvulo flota libre hasta el día 21 ó 23 del ciclo, cuando el blastocisto se implanta en el endometrio. La secreción de GCH se inicia inmediatamente (14, 22, 41).

Endocrinológicamente, un embarazo puede dividirse en dos fases: una fase inicial "ovárica", en que el ovario forma los esteroides que mantienen el embarazo, seguida de una fase "placentaria" en que las hormonas esteroides se originan en la unidad fetoplacentaria. Inicialmente, la excreción de GCH aumenta rápidamente, para alcanzar un máximo hacia las 8-10 semanas de gestación (Figura # 2). Esta excreción aumentada se mantiene por un corto tiempo y después disminuye hasta el momento siguiente al parto. Una semana después su concentración baja a niveles de excreción iguales a los encontrados en mujeres no embarazadas (22, 25, 63).

Su función está parcialmente comprendida. Presumiblemente es responsable de la producción de progesterona por el ovario en las primeras 5-7 semanas de gestación. También se le ha involucrado en la modulación a nivel local de la respuesta inmune para evitar el rechazo inmunológico del feto. Se ha llegado a esta conclusión debido a que se ha observado, por un lado, correlación entre aborto y niveles bajos de GCH en las primeras 5-7 semanas de gestación, y por otro lado, que también ocurre aborto cuando se tiene la presencia de anticuerpos contra la hormona (63).

Otra hormona trofoblástica es la hormona lactógeno placentaria (hPL), y es perceptible en suero desde aproximadamente la sexta semana de gestación (Figura # 2), con un aumento progresivo. El nivel de

esta hormona es un índice del crecimiento normal y funcionamiento de la unidad fetoplacentaria. Su papel en el embarazo no está claramente establecido.

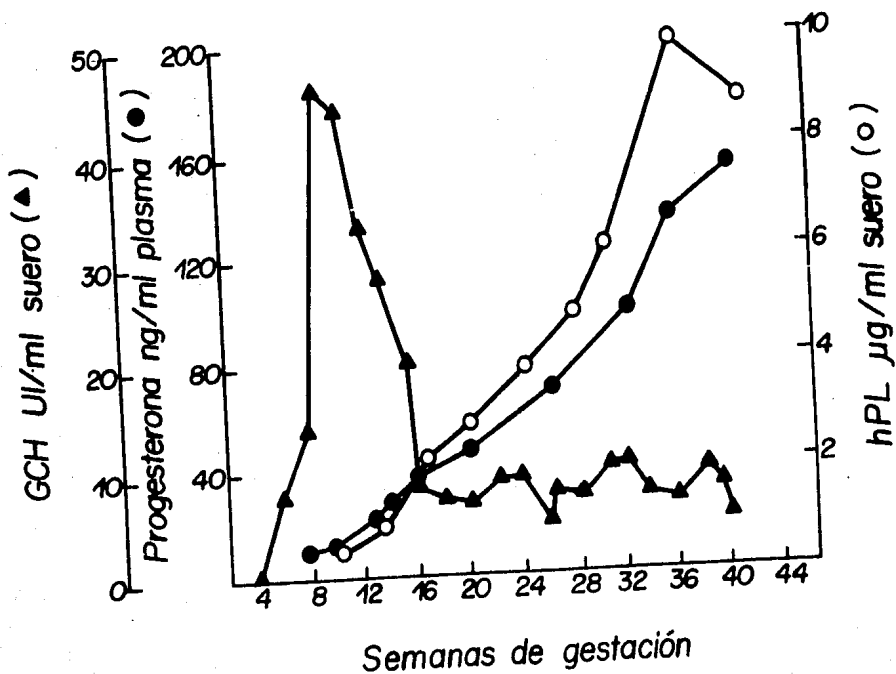


Figura # 2. Hormonas producidas durante el embarazo normal (63).

GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA: COMPOSICION QUIMICA

Es una glucoproteína hidrosoluble. Análisis de los aminoácidos de preparaciones altamente purificadas sugieren un peso molecular a proximado de 60 Kd, aunque en la literatura se encuentran reportados valores tan variables como 27 y 100 Kd. (5, 16, 26, 32, 55).

Es una proteína con propiedades inmunológicas y biológicas semejantes a las hormonas luteinizantes hipofisarias. Como en el caso de éstas, consiste de dos subunidades: alfa y beta. Tiene una gran homología estructural con la hormona luteinizante humana, siendo casi idénticas las cadenas alfa de las dos hormonas.

La cadena alfa es más corta que la beta, su papel no ha sido establecido pero se sabe que es necesaria para mantener una actividad biológica óptima. Las subunidades aisladas no poseen la actividad biológica de la GCH nativa en bioensayos convencionales, pero se pueden recombinar con sustancial restauración de su actividad -- (16, 22, 24, 41, 42, 63).

La secuencia de aminoácidos de ambas subunidades ha sido determinada por varios autores, encontrándose algunas diferencias. La unidad alfa está estrechamente relacionada a las subunidades alfa de otras hormonas glucoproteicas, como TSH Y LH bovinas y humanas. Es una glucoproteína con cadena polipeptídica de 92 residuos y la cadena de oligosacáridos está inserta en los residuos 52 y 78 (5, 6, 7, 8, 44, 45, 46, 63).

La secuencia de aminoácidos para la subunidad alfa es (44):

Ala-Pro-Asp-Val-Gln-Asp-Cys-Pro-Glu-Cys-Thr-Leu-Gln-Glu-Asp-Pro-Phe-Phe-Ser-Gln-Pro-Gly-Ala-Pro-Ile-Leu-Gln-Cys-Met-Gly-Cys-Cys-Phe-Ser-

Arg-Ala-Tyr-Pro-Thr-Pro-Leu-Arg-Ser-Lys-Lys-Thr-Met-Leu-Val-Gln-Lys-Asn-Val-Thr-Ser-Glu-Ser-Thr-Cys-Cys-Val-Ala-Lys-Ser-Tyr-Asn-Arg-Val-Thr-Val-Met-Lys-Lys-Phe-Lys-Val-Glu-Asn-His-Thr-Ala-Cys-His-Cys-Ser-Thr-Cys-Tyr-Tyr-His-Lys-Ser.

La subunidad beta confiere actividad biológica específica a la GCH (2, 7, 44, 49, 63). Es un glucopéptido de 139-146 aminoácidos, teniendo marcada homología con la subunidad beta de LH, que posee 115 residuos, de los cuales aproximadamente el 80% son idénticos. La GCH-beta posee 30 residuos adicionales por la parte carboxilo terminal, no encontrándose en la LH-beta o en otras subunidades beta de hormonas glucoproteicas reportadas. Este fragmento es rico en serinas y prolinas, no contiene aminoácidos aromáticos ni cisteína (62). Contra esta parte de la molécula se han creado antisueros y se han utilizado en radioinmunoensayos para evitar reacción cruzada con LH (2, 49, 52, 62,63).

La secuencia de aminoácidos para la subunidad beta es (7, 44):

Ser-Lys-Glu-Pro-Leu-Arg-Pro-Arg-Cys-Arg-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr-Leu-Ala-Val-Glu-Lys-Glu-Lys-Cys-Pro-Val-Cys-Ile-Thr-Val-Asn-Thr-Thr-Ile-Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys-Pro-Thr-Met-Thr-Arg-Val-Leu-Gln-Gly-Val-Leu-Pro-Ala-Leu-Pro-Gln-Val-Val-Cys-Asn-Tyr-Arg-Asp-Val-Arg-Phe-Glu-Ser-Ile-Arg-Leu-Pro-Gly-Cys-Pro-Arg-Gly-Val-Asn-Pro-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Val-Ala-Leu-Ser-Cys-Gln-Cys-Ala-Leu-Cys-Arg-Arg-Ser-Thr-Thr-Asp-Cys-Gly-Gly-Pro-Lys-Asp-His-Pro-Leu-Thr-Cys-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln.

Las cadenas de oligosacáridos se encuentran en los residuos 13, 30, 121, 127, 132 y 138 (5, 6, 42, 63).

El contenido de carbohidratos de GCH consiste en (3):

	%
Galactosa	5.3
Manosa	5.3
Fucosa	0.6

Hexosa total	11.2

N-Acetilglucosamina	8.9
N-Acetilgalactosamina	2.2

Hexosamina total	11.0

Acido siálico	9.0

La eliminación de los residuos de ácido siálico reduce marcadamente la actividad biológica. Se ha sugerido que esta fracción inhibe su rápida destrucción en el cuerpo, es decir, es responsable de su larga vida media (42).

En 1938 fué establecido el primer estándar internacional para GCH. Una Unidad Internacional (UI) está relacionada con la actividad específica gonadotrópica de 0.1 mg de muestra estándar seca mantenida en el National Institute for Medical Research, Londres. Esta es la cantidad de actividad suficiente para causar cornificación --

del epitelio vaginal en ratas inmaduras.

Se ha reportado que la potencia de la preparación más activa - de GCH es de 12,000 UI/mg.

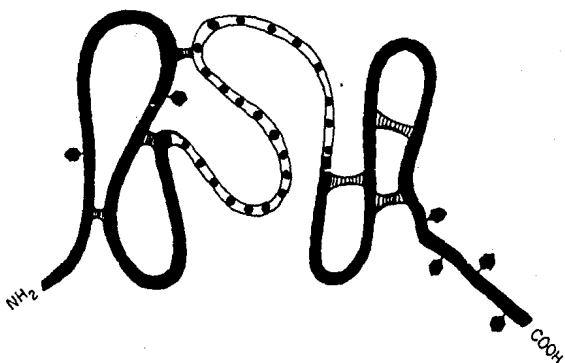


Figura # 3. Diagrama conceptual de la subunidad beta de GCH.

O B J E T I V O S

GENERAL. Montar, a partir de insumos nacionales, una prueba para el diagnóstico de embarazo basada en la inhibición de hemaglutinación indirecta con una sensibilidad de 1 UI de gonadotropina coriónica humana (GCH) por mililitro de orina.

PARTICULAR.

1. Purificar hormona gonadotropina coriónica humana a partir de orina de mujeres embarazadas.
2. Producir antisueros anti-GCH.
3. Sensibilizar eritrocitos de carnero con GCH para el montaje de la prueba.

H I P O T E S I S

Si se conocen los cambios hormonales que ocurren durante el embarazo, y en especial el de la hormona gonadotropina coriónica humana, entonces su presencia en orina de mujeres con amenorrea permitirá suponer la presencia de embarazo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los objetivos del presente trabajo plantean tres necesidades básicas para su realización:

1. Purificación de la hormona gonadotropina coriónica humana (GCH),
2. Producción de sueros anti-GCH, y
3. Acoplamiento covalente de GCH a eritrocitos de carnero para el desarrollo de la prueba.

Con respecto a cada punto, en la bibliografía analizada se encontraron muchas técnicas descritas, en las que los autores mencionan ventajas sobre las descritas previamente, de tal manera -- que se probaron algunas de ellas para conocer cuál funcionaba mejor dentro de las posibilidades técnicas y de equipo con que se cuenta en el laboratorio.

Se describen a continuación:

PURIFICACION DE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA

Precipitación con acetona (11). Una muestra de 250 ml de orina de mujer embarazada cursando el primer trimestre, se acidifica a pH 4.5 - con ácido acético glacial, se enfría a 4°C y se filtra para desechar el material insoluble. Se agrega un litro de acetona fría, manteniendo agitación constante durante 15 minutos. El precipitado formado se separa por filtración con papel Whatman no. 4 y se lava con etanol frío. Cuando el etanol se ha evaporado por completo, el precipitado se resuspende en 25 ml de cloruro de sodio 0.15M - fosfatos de sodio 0.01M, (PBS), pH 7.2. Se centrifuga a 2,500 rpm (Centrífuga Beckman mod. TJ-6) durante 5 min y se desecha el material insoluble. A este producto se le nombra extracto crudo de GCH y se conserva liofilizado (liofilizadora Virtis).

Adsorción de GCH sobre ácido benzoico (41, 51). Un litro de orina acidificada a pH 4.5 se incuba con 50 ml de una solución de acetona saturada con ácido benzoico durante una hora con agitación suave. Se suspende la agitación y se deja reposar durante la noche. Se centrifuga, se desecha el sobrenadante y el precipitado se lava con acetona fría; la GCH se extrae con agua, se centrifuga y el sobrenadante se liofiliza.

Adsorción sobre Permutita IRC-50 (36, 41). Una muestra de 250 ml de orina acidificada a pH 4.5 se incuba durante la noche con agitación continua con Permutita IRC-50, se lava con etanol al 38% conteniendo 10% de acetato de amonio. De la solución obtenida se precipita la hormona añadiendo etanol hasta alcanzar una concentración del 70-75% y el producto se seca.

PURIFICACION DE GCH A PARTIR DE EXTRACTO CRUDO
(5, 8, 24, 26)

Purificación por filtración en Sephadex G-50. Doce ml de una muestra de extracto de orina (5 mg/ml) se hacen pasar por una columna (Pharmacia Fine Chemicals) de Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals) de 48 x 2.5 cm, utilizando PBS con una velocidad de flujo de 15 ml/hr.- Se recogen fracciones de 3 ml (Colector de Fracciones LKB 2111 Multi rac), cada una de las cuales se lee a una longitud de onda de 280 nm (Espectrofotómetro Carl-Zeiss). Se construye una gráfica de volumen- de elución contra D.O. y se recolectan las fracciones proteicas que se conservan liofilizadas.

Purificación por filtración en Sephadex G-100. La cromatografía se realiza bajo las mismas condiciones que en el caso de Sephadex G-50.

Purificación por intercambio iónico en DEAE Sephadex A-50. Un volumen de 5 ml de extracto de orina (5 mg/ml) se hacen pasar por una columna de DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals) de 36 x 1.6 cm, previamente equilibrada con una solución amortiguadora de 0.04 tris-fosfatos, pH 8.7. El desprendimiento de la hormona se realiza con un gradiente discontinuo añadiendo al amortiguador de equilibrio: cloruro de sodio 0.1M, 0.2M y finalmente, además de cloruro de sodio 0.2M, se cambia el pH a 9. Se mantiene un flujo de 15 ml/hr y se colectan fracciones de 3 ml, se mide la absorbancia a 280 nm y las fracciones obtenidas se reúnen y liofilizan.

Cromatografía de Afinidad. Diez ml de Sepharosa 4B-200 (Pharmacia Fine Chemicals) previamente activada (59) y acoplada a anticuerpos contra GCH, se incuban con 125 ml de orina de mujer embarazada y se deja en agitación suave durante la noche. La resina se coloca en embudo Buchner y se lava con PBS hasta que este amortiguador de lavado mues

tre una absorbancia de cero a longitud de onda de 280 nm. Posteriormente se inicia el desprendimiento de la hormona que se fijó al anticuerpo por medio de 30 ml de una solución de glicina-HCl, pH 2.8, los cuales se reciben en un matr az kitazato en el que previamente se han colocado 10 ml de K_2HPO_4 2M, pH 10 para neutralizar el pH bajo de la glicina y así impedir la desnaturalización de la hormona. Enseguida se realiza otra incubación con glicina-HCl, pH 2.2 y de esta manera se desprenden las moléculas de hormona que han sido fijadas por anticuerpos de alta afinidad. Finalmente se liofiliza la hormona.

Electroforesis preparativa (45). Una muestra de 1.5 mg de extracto crudo de GCH disuelto en 2 ml de PBS se somete a una electroforesis sobre un gel de policarilamida al 10% de 6 mm de espesor, utilizando un amortiguador de corrida 0.02M tris-0.15M glicina y 0.8% de -- SDS (Equipo para electroforesis LKB 2001 vertical). La corriente empleada para el gel superior es de 20 mA y para el gel inferior es de 30 mA. La electroforesis se detiene cuando el frente del colorante ha migrado hasta el final del gel, que se revela con una solución 4M de acetato de sodio, el cual precipita el SDS libre, dejando transparentes las bandas donde se localizan las fracciones proteicas. Se recortan las bandas y la GCH se recupera del gel aplicándole 100 volts durante 30 min para que pase al mínimo volumen de -- amortiguador de corrida. La GCH así obtenida se dializa contra agua destilada y se liofiliza.

Dentro de la purificación de la hormona se contempla el aislamiento de la subunidad beta con el propósito de inmunizar conejas y obtener un antisuero que permita una prueba más específica.

Los métodos probados fueron los siguientes:

Purificación por intercambio iónico en DEAE Sephadex A-25 (17)

- a).- Disociación de subunidades. Un gramo de GCH purificada se lleva a pH 4.5 con ácido clorhídrico, se incuba con 25 ml de una solución 10M de urea a 40°C durante una hora. Luego de este período se diluye a una concentración final de 8M de urea con una solución de glicina 0.03M y se ajusta a pH 7.4 con hidróxido de sodio 0.1N.
- b).- Cromatografía. Se aplicam 2 ml de la solución tratada con urea a una columna de DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia Fine Chemicals) de 36 x 1.6 cm, previamente equilibrada con urea 8M, pH 7.4. El desprendimiento de la subunidad alfa se realiza con el mismo amortiguador de corrida. Después de 160 ml se cambia a una solución 0.5M de tris-HCl, pH 7.5 para el desprendimiento de la subunidad beta. Se mantiene un flujo por gravedad y se recogen fracciones de 3 ml, cada una de las cuales se lee a 280 nm. Se recolectan las subunidades, se dializan contra ácido acético al 1% (una vez) y posteriormente con agua destilada.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS

En la información consultada encontramos que los antisueros han sido obtenidos de conejos (21, 49, 55, 61). En este trabajo, además de conejos, se inmunizan yeguas con el propósito de obtener suero - en gran escala. El esquema de inmunización seguido en cada caso, se describe enseguida:

a). Yeguas vírgenes jóvenes. Los dos primeros estímulos antigénicos consisten de 7,500 UI de GCH comercial (Sigma) disuelta - en 2 ml de PBS, emulsificada con un volumen igual de Adyuvante-Completo de Freund (Difco Laboratories) por vía subcutánea cada 15 días. Treinta días después de la primera dosis se continúa - estimulando utilizando las mismas dosis, sin ACF y por vía in - tramuscular con intervalo de 15 días.

b). Conejas. Dos conejas vírgenes jóvenes de raza Nueva Zelanda, de 2.5 Kg de peso se inmunizan con 2,500 UI de GCH comercial di - suelta en 0.5 ml de PBS, emulsificada con un volumen igual de - ACF. El esquema de inmunización seguido es el mismo que el em - pleado para las yeguas.

c). Conejas. Una vez purificada la GCH, se estimulan conejas si - guiendo el mismo esquema descrito anteriormente, utilizando do - sis de 980 ug.

Basados en el hecho de que el anticuerpo dirigido contra la mo - lécula completa de GCH da reacción cruzada con la hormona luteini - zante, intentamos obtener un antisuero más específico inmunizando - conejas con la subunidad beta de GCH.

En este caso, los dos primeros estímulos consistieron de 380 ug de GCH-beta en 0.4 ml de PBS, emulsificada con un volumen igual de ACF, por vía subcutánea en sitios múltiples (60, 62).

Purificación de Inmunoglobulinas de yegua anti-GCH

Precipitación con sulfato de amonio. La sangre se deja coagular y se separa el suero. Se le agrega gota a gota un volumen igual (precipitación al 50%) de sulfato de amonio saturado, pH 7.8, se agita suavemente durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifuga a 10,000 rpm durante 30 min y se desecha el sobrenadante. El precipitado se resuspende en PBS hasta el volumen original, se añade medio volumen (precipitación al 33%) de sulfato de amonio, se agita por 10 min y se centrifuga desechando el sobrenadante.

Se realizan tres precipitaciones más al 33% y el precipitado final se resuspende en el mínimo volumen de PBS, se dializa contra el mismo amortiguador hasta eliminar el sulfato de amonio. Se guarda en congelación.

ACOPLAMIENTO DE GCH A ERITROCITOS

Durante la sensibilización de eritrocitos se pusieron en práctica algunas técnicas para elegir la que brindara mejores resultados. Los eritrocitos que se utilizaron fueron de carnero, que se conservaron por un período no mayor de 30 días en solución de Alsever estéril.

a). Glutaraldehído. Por cada ml de eritrocitos de carnero al 50% en solución salina fisiológica, se agregan: 1.5 ml de glutaraldehído neutralizado, 5 ml de solución salina y 1 ml de PBS 0.01M, pH 8. Se incuba con agitación suave durante 24 horas a 4°C. Luego los eritrocitos se lavan tres veces con solución salina. De éstas células se toma 0.1 ml y se incuba con 250 UI de GCH comercial disuelta en PBS y 5 ml de amortiguador de acetatos 0.1M, pH 5 durante la noche a temperatura ambiente. Los eritrocitos-GCH se lavan tres veces con PBS, pH 6.8 y se resuspenden en el mismo amortiguador conteniendo albúmina sérica bovina (ASB) al 1%.

b). Ácido tánico. Se prepara una suspensión de eritrocitos al 3.3% en PBS, pH 7.2, se añade un volumen igual de ácido tánico a una dilución 1:20,000 (27, 32) y se incuba durante 15 min en baño de hielo. Enseguida los eritrocitos se lavan tres veces con PBS y se resuspenden al 3.3% en solución salina. A tres ml de esta suspensión se agregan 2,500 UI de GCH comercial disuelta en PBS, pH 6.4 y se incuba durante 15 min a 37°C. Finalmente las células se lavan tres veces con el mismo amortiguador y se resuspenden al 3.3% con ASB 1%.

c). Formaldehído e Hidroquinona. Una suspensión de eritrocitos de carnero al 1% en PBS 0.15 M, pH 7 conteniendo 0.15 % de hidroquinona (31), se incubaba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se añade 10% v/v de formalina y se incubaba durante 18 horas a temperatura ambiente. Los eritrocitos se lavan tres veces con amortiguador de EDTA y se resuspenden en el mismo al 1% conteniendo GCH comercial (25 UI/ml de suspensión al 1%), se incuban durante una hora a 37°C con agitación ocasional. Los eritrocitos-GCH se lavan con amortiguador de boratos-ácido succínico y se resuspenden al 3.3% en el mismo.

Elegido el tratamiento previo a la sensibilización, se acoplaba GCH a eritrocitos, probando diferentes concentraciones de hormona purificada: 325, 650, 975 y 1300 ug por cada 0.1 ml de paquete celular.

Utilizando los antisueros y estos eritrocitos se realizan pruebas de aglutinación para obtener la combinación antígeno-anticuerpo adecuada.

Los ensayos de inhibición de hemaglutinación se realizan, por una parte, con cantidades conocidas de GCH comercial para conocer la sensibilidad de la prueba, y por otra, con muestras de orina previamente clasificadas como positivas o negativas en los centros de recolección.

Durante los ensayos de hemaglutinación se utilizan los eritrocitos como una suspensión al 3.3% en PBS conteniendo ASB al 1%.

RESULTADOS

COMPARACION DE METODOS DE CONCENTRACION DE GCH

De las técnicas empleadas en la concentración de gonadotropina a partir de orina, se decidió utilizar la precipitación con acetona, debido a que las técnicas de adsorción sobre ácido benzoico y sobre Permutita IRC-50 dan como resultado un producto que, probado por equipo comercial (Pren-Tex, Laboratorio Lafon), no tiene actividad gonadotrópica.

En promedio, el extracto de orina obtenido durante el proceso de precipitación con acetona, tiene una concentración de proteína, determinada por el método de Lowry (40), de 0.163 mg/ml de orina.

COMPARACION DE METODOS DE PURIFICACION DE GCH

Filtración en Sephadex G-100. La cromatografía realizada tiene como resultado la obtención de tres fracciones (Figura # 4). Una vez reunidos los tubos que constituyen cada fracción se encontró que solo la fracción 1 tiene actividad gonadotrópica. Esta fracción representa el 32.54% del total de proteínas de la muestra sometida a cromatografía, de acuerdo a la cuantificación por el método de Lowry (40). El análisis de pureza por electroforesis en gel de acrilamida al 10% con SDS (EGA-SDS) señala la presencia de tres contaminantes (Figura # 8).

Filtración en Sephadex G-50. Como resultado de la cromatografía, al graficar D.O. contra número de tubo (Figura # 5), se obtie

nen tres fracciones, de las cuales la número 1 tiene actividad gonadotrópica, y la cuantificación de proteínas indica que constituye el 15% del total de proteína contenida en la muestra sometida a cromatografía. El análisis de pureza en EGA-SDS muestra una sola banda (Figura # 8).

Intercambio iónico en DEAE Sephadex A-50. Este sistema dió como resultado una primera fracción, la cual no es adsorbida en la columna y es obtenida en la solución amortiguadora de equilibrio con la que se lava la resina. Posteriormente con el gradiente discontinuo se obtienen otras dos fracciones; sólo la fracción 1 tiene actividad gonadotrópica.

Electroforesis preparativa. En la Figura # 7 se muestran los resultados observados durante la purificación de GCH-G 100 por electroforesis preparativa. Se recortaron cuatro bandas, de las cuales, por medio de nueva electroforesis se obtienen en solución las proteínas. Se encontró que las dos primeras bandas tienen actividad gonadotrópica.

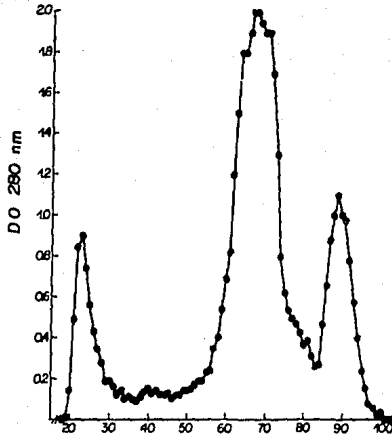


Figura # 4. Gráfica obtenida durante la purificación de GCH - por Sephadex G-100.

Fracción	Tubos
1	21-29
2	58-72
3	82-98

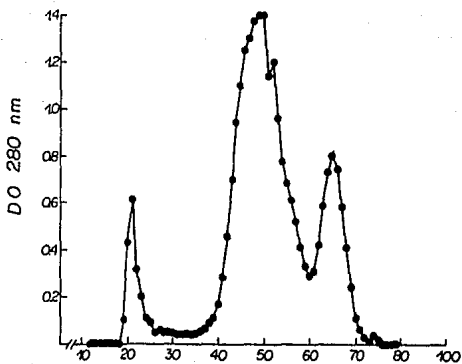


Figura # 5. Gráfica obtenida durante la purificación de GCH - por Sephadex G-50.

Fracción	Tubos
1	19-26
2	40-59
3	61-70

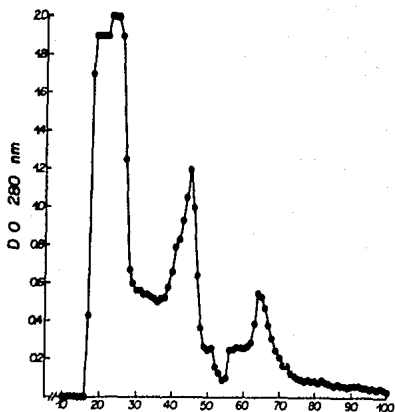


Figura # 6. Gráfica obtenida durante la purificación de GCH - por DEAE Sephadex A-50.

Fracción	Tubos
1	16-28
2	38-47
3	62-70



Figura # 7. EGA-SDS Preparativa para la purificación de GCH.

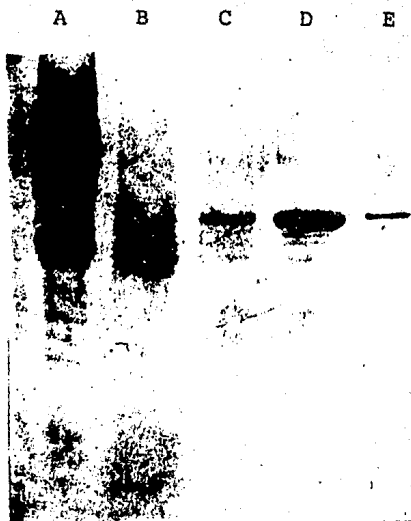


Figura # 8. EGA-SDS analítico de GCH.
A - Estándar de pesos moleculares
B - Hormona comercial (Roussel)
C - GCH-G100
D - GCH-A 50
E - GCH-G50

COMPARACION DE METODOS DE PURIFICACION DE SUBUNIDAD BETA

Intercambio iónico en DEAE Sephadex A-25, con tratamiento previo de urea. La figura # 9 muestra las fracciones recolectadas durante la purificación de subunidad beta a partir de GCH purificada por Sephadex G-50 (GCH-G50). Como se puede observar, se obtiene una buena separación de las subunidades. La cuantificación de proteínas indica que la fracción 1 constituye el 37.68% y la fracción 2 el 22.15% del total de proteína inicial. El análisis de identificación y pureza de la subunidad beta (Figura # 11), muestra que la fracción 1 está constituida por la molécula completa y las dos cadenas polipeptídicas, mientras que la fracción 2 solamente está formada por la cadena beta.

Electroforesis preparativa y tratamiento previo con mercaptoetanol. Como se muestra en la figura # 8, se obtienen cuatro bandas las cuales fueron recortadas y sometidas a electroforesis para la obtención en solución de cada una de las proteínas. Se encontró que ninguna de ellas tiene actividad gonadotrófica.

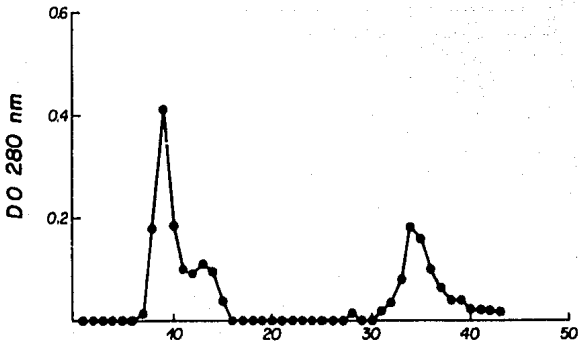


Figura # 9. Gráfica obtenida durante la purificación de GCH- β por DEAE-Sephadex A-25.

Fracción	Tubos
1	7-11
2	31-38



Figura # 10. EGA-SDS Preparativa para la purificación de GCH- β .



Figura # 11. EGA-SDS analítico de GCH- β .

A - Fracción 2

B - Fracción 1

C - GCH nativa (Roussel)

PRODUCCION DE ANTICUERPOS

Los animales inmunizados de acuerdo al esquema descrito antes, fueron sangrados una semana después de la cuarta inmunización, las yeguas de la vena yugular y las conejas de la vena marginal de la oreja. Al titular los antisueros con eritrocitos sensibilizados -- con GCH comercial, se observa (Figura # 12), que la mayor capacidad aglutinante corresponde a las inmunoglobulinas de yegua.

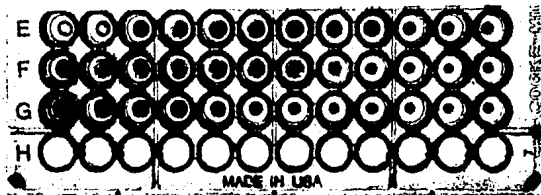


Figura # 12. Prueba de hemaglutinación utilizando eritrocitos-GCH y diluciones seriadas del suero.

Línea E - Igs de yegua anti-GCH

Línea F - Suero de coneja anti-GCH

Línea G - Suero de coneja anti-GCH beta

ACOPLAMIENTO DE GCH A ERITROCITOS

Al incubar GCH a eritrocitos por las diferentes técnicas, glutaraldehído, ácido tánico y formaldehído-hidroquinona con diluciones seriadas del suero de coneja anti-GCH, se obtuvieron los siguientes resultados (Figura # 13):

- a). Los eritrocitos tanizados no aglutinan.
- b). Los eritrocitos acoplados con formaldehído-hidroquinona - aglutinan aparentemente en forma inespecífica ya que nunca se encontró la dilución final.
- c). Los eritrocitos acoplados con glutaraldehído muestran una actividad razonable en su aglutinación.

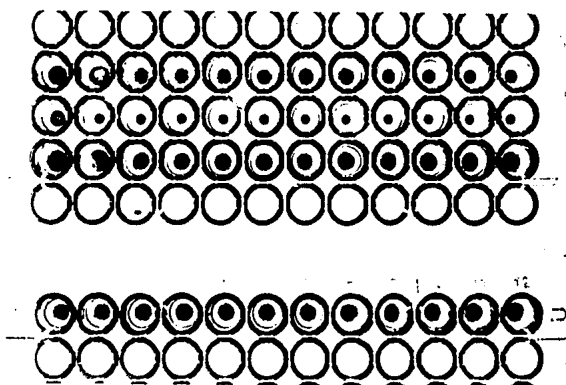


Figura # 13. Prueba de hemaglutinación

Línea E - Glutaraldehído

Línea F - Acido tánico

Línea GA- Formaldehído e hidroquinona

ELECCION DE CONCENTRACION DE GCH

Utilizando eritrocitos sensibilizados con diferentes concen -
traciones de GCH-G50 por el método de glutaraldehído, se incubaron
con diluciones seriadas del suero de coneja anti-GCH, desde 1:2 -
hasta 1:4096 y se obtuvieron los siguientes resultados:

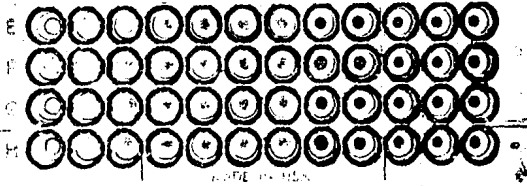


Figura # 14. Prueba de hemaglutinación

Línea E - 325 ug

Línea F - 650 ug

Línea G - 975 ug

Línea H - 1300 ug

ESTANDARIZACION

Se realizaron ensayos de inhibición de hemaglutinación utilizando hormona comercial (Roussel) en cantidades conocidas (desde 200 hasta 0.1 UI de GCH/ml) para conocer la sensibilidad de la prueba. Las condiciones bajo las cuales se realizaron estos ensayos son las siguientes:

1. Eritrocitos sensibilizados con 650 ug de GCH-G50/0.1 ml de paquete celular tratado con glutaraldehído.
2. Suero de coneja anti-GCH en una dilución de 1:128.
3. De cada reactivo se utilizan 25 ul.

Se encontró que la sensibilidad de la prueba es de 3 UI de GCH/ml (Figura # 15).

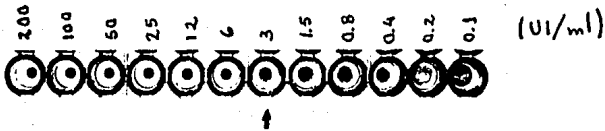


Figura # 15. Estandarización con GCH comercial

PRUEBAS DE INHIBICION

Se preparó un lote de eritrocitos de carnero a los cuales se acoplaron 650 ug de GCH-G50 mediante la técnica de glutaraldehído por cada 0.1 ml de paquete celular. Con estos eritrocitos se probaron 85 orinas provenientes de mujeres no embarazadas y 84 de mujeres embarazadas, utilizando suero de coneja anti-GCH a una dilución 1:128. Como se observa en las figuras # 16 y # 17, existen 6 casos de orinas de mujeres embarazadas que no inhiben la hemaglutinación, así como un caso de orina de mujer no embarazada con capacidad de inhibir la reacción.

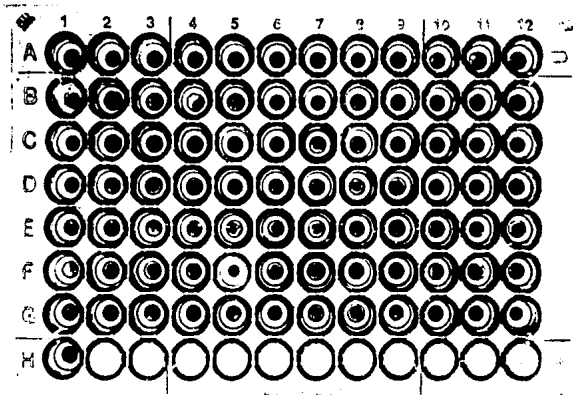


Figura # 16. Pruebas de inhibición de hemaglutinación utilizando orinas de mujeres no embarazadas.

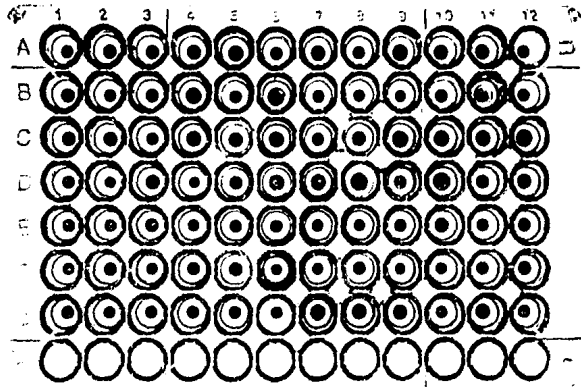


Figura # 17. Pruebas de inhibición de hemaglutinación utilizando orinas de mujeres embarazadas.

DISCUSSION

La metodología implicada en una prueba inmunológica como la descrita en este trabajo, aparentemente es sencilla, y existen muchas publicaciones al respecto.

En México existen muchos laboratorios que distribuyen en forma comercial equipos para el diagnóstico de embarazo; muchos de estos equipos están constituidos por antisueros en contra de la molécula completa de la hormona, por lo que las reacciones falsas constituyen del 3 al 5% aproximadamente.

De la información obtenida, se desprende que nuestro país, en 1980, importó 400 Kg de GCH con un costo aproximado de 12 millones de pesos (57). Podemos decir entonces que, aunque en nuestro país se distribuyen comercialmente equipos para el diagnóstico de embarazo de distintos laboratorios, todos ellos implican la importación de reactivos, equipos, estuches, etc., por lo que para lograr el objetivo fijado de desarrollar la prueba utilizando exclusivamente insumos nacionales, fué necesario probar muchas técnicas para finalmente utilizar:

- a). La más sencilla.
- b). La más barata.
- c). La que proporcione un mejor rendimiento.
- d). La que permita la obtención de productos inmunológicamente activos.

Inicialmente se compraron equipos comerciales para poder verificar la actividad inmunológica de los primeros reactivos.

El método seleccionado para la concentración de la hormona a

partir de la orina de mujeres cursando el primer trimestre del embarazo, fué el de precipitación con acetona debido a que los productos obtenidos por las otras técnicas carecían de actividad gonadotrópica cuando se probaron con sueros anti-GCH comerciales.

La purificación de GCH por los diversos tipos de cromatografía permitió demostrar que, de los productos obtenidos, el más puro de acuerdo a los resultados de electroforesis en gel de acrilamida-SDS, fué el obtenido por filtración en Sephadex G-50. La figura # 8 muestra que la pureza obtenida por las demás columnas fué pobre, ya que se pueden observar varias bandas de pesos moleculares distintos.

La separación de cadenas alfa y beta se realizó por medio de dos técnicas: EGA-SDS preparativa, utilizando un agente reductor y visualizando las bandas de proteínas con acetato de sodio 4M, lo cual dió como resultado la obtención de cuatro bandas que fueron recortadas y sometidas a una nueva electroforesis para obtener las proteínas en solución.

Sin embargo, una vez obtenidos estos productos, no mostraron actividad gonadotrópica.

Por otro lado, la disociación de las subunidades por medio de urea y la separación en columna de DEAE Sephadex A-25 (Figura # 9) se realizó con bastante éxito. Como se observa en la figura # 11, la subunidad alfa está contaminada con hormona completa y cadena beta mientras que la subunidad beta es electroforéticamente homogénea.

En cuanto a la producción de antisueros, observamos que al ti

tularlos (Figura # 12), el que presenta una mayor actividad inmunológica es la preparación de inmunoglobulinas de yegua (hasta dilución 1:512), siguiéndole el suero de coneja anti-GCH (dilución - - 1:128) y finalmente el suero de coneja anti-GCH beta (dilución - - 1:32).

Estos resultados sugieren que las inmunoglobulinas de yegua, debido a su mayor título, serían las adecuadas para los ensayos de inhibición de hemaglutinación. Sin embargo, al ser utilizadas en las pruebas con muestras de orina, en todas ellas se observa aglutinación, aún con las orinas provenientes de mujeres embarazadas, indicando esto que hay una reacción inespecífica que ocasiona to dos estos falsos negativos.

Los motivos por los cuales las inmunoglobulinas de yegua no funcionaron no fueron investigados.

La subunidad beta, tal como está reportado, tiene poca capacidad antigénica dado que la coneja inmunizada responde con un título bajo de anticuerpos a pesar de haber recibido cuatro dosis, de acuerdo al esquema descrito anteriormente.

Debido a ello, en el trabajo actual se decidió utilizar el suero de coneja inmunizada con la molécula completa, aunque es deseable el continuar inmunizando la coneja con la subunidad beta con la finalidad de incrementar su título y tener así un anticuerpo más específico que nos permita disminuir el número de resulta dos falsos.

El acoplamiento de GCH a los eritrocitos por diferentes métodos nos da un patrón de aglutinación diferente. En el caso de tra-

tamiento con formaldehído-hidroquinona, observamos aglutinación - aún en diluciones muy elevadas (Figura # 13) del antisuero, es decir, hay una reacción inespecífica que impide que los eritrocitos sedimenten. En la misma figura, con los eritrocitos tanizados no se efectúa un buen acoplamiento de la hormona ya que en todas las diluciones del anticuerpo los eritrocitos sedimentan. Entonces, - de acuerdo a estos resultados, vemos que el mejor método de acoplamiento de GCH a la superficie de los eritrocitos se logra con glutaraldehído, ya que permite observar aglutinación cuando se usa el anticuerpo y además permite observar la inhibición de la hemaglutinación cuando en el sistema se añade orina de mujeres embarazadas.

Habiendo elegido el método de sensibilización y el antisuero mediante pruebas de aglutinación con eritrocitos sensibilizados - con hormona comercial, se probaron diferentes concentraciones de GCH acopladas a eritrocitos.

Basados en el criterio de utilizar la menor cantidad de GCH-G50 y la mayor dilución del antisuero con el propósito de tener una prueba sensible, se eligió la concentración de 650 ug y la dilución del antisuero de 1:128 (Figura # 14).

El equipo así desarrollado tiene una sensibilidad de 3 UI de GCH/ml de orina y una confiabilidad del 95.9%.

CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten - establecer una metodología sencilla que conduce al montaje de la prueba para el diagnóstico del embarazo. Consiste en:
 - a). Recolección de muestras de orina de mujeres embarazadas.
 - b). Concentración de GCH mediante precipitación con acetona.
 - c). Purificación de GCH por Sephadex G-50.
 - d). Inmunización de conejas con 980 ug de GCH-G50.
 - e). Obtención y titulación del suero anti-GCH.
 - f). Acoplamiento covalente de GCH-G50 a eritrocitos de carnero con 650 ug de hormona por cada 0.1 ml de paquete celular, - utilizando el método de glutaraldehído.
 - g). Estandarización de la prueba.
 - h). Montaje de la prueba de inhibición de hemaglutinación utilizando 25 ul de cada reactivo.
- 2.- El equipo así desarrollado detecta hasta 3 UI de GCH/ml de orina y tiene una confiabilidad del 95.9%.
- 3.- Aunque la sensibilidad no es la fijada en el objetivo, podemos afirmar que se puede montar una prueba más específica y más sensible si se inmunizan conejas con la subunidad beta acoplada a otra proteína, por ejemplo toxoide tetánico, para aumentar su capacidad inmunogénica (37).
- 4.- El desarrollo a nivel industrial implica:
 - a). El estudio de la estabilidad de los productos obtenidos.
 - b). Pruebas de control de calidad necesarias para su venta.
 - c). Producción de lotes grandes.

SOLUCIONES

Solución de Alsever

Dextrosa	2.05	g
Citrato de Sodio	0.8	g
Acido Cítrico	0.05	g
Cloruro de Sodio	0.45	g
Agua Destilada	100	ml

Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. El pH de la solución debe ser 6.1.

Amortiguador de Fosfatos 0.01M, pH=7.4 (PBS)

Solución A	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27.6	g/l
Solución B	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	53.65	g/l

Se mezclan aproximadamente 16.5 ml de Solución A con 33.5 ml de Solución B, se añaden 7.4 g de NaCl, se ajusta el pH y se afora a un litro con agua destilada.

Amortiguador de Acetatos 0.1M, pH=5

Acetato de Sodio	12	g
Acido Acético Glacial	0.6	ml

Se mide el pH, se ajusta si es necesario y se afora a un litro con agua destilada.

Amortiguador de Borato-Acido Succínico 0.05M, pH=7.5

Solución A	Borato de Sodio $\cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	19.1	g/l
	Cloruro de Sodio	7.5	g/l
Solución B	Acido Succínico	5.9	g/l
	Cloruro de Sodio	7.5	g/l

Se mezclan volúmenes iguales de ambas soluciones y se ajusta el pH si es necesario.

Glutaraldehído Neutralizado

Nueve mililitros de glutaraldehído se mezclan con un mililitro de Carbonato de Sodio al 10%.

Amortiguador de E.D.T.A. pH=8.4

E.D.T.A. 17 g/l

Se ajusta el pH con Hidróxido de Sodio 2N.

Amortiguador Tris-Fosfato 0.04M, pH=8.7

Fosfato de sodio monobásico 5.4 g

Tris (hidroximetil)-aminometano 4.84 g

Se mide el pH, se ajusta si es necesario y se afora a un litro con agua destilada.

Amortiguador 0.02M Tris-0.15M Glicina, pH=8.4

Tris (hidroximetil)-aminometano 12 g

Glicina 57.6 g

Se mide el pH, se ajusta si es necesario y se afora a un litro con agua destilada. De esta solución se toman 200 ml, - se le añaden 8 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y se afora a un litro con agua destilada.

BIBLIOGRAFIA.

1. Albert, A. Follicle-stimulating activity of human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocr. Metab.* 29: 1504-1509, 1969.
2. Arends, J. Radioimmunoassay of urinary human chorionic gonadotropin. *Acta Endocr.* 66: 611-626, 1971.
3. Ashitaka, Y et al. Purification and properties of chorionic gonadotropin from the trophoblastic tissue of hydatiform mole. *Endocrinology* 90: 609-617, 1972.
4. Ayala, A. R. et al. Highly sensitive radioimmunoassay for chorionic gonadotropin in human urine. *J. Clin. Endocr. Metab.* 47: 767-773, 1978.
5. Bahl, O. P. Human chorionic gonadotropin. Purification and physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* 244: 567-574, 1969.
6. Bahl, O. P. Human chorionic gonadotropin. The nature of the carbohydrate units. *J. Biol. Chem.* 244: 575-583, 1969.
7. Bahl, O. P. Human chorionic gonadotropin. Amino acid sequence of the alfa and beta subunits. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 48: 416-422, 1972.
8. Bell, J. J., Canfield, R. E. and Sciarra, J. J. Purification and characterization of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 84: 298-307, 1969.
9. Bellisario, R., Carlsen, R. B. and Bahl, O. P. Human chorionic gonadotropin. Linear aminoacid sequence of the alfa subunit. *J. Biol. Chem.* 248: 6796-6809, 1973.
10. Berry, M. C., Thompson, J. D. and Hatcher, R. The radioreceptor assay for hCG in ectopic pregnancy. *Obstet. Gynec.* 54: 43-43, 1979.
11. Borth, R., Ferin, M. and Menzi, A. Comparison of bioassay and immunoassay of human chorionic gonadotropin in urine. *Acta Endocr.* 50: 335, 1965.

12. Braunstein, G. D. et al. Widespread distribution of a chorionic - gonadotropin-like substance in normal tissues. *J. Clin. Endocr. Metab.* 49: 917-925, 1979.
13. Campbell, D. H. et al. Methods in Immunology, 2da. ed. W. A. Benjamin, USA 1970.
14. Catt, K. J., Dufau, M. L. and Vaitukaitis, J. L. Appearance of - hCG in pregnancy plasma following the initiation of implantation of the blastocyst. *J. Clin. Endocr. Metab.* 40: 537-547, 1975.
15. Das, C., Talwar, G. P. and Ramakrishnan, S. Discriminatory effect of anti-Pr-beta-hCG-TT antibodies on the neutralization of the - biological activity of placental and pituitary gonadotropins. - *Contraception* 18: 35-50, 1978.
16. Davidsohn, I. y Henri, B. J. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio, 6xta. ed. Salvat, España 1981.
17. Donini, S. et al. Subunits of human chorionic gonadotropin. An - immunochemical study. *Acta Endocr.* 73: 133-145, 1973.
18. Faulk, W. P. Immunology of the maternofetal relationship. *Immunology* 80.
19. Fisher, L. An introduction to gel chromatography. North Holland Publishing Co. Sweeden, 1969.
20. Fudenberg, H. H. et al. Inmunología Clínica, 2da. ed. El Manual-Moderno, México 1980.
21. Fulthorpe, M. B. et al. Pregnancy diagnosis by a one-stage passive haemagglutination inhibition method. *Brit. Med. J.* 20: 1043-1054, 1963.
22. Garvey, C. et al. Methods in Immunology, Publishers W. A. Benjamin, 3a. ed. USA 1979.
23. Givens, J. R. Endocrinology of Pregnancy, Year Book Medical Publishers, USA 1981.
24. Goverde, B. C. et al. Chemical composition and its relation to - biological activity. *Acta Endocr.* 59: 105-119, 1968.

25. Guyton, A. C. Tratado de Fisiología Médica, 6xta. ed. Ed Interamericana, México 1984.
26. Hell, H. van, et al. Studies on human chorionic gonadotropin. Purification and some physicochemical properties. Acta Endocr. 59: 89-104, 1968.
27. Herbert, W. J. J. Passive haemagglutination with special reference to the tanned cell technique. Handbook of Experimental Immunology, 1978.
28. Heukeshoven, J. and Dernick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrilamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis 6: 103-112, 1985.
29. Hobson, B. M. Diagnóstico de embarazo utilizando la prueba Preg-nosticon. J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth. 75: 718-723, 1968.
30. Hobson, B. M. and Wide, L. The immunological and biological activity of human chorionic gonadotropin in urine. Acta Endocr. 46: - 632-638, 1964.
31. Holloday, L. A. and Puett, D. Gonadotropin and subunit conformation. Arch. Bioch. Biophys. 171: 708-720, 1975.
32. Ito, Yusei. Immunological studies for the assay of human chorionic. Nagoya Me. J. 16: 177-200, 1971.
33. Jaffe, R. B., Lee, P. A. and Midgley, A. R. Jr. Serum gonadotropins before, at the inception of, and following human pregnancy. J. Clin. Endocr. Metab. 29: 1281-1283, 1969.
34. Kabat, E. A. Inmunquímica Experimental, 2da. ed., México 1964.
35. Kadar, N., Caldwell, B. V. and Romero, R. A. A method of screening for ectopic pregnancy and its indications. Obst. Gynec. 58: 162-165, 1981.
36. Katzman, P. A. et al. The preparation of chorionic gonadotropin by chromatographic absorption. J. Biol. Chem. 148: 501, 1943.
37. Kenecht, M. The lack of an effect of active immunization with the beta subunit of chorionic gonadotropin coupled to tetanus toxoid

- on the growth of human choriocarcinoma maintained in the hamster cheek pouch. *Endocrinology* 106: 155-161, 1980.
38. Kenecht, M. Neutralization of the gonadotropic effects of human-chorionic gonadotropin secreted by human choriocarcinoma transplanted in hamster actively immunized against the beta-subunit of human chorionic gonadotropin coupled to tetanus toxoid. *Endocrinology* 106: 150-154, 1980.
 39. Kimura, Hiroko. Immunoassay with stable polystyrene latex particles. *J. Immunological Methods*. 38: 356-368, 1980.
 40. Lowry, O. H. et al. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-269, 1951.
 41. Marenzi, A. D. *Hormonas*, Ed. El Ateneo, Argentina 1957.
 42. Martin, D. W. et al. *Biocufmica de Harper*, 18va. ed. El Manual Moderno, M6xico 1982.
 43. Mc. Isaac, S. F. and Karnauchow, P. N. Prozone phenomenon in the direct agglutination test for pregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 109: 1213, 1971.
 44. Morgan, F. J., Birken, S. and Canfield, R. E. The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alfa subunit and beta subunit. *J. Biol. Chem.* 250: 5247-5258, 1975.
 45. Morgan, F. J. and Canfield, R. E. Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 88: 1045-1053, 1971.
 46. Morgan, F. J. et al. Properties of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 94: 1601-1606, 1974.
 47. Nixon, W. E. et al. Similarity of antigenic determinants in pituitary and chorionic gonadotropins from primates. *Endocrinology* 88: 702-706, 1971.
 48. Olson, C. M. et al. Limitations of qualitative serum beta-hCG assay in the diagnosis of ectopic pregnancy. *J. of Reproductive Medicine* 28: 838-842, 1983.
 49. Paul, W. E. and Ross, G. T. Immunologic cross-reaction between -

- human chorionic gonadotropin and pituitary gonadotropin. *Endocrinology* 75: 352-358, 1964.
50. Printz, M. P. et al. Human Angiotensinogen. Purification, partial characterization, and a comparison with animal prohormones. *J. Biol. Chem.* 252: 1654-1662, 1977.
 51. Puett, D. et al. Characterization of the human chorionic gonadotropin fractions in pregnancy urine. *Acta Endocr.* 89: 612-624, 1978.
 52. Ramakrishnan, S., Das, C. and Talwar, G. P. Recognition of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin and subdeterminants by target tissue receptors. *Biochem. J.* 176: 599-602, 1978.
 53. Rathnam, P. and Saxena, B. B. Subunits of LH. *J. Biol. Chem.* 246: 7087, 1971.
 54. Robbins, J. L. et al. Latex agglutination reactions between human chorionic gonadotropin and rabbit antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109: 321-325, 1962.
 55. Schuurs, E. and Homan, J. D. H. Studies on human chorionic gonadotropin. *Acta Endocr.* 59: 120-138, 1968.
 56. Scott, M. P. New Pregnancy test technology and clinical applications. *Outlook* 3: 2-6, 1985.
 57. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Importación de Productos Químicos y sus Materias Primas, 1978-1980. México 1981.
 58. Shastri, N. et al. Differential affinity of Anti-Pr-beta-hCG-TT antibodies for hCG and hLH. *Contraception* 18: 23-33, 1978.
 59. Steven, C. M., Parich, I. and Cuatrecasas, P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.*
 60. Swaminathan, N., Rasor, J. and Braunstein, D. Preparation and properties of high titer antisera against the beta-unit of human chorionic gonadotropin. *Molecular Immunology* 16: 113-116, 1978.
 61. Vaitukaitis, J. L. et al. A radioimmunoassay which specifically -

- measures human chorionic gonadotropin in the presence of human -
luteinizing hormone. Am. J. Obstet. Gynecol. 113: 751-758, 1972.
62. Vaitukaitis, J. et al. A method for producing specific antisera
with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr. 33: 988-991, -
1971.
63. Talwar, G. P. et al. Hormones and antibodies in the study and -
control of reproductive processes. Immunology 80: 1118-1135, -
1980.
64. Tsuruhara, T. et al. Biological properties of hCG after removal
of terminal sialic acid and galactose residues. Endocrinology -
91: 296-301, 1972.
65. Weare, J. A. and Reichert, L. E. Studies with carbodiimido-cross
linked derivates of bovine lutropin. J. Biol. Chem. 254: 6072 -
6979, 1979.
66. Weber, K. and Osborn, The reliability of molecular weight deter-
minations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244: 4406-4412, 1969.
67. Widmann, F. K. Interpretación Clínica de las Pruebas de Laborato-
rio, 2da. ed. Ed. Jims, España 1981.