

302927  
2  
2eje.

universidad femenina de México  
UM

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

Con Estudios Incorporados a la U. N. A. M.

DETERMINACION DE GONADOTROPINA  
CORIONICA HUMANA EN UN MEDICAMENTO  
(Desarrollo de un método cuantitativo de valoración  
de HCG por inhibición de hemaglutinación en tubo)

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

MARIANNA STANISLAWA KACZOR CRAUSAZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

Esta tesis se realizó en el laboratorio

## **GRUPO ROUSSEL DE MEXICO.**

### **MI agradecimiento:**

Para Grupo Roussel de México por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y en forma muy especial al Ing. Francisco Muñoz Casillas y a la Quím. María Libia García Ruiz.

Por la apreciable ayuda recibida de M. Jean-Francois Beauvallet y M. P. Petitjean de ROUSSEL UCLAF en Francia.

Por las atenciones recibidas de la Q.F.B. Velia López Ortiz y del personal del laboratorio de Control de Calidad, así como él de Servicio Técnico.

**Mi agradecimiento por su apoyo y atenciones a:**

**Dr. Miguel Romero Lira.**

**Dr. Jesús Fainsod, Q.F.B. Ma. Esther Morales y Q.B.P. Martha Morales, de Carter Wallace de México.**

**Q.F.B. Antonio Roldan , Q.B.P. Sergio Escamilla, Dr. Martín Muy y Q.B.P. Elizabeth Mancera, de Organon de México.**

**Dr. Samuel Karchmer y Dr. Antonio Espinoza del Instituto Nacional de Perinatología.**

**Quím. Narciso Martínez del Hospital Juárez y Dr. Josué Garza del Instituto Nacional de la Nutrición.**

**A los laboratorios Pharmacia, Hybritech , Boehringer Mannheim y Abbott.**

Un agradecimiento profundo y sincero por el apoyo recibido en la elaboración de este trabajo, por el ejemplo que constituyen tanto sus labores en la docencia, como su amabilidad.

- A mi directora de tesis: Q.F.B. Maité Astigarraga Zavaleta
- A mis asesores: Dr. Luis Iglesias  
Q.F.B. Esperanza Hernández Koellig  
Q.F.B. José Luis Ibarnea  
Q.F.B. Rebeca Mendizabal
- A mis profesores: Q.F.B. Enrique Calderón  
Q.F.B. Santiago Salazar López
- A Nuestra directora de carrera: M. en C. Verónica Rodríguez López.

A la Universidad Femenina de México y a la memoria de su fundadora Sra. Doña Adela Formoso de Obregón Santacilia por su lucha para dignificar la vida de la mujer y por habernos dado una casa de estudios donde vivimos y aprendimos durante los nueve semestres de nuestra vida académica, un poco de nuestra alma se quedará siempre con ella.

## Dedicatoria

Llegando al término de este modesto trabajo, quiero dedicarlo a mis seres queridos y testimoniales aquí mi agradecimiento:

A mi madre Anne-Marie, por su entrega durante tantos años, por darme siempre su apoyo incondicional y por haberme transmitido su entusiasmo ante la vida.

A mi padre Feliks, por habernos enseñado el valor del estudio y el amor a la verdad por encima de todo.

A mi hermano, por ser mi compañero desde la infancia, por compartir conmigo sus búsquedas y por su generosidad.

A mis tíos y primos de las queridas familias Kaczor, Crausaz y Lortal, nos unen nuestros orígenes y ojalá también nuestro futuro. En especial a Maggi y a la memoria de Marian.

A mis amigas Anne-Laure, Monique y Janine, con las cuales compartí alegrías, sueños y cariño.

A toda la familia de Manuel que me recibió con tanto afecto y en particular a la familia de Martha y Carlos Díaz Infante.

A Manuel, mi esposo, por brindarme su apoyo durante mi carrera y mi trabajo de tesis. Por transmitirme su ánimo ante la vida. Pero mi sentimiento de gratitud no podría caber en estas palabras y todavía menos si lo acompaña mi amor. Sencillamente, doy gracias a Dios de que pueda hoy, a mi lado, leer estas líneas.

A Dios por la vida que recibí.

## ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo  
Ag: Antígeno  
AMPc: Adenosin-3',5'-monofosfato cíclico  
ASN: Asparragina  
CV: Coeficiente de variación  
EIA: Ensayo inmunoenzimático  
ELISA: " Enzyme-linked inmuno-sorbent assay "  
          inmunoensayo enzimático de fase sólida  
FSH: Hormona folículo estimulante  
GTPc: Guanosin-3',5'-monofosfato cíclico  
HCG: Gonadotropina coriónica humana  
HI: Inhibición de hemaglutinación  
IFM: Ensayo fluorométrico  
IgG: Inmunoglobulinas G  
IRMA: Ensayo inmunoradiométrico  
IRP: "International Reference Preparation"  
          Preparación internacional de referencia  
IS: Estandar internacional  
LH : Hormona luteinizante  
mRNA: Acido ribonucleico mensajero  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
P.E.: Punto de equilibrio  
RIA: Radio inmunoensayo  
SER : Serina  
SSI: Solución salina isotónica  
THR: Treonina  
TSH: Hormona tirotrópica  
TYR: Tyrosina  
UI: Unidades internacionales  
USP: United States Pharmacopeia  
WHO: "World Health Organization"

# INDICE

Introducción.....	I
-------------------	---

## CAPITULO I

1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Objetivos.....	3

## CAPITULO II GENERALIDADES

2.1 Hormonas.....	4
2.2 Gonadotropinas.....	4
2.3 Gonadotropina coriónica humana (HCG).....	6
2.3.1 Origen y química.....	6
A) Origen, descripción y solubilidad	
B) Estructura química	
2.3.2 Genes de estructura y Expresión.....	12
2.3.3 Secreción.....	12
2.3.4 Concentraciones séricas y metabolismo.....	13
2.4 Farmacología de la HCG.....	15
2.4.1 Indicaciones terapéuticas de la HCG.....	15
2.4.2 Precauciones a considerar en el uso de la HCG.....	15
2.4.3 Farmacocinética (absorción, distribución y excreción).....	17
2.4.4 Farmacodinamia (modo de acción, mecanismo de acción, relación estructura actividad ).....	18
2.4.5 Toxicidad.....	19
2.4.6 Contraindicaciones y efectos adversos.....	20
2.4.7 Preparados, vía de administración, y dosis.....	20
2.4.8 Almacenamiento, estabilidad y requerimientos farmacopéuticos.....	20
2.5 Métodos de extracción y de purificación de HCG	
2.5.1 Métodos de extracción.....	21
2.5.2 Métodos de purificación.....	23
2.6 Proceso de fabricación de polvo liofilizado de HCG para solución inyectable.....	23
2.7 Métodos de valoración de HCG.....	25
2.7.1 Métodos biológicos.....	25
2.7.2 Métodos inmunológicos.....	28
2.7.2.1 Prueba de inhibición de aglutinación.....	28
2.7.2.2 Ensayo con radioreceptores.....	31
2.7.2.3 Radioinmunoensayos.....	32

2.7.2.4	Radioinmunoensayos enzimáticos.....	33
2.7.2.5	Ensayos inmunométricos.....	34
2.7.3	Otros métodos de valoración de HCG.....	36
2.8	Importancia clínica y uso de la HCG.....	36
2.8.1	Pruebas de diagnóstico.....	36
	A) Prueba de embarazo	
	B) Prueba de diagnóstico y monitoreo de tumores	
	C) Uso de la Hcg como método de contracepción	
2.9	Estandarización en la valoración de HCG.....	40
2.10	Proceso de validación en la industria farmacéutica.....	41
	A) Concepto general de validación.....	41
	B) Validación de un método analítico.....	42

### **CAPITULO III DESARROLLO DE UN MÉTODO DE VALORACIÓN HCG EN UN MEDICAMENTO**

3.1	Selección de tres inmunoensayos comercializados en México, susceptibles de utilizarse en la industria farmacéutica para la medición de la HCG.....	48
3.1.1	Criterios para la selección de tres inmunoensayos para valoración de HCG en la industria farmacéutica.....	48
3.1.2	Tabla de los inmunoensayos comercializados en México para la valoración de HCG y sus características.....	51
3.1.3	Prueba de reactivos.....	51
3.1.4	Método.....	52
3.1.5	Resultados.....	53
3.1.6	Análisis de resultados y conclusión.....	54
3.2	Pruebas preliminares para la determinación de la sensibilidad de los reactivos.....	56
3.3	Pruebas preliminares de estabilidad del reactivo y de la HCG en diferentes soluciones y a diferentes temperaturas.....	61
3.3.1	Determinación de la estabilidad del reactivo.....	61
3.3.2	Determinación de la sensibilidad del reactivo.....	63
3.3.3	Determinación de la interferencia por parte de los excipientes y diluentes.....	66
3.3.4	Determinación de la estabilidad de la materia prima en SSI.....	69
3.3.5	Determinación de la estabilidad de la materia prima con excipientes y buffer fosfato-albúmina.....	71

3.3.6	Estabilidad de una solución de materia prima, con excipientes de formulación y concentración igual a la solución envasada en producción.....	72
3.3.7	Conclusión.....	74
3.4	Selección del inmunoensayo más apropiado para la valoración de HCG en un medicamento y la validación del método analítico correspondiente.....	78
3.4.1	Criterios para la selección del inmunoensayo.....	78
3.4.2	Método.....	78
3.4.3	Resultados.....	80
3.4.4	Análisis de resultados.....	83
3.4.5	Conclusión.....	87
3.5	Desarrollo de un procedimiento cuantitativo para la valoración de HCG por método de inhibición de hemaglutinación en tubo UCG-TITRATION-SET.....	92
3.5.1	Calibración de los goteros incluidos en el estuche "UCG-TITRATION SET".....	92
3.5.2	Determinación de una linealidad entre la concentración de la HCG y el diámetro del anillo en la prueba de inhibición de hemaglutinación.....	92
3.5.3	Validación de la linealidad del sistema de medición.....	93
3.5.4	Validación de la repetibilidad del método analítico con materia prima ( prueba preliminar).....	94
<b>CAPITULO IV    METODO ANALITICO DESARROLLADO.....</b>		<b>103</b>
4.1	Determinación de la sensibilidad del reactivo.....	106
4.2	Valoración de materia prima deHCG.....	110
4.3	Valoración de producto terminado.....	113
4.4	Procedimiento general de titulación.....	117
4.5	Demostración de fórmulas.....	119
4.7	Hojas de datos y resultados.....	121
<b>CAPITULO V    VALIDACION DEL METODO DE CUANTIFICACION DE HCG EN UN MEDICAMENTO POR INHIBICION DE HEMAGLUTINACION EN TUBO ( UCG - TITRATION SET)</b>		
5.1	Plan de validación.....	124
5.1.1	Ensayos preliminares.....	124
5.1.2	Linealidad del sistema de medición.....	126
5.1.3	Estabilidad de la muestra analítica.....	127
5.1.4	Precisión del sistema de medición.....	128
5.1.5	Linealidad del método analítico.....	129
5.1.6	Exactitud del método analítico y repetibilidad.....	130
5.1.7	Reproducibilidad del método analítico.....	131

5.1.8	Especificidad del sistema de medición.....	132
5.1.9	Comparación entre el método biológico e inmunológico.....	133
5.2	Cronograma y estimación de costo del programa de validación.....	134
5.2.1	Cronograma para la validación.....	134
5.2.2	Cantidad de materia prima de HCG necesaria para la validación.....	135
5.2.3	Cantidad de reactivo "UCG-TITRATION SET" necesario para la validación.....	136
5.2.4	Cantidad de producto terminado necesario para la validación.....	136
5.2.5	Costo total de la validación.....	136
5.2.6	Costo de las valoraciones biológicas.....	137
5.3	Análisis y conclusión.....	137
<b><u>CAPITULO VI</u> CONCLUSIONES GENERALES.....</b>		<b>138</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u>.....</b>		<b>141</b>
<b><u>ANEXOS</u>.....</b>		<b>146</b>

## INTRODUCCION

La prueba de valoración de Gonadotropina Coriónica Humana " HCG ", plantea serios problemas a los laboratorios de la industria farmacéutica, ya que el único método autorizado para la valoración de los productos terminados en los que se utiliza esta hormona, es el biológico.

Esta hormona es utilizada en numerosos medicamentos, y por lo tanto los laboratorios deben de valorar un número muy elevado de lotes de producto terminado utilizando precisamente el método de valoración biológica, que presenta múltiples inconvenientes : demasiado tiempo para su realización, ya que dura como mínimo 5 días, el sacrificio de muchos animales, en general unas 40 ratas (en cada prueba a las que después de administrarles la hormona se les extirpan los ovarios o la próstata para determinar el aumento de peso producido por la inyección del fármaco), y finalmente un costo también elevado en cada prueba. A pesar de todos estos inconvenientes la industria farmacéutica no ha desarrollado aún un método inmunológico alternativo y por lo tanto se ve obligada a continuar utilizando el método biológico, único permitido por las Farmacopeas .

Los laboratorios farmacéuticos que producen este medicamento deben de someter tanto cada lote de materia prima empleado en su fabricación, como de producto terminado, a un control de calidad riguroso a fin de cumplir con las especificaciones dictadas por la Secretaría de Salud, especificaciones estas que aparecen en las Farmacopeas editadas por cada país y que estipulan en este caso en particular que el título de la hormona debe de estar comprendido entre el 80% y el 125% del valor etiquetado.

Con estos antecedentes, Laboratorio Roussel de México solicitó el desarrollo de un método de valoración inmunológico, alternativo al biológico, para valorar la hormona en producto terminado, que pudiera presentarse en su momento a las autoridades de la Secretaría de Salud, para su autorización.

Es un hecho que las pruebas biológicas han sido casi totalmente substituidas por pruebas inmunológicas en el área clínica, donde la dosificación de la HCG permite realizar tanto diagnósticos de embarazo, como de eficacia de tratamientos oncológicos, sin embargo, la industria farmacéutica aún no ha dado este paso y sigue utilizando el método biológico.

Bien se entiende que las propiedades medidas por las valoraciones biológicas e inmunológicas son distintas, por esta razón solamente se pretende substituir la valoración biológica en productos terminados, más no en materia prima. Sin embargo, debe de considerarse también que los avances obtenidos en los últimos años en las técnicas inmunológicas, así como en los conocimientos relacionados con la estructura, estabilidad, pureza y función de la hormona, han sido muy importantes. En efecto, los resultados de las primeras pruebas, realizadas en los

años sesentas, que confrontaban las pruebas biológicas e inmunológicas revelaron algunas discrepancias entre los dos métodos, sin embargo desde entonces, las técnicas inmunológicas han evolucionado notablemente.

Al considerar la posibilidad de efectuar una valoración inmunológica, para la determinación de una substancia en un producto terminado, como método alterno de una valoración biológica, hay que analizar dos puntos principales: Primero, determinar si existe una buena correlación entre los dos títulos y segundo, demostrar que la valoración inmunológica cumple con los requerimientos de precisión, exactitud y linealidad de un método analítico aceptable.

Con base en estas consideraciones, el propósito de este trabajo fue el de determinar la posibilidad de uso de un ensayo inmunológico para valorar gonadotopina coriónica humana en un medicamento, para lograrlo, se llevó a cabo una revisión de la bibliografía que sobre el tema existe al día de hoy, analizándose igualmente de manera exhaustiva los reactivos que ofrece el mercado nacional.

La estrategia consistió en analizar todos los tipos de reactivos existentes, incluyendo las posibilidades que ofrecían las diversas pruebas es decir: RIA, Inhibición de Hemaglutinación, FluoroInmunoensayo y Ensayo Inmunoenzimático, preseleccionando algunos de ellos en base a su capacidad para tener buena correlación con la valoración biológica, para finalmente seleccionar el reactivo que presentó los mejores resultados, y continuar con su adaptación y normalización para la cuantificación de HCG en un medicamento.

Como los reactivos que se analizaron están destinados a análisis clínicos, se desarrollaron innumerables pruebas que nos permitieron adaptar ese reactivo a las necesidades de la industria farmacéutica. La investigación preliminar, tanto bibliográfica como en el laboratorio, así como las pruebas subsecuentes realizadas con el reactivo seleccionado, tendientes a la adaptación y normalización del método son descritas en este trabajo.

## 1.1 ANTECEDENTES

La GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG) conocida comúnmente como la hormona del embarazo, es producida por la placenta, y se encuentra en el suero y en la orina de las mujeres embarazadas.

Esta hormona es de gran importancia en el área farmacéutica, relacionada directamente con las pruebas de detección temprana del embarazo, es utilizada además en diversas terapias relacionadas con disfunciones hormonales tanto de hombres como de mujeres, encontrándose generalmente dentro de la industria farmacéutica, bajo la forma de polvo liofilizado para solución inyectable.

Fue en 1927 cuando Ascheim y Zondek identificaron por primera vez en la orina de mujeres embarazadas, una substancia con una actividad similar a la Hormona Luteinizante (LH), demostrando más tarde que efectivamente se trataba de una hormona, a la que llamaron GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG). Posteriormente, en 1928 se desarrolló un ensayo biológico para la detección y la medición de la HCG, el cual dominó, durante más de tres décadas, el campo de las pruebas de embarazo, así como otras pruebas de diagnóstico de diversas patologías.

Sin embargo, los inconvenientes inherentes a tales pruebas, fundamentalmente complejidad, tiempo y costo, frenaron la utilización de la hormona para el desarrollo de métodos diagnósticos. Estas pruebas sacrifican muchos animales, son caras, y requieren de mucho tiempo, así como de personal muy capacitado; por otra parte, todas las pruebas biológicas presentan dificultades de interpretación y diferencias en las respuestas biológicas de los animales de prueba.

No fue sino hasta 1960, cuando Wide y Gemzell, desarrollaron el primer ensayo inmunológico; la simplicidad y el bajo costo de los procedimientos inmunológicos en placa o en tubo, permitieron el desarrollo de pruebas para la detección del embarazo. Aunque su sensibilidad era baja hacían posible la detección del embarazo de 3 a 5 semanas después de la concepción. Posteriormente, el desarrollo del radioinmunoensayo permitió que el uso de los métodos de valoración de gonadotropina coriónica humana se expandiera a otras áreas de diagnóstico clínico, gracias a su gran sensibilidad, especificidad y a su carácter cuantitativo.

Finalmente, es en 1975 cuando se descubren los anticuerpos monoclonales que por su estructura homogénea revolucionaron el campo de las pruebas diagnósticas *in vitro*, y que sustituyeron poco a poco a los antisueros policlonales utilizados en los métodos de valoración radioinmunológicos. El método "sandwich" o inmunometría, se desarrolla utilizando muy a menudo los anticuerpos monoclonales junto con una gama de marcadores muy variada, tanto enzimáticos y radioisotópicos, como fluorescentes.

Paralelamente, y a pesar de que la naturaleza proteica de la hormona presenta una complejidad que hace difícil su estudio, los estudios químicos relacionados con la estructura de la gonadotropina coriónica humana avanzaron, dando a conocer su estructura heterodimérica, es decir que la HCG está constituida por dos subunidades, Alfa y Beta, que separadas no presentan actividad biológica.

Como consecuencia y debido a la utilización de anticuerpos monoclonales, durante la última década aparecieron muchas pruebas nuevas de diagnóstico clínico, la principal aportación consistió en la posibilidad de utilizar antisueros contra la subunidad Beta de la hormona, dando a las pruebas una gran especificidad que evita las interferencias en el resultado por la presencia de hormonas similares, como es el caso de la LH, FSH, y TSH. También permitió el desarrollo de trabajos enfocados a estudiar tumores gracias a la medición de la subunidad beta libre de la HCG.

Finalmente, un aporte de importancia fue el desarrollo de métodos cuantitativos de diagnóstico que evitan los problemas relacionados con la utilización de radioisótopos, sustituyéndolos por marcadores enzimáticos, principalmente en pruebas de tipo ELISA de 2 sitios que ofrecen precisión y sensibilidad comparable a los radioinmunoensayos.

## 1.2 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el de llevar a cabo un estudio que permita encontrar un método inmunológico para cuantificar Gonadotropina Coriónica Humana en un medicamento, utilizando los productos existentes en el mercado nacional, que pueda satisfacer las exigencias de un laboratorio de control de calidad de la industria farmacéutica en cuanto a sencillez de uso y confiabilidad, proporcionando un método validable que represente un método alternativo a la tan laboriosa valoración biológica, que es la única actualmente autorizada por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

## CAPITULO II

### 2.1 HORMONAS

El término HORMONA (derivado de una palabra griega que significa "estimular") hace referencia a una entidad química específica segregada en la sangre por un grupo bien definido de células y transportada por el sistema vascular a un punto distante de su origen, donde realizará su acción. (1)

Sobre la base de su estructura química se puede realizar una clasificación en cuatro grupos principales:

- Glucoproteínas compuestas por 2 cadenas diferentes( Ej:HCG,LH)
- Aminoácidos o sus derivados, procedentes de la médula suprarrenal y de la glándula tiroides (Ej: epinefrina y norepinefrina)
- Esteroides derivados del colesterol, procedentes de las glándulas sexuales y de la corteza suprarrenal (Ej: testosterona y estrógenos)
- Proteínas, procedentes de la hipófisis, del páncreas, del hipotálamo y de la paratiroides. [ son solubles en el plasma, mientras que las anteriores son poco solubles por lo que requieren proteínas específicas para su transporte ]

Las acciones de las hormonas se pueden clasificar según los tres apartados siguientes:

- 1.-Morfogénesis, que implica el crecimiento, la diferenciación y la maduración del organismo.
- 2.-Homeóstasis, que mantiene un equilibrio dinámico fluido de los componentes del medio interno de un animal.
- 3.-Integración funcional, mediante la cual el sistema nervioso y el sistema endócrino dependen uno del otro, complementándose mutuamente en muchas de sus funciones.

### 2.2 GONADOTROPINAS

Definición: se denomina hormonas gonadotrópicas, gonadotropinas ó gonadotrofinas a las hormonas capaces de estimular las glándulas sexuales ó gónadas, o sea el testículo y el ovario. Son todas glucoproteínas que se destruyen por las enzimas proteolíticas. ( 2 )

Las gonadotropinas tienen dos orígenes:

a) La hipófisis anterior o pars distalis de ambos sexos, constituyendo las gonadotropinas hipofisarias, a saber, las hormonas folículoestimulante y luteinizante, existiendo además en la orina de las mujeres menopáusicas una gonadotropina menopáusica humana.

b) en el tejido coriónico o trofoblasto de la placenta, se encuentran las gonadotropinas placentarias, que generalmente se obtienen de la orina de la mujer embarazada constituyendo la gonadotropina coriónica.

-La hormona folículoestimulante (FSH), extraída en estado puro y cristalino de la hipófisis de oveja y de cerdo, es una glucoproteína, de peso molecular de 33,000, constituida por dos cadenas polipeptídicas alfa y beta unidas a carbohidratos, pero cuya estructura no está completamente dilucidada. La FSH estimula la formación del esperma en los testículos, (células de Sertoli) y la maduración del folículo y el oocito en el ovario. No se emplea en medicina.

-La hormona luteinizante (LH) estimulante del folículo en el ovario y de las células de Leydig en los testículos, es una glucoproteína de peso molecular aproximado de 29,000 constituida por dos cadenas polipeptídicas alfa y beta y carbohidratos, cuya estructura tampoco está completamente dilucidada. Las cadenas separadas, como en el caso de las FSH no tienen actividad. No se emplea en medicina.

-La gonadotropina o gonadotropina hipofisaria humana es una preparación también denominada HPG que era extraída anteriormente de hipófisis de cadáveres, no es completamente pura y posee la actividad de las hormonas folículoestimulante y luteinizante, fue útil en el tratamiento de la esterilidad.

-La gonadotropina menopáusica humana o menotropina o HGM (Pergonal) como su nombre lo indica, se extrae de la orina de mujeres posmenopáusicas y procede de la hipófisis, posee la actividad de las hormonas folículoestimulante y luteinizante, es útil en el tratamiento de la esterilidad.

-La gonadotropina o gonadotropina coriónica, gonadotropina o gonadotropina coriónica humana (HCG) (Endocorión, Profasi, Gonadotropy) se extrae de la orina de mujeres embarazadas, pues se la encuentra en ella y se forma en los cultivos de células placentarias-trofoblasto. Obtenida en estado puro y cristalizada, es una glucoproteína de peso molecular de casi 36,700, constituida como las anteriores por las dos cadenas polipeptídicas alfa (estructura idéntica a las subunidad alfa de FSH, LH, y TSH) y beta (confiere especificidad, es similar a la LH en los primeros 120 aminoácidos, pero su extremo N-terminal de 30 aminoácidos es único). Su acción es semejante a la LH.

## 2.3 GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA

### 2.3.1 ORIGEN Y QUIMICA

#### A) Origen, descripción y solubilidad

Origen: La gonadotropina coriónica humana (HCG) se forma en las células placentarias llamadas trofoblastos y se extrae de la orina de mujeres embarazadas. Su potencia no debe de ser inferior a 2500 Unidades por cada mg. ( 24)

Descripción: Polvo amorfo blanco o casi blanco, ligeramente amarillo-café, sin olor. ( 37)

Solubilidad: Muy soluble en agua y prácticamente insoluble en éter.

Almacenamiento: Conservar en refrigeración, en envases bien cerrados, preferentemente en vidrio tipo I y protegido de la luz.

#### B) ESTRUCTURA QUIMICA

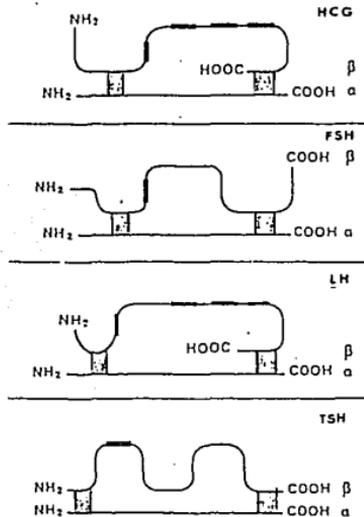
La gonadotropina coriónica humana es una glucoproteína constituida por dos subunidades polipeptídicas diferentes, alfa y beta, ligadas de manera no covalente y unidas a cadenas laterales de carbohidratos.

La Hcg es una de las 4 hormonas glucoprotéicas que son estructuralmente y funcionalmente similares ( ver tabla N° 1 y Figura N° 1 ). Los otros miembros de este grupo lo forman la LH, FSH y TSH. Cada una de estas hormonas consta de 2 subunidades diferentes , alfa y beta , que se asocian de manera no covalente. La subunidad alfa de estas hormonas difiere de las otras solamente por su composición en carbohidratos. La subunidad beta difiere de manera más intensa tanto en la composición de los aminoácidos como en la composición de los carbohidratos, y es responsable de la atribución de las diferentes actividades biológicas a las hormonas (3).

La molécula intacta de HCG tiene un peso molecular de 36700 y contiene un 30 % de carbohidratos en peso. La conformación nativa de la molécula contiene un 60% de estructura beta y menos de 10 % de la hélice alfa. Esta conformación se estabiliza notablemente por los puentes disulfuro. La disociación de la molécula intacta en sus subunidades se acompaña por cambios conformacionales en las subunidades.

**Tabla 1** .- Número de aminoácidos de las cadenas alfa y beta de las hormonas TSH,LH,FSH y HCG humanas (4).

HORMONA	CADENA ALFA	CADENA BETA
TSH	89	112
LH	89	115
FSH	89	115
HCG	89-92	147



**Fig 1**.- Representación esquemática de la estructura de la HCG, FSH,LH y TSH.Estas glucoproteínas están formadas por dos subunidades llamadas alfa y beta. La subunidad alfa es común a las cuatro hormonas y la especificidad de acción de cada una estriba en las diferencias estructurales de la cadena beta. Las zonas sombreadas representan globalmente los puentes disulfuro entre las cadenas. Las zonas engrosadas de las cadenas beta indican de manera arbitraria las homologías parciales de sus estructuras primarias(4).

Las estructuras primarias de la subunidad alfa de todas las hormonas glucoproteicas son sensiblemente iguales y constan de 89 a 92 aminoácidos de secuencia idéntica, sin embargo, los carbohidratos difieren de manera significativa. La molécula contiene 5 enlaces disulfuro entre las cisteínas 7 y 31, 10 y 32, 28 y 60, 59 y 87, y 82 y 84. ( Fig. 2 )

-La subunidad alfa de la HCG consiste en una cadena simple de 92 aminoácidos con complejos oligosacarídicos N-ligados con ASN-78 y con ASN-52. La molécula debe su estructura a las dos unidades de carbohidratos y a los enlaces disulfuro entre las cisteínas 7 y 31, 10 y 32, 28 y 60, 59 y 87, y 82 y 84.

{ FSH LH	---	1	15
		H-Val-Glx-Asp-Cys-Pro-Glx-Cys-Thr-Leu-Glx-Glx-Asn-Pro-Phe-Phe-	
HCG	H-Ala-Pro-Asx-Val		
		16	30
		Ser-Gln-Pro-Gly-Ala-Pro-Ile-Leu-Gln-Cys-Met-Gly-Cys-Cys-Phe-	
		31	45
		Ser-Arg-Ala-Tyr-Pro-Thr-Pro-Leu-Arg-Ser-Lys-Lys-Thr-Met-Leu-	
		46	60
		Val-Gln-Lys-Asn-Val-Thr-Ser-Glx-Ser-Thr-Cys-Cys-Val-Ala-Lys-	
		(CHO)	
		61	75
		Ser-Tyr-Asn-Arg-Val-Thr-Val-Met-Gly-Gly-Phe-Pys-Val-Glx-Asn-	
		(CHO)	
		76	89
		His-Thr-Ala-Cys-His-Cys-Ser-Thr-Cys-Tyr-Tyr-His-Lys-Ser-OH	

Fig 2.- Secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa de las gonadotropinas humanas (5)

La subunidad beta de la HCG consiste de una cadena sencilla de 145 aminoácidos y 6 unidades de oligosacáridos ( Fig 3 ). La molécula contiene seis enlaces disulfuros entre las cisteínas 9 y 90, 23 y 72, 26 y 110, 34 y 88, 38 y 57, 93 y 100, las que deben tener implicaciones en la conservación de estructura cuaternaria. Los primeros 121 aminoácidos aminoterminales de la beta-HCG tienen 80 % de homología con la beta-LH; el terminal carboxilo de la beta-HCG contiene una secuencia de 24 aminoácidos que no existen en la beta-LH. las secuencias homólogas entre la beta-HCG y las subunidades beta de la FSH y de la TSH son mucho menores que las que existen entre la beta-HCG y la beta-LH (6,3) (fig. 1).

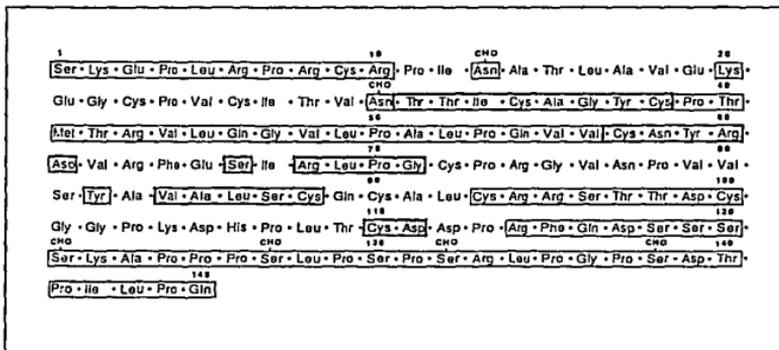


Fig 3.- Secuencia de aminoácidos de la subunidad beta de las gonadotropinas humanas ( 5 ) ( 32 )

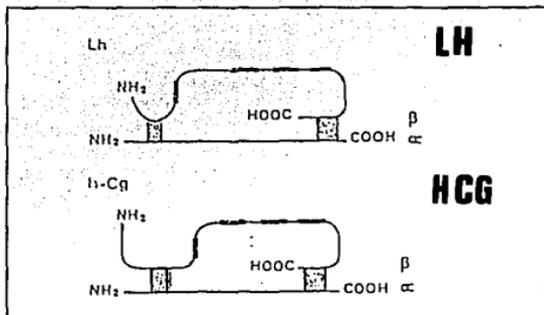


Fig 4.- Homología de estructura de la LH y de la HCG (4).

Dos de las seis unidades de carbohidratos de la beta-HCG son N-ligadas a la ASN-13 y ASN-30. Ellas son idénticas a las presentes en la alfa-HCG, excepto una de ellas que contiene una parte adicional de fucosa. La parte restante de la unidad de carbohidratos es O-ligada a la SER-121, SER-127, SER-132, y SER-138.

Las dos subunidades de la molécula se requieren para la actividad biológica. Esto se debe a que ninguna subunidad sola se puede unir al receptor. La subunidad beta es en gran medida responsable de la determinación de la especificidad de la reacción de unión y de la subsecuente actividad biológica de la molécula intacta.

La subunidad alfa también está involucrada en este proceso, pero en un grado mucho más pequeño. Diferentes modelos fueron recientemente propuestos para describir la unión de la HCG a sus receptores en células luteales de ratón. En estas, las dos subunidades están en contacto con el receptor, con casi toda la subunidad beta escondida entre la subunidad alfa y el sitio de unión. Los residuos de aminoácidos que están involucrados en la reacción de unión no han sido totalmente identificados. Estudios que examinan los efectos de la modificación o del retiro del pentapéptido carboxiterminal de la subunidad alfa sobre la actividad de unión con el receptor, sugieren que esta región de la molécula está involucrada en la reacción de unión. El grupo carboxiterminal de la subunidad beta no parece estar involucrado en la reacción de unión ya que el antisuero que se une selectivamente a los lados del péptido carboxiterminal de la beta-HCG, no inhibe

la actividad de unión de la hormona con el receptor. Además, el hecho de que la LH humana se une al mismo receptor que la HCG, aún cuando en la beta-LH falta la parte de 24 aminoácidos carboxiterminales de la beta-HCG, también sugiere que el péptido carboxiterminal de la beta-HCG no se requiere para la unión de la hormona al receptor. En cambio se constata que la tirosina se conserva en todas las subunidades alfa, lo que sugiere que esta parte es responsable de la unión con el receptor (32).

Se obtuvo igualmente, alguna información sobre la orientación de varios residuos de aminoácidos en la estructura terciaria de la HCG Intacta. Estos estudios sugieren que la TYR-41 y la TYR-69 de la alfa-HCG y los residuos de aminoácidos 31-38, TYR-61 y TYR-84 de la beta-HCG se encuentran en la región de contacto de las subunidades (32)

Algunos estudios, examinando el papel de las partes de carbohidratos de la HCG, demostraron que las cadenas oligosacáridicas no son necesarias para la conservación de la conformación de la molécula. Tampoco parece que los carbohidratos tengan un papel en la unión con el receptor o el anticuerpo ya que las moléculas de HCG en las cuales una o las dos subunidades fueron desglucosiladas, mostraron una unión a varios antisueros de HCG, así como a receptores de HCG, en gónadas de roedores y ovarios humanos. Las partes carbohidratadas parecen sin embargo, estar involucradas en el apareamiento del complejo hormona-receptor a la adenilatociclasa. Esto fue propuesto por numerosos estudios que demostraron que la HCG desglucosilada era menos efectiva que la HCG nativa en estimular tanto la actividad de la adenilatociclasa, como la producción, *in vitro*, de la AMPc y de los esteroides.

En algunos casos, la HCG desglucosilada inhibe el efecto estimulador de la HCG nativa en estos procesos. Estudios llevados a cabo sobre el mecanismo de acción de la HCG desglucosilada sobre los ovarios de ratas, sugieren que las partes carbohidratadas pueden actuar para el acoplamiento del complejo hormona-receptor a la proteína G, un componente de la adenilatociclasa. El mecanismo por el cual esto ocurre no es conocido.

Los residuos del ácido siálico presentes en los azúcares terminales de las cadenas oligosacáridicas de las dos subunidades de HCG parecen proteger a la hormona de la degradación rápida, *in vivo*; ya que un aumento significativo de la tasa de desaparición de la HCG ocurre después de su desialización. La rápida desaparición de la circulación de la HCG desializada fue atribuida a la exposición de la galactosa, la cual hace la molécula susceptible a la unión y captación por los receptores hepáticos para las glucoproteínas que contienen carbohidratos con un residuo terminal galactosa (3).

### 2.3.2 GENES DE ESTRUCTURA Y EXPRESION

Un gene codifica para la subunidad alfa de las cuatro hormonas glucoproteicas. La localización del gene de la subunidad alfa es controversial, se ha reportado tanto sobre el cromosoma 6 como sobre el 18.

Existen ocho genes que codifican para la subunidad beta de la HCG y de la LH. Siete de estos genes codifican para la beta-HCG. Los ocho genes están ligados y se ubican en el cromosoma 19. (11)

### 2.3.3 SECRECION

La HCG intacta y sus subunidades fueron localizadas por varios métodos inmunocitoquímicos, en los sincitiotrofoblastos y ocasionalmente en trofoblastos intermediarios y citotrofoblastos de la placenta.

Los oligosacáridos O-ligados son pegados a la subunidad beta justo antes de la secreción de la hormona. La unión probablemente ocurre en el aparato de Golgi.

Se puede considerar que la estructura tridimensional de la HCG biológicamente activa se logra después de varios intermediarios separados tanto temporalmente como espacialmente. Alguna ligera formación de la estructura terciaria aparece antes de la desunión del péptido señal en el retículo endoplasmático, en donde aparentemente comienza la dimerización. Después de cambios conformacionales, que ocurren durante la siguiente modificación de la hormona, aparece la estructura dimérica estable y biológicamente activa.

La subunidad alfa se sintetiza en cantidades mayores que la subunidad beta durante la mayoría de los embarazos. La cantidad limitada de beta-HCG en relación con la alfa-HCG se debe más bien a una tasa de síntesis mas baja de la beta-HCG, que a una degradación aumentada de la subunidad. La diferencia en las tasas de síntesis entre las subunidades se debe, por lo menos en parte, a diferencias en las cantidades de mRNAs para las subunidades, ya que los niveles de mRNAs para la alfa-HCG exceden los mRNAs para beta-HCG en un factor dos.(11)

Existen diferencias estructurales entre la subunidad alfa libre y la subunida alfa obtenida de la HCG intacta. Aunque no se explica totalmente esta diferencia parece que la subunidad alfa libre contiene una cadena adicional de sacáridos O-ligada, probablemente ligada a la THR-39. Las porciones proteínicas de los dos tipos de subunidad alfa parecen ser idénticas.

Una vez realizada la síntesis de la HCG, la hormona es liberada rápidamente por la célula. El mecanismo sin embargo, no es conocido y parece ser que su

liberación no corresponde al mismo mecanismo que el seguido en la liberación de las hormonas glucoprotéicas de origen hipofisario.

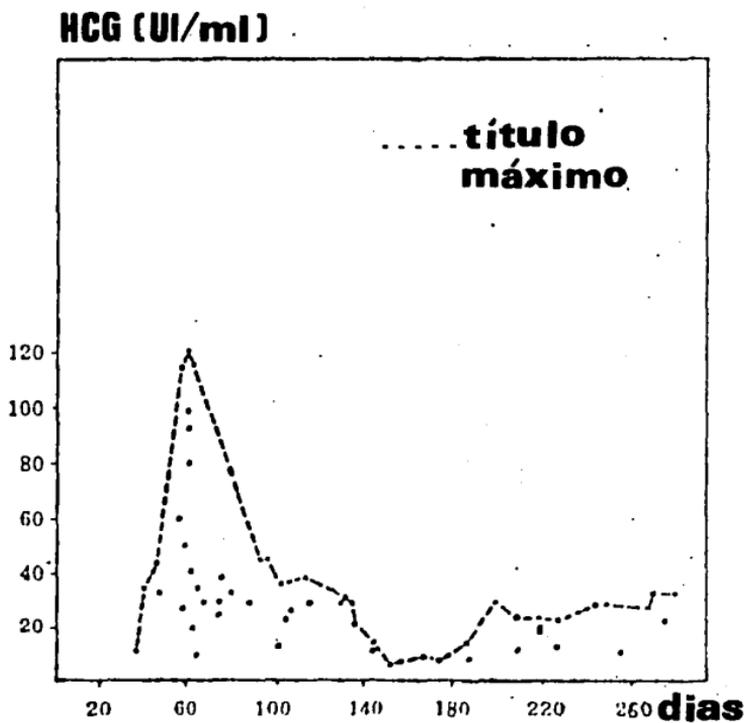
#### 2.3.4. CONCENTRACIONES SERICAS Y METABOLISMO

La HCG intacta ha sido detectada en la circulación materna alrededor del décimo día después del pico de LH de mitad de ciclo, lo que coincide con el período de implantación cuando el trofoblasto entra en contacto por primera vez con la sangre materna. Después de su aparición en la sangre materna, la concentración de la HCG intacta crece muy rápidamente hasta las ocho semanas de embarazo. Entre las semanas 8 y 12, la concentración de HCG queda casi constante y después decrece hasta la semana 18 del embarazo. La concentración de la HCG en la sangre materna queda casi constante durante todo el resto del embarazo. (Fig. 5)

La subunidad alfa también es liberada en la circulación materna y se detecta hacia la sexta semana de embarazo; su concentración crece uniformemente hasta la semana 36, después de la cual queda casi constante. La concentración de la subunidad alfa libre en la sangre materna siempre es menor al 10 % de la HCG intacta, su función en la sangre no es conocida. La concentración de subunidad beta HCG es de aproximadamente el 0.5% de la HCG. ( 56 )

La HCG también está presente en la sangre fetal, así como en el líquido amniótico.

La HCG intacta desaparece muy lentamente de la sangre materna. Su desaparición corresponde a una cinética multiexponencial, con una tasa media de desaparición de 6 horas para el primer compuesto. Del 20% al 25% de la hormona se excreta en la orina en su forma intacta, y lo demás parece que es captado y degradado por diferentes tejidos, principalmente en el hígado y los riñones. La disociación de la hormona en sus subunidades en la sangre no es un paso inicial de su desaparición metabólica.



**Fig 5.-** Concentración sérica de HCG en un embarazo normal

## 2.4. FARMACOLOGIA DE LA HCG

### 2.4.1 INDICACIONES TERAPEUTICAS

#### ACEPTADAS

-**CRIPTORQUIDIA** (tratamiento) La HCG está indicada para el tratamiento de la criptorquidia prepuberal no causada por una obstrucción anatómica.

**INFERTILIDAD MASCULINA** (tratamiento) la HCG esta indicada sola o junto con menotropina o clomifeno, para el tratamiento del hipogonadismo masculino debido a una deficiencia hipofisaria.

**INFERTILIDAD FEMENINA** (tratamiento) La HCG esta indicada junto con menotropina, o en algunos casos con clomifeno, para estimular la ovulación y el embarazo. En general, el uso de HCG con menotropina no es el tratamiento de primera elección para la inducción de la ovulación pero se utiliza en pacientes que no responden a un tratamiento menos costoso y menos peligroso como es él del clomifeno.

**FERTILIZACION IN VITRO** (tratamiento) La HCG esta indicada, en conjunto con la menotropina, para estimular el desarrollo de muchos oocitos en la paciente anovulatoria que va a someterse a una fertilización *in vitro*.

#### NO.ACEPTADO

No se ha comprobado la eficacia de la HCG ni tampoco se le recomienda para bajar de peso.

### 2.4.2 PRECAUCIONES A CONSIDERAR EN EL USO DE LA HCG (7)

#### PODER CARCINOGENO Y MUTAGENO

No se han realizado estudios ni en animales ni en humanos. (7)

#### EMBARAZO Y REPRODUCCION

Se han reportado casos de muerte fetal y malformación congénita en niños cuyas madres fueron tratadas con HCG, sin embargo, no se ha podido establecer una relación directa de causa-efecto.

**INTERFERENCIAS EN PRUEBAS DE DIAGNOSTICO.**

Ensayo Inmunológico para HCG: la prueba de embarazo debería de realizarse por lo menos 10 días o más después de la administración de HCG para evitar un resultado positivo falso.

**Valores fisiológicos de pruebas de laboratorio**

.-La excreción urinaria de 17-cetoesteroides, 17-hidroxicorticoesteroides, y algunos otros esteroides puede aumentar.

**PROBLEMAS MEDICOS**

No se debe de recetar HCG cuando existen los siguientes problemas médicos:

**Para todas las indicaciones:**

.-Hipertrofia de la hipófisis o tumor (puede crecer la hipófisis).

**Para criptorquidia:**

.-Pubertad prematura

**Para inducción de la ovulación:**

.-Sangrado vaginal de origen indeterminado

.-Tumor fibroide del útero

.-Quiste ovárico o crecimiento ovárico (riesgo de un crecimiento posterior)

**Para hipogonadismo masculino:**

.-Carcinoma prostático u otro neoplasma andrógeno dependiente

Se debe de considerar el binomio riesgo-beneficio cuando existen los siguientes problemas médicos:

Asma/problemas cardiacos/epilepsia/migrañas/deterioro de la función renal

**CONTROL DEL PACIENTE**

Los siguientes controles del paciente pueden ser de especial interés:

**Para la inducción de la ovulación:**

.-Examen pélvico completo para evaluar el tamaño de los ovarios. (se recomienda a diario después de que la concentración de estrógenos empiece a subir, y hasta por lo menos dos semanas después de la administración de HCG).

.-Toma diaria de la temperatura corporal basal (tomada por la paciente a fin de determinar si ocurrió la ovulación)

.-Observación del moco cervical (recomendado para ayudar a determinar si ocurrió la maduración folicular y la ovulación)

.-Determinación del estradiol sérico (recomendado a diario empezando una semana después del comienzo de cada tratamiento con menopropina, la HCG debería de administrarse solamente después de haberse valorado la producción de estrógenos 24 horas antes.

.-Análisis de ultrasonido ( se recomienda antes de una terapia con HCG para proporcionar información sobre el número y tamaño de los folículos presentes)

#### Para hipogonadismo masculino:

.-Determinaciones de testosterona sérica (para excluir otras causas y evaluar el éxito del tratamiento, debería de aumentar)

.-Cuenta espermática y determinación de la motilidad del espermatozoides (para evaluar el éxito del tratamiento)

#### Para determinación de la función testicular en un retardo de pubertad:

.-Concentraciones séricas de testosterona ( se recomienda antes del tratamiento y un día después de él, debería de duplicar si los testículos son normales).

### 2.4.3 FARMACOCINETICA

La farmacocinética ha sido especialmente estudiada por determinaciones basadas en radioinmunoensayos.(2)

-**ABSORCION:** Al igual que las hormonas hipofisarias, la gonadotropina coriónica humana es una sustancia de origen proteínico que se destruye por las enzimas digestivas por lo que no actúa cuando se administra por vía bucal. En cambio se absorbe y actúa perfectamente cuando se inyecta por vía subcutánea ó intramuscular.

-**DISTRIBUCION Y EXCRECION:** Una vez absorbida la HCG, pasa a la sangre. La HCG se destruye parcialmente en el organismo y el resto se excreta en la orina; su concentración en ella tiene un patrón similar al correspondiente en el plasma. Se detecta tanto en orina como en suero por medio de las pruebas de embarazo.

La vida media de la HCG es de tipo bifásica es decir que desaparece de la circulación en dos periodos: uno con vida media de 20 a 37 horas, el otro, de 5 a 16 horas. (8) La USP, por su parte, indica valores de vida media de 5.6 y 24 horas. (7)

#### 2.4.4 FARMACODINAMIA

- **MODO DE ACCION:** La acción principal de la HCG es estimular la conversión del colesterol en pregnenolona, intermediario necesario para la síntesis de los andrógenos, estrógenos y progesterona.

- **MECANISMO DE ACCION:** El mecanismo de acción de la HCG es el mismo que el de la LH.

La HCG y la LH se unen a receptores de la membrana celular de los órganos "blanco"- ovario, testículo para estimular la adenilciclase, lo que origina un aumento de la concentración intracelular de AMP cíclico que, actuando como segundo mensajero, produce un aumento de la biosíntesis de las hormonas sexuales (esteroidogénesis).(2)

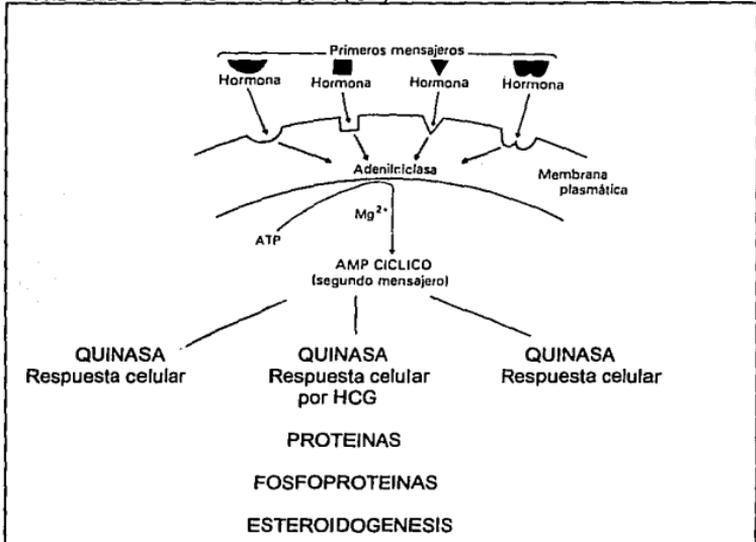
#### - RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD:

La interacción entre la hormona y su receptor de membrana específico provoca una señal que se transmite a una enzima de membrana, la adenilciclase por medio de proteínas, ellas también de membrana, las proteínas G.

La activación de la adenilciclase por las proteínas G se puede resumir de la manera siguiente: Después de la fijación de la hormona sobre el receptor, este último cambia de conformación, se une a la proteína G que se disocia y libera la subunidad alfa. Esta subunidad alfa que podemos considerar como una proteína G "activada" fija una molécula de GTP. El complejo [subunidad alfa-GTP] se adhiere a la adenilciclase, la activa y se produce la síntesis del AMP cíclico. Pero la proteína alfa es una GTPasa la cual hidroliza rápidamente el GTP en GDP, lo que provoca la liberación de la adenilciclase del complejo [subunidad alfa-GDP] y su inactivación así como la activación de la subunidad alfa. La proteína alfa vuelve a asociarse con las otras dos subunidades beta y gamma para volver a formar la proteína G inicial. Si una molécula de hormona sigue fijada al receptor, este puede activar una nueva proteína G. Cada receptor activa varias moléculas adenilciclase. Existe por lo tanto un fenómeno de amplificación de la señal, que a partir de un enlace hormona-receptor provoca la síntesis de varias moléculas de AMP cíclico ( 9/1 ) ( 32 ).

El AMP cíclico activa las proteínas-quinasas. Estas enzimas contienen dos tipos de subunidades: las subunidades enzimáticas y las subunidades reguladoras. En cuanto el AMP cíclico se haya sintetizado, se fija sobre las subunidades reguladoras que cambian de conformación, se separan de las subunidades enzimáticas que se activan y fijan residuos fosfatos sobre algunas enzimas específicas, lo que provoca su activación o su inhibición, llevándose a cabo finalmente la esteroidogénesis. ( Fig 6 ) ( 52 )

En cuanto a la función que desempeñan algunos aminoácidos, estudios revelan que las tirosinas 69, 30 y 41 así como las lisinas 67 y 71 de la cadena alfa están probablemente implicadas en la unión con la subunidad beta, mientras que la tirosina en posición 92 presente en todas las glucoproteínas podría estar involucrada con la unión al receptor. ( 32 )



**Fig 6.** El esquema representa cuatro hormonas diferentes ( los mensajeros primeros ), cada una capaz de estimular receptores específicos en la membrana celular, y se forma AMP cíclico ( el segundo mensajero común ). El AMP cíclico se fosforila, con lo cual activa cierto número de quinasa de proteína ( o sea quinasa que fosforilan proteína ) y éstas a su vez, llevan a cabo las respuestas celulares.

#### 2.4.5 TOXICIDAD

La gonadotropina coriónica humana es capaz de provocar el síndrome de hiperestimulación, así como embarazos múltiples, sobre todo si la paciente se trata antes con gonadotropina menopáusica a dosis elevadas. ( 2 )

#### 2.4.6. CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS ADVERSOS

##### contraindicaciones:

La administración de HCG está contraindicada en casos de: tumor de la hipófisis o gónadas y en mujeres menores de 18 años. ( 10, 52, 55 )

##### Efectos adversos y colaterales:

Los efectos colaterales más frecuentes, han sido: cefálea, alteraciones en el estado de ánimo, edema y dolor en el sitio de inyección. En los varones es probable la aparición de ginecomastia. Se ha reportado dolor ovárico y hemorragia peritoneal. Se debe vigilar a la paciente, previniendo ruptura ovárica.

#### 2.4.7. DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION

Los pacientes que reciben gonadotropina coriónica, deben de estar bajo la supervisión de un médico con experiencia en el tratamiento de problemas ginecológicos o endocrinológicos.

##### Dosis usual para adultos ( 55 ) :

(Forma farmacéutica : gonadotropina coriónica para inyección)

-Hipogonadismo hipogonadotrópico en hombre: intramuscular, 1000 a 4000 unidades 2 ó 3 veces por semana durante varias semanas o meses; puede administrarse de manera indefinida mientras exista respuesta.

-Inducción de ovulación: intramuscular, 5000 a 10,000 unidades, un día después de la última dosis de menotropina o 5 a 7 días después de la última dosis de clomifeno.

##### Dosis pediátrica usual:

.Criptorquidia prepubertaria: Intramuscular, 1000 a 5000 unidades 2 ó 3 veces por semana durante varias semanas. ( 55 )

#### 2.4.8. ALMACENAMIENTO, ESTABILIDAD Y REQUISITOS FARMACOPÉICOS

Embalaje y almacenamiento: Almacenar a una temperatura inferior a 40°C (104°F), preferentemente entre 15° y 30°C (59 a 86°F), a menos que exista otra indicación de parte del fabricante.

**Estabilidad:** La solución reconstituida para inyección, se debe de usar en un plazo de 48 horas, ( 53 )

**Requisitos:** Conservar en frascos para sólidos estériles, protegidos de la luz y almacenados en un lugar cuya temperatura no exceda 20°C. La etiqueta debe de indicar la fecha de caducidad. Almacenada de esta manera se espera que la hormona conserve su título por lo menos 3 años. Contiene de -20% hasta +25% de la cantidad indicada en el marbete, en unidades internacionales de Gonadotropina Coriónica. Puede contener un agente antimicrobiano. Satisface los requisitos siguientes: solución reconstituida, pirógenos, pH(6.0 - 8.0) y actividad estrogénica así como la prueba de esterilidad, uniformidad de contenido en unidades y etiquetado. ( 24 )

## 2.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y DE PURIFICACION DE HCG

### 2.5.1 Métodos de extracción

#### A) Métodos de precipitación

a) Precipitación alcohólica: Numerosos investigadores han usado esta técnica con algunas modificaciones. En general los resultados son satisfactorios en títulos altos (ej: orina de mujeres menopáusicas), sin embargo, en títulos bajos se obtienen productos bastantes tóxicos.

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

b) Precipitación por acetona: La técnica es muy similar a la descrita en el método de precipitación con alcohol. También da resultados satisfactorios con orinas de alto título en HCG.

- 1.- Una muestra de 250 ml de orina de mujeres embarazadas del primer trimestre, se acidifica a pH 4.5 con ácido acético glacial.
- 2.- Se enfría la muestra a 4o C y se filtra para desechar el material insoluble.
- 3.- Se adiciona 1 lt de acetona fría bajo agitación constante durante 15 minutos.
- 4.- Se filtra con papel Whatman No 4.- y se lava el precipitado con etanol frío.
- 5.- Cuando el etanol se ha evaporado por completo, el precipitado se resuspende con 25 ml de una solución de cloruro de sodio 0.15 M - fosfato de sodio 0.01 M, pH 7.2
- 6.- Se centrifuga a 2500 r.p.m. durante 5 minutos y se desecha el material insoluble.
- 7.- Se liofiliza el extracto para su conservación. (11)

#### B) Métodos de adsorción:

a) Adsorción con ácido benzoico: Un litro de orina previamente refrigerada y filtrada se acidifica a pH 4.5 y se incuba con 50 ml de una solución de acetona saturada con ácido benzoico durante una hora con agitación suave. El ácido benzoico se precipita bajo la forma de cristales finos en los cuales la HCG así como otras proteínas se adsorben. Se suspende la agitación y se deja reposar toda la noche. Se centrifuga o se filtra, se desecha el sobrenadante y el precipitado se lava con acetona fría o etanol (13) lo que disuelve el ácido benzoico y permite la precipitación de las proteínas y de la HCG. Se lava el precipitado con acetona o con acetona y éter (13) y se extrae la HCG con agua, se centrifuga y el sobrenadante se liofiliza.

b) Adsorción de caolín con precipitación por acetona: En 1941 Scott (14) describe un método para la extracción de HCG a partir de orina de señoras embarazadas en el cual la hormona fue adsorbida sobre caolín a pH de 4.0 y eluida por hidróxido de sodio 0.1N. Sin embargo, los extractos obtenidos no son suficientemente concentrados para la estimación de gonadotropina en orina de mujeres embarazadas.

Según el autor, el pH es el factor más importante que se debe de controlar. Debe de estar comprendido entre 3.5 y 4.5 , de lo contrario puede haber pérdida de un 40% del material adsorbido.

c) Adsorción con hidróxido de aluminio: Esta técnica es similar en muchos aspectos al método de caolín-acetona. (15)

d) Adsorción en columna de permutit: La hormona se puede adsorber a partir de una orina acidificada en una columna de Permutit (Silicato de aluminio sintético). Después de lavar con agua y mezclas de acetato de amonio y etanol, el material activo se eluye con una mezcla de etanol en acetato de amonio. Después se precipita aumentando la concentración de etanol. (13)

## 2.5.2 METODOS DE PURIFICACION

Un estudio muy completo fué descrito por Got y Bourrillon(1960). Ellos precipitaron varias veces un extracto de ácido benzóico a partir de un buffer de fosfatos de pH 4.5 y de una solución conteniendo cloruro de calcio.- Finalmente se realizaba su fraccionamiento en una columna de Permutit con una mezcla de acetato de amonio y etanol (60:40 v/v). El producto contenía 13,000 UI/mg y se reportó homogéneo según el criterio de 1967. (13)

La purificación de hormona se complica por el hecho de que existe una heterogeneidad considerable entre las moléculas de HCG principalmente por las variaciones en la estructura de los carbohidratos.

El método de purificación ( 54 ) comúnmente usado consiste en:

- Cromatografía en columna CM-Sephadex C-25 a un pH de 5.0.
- Fraccionamiento final en columna de Sephadex G-100 o G-200.
- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

## 2.6 PROCESO DE FABRICACION DE POLVO LIOFILIZADO DE HCG PARA SOLUCION INYECTABLE.

La gonadotropina coriónica humana se comercializa para fines terapéuticos bajo la forma farmacéutica de solución inyectable.

Su presentación es un frasco ampula conteniendo la HCG liofilizada y una ampollita con disolvente, generalmente una solución isotónica de cloruro de sodio.(18)

La gonadotropina coriónica humana ya extraída y purificada, se presenta bajo la forma de un polvo blanco a beige según su potencia. Para liofilizarla, es necesario solubilizarla en una solución acuosa a la cual se añaden diferentes excipientes los cuales tienen como función la de proporcionar: un pH adecuado(ej fosfato disódico

anhidro y fosfato monosódico anhidro), un agente antimicrobiano (ej: paraoxybenzoato de metilo), y un diluyente (ej: manitol).(18)

La solución obtenida se filtra con un filtro Sartorius de 0.22 micras para asegurar su esterilidad y después de realizar el llenado en frascos ampula se somete al proceso de liofilización.

Este proceso consiste en un ciclo de varias horas durante el cual se pasa por una fase de congelamiento, una fase de inyección de aire filtrado a través del cual se extrae la humedad y una fase de sublimación que permite secar el material a una temperatura baja gracias a la aplicación de un vacío. queda solamente el material no volátil, distribuido en el espacio correspondiente al volumen inicial con una enorme superficie y fácilmente soluble en agua.

Todo el material utilizado en este proceso se esteriliza previamente en autoclave y el proceso se realiza en una área estéril en presencia de un supervisor.

El proceso de liofilización es muy costoso pero asegura una buena estabilidad a productos inestables en medio acuosos y termolábiles.

## 2.7 MÉTODOS DE VALORACION DE HCG

Hoy en día existen principalmente dos tipos de métodos para valorar la gonadotropina coriónica humana, los métodos inmunológicos cuyo número y cuyas posibilidades están en pleno desarrollo y los métodos biológicos que también han cambiado desde las mediciones de actividad realizadas "in vivo" en animales.

Conviene aquí subrayar que nuestro interés en este trabajo es valorar la HCG en materia prima y/o en un producto terminado farmacéutico. Y que por lo tanto los criterios de calidad de un reactivo comercial destinado a dosificar la hormona por inmunoensayo, no son necesariamente los del proveedor ya que este adecua su producto al área clínica. Por lo tanto en este inciso nos limitaremos a enumerar los diferentes métodos existentes así como a exponer los fundamentos.

### 2.7.1 MÉTODOS BIOLÓGICOS

#### a) Métodos cualitativos ( en desuso )

- METODO DE KUPPERMAN: Se utiliza como muestra la primera orina de la mañana, la cual se filtra y se añade un conservador. Unas ratas Wister de 150 g son inyectadas subcutáneamente con 1.0 ml de la orina y transcurridas 24 horas de la inyección se observan los ovarios. La prueba se considera positiva si se aprecia la reacción de hiperemia la cual deberá de mostrar un color rojo brillante. Es necesario comparar la coloración que presentan los ovarios con la de los riñones y el bazo como testigos negativos. La desventaja del método es que se necesita practica y criterio para interpretar los resultados. (19)

- METODO DE FRIEDMAN: El método utiliza conejos en los que se induce la ovulación por la inyección de HCG. El procedimiento se basa en tres principios fundamentales:

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

La prueba consiste en 6 inyecciones intravenosas de 4 ml de orina por un período de 2 días. Transcurridas 48 horas de la última inyección, se observan los ovarios. La prueba se considera positiva, si se aprecian cuerpos hemorrágicos y cuerpos luteos. La desventaja del método, es la dificultad de realizar las inyecciones repetidas en la vena marginal y la ventaja, para la época en que se realizaban, es

decir en los años sesenta, es que el resultado se ve microscópicamente en sólo dos días. (19) (1).

- PRUEBA DE ASCHEIM Y ZONDEK: La orina estudiada se inyecta a ratones inmaduros y el resultado positivo se manifiesta por hipertrofia del útero y aparición de manchas hemorrágicas en el ovario a consecuencia de la rotura de los folículos.

A continuación se presentan en la tabla 2 las diferentes pruebas cualitativas(20) (1) que se practicaron para determinar la presencia de HCG en orina de mujeres:

b) Métodos cuantitativos

i) IN VIVO

Diversos son los métodos (33) utilizados para la valoración de la gonadotropina coriónica humana:

1.-Aumento de peso del útero o de los ovarios de ratas hembras inmaduras , ensayo que se realiza sobre varios lotes y diversas dosis, en comparación con el preparado patrón; constituye un método de respuestas graduales.En este ensayo se mide el aumento de peso debido a la secreción secundaria de estrógenos, los cuales provocan la ovulación por ruptura del folículo y la formación del cuerpo amarillo. ( 22, 23, 37 )

2.-Aumento de peso de las vesículas seminales y/o la próstata de ratas machos inmaduros,este aumento de peso se debe a la secreción de andrógenos por el testículo. Por lo que se mide la actividad estimulante de las células intersticiales. ( 24, 25 )

Además de estos métodos principales, podemos citar otro método basado en la estimulación de HCG de la actividad de la tiroides. Esta medición se realiza en ratones hembras después de haber suprimido en ellos la producción endógena de la tiroides .(21)

En todos los casos, los resultados se expresan en unidades internacionales(UI).

Ya que las valoraciones biológicas *IN VIVO* son los únicos métodos aceptados por las autoridades sanitarias para la valoración de Gonadotropina Coriónica Humana en la industria farmacéutica, se presenta a continuación en la Tabla 3 los diferentes métodos que aparecen en las farmacopeas existentes.(22,23,24,25,37)

**TABLA 3 . Valoración de HCG por bioensayo según diferentes Farmacopeas**

FARMACOPEA ANIMAL DE PRUEBA	NUMERO DE GRUPOS	ANIMALES POR GRUPO	SOLVENTE	MEDICION	TIEMPO REQUERIDO (DIAS)	
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS (5a ED. 1988)	ratas hembras	4	10	S1	aumento peso ovarios	6
ESTADOS UNIDOS AMERICANOS (USP XX 1980)	ratas hembras	6	10	S2	aumento peso útero	4
BRITANICA (BP 1988)	ratas machos	4	8	S3	aumento peso vesícula seminal o próstata	5
FRANCESA (1986)	ratas machos	6	5	S4	aumento peso vesícula seminal o próstata	5
JAPONESA (JP XII)	ratas	4	10	S5	aumento peso ovarios	5

Donde: S1= Solución salina isotónica

S2= Solución salina isotónica adicionada de suero de albúmina bovina (1 mg/ml) de pH 6.9 a pH 8.0 ajustado con solución de hidróxido de sodio

S3= Buffer fosfato albúmina con fenol o timerosal

S4= Solución salina con albúmina sérica bovina y regulada a pH 7.2 con ortofosfato disódico hidrogenado anhidro, y adicionada de fenol (0.4% m/v) ó de timerosal (0.002 % m/v)

S5= Solución salina isotónica con suero de albúmina bovina

\* Solución salina isotónica para producto terminado

**Tabla 2. Métodos biológicos para valoración cuantitativa de HCG ( 1 ) ( 13 )**

ANIMAL	SEXO	RESPUESTA	PRUEBA DE
Ratón	Hembra	Hiperemia ovárica	Ascheim-Zondek
Ratón	Hembra	Cuerpo amarillo	
Rata	Hembra	Hiperemia ovárica	Kupermann
Conejo	Hembra	Cuerpo amarillo	Friedman
Xenopus laevis	Hembra	Ovulación	
Rana	Macho	Espermación	

ii) IN VITRO

Son métodos pesados, difíciles de llevar a cabo en un laboratorio de control de calidad de la industria farmacéutica. Se utilizan más bien a nivel de investigación.

El principio consiste en la medición de la producción de esteroides (andrógenos ó estrógenos) por las células blanco de la HCG, es decir las células de Leydig ó de Sertoli del testículo. La exactitud y la reproducibilidad de estos métodos esta sometida a las fluctuaciones del material celular, sin embargo, el interés que representan se ha visto incrementado por los problemas encontrados en los inmunoensayos. Estos métodos una vez bien estandarizados podrían en el futuro resultar buenos métodos de arbitraje en situaciones de discordancia entre resultados obtenidos por pruebas utilizando anticuerpos.(9)

2.7.2 MÉTODOS INMUNOLÓGICOS2.7.2.1 Prueba de inhibición de aglutinación

Fue hasta 1960 que Wide y Gemzell, y Brody y Carlstrom, desarrollaron el primer ensayo inmunológico con la gonadotropina coriónica humana. Esto se debió a una suficiente purificación de la molécula de HCG, lo que permitió la obtención de un suero anti-HCG muy potente a partir de conejos. Los primeros inmunoensayos estaban basados en la inhibición de la hemaglutinación(HI), en los cuales la HCG esta unida a glóbulos rojos. El mismo principio se aplica a las pruebas de inhibición de aglutinación con látex, en los cuales la HCG esta unida a partículas de látex. En estos ensayos, la orina de mujeres en las cuales se sospecha un embarazo se mezcla con los anticuerpos anti-HCG, y a la mezcla se añade la solución de glóbulos rojos o partículas de látex recubiertas con HCG. Si la mujer no esta embarazada, o sea en ausencia de HCG, los anticuerpos anti-HCG no reaccionan con la orina y por lo tanto se combinarán con la HCG que recubre los glóbulos rojos o las partículas de látex, provocando aglutinación. Si la mujer está

embarazada, la HCG presente en la orina se unirá a los anticuerpos anti-HCG de tal manera que cuando se añade la solución de glóbulos rojos recubiertos con HCG, no existen anticuerpos libres para unirse y por lo tanto no existe aglutinación, de aquí los términos de "inhibición de la hemaglutinación" o inhibición de aglutinación con látex". (Fig 7)

Esta metodología es la base de las pruebas en tubo y en placa para la detección del embarazo, que se han utilizado durante las tres últimas décadas.

Estas pruebas son fáciles de realizar, no tan caras y fáciles de conseguir. Sin embargo, si se comparan con algunas de las nuevas pruebas, los ensayos en tubo y en placa son mucho menos sensibles para la detección de HCG, además presentan problemas de reacción cruzada con la LH. Por esta razón las pruebas que utilizan anticuerpos no muy específicos, han sido fabricadas con una sensibilidad menor para evitar que reaccionen con concentraciones altas de LH, las cuales pueden presentarse en mujeres menopáusicas o en la mitad del ciclo en las mujeres que ovulan.

La sensibilidad de las pruebas en placa varía de 1.5 hasta 2.0 UI HCG/ ml de orina. Las pruebas en tubo detectan generalmente 0.5 hasta 1.0 UI HCG/ ml de orina. La exactitud de estas pruebas alcanza 98% sólo hasta por lo menos 42 días después de las últimas menstruaciones. Son productos estables. ( 7 a 18 meses)

Los resultados en la prueba de inhibición de hemaglutinación en tubo se leen de la manera siguiente ( ver Fig.8.-):

- 1.- La aglutinación positiva esta indicada por un sedimento amarillento, granular y difuso en el fondo del tubo.(ausencia de HCG)
- 2.- La falta de aglutinación ( inhibición de aglutinación ) esta indicada por la formación de un boton rojo en el fondo del tubo de ensayo, que se desliza cuando se inclina ( presencia de altas cantidades de HGC ).
- 3.- La aglutinación parcial esta indicada por un aspecto intermedio entre el revestimiento difuso del fondo del tubo y el botón rojo. Este toma la forma de un anillo con el centro vacío.(presencia de bajas cantidades de HCG, o sea cuya concentración es muy cercana a la sensibilidad del reactivo).

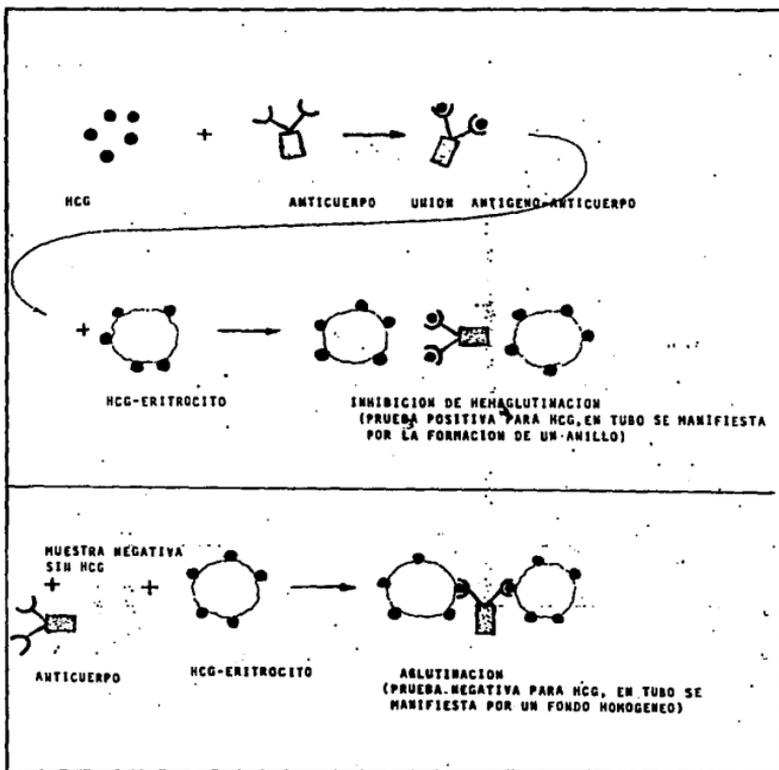


Fig 7. Principio de la prueba de inhibición de la aglutinación  
(se pueden sustituir los glóbulos rojos por partículas de látex)

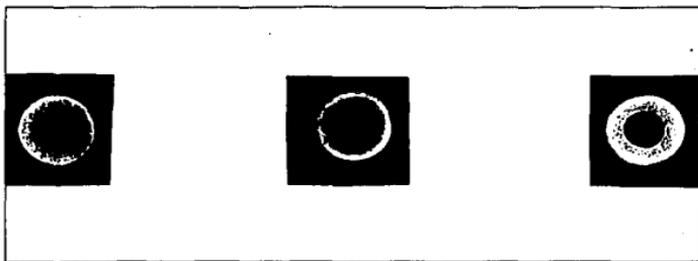


Fig.8.-Patrones de hemaglutinación positiva, parcial y negativa. (26)

#### 2.7.2.2. ENSAYOS CON RADIORRECEPTORES

La purificación de receptores para la HCG localizados en el cuerpo amarillo ha permitido el desarrollo de los ensayos con radiorreceptores, que son métodos que funcionan con un principio de inhibición competitiva.

En este método una cantidad conocida de HCG radiomarcada se mezcla con la muestra a analizar y posteriormente se adiciona a receptores purificados de HCG. En ausencia de HCG, la radioactividad correspondiente a los receptores será alta, mientras que en presencia de HCG, la radioactividad correspondiente a los receptores será baja.

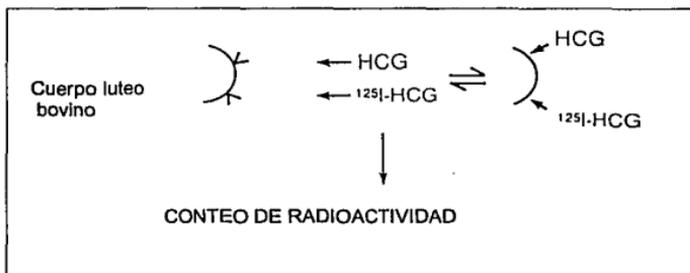


Fig.9.- Principio del ensayo con radiorreceptores.

Este tipo de ensayo es más sensible que el de inhibición de la aglutinación, sin embargo, cantidades altas de LH interfieren en la prueba ya que la LH se une a los mismos receptores que la HCG. Tomando en cuenta esta limitación de especificidad se han desarrollado ensayos comerciales con una sensibilidad limitada a 200 mUI de HCG/ml.

### 2.7.2.3. LOS RADIOINMUNOENSAYOS

a).-Los radioinmunoensayos(RIA) convencionales están basados en el mismo principio general que los ensayos con radioreceptores.

El receptor para la HCG se sustituye por un anticuerpo que se une con la HCG. Una cantidad conocida de HCG radiomarcada compete con la HCG no marcada de la muestra a analizar. En ausencia de HCG en la muestra, la radioactividad asociada es alta; si la concentración de HCG en la muestra es alta, la radioactividad asociada será baja.(fig.10)

El coeficiente final de antígeno marcado para el anticuerpo específico depende de la proporción de antígeno no marcado, presente en el sistema.

Con el fin de contar la cantidad de antígeno no marcado en el sistema, será necesario algún medio para separar la radioactividad residual libre de aquella que está formando complejos con los anticuerpos, tales técnicas de separación incluyen a los métodos de adsorción (con silicatos, carbón vegetal), o precipitación fraccionada.(26) y precipitación inmunitaria de la fracción enlazada con un segundo anticuerpo, dirigido contra los determinantes antigénicos de IgG del primer anticuerpo.

Si el antígeno que se ensaya en la prueba ha reaccionado con el anticuerpo, el antígeno radioactivo indicador no podría reaccionar con el anticuerpo. En este caso, la radioactividad en el precipitado sería muy baja. Sin embargo, si el antígeno que se ensaya no reacciona con el anticuerpo, la radioactividad del precipitado será elevada. La cantidad del antígeno no marcado se deduce a partir de una curva de calibración estándar (26 y 38).

Los radioinmunoensayos que utilizan anticuerpos contra la molécula de HCG intacta, han mostrado tener reacción cruzada con la LH. Para remediar este problema se han creado radioinmunoensayos más específicos, estos son los RIA de subunidad beta, que utilizan un anticuerpo contra la subunidad beta purificada. Con este ensayo se puede detectar cantidades de HCG de 5mUI/ml en el suero con una reacción cruzada mínima con la LH. Este ensayo descrito inicialmente en 1972, constituye la base de un sinnúmero de pruebas tanto cualitativas como cuantitativas para la detección de la HCG. El uso de la prueba de RIA DE

SUBUNIDAD BETA ha permitido la obtención de informaciones de utilidad clínica en evaluaciones de problemas relacionados con el embarazo y los tumores trofoblasticos y no trofoblasticos.

b) Otro método de radioinmunoanálisis es el análisis inmunoradiométrico (IRMA) de fase sólida en dos sitios, que implica la adsorción de anticuerpo en una matriz insoluble (ver 2.7.2.5.) a la que se añade la muestra que contiene el antígeno, que es medido mediante una segunda reacción, ahora con anticuerpo marcado con radioactividad. La cantidad de radioactividad que permanece sobre la matriz insoluble, después de un lavado, es proporcional a la concentración del antígeno ligado por la reacción inicial.

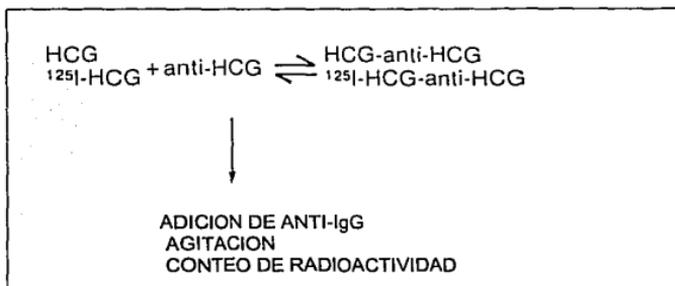


Fig. 10.- Principio del radioinmunoensayo (RIA)

#### 2.7.2.4. LOS INMUNOENSAYOS ENZIMATICOS

Los inmunoensayos enzimáticos (EIA) evitan el uso de radioisótopos y por lo tanto utilizan enzimas unidas a los anticuerpos anti-HCG. La cantidad de enzima ligada al anticuerpo o al antígeno se mide gracias a una reacción colorimétrica. Como lo mencionamos anteriormente con el RIA, también ocurren reacciones cruzadas con la LH en inmunoensayos enzimáticos que utilizan anticuerpos contra la molécula de HCG intacta. La especificidad por lo tanto se consigue utilizando anticuerpos contra la subunidad beta de la HCG.

### 2.7.2.5 LOS ENSAYOS INMUNOMETRICOS

Avances científicos en tres áreas han permitido el desarrollo de las pruebas de embarazo más recientes basadas en métodos inmunométricos. Estos son:

#### 1.- Tecnología de unión en fase sólida

La unión a una superficie sólida (perlas, tubos o microplacas de fondo plano de poliestireno o polivinilo) ha sido posible gracias a los avances conseguidos en la tecnología de unión a una fase sólida.

Cuando hay presencia de HCG en una muestra, esta se une selectivamente a un anticuerpo en la superficie del soporte sólido. La adición de un segundo anticuerpo apropiadamente marcado da como resultado la unión del anticuerpo marcado a la HCG capturada por la fase sólida y permite así su identificación. Este tipo de ensayo se conoce como ensayo inmunométrico de dos sitios o como ensayo sandwich, ya que la HCG está atrapada entre dos anticuerpos.

#### 2.- Conjugación química de las enzimas

Aunque también se podría utilizar un marcador radioactivo para el segundo anticuerpo, los avances en la conjugación química de enzimas han permitido el desarrollo de un método de identificación conveniente. Las enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa se pueden conjugar a anticuerpos en forma covalente, sin que el conjugado resultante (antígeno-enzima o anticuerpo-enzima) pierda sus características de reactividad inmunológica o enzimática. La característica de las enzimas para catalizar la conversión de un gran número de moléculas de sustrato, proporciona la base para amplificar y detectar indirectamente una reacción Ag-Ac. Asimismo, en este sistema la acción de la enzima sobre los sustratos genera productos coloridos, lo que permite la realización de pruebas cualitativas, interpretadas por la intensidad en el color desarrollado y de pruebas cuantitativas utilizando un colorímetro o espectrofotómetro.

#### 3.- Tecnología de anticuerpos monoclonales

Utilizando una tecnología de anticuerpos monoclonales se han desarrollado anticuerpos altamente específicos para regiones antigénicas especiales de la molécula (epítopes). Se han generado diferentes anticuerpos contra diferentes regiones de la molécula de HCG que han llevado a la obtención de métodos muy específicos para la valoración de la molécula de HCG. Este tipo de ensayos es altamente específico porque no detecta la LH, FSH o la TSH.

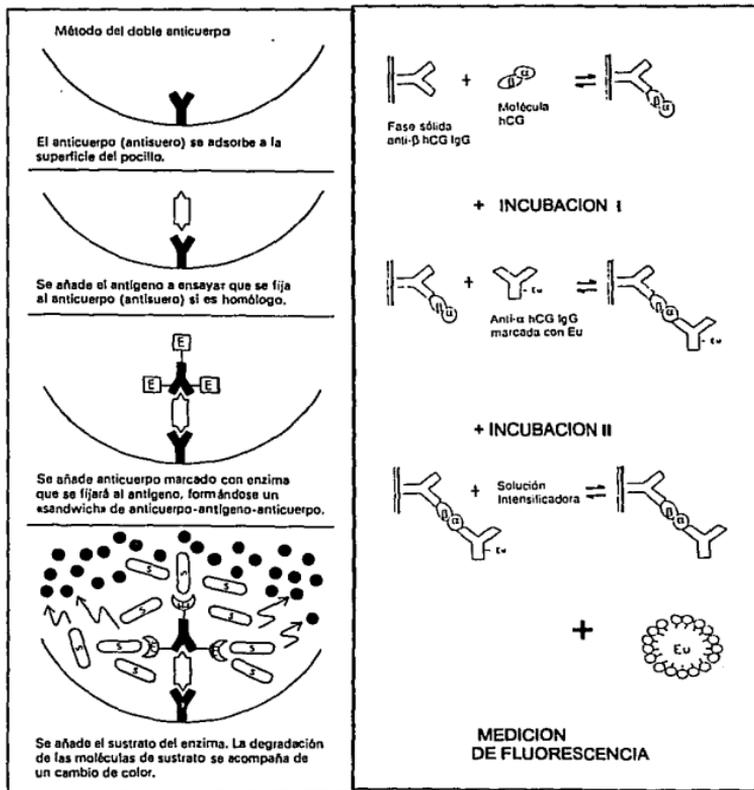


Fig 11a. Técnica de ELISA (49)

Fig 11b. Ensayo Inmunofluorométrico de 2 sitios en fase sólida.(50)

En la figura 11 se presentan los procedimientos de 2 ensayos inmunométricos; la técnica de ELISA que utiliza un marcador enzimático y un ENSAYO INMUNOFUOROMETRICO de dos sitios en fase sólida. En esta técnica la muestra de HCG reacciona en primer lugar con los anticuerpos monoclonales, dirigidos contra la subunidad beta, que están inmobilizadas en la placa. En segundo lugar los anticuerpos marcados con Europio y dirigidos a la subunidad alfa, reaccionan con la HCG intacta que se encuentra unida al anticuerpo de la fase sólida. Se añade una solución intensificadora que forma unos quelatos fluorescentes con el Europio. la fluorescencia es proporcional a la cantidad de HCG. ( 53 )

### 2.7.3. OTROS METODOS DE VALORACION DE HCG

En la década de los cincuentas se habían propuesto diferentes métodos para valorar la HCG por métodos químicos. Estos métodos ya no se usan ya que no son específicos para la HCG. Sin embargo, se presentan a continuación de manera resumida.

-Capacidad de la HCG de consumir una cantidad determinada de yodos, probablemente porque tiene doble ligaduras(Fleury and Lange 1955).

-Determinación de los grupos aldehídos formados después de oxidar la HCG con yodo. La determinación se hace por colorimetría con el reactivo de Schiff. El método requiere una purificación previa (electroforética o cromatográfica) de la HCG.

## 2.8. IMPORTANCIA CLINICA Y USO DE LA HCG

### 2.8.1 Pruebas de diagnóstico

#### A) Prueba de embarazo

- Embarazo normal: En un ciclo menstrual en el cual ocurre una concepción, la HCG se puede detectar en el suero 9 a 11 días después de la ovulación. Los niveles de HCG aumentan rápidamente y alcanzan un pico de 8 a 10 semanas después de la última menstruación; posteriormente baja el nivel y se queda estable a partir de la semana 18 hasta el final de la gestación. El nivel máximo alcanzado es de unos 50,000mUI/ml hasta 150,000 mUI/ml. ( Fig 5 )

-Embarazo ectópico: Aproximadamente el 1% al 2% de los embarazos son extrauterinos, y 95 % de estos se localizan en los trompas de Falopio. En la mayoría de los casos , los embarazos ectópicos no se detectan sino hasta que se rompen las trompas. Sin embargo un análisis por ultrasonido combinado con la

medición de la HCG permite diagnosticar el embarazo ectópico antes de la ruptura de las trompas en su caso.

En el pasado, la sensibilidad de las pruebas de embarazo era tal que no se podían detectar los embarazos ectópicos. Las pacientes con embarazo ectópico tienen concentraciones de HCG del orden de 25 mUI/ml o superiores en el suero y de 50 mUI/ml o superiores en la orina, es decir concentraciones inferiores a las que existen en un embarazo normal. Por lo tanto se requieren de pruebas mucho más sensibles para poder detectar la presencia de la HCG en estos casos.

-Abortos espontáneos: Se han constatado niveles de HCG inferiores a los normales en las mujeres que posteriormente presentan un aborto espontáneo. En las mujeres que presentan sangrado durante el primer trimestre de embarazo, la determinación del nivel de HCG ha sido de gran importancia para determinar cuáles de ellas llegarán a término y cuáles no. El hallazgo de un tiempo de duplicación de la tasa de HCG muy largo representa la mejor ayuda en este tipo de situación. Si la tasa de HCG baja con el tiempo, excluyendo la baja que ocurre entre la semana 8 y 12 después de la concepción, hay seguridad de un embarazo anormal.

El uso de los métodos específicos y sensibles para la detección de HCG, ha llevado a la definición de abortos espontáneos, también conocidos como embarazos ocultos. Estos padecimientos ocurren en 5% de los embarazos y muy a menudo se manifiestan por menstruaciones más pesadas que de costumbre o por un ligero atraso de ellas. Ni la paciente, ni el médico son conscientes de ello. La frecuencia de estos problemas es más grande en poblaciones de mujeres con problemas de infertilidad o sometidas a la fertilización "in vitro".

#### B) Prueba de diagnóstico y monitoreo de tumores.

-Enfermedades trofoblásticas gestacionales: Generalmente en estos casos, se observan concentraciones de HCG de 5,000 a 6,000,000 mUI/ml. Las concentraciones de HCG más altas se han visto en mujeres con mola hidatiforme. La concentración puede llegar a millones de mUI/ml. (39)

El nivel de HCG en pacientes con embarazo molar es mucho mayor al que presentan las pacientes con coriocarcinoma. En los dos casos, mediciones seriadas de HCG por inmunoensayos cuantitativos permiten al médico monitorear los efectos de la terapia. La desaparición de HCG es muy rápida después de la extirpación de la mola ( $t_{1/2} = 24$  a 36 horas). Si la concentración de HCG vuelve a subir de manera significativa, se debe de sospechar una enfermedad trofoblástica residual y dar la terapia adecuada. Los resultados de quimioterapia para coriocarcinoma también se pueden monitorear haciendo una medición seriada de HCG.

Finalmente se puede utilizar la medición de HCG para diagnosticar metástasis intracraneal a partir de enfermedades trofoblásticas gestacionales. Los pacientes con este padecimiento tienen valores de HCG en el líquido cefalorraquídeo de 60 mUI/ml o menos. ( 39, 51 )

-Tumores testiculares: Los tumores de las células germinales del testículo corresponden al 95% de todos los tumores testiculares.

La mayoría de los pacientes presentando estos tumores tienen HCG inmunorreactiva en la circulación. Aunque estas concentraciones son demasiado bajas para ser detectadas por pruebas de embarazo en tubo o en placa, sí pueden ser detectadas por inmunoensayos o radioinmunoensayos mucho más sensibles.

El monitoreo de las mediciones de HCG permite determinar si un tratamiento ha sido efectivo o no. También se recomienda hacer la medición simultánea de la alfa fetoproteína que también es un marcador tumoral. ( 39,51 )

-Tumores no trofoblásticos: Muchos reportes indican que 10% a 16% de los pacientes con tumores malignos no trofoblásticos tienen HCG inmunorreactiva en el suero, mientras que 50 % de estos pacientes tienen HCG en la orina. Otros estudios también localizaron HCG en más de la mitad de los tumores tisulares. ( Carcinoma de hígado, páncreas, estómago, pulmón, pecho, riñón.) (39).

### C) USO DE LA HCG COMO METODO DE CONTRACEPCION

La Organización Mundial de la Salud, ha sido involucrada desde 1974 en el desarrollo de una vacuna anti-HCG para la regulación de la fertilidad. El mecanismo exacto de su efecto sobre la fertilidad no es conocido, el mecanismo principal es la estimulación de anticuerpos que neutralizan el efecto luteotrópico de la HCG. Esto tiene como consecuencia una regresión del cuerpo amarillo y una ruptura en implantación. Otra acción posible podría ser un ataque inmune a las células productoras de HCG. ( 34 )

Se han conseguido inmunizar animales y bloquear su fertilidad (1976) .Al principio de los estudios se utilizó un antisuero contra la HCG intacta, enseguida un antisuero contra la subunidad Beta de la HCG y últimamente, a fin de evitar una reacción cruzada autoinmune involucrando a la LH, el antígeno utilizado en la vacuna es un oligopéptido sintético que corresponde a la secuencia 109-145 de aminoácidos de la parte carboxiterminal de la beta-HCG.

Para conseguir la producción de anticuerpos, el antígeno sintetizado se conjuga con el toxoide diftérico o el toxoide del tétanos para formar de esta manera un complejo inmunogénico.

Pruebas clínicas de Fase I han sido realizadas en 1986 y 1987 , aprobadas previamente por la FDA de Los Estados Unidos de America y por el Departamento de Salud de Australia.

Los aspectos éticos relacionados con este tipo de vacuna son de importancia también. Los principios éticos que deben de guiar las investigaciones biomédicas que involucran sujetos humanos aparecen en " The Declaración of Helsinki of the World Medical Association" y en "the Proposed Internacional Guideliness for Biomedical Research Involving Human Subjects". Estas exigen que toda prueba clínica, con el protocolo correspondiente, sea revisada por un comité ético independiente.

En Australia hubo una reacción enérgica por parte de la comunidad en relación con el desarrollo y uso de esta vacuna a tal punto que un senador federal en nombre de las organizaciones que piden el "Derecho a la Vida" adoptó las medidas siguientes: 1) una campaña pública acusando a los investigadores de "experimentar con embriones humanos " 2) un intento de bloquear las contribuciones del gobierno australiano a la OMS, y 3) Exigir un reporte para la divulgación del nuevo fármaco investigado y los documentos de las pruebas. Este último requerimiento fue particularmente costoso ( en tiempo y dinero) e involucró tanto a la OMS, y a las compañías farmacéuticas que financian el proyecto como a los investigadores.(34,35)

En México hubo también reacciones por parte de grupos de mujeres que cuestionaban los efectos secundarios y adversos de esta vacuna opinando que no debería de usarse ya que se desconoce la magnitud de esos efectos, sobre todo a largo plazo.

Finalmente, diremos que esta vacuna antifertilidad suscita mucha polémica en los medios que tienen conocimiento de su existencia y desarrollo. Sin embargo las investigaciones que se han desarrollado han sido apoyadas y financiadas desde hace casi 20 años por organismos preocupados por la expansión demográfica particularmente en los países en desarrollo ( 90% del crecimiento global). Según sus pronósticos, durante los 20 últimos años de este siglo la población del mundo aumentará la mitad de la población que se ha acumulado desde el origen del hombre hasta el año de 1980, o sea que en 20 años pasaría de 4 mil millones de hombres a más de 6 mil millones. Según estos organismos no habría suficiente comida ni suficiente trabajo para toda esta población, de aquí la justificación del desarrollo de esta vacuna anticonceptiva(34).

## 2.9 ESTANDARIZACION DE LA VALORACION DE HCG

Es en 1938 que la Organización Mundial de la Salud establece el Primer Estándar Internacional para la HCG. Se utilizó una substancia impura a la que se le asignó un valor unitario en base a su actividad biológica.

En 1964, cuando el estándar anterior se terminó, se utilizó una hormona de una pureza de aproximadamente 20% para realizar el siguiente estándar llamado Segundo Estándar Internacional de HCG ( Second International Standard for HCG "2nd IS" ), este estándar contenía 5,200 UI/mg de HCG y se utilizó para calibrar hormona tanto por ensayos biológicos como por ensayos inmunológicos. Este estándar sin embargo contenía subunidades libres de HCG, además de la molécula intacta. Por lo tanto, diferentes anticuerpos con diferentes especificidades a la HCG y a sus subunidades llevaron a la obtención de resultados dispares en la medición de HCG en muestras donde existían simultáneamente HCG intacta y sus subunidades.

Como respuesta a la necesidad de un estándar para inmunoensayos, la OMS permitió la realización del First Internacional Reference Preparation for HCG en 1975 (1st IRP). Esta sustancia de referencia no contenía subunidades libres, sin embargo su potencia fue determinada en base a un ensayo biológico que tomó como referencia el Second International Standard for HCG. (42) ( 51 )

La comparación de resultados basados en el Second International Standard y en el "1st IRP" podrían ser obtenidos sólo bajo condiciones ideales. La situación ideal sería un inmunoensayo tipo ( mismos anticuerpos, mismo buffer, mismo pH ), el cual determina "la HCG-beta total". Si estas condiciones ideales se cumplieran, 1 mUI/ml de HCG medido contra el Second International Standard de HCG sería equivalente aproximadamente a 1.5 a 2.2 mUI/ml de HCG medido contra el First International Reference Preparation. Por lo tanto, si una materia prima de HCG contiene 5000 UI/mg en un ensayo calibrado contra el 2nd IS, contendría 9250 UI/mg con el mismo inmunoensayo calibrado contra el 1st IRP ( tomando una equivalencia promedio de 1.85 mUI/ml ). ( 40 ) 8 55 )

Es muy difícil contar con estas condiciones de trabajo en cada laboratorio. Existen variaciones entre los anticuerpos, el diseño del ensayo y las condiciones de reacción en los diferentes ensayos que uno quisiera comparar. Por estas diferencias, la cantidad de HCG determinada en un ensayo con un estándar determinado no puede ser convertida de manera exacta a otra cantidad obtenida por otro ensayo con otro estándar.

En 1981 fabricantes de estuches para pruebas de diagnóstico del embarazo, habían encontrado en el empleo de la preparación de gonadotropina coriónica humana para valoración inmunológica, dificultades para la calibración de esos estuches, por lo tanto, el comité de la OMS, convino que los fabricantes podían

continuar calibrando esos estuches en función de la unidad definida por el Segundo Patrón Internacional de HCG, para valoración biológica. (43)

En 1986 al agotarse prácticamente las existencias del 2nd IS de HCG establecido en 1964, la OMS determinó que las existencias de la Preparación Internacional de Referencia de HCG, 1st IRP, constituirían el Tercer Patrón Internacional de HCG, (3rd IS 1986) y definió la actividad del contenido de cada ampolla, como 650 Unidades Internacionales de HCG. (43)

Por otra parte, la Convención Farmacopeica de los Estados Unidos de América comercializa una sustancia de referencia de HCG, el USP-HCG Reference Standard, cuyo título se expresa en unidades USP, las que difieren de las Unidades Internacionales, además de que no existe factor de conversión para expresar las UI en unidades de USP. (Anexo 1)

## 2.10 PROCESO DE VALIDACION EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

### A) CONCEPTO GENERAL DE VALIDACION

Uno de los problemas más comunes dentro de la industria Farmacéutica es el desarrollo y validación de métodos analíticos confiables y reproducibles que permitan asegurar la calidad de las diversas formas farmacéuticas mediante el análisis de los principios activos en el intervalo de concentración esperado, sin alteraciones debidas al sistema de medición, al método empleado, al analista o a las alteraciones del medio ambiente, que de manera aleatoria se presentan durante el análisis.

A la comprobación y verificación de la efectividad y reproducibilidad de una técnica, una operación o un proceso se le ha llamado "validación".

Los requisitos mínimos para validar un sistema son:

- Tener un sistema de buenas prácticas de manufactura en operación
- Tener un conocimiento lo mas amplio posible del fármaco considerado.
- Tener un equipo humano interdisciplinario preparado, capaz de determinar tanto las alternativas de validación como de preparar los protocolos a seguir en cada caso particular.

## B) VALIDACION DE UN METODO ANALITICO

Un método analítico va a estar siempre sujeto a error, el error lo podemos dividir en: Error controlable o determinado, que es todo aquel debido a una falta de control de calidad de la técnica analítica, por ejemplo, uso de reactivos poco estandarizados o impuros, interferencias, errores instrumentales o de operación (error de pesado, daltonismo, error de cálculos) o a error incontrolable o indeterminado, que es aquel error que permanece aún cuando se han hecho todos los esfuerzos por eliminar el error determinado.

El error determinado puede disminuirse a su mínimo valor con un control de calidad adecuado; el error indeterminado del método analítico debe "validarse".

La validación de un método analítico entonces se refiere a la evaluación cuantitativa del error indeterminado. A pesar de que en todos los métodos es necesaria dicha validación, la metodología exacta depende de cada técnica, las que nunca varían son las bases estadísticas a través de las cuales podemos definir el error.

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en este caso, en términos de parámetros analíticos. La confiabilidad de los resultados se determina con métodos estadísticos. Los parámetros típicos que se deberían de considerar en la validación de diferentes tipos de ensayos, se especifican en la tabla 4. Ya que existen diferentes opiniones acerca de la terminología y del uso, cada parámetro se define a continuación. (23)

**Tabla 4. Parámetros analíticos típicos utilizados en pruebas de validación.**

Precisión
Exactitud
Límite de detección
Límite de cuantificación
Especificidad
Rango
Linealidad

**PRECISION:** DEFINICION- La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados individuales de una prueba cuando el procedimiento se aplica de manera repetida a muestras múltiples de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico se expresa normalmente como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación). La precisión es una medida del grado de reproducibilidad de un método analítico bajo circunstancias normales de operación.

**DETERMINACION-** La precisión de un método analítico se determina analizando una cantidad suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, a fin de poder calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o del coeficiente de variación. En este caso los ensayos son análisis independientes de muestras que fueron sometidas al procedimiento analítico completo desde la preparación de la muestra hasta el resultado final.

**EXACTITUD: DEFINICION-** La exactitud de un método analítico es la cercanía de los resultados obtenidos por el método hacia los valores verdaderos. Se puede a menudo expresar la exactitud como el porcentaje de recuperación mediante el análisis de una cantidad conocida de sustancia a analizar (principio activo).

**DETERMINACION-** La exactitud de un método analítico se puede determinar aplicando este método a muestras o mezclas de excipientes a las cuales se adicionaron cantidades conocidas del principio activo, en los dos casos tanto por encima como por debajo del nivel normal esperado de las muestras. La exactitud se calcula a partir de los resultados obtenidos como el porcentaje de recuperación de la sustancia analizada.

**LIMITE DE DETECCION: DEFINICION-** El límite de detección es un parámetro del límite de la prueba. Es la concentración más pequeña de una sustancia (PA) en la muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. Así es que los límites de la prueba indican básicamente si la concentración analizada se encuentra por encima o por debajo de un cierto nivel. El límite de detección se expresa normalmente como la concentración de la sustancia en la muestra (e): porcentaje).

**DETERMINACION-** La determinación del límite de detección de un método analítico varía dependiendo de si se trata o no de un procedimiento instrumental. Para procedimientos instrumentales, se puede usar diferentes técnicas. Algunos investigadores determinan la señal al nivel de ruido, comparando los resultados con muestras de concentración de la sustancia conocida con los de muestras de blanco y se establece el nivel mínimo al cual la sustancia se puede detectar. Un cociente con el nivel de ruido de 2:1 ó 3:1 es generalmente aceptable. Otros investigadores miden la magnitud del ruido de fondo de la respuesta analizando un número de blancos y calculando la desviación estándar de estos resultados. La desviación estándar multiplicada por un factor, generalmente 2 ó 3, proporciona una estimación del límite de detección. Posteriormente, el límite se valida mediante el análisis de una cantidad adecuada de muestras conocidas preparadas con una concentración cercana al límite de detección.

Para los métodos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de

substancia y estableciendo la cantidad mínima a la que se puede detectar experimentalmente la substancia.

**ESPECIFICIDAD: DEFINICION-** La especificidad de un método analítico es su habilidad para medir exactamente y específicamente la substancia en presencia de otros componentes que podrían estar presentes en la muestra a analizar. La prueba de especificidad compara los resultados obtenidos por muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, compuestos químicos relacionados o excipientes, con resultados obtenidos a partir de muestras a las cuales no fueron adicionadas ningunas substancias. La especificidad es la medida del grado de interferencia ( o su ausencia ) en el análisis de muestras complejas de mezclas.

**DETERMINACION-**La especificidad de un método analítico se determina comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación o excipientes con los resultados obtenidos a partir de un análisis de muestras puras.

Cuando las impurezas o los productos de degradación no fueron identificadas o no es posible conseguirlos, la especificidad puede demostrarse mediante un análisis de muestras que contienen impurezas o productos de degradación y comparando los resultados con los obtenidos por pruebas adicionales de pureza (ej: ensayos cromatográficos, solubilidad). El grado de concordancia de los resultados es la medida de la especificidad.

**LINEALIDAD Y RANGO: DEFINICION DE LINEALIDAD-** La linealidad de un método analítico, es su habilidad para proporcionar resultados que son directamente, o por una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de la substancia en las muestras dentro de un rango determinado. La linealidad generalmente se expresa en términos de varianza alrededor de la pendiente de la regresión lineal calculada de acuerdo a una relación matemática establecida a partir de los resultados obtenidos por el análisis de muestras con concentraciones diferentes de la substancia.

**DEFINICION DE RANGO-** El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superiores e inferiores( incluyendo estos niveles) de la substancia que ha demostrado ser determinado con precisión, exactitud y linealidad, utilizando el método descrito. El rango se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados (ej, porcentaje) obtenidos por el método analítico.

**DETERMINACION DE LA LINEALIDAD Y DEL RANGO-** La linealidad de un método analítico se determina mediante un tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis de muestras con concentraciones de la

substancia a analizar de tal manera que cubren el rango del método que se pretende validar. El tratamiento es normalmente un cálculo de regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados de los resultados contra la concentración de la sustancia. En algunos casos, para obtener una proporcionalidad entre las muestras y las concentraciones de las muestras, los datos de la prueba pueden someterse a una transformación matemática antes de llevar a cabo el análisis de regresión. La pendiente de la regresión lineal y su varianza proporcionan una medida matemática de la linealidad. Graficar los resultados de la prueba en función de la concentración de la sustancia, también puede representar una alternativa aceptable al cálculo de la regresión lineal.

El rango del método se valida verificando que el método analítico proporcione una precisión, exactitud y linealidad aceptable cuando se aplica a muestras que contienen una cantidad de sustancia que corresponda tanto a los valores externos del rango como a los valores internos.

**REPRODUCIBILIDAD: DEFINICION-** El grado de reproducibilidad de un método analítico se determina analizando las mismas muestras bajo una variedad de condiciones normales de prueba, tales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes temperaturas de ensayo, diferentes días, etc. La reproducibilidad se expresa normalmente como la ausencia de influencia sobre los resultados de parte de variables operacionales y ambientales del método analítico. La medida de la reproducibilidad de los resultados de prueba considera condiciones de operación normales o esperadas de un laboratorio a otro o de un analista a otro.

**DETERMINACION-** La reproducibilidad de un método analítico se determina analizando alícuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, utilizando condiciones operativas y ambientales que pueden diferir pero que están dentro de los parámetros especificados de la prueba. El grado de reproducibilidad de los resultados se determina como una función de las variables de la prueba. Esta reproducibilidad se puede comparar a la precisión de la prueba en condiciones normales a fin de obtener una medida de la reproducibilidad del método analítico.

**LIMITE DE CUANTIFICACION: DEFINICION-** El límite de cuantificación es un parámetro de los análisis cuantitativos para cantidades bajas de sustancia en las muestras, como son las impurezas en materia prima y los productos de degradación en los productos farmacéuticos terminados. Representa por lo tanto la cantidad más baja de la sustancia que puede ser determinada con una precisión y una exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa como la concentración de sustancia en la muestra.

**DETERMINACION-** La determinación del límite de cuantificación de un método analítico puede variar dependiendo de si se trata de un método instrumental o no. Para procedimientos instrumentales, comunmente se mide la magnitud del ruido de fondo analizando un cierto número de blancos y calculando la desviación estándar multiplicada por un factor, que normalmente es 10, esto proporciona una estimación del límite de cuantificación. Este límite se valida posteriormente mediante el análisis de una cantidad adecuada de muestras cuya concentración conocida o preparada este cerca del límite de cuantificación.

Para procedimientos no instrumentales, el límite de cuantificación se determina generalmente analizando muestras con concentraciones conocidas de substancia y estableciendo el nivel mínimo al cual la substancia se puede detectar con una precisión y una exactitud aceptable.

#### **C) ELEMENTOS REQUERIDOS EN LA PRUEBA DE VALIDACION**

Los elementos requeridos para una prueba de validacion de un método analítico para valoración cuantitativa de principio activo son : precisión, exactitud, especificidad, rango, linealidad y reproducibilidad. La validación de un método analítico para valoración de impurezas o compuestos de degradación, requiere además una prueba de limite de detección .

Para métodos farmacopéicos, no es necesario un análisis estadístico a partir de materia prima, pero sí es importante el análisis sobre producto terminado. Para los métodos no farmacopéicos , sin embargo, es necesario realizar los dos tipos de análisis estadísticos.

#### **D) CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD**

Ni la Secretaría de Salud, ni el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México han publicado los criterios de aceptabilidad para los diferentes parámetros a analizar en un estudio de validación de un método analítico con fundamento inmunquímico. Ante esta situación se pueden tomar en cuenta como punto de comparación los criterios establecidos para las pruebas microbiológicas(30) y algunos criterios que prevalecen en las determinaciones inmunológicas de las áreas clínicas(31). ( tabla 5 )

**TABLA 5. Criterios de aceptabilidad en la validación de métodos analíticos, expresados en términos de coeficiente de variación.(30)**

PARAMETRO	TIPO DE PRUEBA		
	Química	Microbiológica	(Inmunológica*)
Precisión sistema	< 1.5%	< 3%	
Exactitud y repetibilidad	<3%	< 5%	2%-8% (apolipoproteína)
Reproducibilidad	< 3%	< 5%	5%-15%(bilirrubina) 5%-10%(apolipoproteína)
* Nota: Coeficientes de variación observados en métodos inmunológicos (RIA, ELISA) en valoraciones de proteínas y hormonas. (31) (44) (45).			

Hay que mencionar finalmente que las pruebas inmunoquímicas presentan una variabilidad mucho mayor a las pruebas microbiológicas, particularmente cuando se trata del análisis de hormonas y de la gonadotropina coriónica humana. Como ejemplo citaremos un control de calidad interhospitalario en Francia donde los coeficientes de variación tenían, sin considerar la HCG, como límite inferior 13.7% de CV para la ferritina y 46.1% para la progesterona. En este estudio la HCG se distinguió con un coeficiente de variación de 77.9%.(9/3)

## CAPITULO III

### 3.1 SELECCION DE TRES INMUNOENSAYOS COMERCIALIZADOS EN MEXICO. SUSCEPTIBLES DE UTILIZARSE EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA PARA LA MEDICION DE HCG

#### 3.1.1 Criterios para la selección de tres inmunoensayos para la valoración de hcg en la industria farmacéutica

Un laboratorio de control de calidad de la industria farmacéutica no puede depender de un solo proveedor para sus reactivos, aún menos cuando el reactivo en cuestión es importado y está sujeto a una legislación de importación cuyos cambios aparecen repentinamente sin aviso alguno. Los análisis deben de seguir haciéndose y con una técnica validada que no puede improvisarse según las fluctuaciones de los reactivos existentes en el mercado nacional. Por tal motivo, en la fase inicial de este trabajo, se pretende investigar las características de todos los reactivos comercializados en México, destinados a las áreas clínicas para la valoración de la gonadotropina coriónica humana.

De los reactivos existentes se van a seleccionar tres de ellos como posibles candidatos para la valoración cuantitativa de HCG en la industria farmacéutica, dos de ellos representarían una alternativa para esta valoración en el caso de que el reactivo electo faltara.

Los criterios para la selección de los tres reactivos son los siguientes:

- 1.- El reactivo debe de proporcionar un resultado cuantitativo de la valoración de HCG de tal manera que su precisión mínima permita determinar que el título de la hormona esté comprendido entre el 80% y el 125 % del valor etiquetado, según las agencias de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- 2.-El reactivo debe de reunir las características necesarias para cuantificar la gonadotropina coriónica humana intacta con sus dos subunidades, ya que las subunidades libres no tienen actividad biológica.
- 3.- El reactivo debe de ofrecer ventajas en relación con el método biológico de valoración de la HCG, es decir que debe de ser más rápido y más sencillo en su uso.

4.- El reactivo debe de estar calibrado contra un estándar de referencia internacional y por lo tanto el resultado se expresará en Unidades Internacionales (UI), de preferencia contra el mismo estándar de referencia utilizado por la casa matriz en la valoración biológica de la materia prima .

TABLE 6: LISTA DE REACTIVOS PARA PRUEBA DE EMBAJAZO POR DETECCION DE HCG, COMERCIALIZADOS EN MEXICO

MARCA	FABRICANTE	SENSIBILIDAD		ARTICULOS POR KIT	ESTANDAR DE EMERGENCIA	PRUEBA
		*mU/ml FOR KIT	UNIDAD V/AL			
GRAVINDEX B-HCG	JOHNSON & JOHNSON	0.8	1 AÑO	75	IAU (PLACA)	MONO (B-HCG) 2D IS 1964
DET. CUANT. HCG	LAFON	50	1.0	---	HI (TUBO)	POLICLONAL (HCG) *
NEO PLANTEST DUOCLON	ORGANON	100	0.5	---	HD (PLACA)	DUOCLONAL (HCG) *
NEO PREGNOSTICON 75	ORGANON	30	0.075	1 AÑO	HD (TUBO)	DUOCLONAL (HCG) *
ORGANON	ORGANON	30	1.0	---	HI (TUBO)	MONO (P.T.B.HCG) *
UCG BETA SLIDE MONO.	CARTER WALLACE	50	0.5	24 MESES	IAU (PLACA)	MONO (B-HCG) *
UCG BETA STRIP	CARTER WALLACE	50	0.2	24 MESES	POLICLONAL (B-HCG)	---
UCG SLIDE TEST	CARTER WALLACE	30	2.0	18 MESES	IAU (PLACA)	POLICLONAL (HCG) *
UCG TITRATION SET	CARTER WALLACE	45	1.0	8 MESES	HI (TUBO)	POLICLONAL (HCG) USP
HCG BETA TEST	LAFON	50	0.2	---	---	POLICLONAL (B-HCG) 2D IS 1964
FREN-TEI-CADERA-B	LAFON	30	1.0	---	---	POLICLONAL (B-HCG) *
DIAGNOSTICO DE EMBAJAZO	LICON	30	1.0	---	---	POLICLONAL (HCG) *
PREGNATEST CONTROL	LAFON	30	1.0	---	---	POLICLONAL (HCG) 2S IS 1964
PREGNOSTEIA DUOCLON	ORGANON	30	0.2	---	SPLA(T)	DUOCLONAL
ENZYMEN-TEST HCG	ROEHLINGER	100	0.9*	---	ELISA	MONO, POLI (B-HCG) 1.1RP/75/537
B-HCG 15/15	ABBOTT	100	0.76*	---	ELIA	POLICLONAL (B-HCG) 2D IS 1964
TANDEM B-HCG	HYBRITTECH	100	0.20*	---	ELIA	MONOCLONAL (B-HCG) 1.1RP/75/537
ABBOTT T.P. HCG COMBO.	ABBOTT	40	25*	---	ELIA	MONOCLONAL (B-HCG) 2D IS 1964
EMUCHEN VIP HCG	HYBRITTECH	25/50	---	---	ELIA	MONOCLONAL (B-HCG) 3RD IS 75/537
REVELASTICK	IND. QUIM. TORREON	96	0.5*	8 MESES	IFMA	MONOCLONAL (B-HCG) 1.1RP/75/537
DELTA HCG TR-PIA	PHARMALCIA	100	---	---	ELIA	MONOCLONAL
EMUCHEN B-HCG	HYBRITTECH	100	1.5*	30 DIAS	IFMA	MONOCLONAL DOBLE AC *
TANDEM-R-HCG	HYBRITTECH	100	---	3 MESES	ELIA	MONOCLONAL (B-HCG) **
TANDEM-11 ICON HCG	HYBRITTECH	24/48	---	6 SEMANAS	ELIA	MONO-POLICLONAL 1.1SP/75/537
AMERSHAM B. HCG	---	---	---	---	---	MONOCLONAL 3RD IS
HCG-CUBE	DIFCO, LAB	24/48	2.0	---	ELIA	---
HCG-EIA	BIOMEDIX	96	---	1 AÑO	ELIA	---
DIAMEDIX	MICROSEPARACIONES	96	---	---	---	---

ELI: EMERGENCIA DE HEMAGLUTINACION  
 SP1A: EMERGENCIA EN SOL PARTICULA  
 ELISA: EMERGENCIA EN EMERGENCIA  
 IFMA: EMERGENCIA EN EMERGENCIA  
 IMA: EMERGENCIA EN EMERGENCIA

### 3.1.2 INMUNOENSAYOS COMERCIALIZADOS EN MEXICO PARA LA VALORACION DE HCG Y SUS CARACTERISTICAS

En la tabla 6 aparecen los reactivos comercializados en México para la valoración de HCG en el área clínica, así como sus características ( marca, sensibilidad, número de pruebas por estuche, caducidad, fundamento, anticuerpos utilizados y estándar de referencia ).

### 3.1.3 PRUEBA DE REACTIVOS

#### Reactivos probados:

Los siguientes reactivos fueron escogidos para la realización de una prueba preliminar, a fin de determinar si el resultado conseguido dejaba entrever una buena correlación con el valor biológico y si no existían problemas mayores en su uso:

1.- ENZYUM-TEST ( BOEHRINGER MANNHEIM ):Determinación cuantitativa de gonadotropina coriónica total humana en suero por inmunoensayo enzimático ( ELISA ).

2.-RIA AMERSHAM BETA HCG ( AMERSHAM ): Determinación cuantitativa de gonadotropina coriónica humana por radioinmunoensayo ( subunidad beta ).

3.-PREGNOSTICON ALL-IN ( ORGANON ): Prueba de embarazo en tubo con una sensibilidad de 1000 UI de HCG por litro de orina. Es una prueba con el principio de inhibición de la aglutinación con anticuerpos monoclonales contra la fracción terminal beta.

4.-NEO PREGNOSTICON 75 DUOCLON ( ORGANON ): Prueba de embarazo en tubo con una sensibilidad de 75 UI de HCG por litro de orina. Es la prueba en tubo de hemaglutinación inversa de mayor sensibilidad y especificidad del mercado. Los anticuerpos monoclonales están dirigidos hacia dos porciones específicas de la HCG ( unión alfa-beta y fracción terminal de beta ) lo cual permite detectar únicamente la HCG intacta.

5.-UCG-TITRATION SET ( CARTER WALLACE ): Detecta la gonadotropina coriónica humana ( HCG ) inmunológicamente, en la orina o en el suero de mujeres embarazadas, con una sensibilidad de 1 UI de HCG por ml de orina o de suero. Se basa en el principio de la inhibición de la aglutinación hemática. El antisuero es convencional de conejo.

3.1.4. **METODO** : Las pruebas se realizaron por duplicado, de acuerdo con los métodos descritos en los instructivos de cada reactivo; Las diluciones se efectuaron con una precisión óptima tal como se realizan en cualquier método analítico químico, ( bureta, pipeta y matraces aforados ), es decir, utilizando material de vidrio volumétrico para conseguir las concentraciones finales deseadas y no realizar diluciones seriadas de factor dos o de factor 1.26 (47) las cuales no permiten acercarse al punto de equilibrio de manera precisa, es decir cuantitativa. Para el reactivo UCG-TITRATION SET se consideró como punto de equilibrio, a un anillo de 4.5 cm de diámetro; para las pruebas en tubo se utilizó SSI como diluyente.

Para los demás reactivos la dilución final se realizó en el diluyente original del estuche y las primeras diluciones en SSI.

## 3.1.5 RESULTADOS

Se analizaron dos materias primas ( M.P. ) de número de lote diferentes así como dos productos terminados ( P.T. ) de lotes diferentes.

**TABLA 7. VALORACION DE MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS TERMINADOS DE HCG POR DIFERENTES INMUNOENSAYOS.**

REACTIVO	PRODUCTO ANALIZADO	RESULTADO (EN % DEL VALOR ETIQUETADO)	MEDIA ARITMETICA	CV
ENZYMUM-TEST	P.T. A	(117%)*		
	M.P. X	(134%)*		
	P.T. A	120%		
	M.P. X	83%		
RIA AMERSHAM BETA HCG	P.T. A(1)	14.5%	29%	59%
		48.7%		
	P.T. A	25%		
	M.P. X	27%		
PREGNOSTICON ALL-IN	P.T. A	36%	56%	50%
	P.T. B	76%		
	M.P. X	89%		
	M.P.Y	90%	89%	1%
NEO-PREGNOSTICON 75 DUOCLON	P.T. A	28%	42%	22%
	P.T. B	57%		
	M.P.X	89%	82%	12%
	M.P. Y	75%		
UCG-TITRATION SET	P.T. A	65%	73%	15%
	P.T. B	81%		
	M.P. X	83%		
	M.P. Y	96%	89%	10%

**Nota:** Los resultados están expresados en términos del estándar de referencia de cada reactivo así como en base a la sensibilidad indicada por el proveedor)

\* El control del reactivo salió fuera del rango permitido.

1) Resultados obtenidos a partir de concentraciones finales distintas.

### 3.1.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSION

Antes de analizar los resultados obtenidos en los diferentes inmunoensayos, ( Tabla 7 ) es necesario señalar que dentro de los reactivos probados unos detectan solamente la fracción beta de la HCG, por lo que no son a priori aptos para la valoración de la HCG en un medicamento, sin embargo se realizaron estas pruebas preliminares para dejar como antecedente un análisis sobre su posible uso, siendo estos reactivos, productos comercializados por empresas de mucho prestigio en el área clínica. Estos son : RIA AMERSHAM BETA HCG y PREGNOSTICON ALL-IN.

El ENZYUM-TEST basado sobre el principio de ELISA es cuantitativo. Este ensayo se realizó con algunos problemas ya que necesita adaptarse al análisis de una muestra de medicamento cuya concentración en HCG es mucho mayor a la que se suele encontrar en las muestra clínicas, por lo que la prueba es tardada ya que requiere la realización de diluciones precisas. Además los resultados obtenidos con el control incluido en el estuche, se salieron de los límites durante dos pruebas, quizás por el calor excesivo del medio ambiente, lo que nos condujo a realizar la prueba en los laboratorios del proveedor mediante un sistema totalmente automatizado, sistema destinado al análisis hospitalario de grandes cantidades de muestras, que no es apto para un laboratorio de la industria farmacéutica. Los resultados obtenidos finalmente son de 120% para el producto terminado y 83% para la materia prima.

El RIA AMERSHAM BETA HCG es un radioinmunoensayo cuantitativo utilizado en centros hospitalarios y considerado durante mucho tiempo como el sistema más sofisticado y sensible. Este tipo de prueba no se puede realizar en un laboratorio de la industria farmacéutica , pero se realizaron estas pruebas pensando que en caso de obtener buenos resultados se podría considerar mandar muestras a un laboratorio de tercería. Los resultados obtenidos son muy bajos , la media de los resultados fue de 29% con productos terminados (CV= 59%) y 27% para materia prima.

El PREGNOSTICON ALL-IN, es un reactivo en tubo semi-cuantitativo. La media de los resultados obtenidos es de 56% para un producto terminado ( CV 50% ) y 89% para materia prima. ( CV = 1% )

El NEO-PREGNOSTICON 75 DUOCLON nos da unos resultados con una media de 42% para producto terminado ( CV = 22% ) y 82% para materia prima, ( CV = 12% ).

El UCG-TITRATION SET nos da una media de resultados de 73% ( CV = 15% ) para producto terminado y 89% para materia prima. ( CV = 10% )

Conviene añadir que el número de ensayos realizados es muy bajo por lo que estos resultados solamente tienen un valor aproximado. Los diferentes ensayos realizados además de haber cuantificado la hormona de las muestras analizadas, han permitido familiarizarse con diferentes tipos de ensayo y su relativa complejidad. Hemos visto que tanto los reactivos comercializados como cuantitativos y como semi-cuantitativos exigen un trabajo largo y costoso para poder valorar HCG en un medicamento en las condiciones requeridas, además se necesita la colaboración de varias personas, como son los proveedores del reactivo, laboratoristas y directivos del laboratorio farmacéutico y personal que nos renta o facilita las instalaciones de diversas entidades hospitalarias. Por lo tanto hemos decidido descartar definitivamente en el desarrollo de nuestro trabajo todos los reactivos que cuantifican solamente la fracción beta de la hormona HCG y los reactivos que requieren un equipo costoso y que son inestables. (ENZYMUM TEST, RIA AMERSHAM BETA HCG, PREGNOSTICON ALL-IN).

En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el reactivo que mejores resultados nos ha dado es el UCG TITRATION SET, ya que el promedio de los resultados obtenidos es el más cercano al valor etiquetado y que es el que presenta menos variaciones ( tabla 7 ); También hemos decidido seguir nuestros trabajos con el reactivo NEO PREGNOSTICON 75 DUOCLON ya que es más específico que el UCG TITRATION SET para la valoración de la HCG intacta. Sin embargo, es necesario subrayar que los resultados obtenidos son muy alejados del valor etiquetado, por lo que se requiere buscar la razón de este hecho. Antes de probar más reactivos es necesario realizar algunas pruebas en cuanto a los aspectos siguientes para explicar los resultados obtenidos.

1.-Determinación de la sensibilidad de los reactivos: Las sensibilidades de los reactivos vienen indicadas por los proveedores, sea en la misma caja, sea en los folletos que acompañan al mismo. Sin embargo, la exactitud de esta calibración no es suficiente para nuestro propósito , sobre todo en reactivos semi-cuantitativos. Además se están manejando diferentes estándares de referencia aún internacionales ( 2nd IS , 3rd IS, 1st IRP,USP ) para calibrar los estuches. Esta situación de no equivalencia de los patrones de referencia, aceptada por la misma OMS, conlleva a una dificultad de comparación de los resultados obtenidos por diferentes reactivos. Por lo tanto es necesario, en las pruebas futuras utilizar el mismo patrón de referencia para todas las pruebas, a fin de poder comparar los resultados entre sí.

2.- Realización de pruebas de estabilidad de la HCG diluida: La HCG es una hormona que fácilmente puede perder su potencia si no se conserva en determinadas condiciones. Todos los inmunoensayos requieren que se realicen grandes diluciones de la HCG a partir del medicamento, por lo que se piensa que puede existir la posibilidad de que estas etapas afecten la estabilidad de la hormona y dando resultados equivocados. Ya que los trabajos de determinación

de estabilidad de la hormona a diferentes temperaturas y en diferentes soluciones son costosos, se realizarán solamente con el reactivo UCG TITRATION SET.

### 3.2 PRUEBAS PRELIMINARES DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD DE LOS REACTIVOS

A continuación se presentan los resultados de determinación de las sensibilidad de los siguientes reactivos para valoración de HCG:

- 1) Neo Pregnosticon 75 Duoclon
- 2) Pregnosticon All in
- 3) Determinación cuantitativa de HCG LAFON
- 4) UCG Titration Set

Las determinaciones se realizan de acuerdo al método indicado en el instructivo de uso de cada reactivo; las diluciones sin embargo, se realizaron con varias concentraciones finales cercanas y equidistantes de la sensibilidad indicada en el marbete.

TABLA 8a: RESULTADOS

1) <u>Pregnoticon All in</u> (sensibilidad 1 UI/ml)								
día	solución estándar	Concentración final (UI/ml)					P.E. UI/ml	
		0.705	0.806	0.907	1.007	1.108		1.210
1	1	-	+	+	+		+	0.907
1	1	-	-	-	-	-	-	> 0.907
2	1	-	-	-	+/-			(1.0)
2	1	-	-	-	-	+		(1.108)
6	1	-	-	-	-	-	*	(1.108)
1	2	-	-	-	-	-	-	>1.111
1	2	-	-	-	-	-	+	1.211
1	3			0.9025	1.0028	1.1030	1.2033	1.05
				-	+/-	+	+	
<u>Resultado promedio:</u> solución 1) 0.907 UI/ml solución 2) 1.161 UI/ml solución 3) 1.05 UI/ml <u>Sensibilidad promedio: 1.024 UI/ml</u>								
* NOTA: la solución de 1.108 UI / ml fue probada en tiempos distintos (seis días), se constata de esta manera que existe una baja del título de la hormona en solución.								

TABLA 8b: RESULTADOS

2) Neo Pregosticon 75 Duoclon (sensibilidad 0.075 UI / ml)

día	solución estándar	concentración final(UI / L)											P.E. UI/L		
		45	50	55	60	65	70	75	80	86	90	100		110	
1	1	-	-	-		+/-		+/-	+/-						65-80
1	1				-	-	+/-								≥65
2	1												+		(100)
2	1												-		(>90)
1	2							-	-		+	+			≤90
1	2										+	-		+	(86)
1	3								-	-	+/-	+			88

Promedio de resultados: solución 1: punto de equilibrio entre 65 y 100 UI/L. No se considera en el promedio, por no haberse realizado la prueba el mismo día.  
solución 2) 90 UI/L  
solución 3) 88 UI/L  
Promedio final : sensibilidad = 88 UI/L

TABLA 8c: RESULTADOS

3) <u>Determinación cuantitativa de HCG LAFON (sensibilidad 1 UI/ml)</u>													
día	solución estándar	concentración final (UI/ml)										P.E.	
		0.08	0.10	0.20	0.25	0.50	0.70	0.80	0.90	1.01	1.11		
1	1							+	+	+	+	+	<0.7
1	1		-			+	+	+					<0.25
2	1			-									>0.1
2	1				+								0.2
<b>Resultado: Sensibilidad aproximada* del reactivo: 0.2 UI/ml</b> (* la determinación es aproximada por haberse realizado la prueba con la misma solución dos días seguidos).													

TABLA 8d: RESULTADOS

4) <u>UCC TITRATION SET (sensibilidad 1 UI/ml)</u>												
Lote de reactivo	Concentraciones finales analizadas(UI/ml)								P.E. (UI/ml)			
	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5					
1		-	-	-	+			+				1.2
1				+	+	+						≤ 1.1
2		-	+	+	+	+	+					1.0
<b>Resultado: Sensibilidad promedio = 1.1 UI/ml</b>												

## CONCLUSION

En resumen se determinaron las sensibilidades siguientes ( tabla 8 ):

- Pregnosticon All IN : 1.0 UI/ml contra 1 UI/ml indicada en el marbete.
- Neo Pregnosticon 75 Duoclon: 0.088 UI/ml contra 0.075 UI/ml indicada en el marbete.
- Determinación cuantitativa de HCG de Lafon: 0.2 UI/ml contra 1UI/ml indicada en el marbete.
- UCG-Titration Set: 1.1 UI/ml contra 1.0 UI/ml indicada en el marbete.

En conclusión podemos decir que las sensibilidades indicadas en los marbetes de los reactivos pueden satisfacer una valoración semicuantitativa, más no existe una exactitud suficiente para realizar una valoración cuantitativa, sobre todo en los reactivos "Neo Pregnosticon 75 Duoclon" y "Determinación cuantitativa de HCG Lafon". Por lo tanto es necesario realizar siempre la determinación de la sensibilidad del reactivo con un estándar antes de realizar la valoración de una materia prima o de un producto terminado.

Refiriéndonos a las valoraciones de HCG presentadas en la tabla 7 del inciso 3.1.4, podemos constatar que una determinación preliminar de la sensibilidad de los reactivos con un estándar es necesaria ya que el valor del resultado se ve afectado de una manera muy significativa. Como ejemplo veamos el caso del "UCG Titration Set" cuya sensibilidad comercial es de 1 UI/ml se encontró un promedio de resultados de 81%, promedio que sería de 89% si se considera la sensibilidad real de 1.1 UI/ml.

Los reactivos cuya sensibilidad real es la más cercana a la sensibilidad indicada por el proveedor son el Pregnosticon All in, que por presentar antisuero solamente contra la cadena beta HCG no se considerará más en nuestro estudio, y el UCG Titration Set.

**Nota:** Dentro de los reactivos probados también esta el "Pregnosopia Duoclon". Este reactivo se comercializa para uso cualitativo para pruebas de embarazo. Sin embargo algunos artículos mencionan la posibilidad de utilizar este principio de spia (sol partícu le immunoassay) para valoraciones cuantitativas gracias a la medición de una absorbancia y a su relación con la concentración de hormona. (4.6)

Las pruebas realizadas no fueron concluyentes ya que no se encontró dicha proporcionalidad, al realizar una curva estándar de 50,100,150,200 y 250 UI/L de HCG diluida en SSI, y hacer las lecturas de las absorbancias a 540 mm ( como blanco se utilizó tanto una SSI como un buffer tris pH 7.6 ).

### 3.3 PRUEBAS PRELIMINARES DE ESTABILIDAD DEL REACTIVO Y DE LA HCG EN DIFERENTES SOLUCIONES Y A DIFERENTES TEMPERATURAS

Todas las pruebas siguientes de estabilidad se realizan con el reactivo UCG-TITRATION SET que se basa en el principio de la inhibición de la aglutinación hemática. El método utilizado para determinar el punto de equilibrio corresponde al método desarrollado en este trabajo y que se presenta en el capítulo IV, sin embargo, en estas pruebas preliminares:

- 1) No se consideran los criterios de aceptabilidad que fueron establecidos posteriormente.
- 2) Se analizan solamente seis diluciones finales " UCG Titration Set ".
- 3) Para los cálculos se considera una sensibilidad promedio determinada, a partir de seis estuches del mismo lote de reactivo.

#### 3.3.1 Determinación de la sensibilidad del reactivo

Se determina una sensibilidad promedio a partir de 4 cajas nuevas y 2 cajas utilizadas anteriormente de 3 a 5 veces(\*\*), todas del mismo número de lote, donde:

Cf =concentración final(Ul/ml)

AF=aforos(ml)

Tb=título biológico(Ul/mg)

r=coeficiente de regresión lineal

Al= alícuotas(ml)

Pm= peso de la muestra(mg)

d= diámetro del anillo(mm)

PE= punto de equilibrio

**Tabla 9. RESULTADOS ( Determinación de sensibilidad de UCG Titration Set )**

caja	Cf	1/Cf	Al	AF	Pm	Tb	d	r	PE
1				10	5.01	3700			
			1.0	100					
	0.9	1.11	4.85	100			5.5		
	1.0	1.00	5.4	100			5.5		
	1.1	0.90	5.95	100			4.5		
	1.2	0.83	6.5	100			4.5		
	1.3	0.76	7.05	100			4.75		
	1.4	0.71	7.55	100			4.25		
								0.87	0.79

caja	Cf	1/Cf	AI	AF	Pm	Tb	d	r	PE
2				10	5.02	3700			
			1.0	100					
	0.7	1.42	3.8	100			5.875		
	0.8	1.24	4.35	100			4.75		
	0.9	1.12	4.8	100			5.25		
	1.0	1.00	5.4	100			4.75		
	1.1	0.90	5.95	100			4.5		
	1.2	0.83	6.5	100			4.25		
								0.88	0.64
3				10	7.4	3700			
			1.0	100					
	0.63	1.59	2.3	100			6.5		
	0.68	1.46	2.5	100			6.25		
	0.74	1.35	2.7	100			5.75		
	0.82	1.22	3.0	100			5.0		
	0.92	1.09	3.35	100			5.0		
								0.96	0.70
4				10	5.0	3700			
			1.0	100					
	0.7	1.42	3.8	100			5.75		
	0.8	1.24	4.35	100			5.5		
	0.9	1.13	4.8	100			4.875		
	1.0	1.00	5.4	100			4.625		
	1.1	0.91	5.95	100			4.5		
	1.2	0.83	6.5	100			(4.5)		
								0.97	0.67
5**				10	5.01	3700			
			1.0	100					
	0.7	1.42	3.8	100			6.5,7.0		
	0.8	1.24	4.35	100			6.0,6.0		
	0.9	1.12	4.8	100			5.75,5.75		
	1.0	1.00	5.4	100			5.0,5.0		
	1.1	0.91	5.95	100			4.75,4.75		
	1.2	0.83	6.5	100			4.5,4.5		
								0.98	0.82

caja	Cf	1/Cf	Al	AF	Pm	Tb	d	r	PE
6**				10	7.4	3700			
	0.63	1.59	1.0	100			-		
	0.68	1.46	2.3	100			6.75		
	0.74	1.35	2.7	100			6.0		
	0.82	1.21	3.0	100			5.5		
	0.92	1.09	3.35	100			5.0		
								0.99	0.76
<p><u>Sensibilidad promedio:</u> para cajas nuevas: S= 0.70 UI/ml  para cajas ya utilizadas : S= 0.79 UI/ml  general: S= 0.75UI/ml</p>									

Análisis de resultados: Los resultados obtenidos (Tabla 9) indican que las cajas que ya habían sido utilizadas presentan una sensibilidad algo inferior a las cajas nuevas y que el promedio de las sensibilidades observadas en el lote analizado es de 0.75 UI/ml,

Se puede observar en que medida un cambio en la sensibilidad de un reactivo lleva a obtener resultados erróneos. Por ejemplo si pensamos tener una sensibilidad de 1 UI/ml y que en realidad la sensibilidad es de 1.2 UI/ml corremos el riesgo de obtener un resultado falso negativo al probar una muestra cuyo contenido sea de 5000 UI/frasco. Si se realiza una dilución de un factor 5000 con una sensibilidad de 1.2, se prueba en realidad 6000 Unidades de hormona (5000 x 1.2) y no 5000 (5000 x 1.0) y el resultado será negativo ya que nuestra muestra no contiene 6000 UI. Por otra parte existe el riesgo de un resultado falso positivo si la sensibilidad real es inferior a la que uno considera en sus cálculos. Buscando 5000 UI con un estuche cuya sensibilidad real sea de 0.8 UI/ml en vez de 1.0 UI/ml, se prueban en realidad 4000 Unidades (5000 x 0.8) y es probable que el resultado sea positivo porque se investigaron 4000 unidades y no 5000 UI.

### 3.3.2 Determinación de la interferencia por parte de excipientes y diluyentes

Para determinar si existe una interferencia por parte de excipientes, se añadió cada excipiente, tanto por separado como juntos, a una cantidad determinada de materia prima de HCG en la misma relación a la existente en el producto terminado, y se relacionó con la valoración de la materia prima sola. Se trabajó con un mismo lote de reactivo UCG Titration Set, cuya sensibilidad de 0.75 UI/ml había sido determinada como se indica en el inciso 3.3.1. Los resultados aparecen a continuación en la tabla 10.

También se determinó la influencia de un diluyente sobre el resultado del análisis. En este caso el diluyente es un buffer de fosfato-albúmina de pH 7.2, mismo que se utiliza en el método de valoración de la HCG en la Farmacopea Europea; además este tipo de diluyente con albúmina se encuentra en muchas pruebas que aparecen en la literatura científica relacionada con estudios de la hormona. También se usa un tipo de diluyente semejante en inmunoensayos para uso clínico (RIA, ELISA) sin embargo, viene en cantidades tan pequeñas que no alcanzan para diluir las concentraciones tan elevadas que se manejan en la industria farmacéutica.

Se realiza esta prueba pensando también que utilizando el mismo diluyente tanto en la valoración inmunológica como en la valoración biológica se puede conseguir una mejor correlación entre método biológico e inmunológico.

#### **Análisis de resultados:**

Los resultados obtenidos demuestran que existe interferencia por parte de los excipientes en la valoración inmunológica de la Gonadotropina Coriónica Humana con el "UCG Titration Set". Por lo tanto se establece que al valorar un producto terminado, es necesario añadir una solución de excipientes al estándar de referencia.

En cuanto al diluyente buffer fosfato-albúmina pH 7.2, se constata igualmente que interfiere en la valoración inmunológica de la HCG en una proporción que se acerca a un 10%. Por lo tanto se descarta el uso de este diluyente para la realización de las pruebas aún sabiendo que esta solución contribuye a una estabilidad de la hormona en solución mayor que la que proporciona la solución salina isotónica.

Sin embargo, sería interesante analizar posteriormente, interferencia de parte de la albúmina en caso de diluir con SSI, una solución inicial de HCG diluida en buffer fosfato albúmina (5mg en 10 ml).

**TABLA 10.** Determinación de la interferencia por parte de excipientes y diluentes. Se hicieron las determinaciones por duplicado (A y B). Entre paréntesis, aparece (n / r) es decir "n" el número de puntos utilizados para calcular la recta de regresión y "r" el coeficiente de regresión lineal.

Substancia analizada	Resultado en % del título biológico		Promedio X	% relativo a la materia prima sola
	A	B		
Materia prima( HCG)	107% (5/ 0.97)	99% (4/ 0.99)	103%	
HCG + excipientes I + II	114% (5/ 0.96)	103% (5/ 0.81)	108%	105%
HCG + excipiente II	112% (5/ 0.86)	108% (5/0.93)	110%	107%
HCG + excipientes I + III	122% (5/ 0.90)	114% (4/ 0.52)	122%	118%
HCG + excipiente I	115% (5/ 0.81)	105% ( 5/ 0.96)	110%	107%
HCG + timerosal (concentración final 0.002%*)	103% (5/ 0.94)	107% (5/ 0.96)	105%	102%
HCG en buffer fosfato albúmina pH 7.2	113% (5/ 0.96)	109% (4/ 0.85)	111%	108%

**NOTA:** \* cantidad de timerosal que se añade a las alícuotas de hormona diluidas en buffer fosfato-albúmina pH 7.2, a fin de conservar la solución que se inyecta durante 4 días seguidos en ratas, según el método de valoración de la Farmacopea Europea.

### 3.3.3 Determinación de la estabilidad del reactivo

Para una valoración cuantitativa de la hormona es necesario conocer con exactitud la sensibilidad del reactivo y su estabilidad en cuanto a esta sensibilidad.

A continuación se describen dos pruebas:

**Prueba I:** Con la finalidad de determinar si existe un cambio de la sensibilidad del reactivo después de haber utilizado en varias ocasiones un mismo estuche, se determina la sensibilidad inicial (i) del estuche y una sensibilidad final (f) después de haber sometido los reactivos del estuche a una simulación de uso durante 7 días que consiste en sacar el estuche a temperatura ambiente durante 30 minutos y agitar la solución de eritrocitos para suspenderla. La prueba se realiza por duplicado (A y B)

**Tabla 11a. RESULTADOS:** Determinación de la estabilidad del reactivo ( 7 días ).

DIA	Cf	1/Cf	AI	AF	Pm	Tb	d	r	PE	
Ai 1				10	5.01	3700				
			1.0	100						
	0.9	1.11	4.85	100					5.5	
	1.0	1.00	5.4	100					5.5	
	1.1	0.91	5.95	100					4.5	
	1.2	0.83	6.5	100					4.5	
	1.3	0.76	7.05	100					4.75	
	1.4	0.71	7.55	100					4.25	
							0.86	0.79		
Af 7				10	7.4	3700				
			1.0	100						
	0.7	1.43	2.55	100					-	
	0.8	1.26	2.9	100					7.5	
	0.9	1.11	3.3	100					-	
	1.0	1.00	3.65	100					5.25	
	1.1	0.91	4.0	100					5.75	
							0.89	0.97		

**RESULTADOS**

DIA	Cf	1/Cf	Al	AF	Pm	Tb	d	r	PE
Bi	1			10	5.01	3700			
	0.6	1.66	3.25	100			7.25		
	0.7	1.42	3.8	100			6.0		
	0.8	1.24	4.35	100			5.375		
	0.9	1.12	4.8	100			5.5		
	1.0	1.00	5.4	100			4.75		
	1.1	0.91	5.95	100			4.5		
								0.97	0.74
Bf	7			10	5.02	3700			
	0.7	1.42	3.8	100			5.5		
	0.8	1.24	4.35	100			5.625		
	0.9	1.12	4.8	100			5.0		
	1.0	1.00	5.4	100			4.5		
	1.1	0.90	5.95	100			4.25		
								0.92	0.66

**Prueba II:** A fin de determinar la estabilidad del reactivo almacenado en refrigeración, se determina una sensibilidad inicial y una sensibilidad final después de tres meses de almacenaje sobre estuches del mismo número de lote.

**Tabla 11b. RESULTADOS:** Determinación de la estabilidad del reactivo (90 días)

DIA	Cf	1/Cf	Al	AF	Pm	Tb	d	r	PE
Ai 1				10	5.01	3700			
			1.0	100					
	0.7	1.42	2.7	100			5.75		
	0.8	1.24	3.25	100			5.5		
	0.9	1.13	3.8	100			4.875		
	1.0	1.00	4.35	100			4.625		
	1.1	0.91	4.9	100			4.5		
	1.2	0.83	5.4	100			(4.5)		
								0.97	0.67
Af 90				10	5.01	3700			
			1.0	100					
	0.5	2.00	2.7	100			-		
	0.6	1.66	3.25	100			-		
	0.7	1.42	3.8	100			-		
	0.8	1.24	4.35	100					
	0.9	1.12	4.9	100			7.625		
	1.0	1.00	5.4	100			4.625		
								(1)	0.95
Bi 1				10	5.01	3700			
			1.0	100					
	0.7	1.42	3.8	100			5.875		
	0.8	1.24	4.35	100			4.75		
	0.9	1.12	4.9	100			5.25		
	1.0	1.00	5.4	100			4.75		
	1.1	0.90		100			4.5		
	1.2	0.83		100			4.25		
								0.88	0.64

DIA	Cf	1/Cf	Al	AF	Pm	Tb	d	r	PE
Bf 90				10	5.01	3700			
	0.5	2.00	1.0	100					
	0.6	1.66	2.7	100			-		
	0.7	1.42	3.25	100			-		
	0.8	1.24	3.8	100			-		
	0.9	1.10	4.35	100			7.75		
	1.0	1.00	4.9	100			4.75		
			5.4	100			4.5		
								0.94	0.88

### **ANÁLISIS DE RESULTADOS:**

Prueba I; Existe una variación muy significativa de la sensibilidad del reactivo, ya que todas las pruebas fueron realizadas con el mismo lote de reactivo y el mismo estándar de referencia. En un caso encontramos una baja muy grande de la sensibilidad (23%) y en el otro caso un aumento (11%). Sin embargo, al analizar la prueba II aparece más bien una tendencia a la baja de la sensibilidad con el tiempo (Tabla 11a).

Prueba II: Después de almacenar los reactivos 3 meses en refrigeración, se constata una disminución muy significativa de la sensibilidad (37-42%). Por lo tanto, no se puede pensar en calibrar varias cajas de un mismo lote de reactivo y considerar esta calibración válida para un tiempo prolongado (Tabla 11b)

Como consecuencia del comportamiento de los reactivos observado en estas dos pruebas, es necesario determinar siempre la sensibilidad del reactivo con un estándar de referencia, justo antes de realizar la valoración de una muestra.

#### **3.3.4 Determinación de la estabilidad de la materia prima en solución salina isotónica (SSI)**

Se determina el título de una materia prima por duplicado (A y B), diluida en solución salina isotónica, y de las concentraciones finales a analizar cercanas a la sensibilidad del reactivo. El Lote de reactivo UCG-Titration-Set tiene una sensibilidad de 0.75 UI/ml.

Se conservaron las muestras en refrigeración (R), es decir a una temperatura de 5 a 8 grados centígrados y también en congelación a una temperatura de -30 grados centígrados. Los resultados aparecen en la tabla 12.

**TABLA 12.- : ESTABILIDAD DE MATERIA PRIMA DE HCG EN SSI****a) Estabilidad de una solución diluida de HCG de concentración final cercana a 1 UI/ml (Resultado en porciento del título inicial)**

	3 hrs	5 hrs	24 hrs	48 hrs	8 días	15 días	
	R	R	R C	R C	C	C	
A)	83% (5/0.84)	83% (5/0.9)	< 51% *	< 44% *	43% (2/1)	39% (2/1)	44% *
B)	89% (4/0.99)	99% (4/0.96)	54% (3/0.99)	<40%	<40%	<40%	
$\bar{X}$ :	86%	91%	≤54%	< 50%	< 50%	<50%	<50%

**b) Estabilidad de una solución concentrada de HCG de 1850 UI/ml en SSI**

	2 días	15 días	22 días	60 días	90 días	
	R C	C	R C	R C	R C	
A)	104% 112% (4/0.99)(4/0.98)	87% (3/0.99)	108% 99% (4/0.95) (3/0.90)	<90% *	<70% *	<74% 78% * (3/0.98)
B)	118% 105% (5/0.91)(5/0.87)	98% (5/0.89)	106% 96% (4/0.87) (3/0.65)		92% (2/1)	122% 84% (3/0.98)(4/0.95)
$\bar{X}$ :	111% 108%	92%	107% 97%		81%	

**c) Estabilidad de una solución de HCG con excipientes en SSI (concentración final de 2738 UI/ml)**

	60 días
	R
A)	90% (0.99)
B)	99% (0.98)
$\bar{X}$ :	94%

Nota: entre paréntesis aparece (n / r) es decir el número de puntos "n" para determinar la regresión lineal y el "r" el coeficiente de regresión lineal.

\*Estimación. R (refrigeración) C (congelación)

### ANALISIS DE RESULTADOS

La materia prima de HCG en solución salina isotónica, no se conserva ni 3 horas estando diluida a una concentración cercana a 1 UI / ml, después de 24 horas ya la concentración es inferior al 50% (tabla 12, fig. 12). Sin embargo una solución concentrada de HCG de unos 1850 UI/ml se conserva mucho mejor como lo podemos apreciar en la curva de las Figuras 14 y 15 y tabla 12, ya que a los 15 días la solución conserva un 90% de su título inicial.

En cuanto a la temperatura más adecuada para la conservación de las soluciones, la precisión de las pruebas y el número de ensayos, no permiten pronunciarse aún sobre esta cuestión, aunque las curvas que aparecen en las Figuras 14 y 15 muestran una pendiente ligeramente más pronunciada en el caso de la conservación en refrigeración, es decir que la congelación ofrece mayor estabilidad que la refrigeración.

La solución de hormona con excipientes ( concentración de 2738 UI/ml) conserva el 94% de su título después de estar almacenada durante 60 días en refrigeración. Este dato revela que la estabilidad de la hormona en solución salina isotónica a concentración alta es buena y que tanto las soluciones utilizadas en la producción de los productos terminados como las soluciones ya reconstituidas antes de ser inyectadas al paciente son estables por mucho tiempo, siempre y cuando se diluyan en una solución estéril y se conserven en refrigeración.

#### 3.3.5 Determinación de la estabilidad de materia prima de HCG a concentración cercana a 1 UI/ml, diluida con excipientes, diluida en SSI y en buffer fosfato albúmina.

Se hacen a continuación tres determinaciones:

- a) Estabilidad de la materia prima con excipientes a una concentración final cercana a 1 UI/ml.
- b) Estabilidad de la materia prima a una concentración final cercana a 1 UI/ml adicionada con timerosal a concentración de 0.002% ( concentración de timerosal indicada por la Farmacopea Europea para la conservación de las muestras que se van a inyectar durante 4 días seguidos en ratas para la valoración biológica de la hormona).
- c) Estabilidad de la materia prima de HCG diluida con buffer fosfato-albúmina pH 7.2

**TABLA 13. RESULTADOS** (en porciento del título inicial)

Solución analizada	1 día		8 días	16 días	60 días	90 días
	R	C	C	C	C	C
<b>HCG+excipiente I+II</b>						
A)	<80%	<80%	<72%			
B)	<80%	<80%	<80%			
	(n=1)					
<b>HCG+timerosal(0.002%)</b>						
A)	<88%	<88%				
B)	77%	<77%	<77%			
	(2/1)					
<b>HCG diluida en buffer fosfato-albúmina pH 7.2</b>						
A)	102%	107%	101%	106%	99%	100%
	(4/0.90)(5/0.84)		(4/0.98)	(5/0.87)	(3/0.99)	(5/0.92)

**Análisis de resultados**

Esta prueba revela que la sola presencia de un conservador como el timerosal o bien la presencia de los excipientes presentes en el producto terminado no son los factores que evitan la degradación de la hormona en solución a una concentración cercana a 1 UI/ml.

Por otra parte se constata que el buffer fosfato-albúmina pH 7.2, sí permite una gran estabilidad de la hormona en solución hasta unos 3 meses y a una concentración baja cercana a 1 UI/ml (Tabla 13, figura 13).

**3.3.6 Estabilidad de una solución de HCG con excipientes de formulación y concentración igual a la solución envasada y liofilizada para producto terminado (2700 UI/ml)**

La determinación de la estabilidad de una solución de HCG con excipientes de 2700 UI/ml se realizó a temperatura ambiente con los matraces protegidos de la luz con papel de aluminio y debidamente tapados. Las pruebas se realizaron por duplicado (A y B) y los resultados aparecen en la tabla 14.

**TABLA 14.** Estabilidad de la solución de HCG reconstituida para inyección.

Prueba	%P	Ta	Al	AF	Pm	d	PE	% del título inicial
<b>A inicial</b>								
			1.0	100	7.4			
	119	4406	2.3	100		6.5		
	110	4054	2.5	100		6.25		
	101	3754	2.7	100		5.75		
	91	3378	3.0	100		5.0		
	81	3025	3.35	100		5.0		
							107%	
							(5/0.97)	
<b>A 5 horas</b>								
			1.0	500	7.4			
	101	3754	1.3	10		5.0		
	91	3378	1.	10		5.0		
	81	3016	1.7	10		4.75		
	73	2695	1.9	10		4.5		
							151%	141%
							(4/0.93)	
<b>B inicial</b>								
			1.0	100	7.4			
	119	4406	2.3	100		-		
	110	4054	2.5	100		6.75		
	101	3754	2.7	100		6.0		
	91	3378	3.0	100		5.5		
	81	3025	3.35	100		5.0		
							99%	
							(4/0.99)	
<b>B 5 horas</b>								
			1.0	500	7.4			
	119	4406	1.15	10		6.25		
	110	4054	1.25	10		5.875		
	101	3754	1.35	10		5.75		
	91	3378	1.5	10		6.0		
	82	3016	1.70	10		4.875	108%	110%
							(4/0.79)	

### Análisis de resultados

Con esta prueba se pretende demostrar la estabilidad de la hormona en solución a una concentración alta de 2700 UI/ml. Sin embargo, los resultados revelan que después de 5 horas el título de la hormona es mayor que el título obtenido en la valoración inicial ( tabla 14 ). Esto sugiere por lo tanto que no se haya disuelto bien la materia prima de HCG en la valoración inicial. En consecuencia es necesario en el futuro esperar por lo menos 15 minutos antes de tomar la alícuota para hacer las diluciones correspondientes de la prueba de valoración, para que la hormona tenga tiempo de disolverse totalmente y proceder a una agitación suave pero eficaz.

Otra explicación de este resultado puede ser en parte la falta de exactitud que representa trabajar con una sensibilidad promedio de un lote de reactivo en vez de determinar la sensibilidad del reactivo justo antes de analizar la muestra.

### 3.3.7 CONCLUSION

Las conclusiones en cuanto a la estabilidad del reactivo UCG Titration set y de la Hormona HCG en solución son las siguientes:

- 1) La indicación de la sensibilidad del reactivo por parte del proveedor no es suficiente para la valoración cuantitativa de la HCG. Como sensibilidad promedio de un lote en particular se encontró 0.75 UI/ml ( en el caso de HCG diluida en SSI y no en orina como lo especifica el fabricante). El uso de una sensibilidad de 1 UI/ml en los cálculos, la indicada por el proveedor, conlleva a un error en la cuantificación de HCG. Este hecho explica en parte los resultados variables obtenidos en la valoración de diferentes materias primas y productos terminados.
- 2) Existe una interferencia por parte de los excipientes presentes en un producto terminado en la cuantificación de HCG de tal manera que el título se ve un poco sobrevaluado por su presencia. Por tal razón se establece que es necesario añadir una solución de excipientes al estándar de referencia que se usa para determinar la sensibilidad del reactivo, esto antes de una valoración de producto terminado. La interferencia observada varió de 5% a 18%.
- 3) El buffer fosfato-albúmina pH 7.2 como diluyente de la hormona, interfiere también en la valoración inmunológica de HCG por inhibición de hemaglutinación, aumentando el valor del título aproximadamente en 10%. Por tal razón, no se recomienda utilizarlo como diluyente final en la valoración inmunológica, a pesar de que las pruebas de estabilidad revelan que la HCG diluida en este buffer conserva su actividad durante por lo menos tres meses, aún a concentración baja cercana a 1 UI/ml. Hay que comentar además, que el uso de este diluyente no es muy práctico ya que constituye una solución viscosa que hace fácilmente burbujas y que puede inducir a errores en la toma de alícuotas además de que el

empleo de la albúmina en la industria farmacéutica no es común, su caducidad es relativamente corta y requiere refrigeración.

4) Las pruebas de estabilidad del reactivo UCG Titration Set revelan que el uso de una misma caja de reactivo después de varias pruebas altera la sensibilidad del reactivo. El almacenamiento de un mismo lote de reactivo en refrigeración durante 3 meses sin manejo ninguno indica igualmente una baja muy significativa de la sensibilidad. Como consecuencia se vuelve a mencionar la necesidad de determinar la sensibilidad del reactivo con una sustancia de referencia antes de cada valoración, se trabaje o no con un mismo número de lote de reactivo o con una caja nueva o ya anteriormente usada.

5) Las soluciones de HCG en solución salina isotónica no se pueden conservar si la concentración es muy baja (cerca a 1 UI/ml) ni 3 horas (ver fig 12). Se deben desechar y si es necesario volver a hacer la prueba se debe de hacer otra vez una nueva solución.

Las soluciones más concentradas, de alrededor de 1850 UI / ml, ( 5 mg de materia prima diluidas en 10 ml), son más estables que las de baja concentración siempre y cuando la solución salina isotónica sea estéril y se trabaje de una manera aséptica. Según se observa en la gráfica de la figura 11, existe sin embargo, una baja del título desde las primeras horas aunque se constata que la pendiente está menos grande que en la gráfica de figura 12 con hormona muy diluida. Convendría por lo tanto realizar un análisis adicional determinando el título con un número de datos mayores en una escala de tiempo más reducida, hasta 8 días como máximo. De esta manera se puede determinar si una solución concentrada puede ser utilizada a las 3 horas, al día siguiente o a la semana siguiente de una prueba que haya dado un resultado dudoso ( esta prueba corresponde a la prueba de estabilidad presentada en el inciso 5.1.2. del plan de validación).

6) La presencia de excipientes o de timerosal al 0.002% no evita la degradación de la hormona cuando la concentración es cerca a 1 UI/ml. Sin embargo una solución de HCG con excipientes a una concentración final de alrededor de 2700 UI/ml es estable durante mucho tiempo (94% a los 60 días).

7) Al hacer la valoración de una materia prima, es absolutamente necesario dejar reposar la primera solución obtenida por la disolución del polvo de HCG en el diluyente durante 15 minutos hasta una hora en un lugar fresco y protegido de la luz, ya que la hormona se tarda en humectarse y disolverse, problema que no existe cuando el polvo es liofilizado. También es importante observar las paredes del matraz en el cual se realiza la dilución a fin de que toda la hormona se disuelva y no quede adherida a las paredes.

# ESTABILIDAD DE HCG EN SOLUCION

%DE CONCENTRACION INICIAL

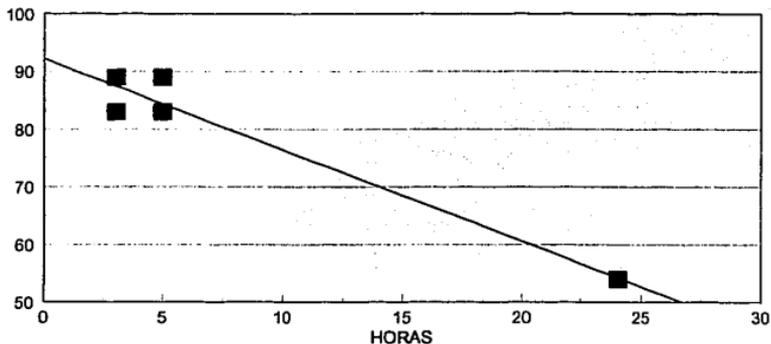


FIG 12.- ESTABILIDAD DE UNA SOLUCION DILUIDA DE HCG ( 1UI / ml ) EN SSI CONSERVACION EN REFRIGERACION

%DE CONCENTRACION INICIAL

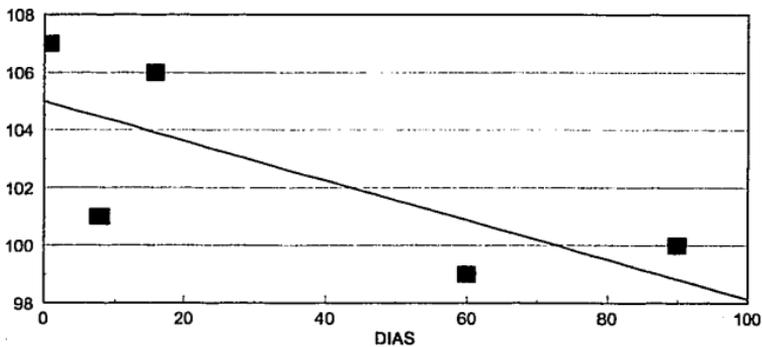


FIG 13 ESTABILIDAD DE UNA SOLUCION DILUIDA DE HCG ( 1 UI / ML ) EN BUFFER FOSFATO ALBUMINA PH 7.2 CONSERVACION EN CONGELACION -30° C

# ESTABILIDAD DE HCG EN SOLUCION

%DE CONCENTRACION INICIAL

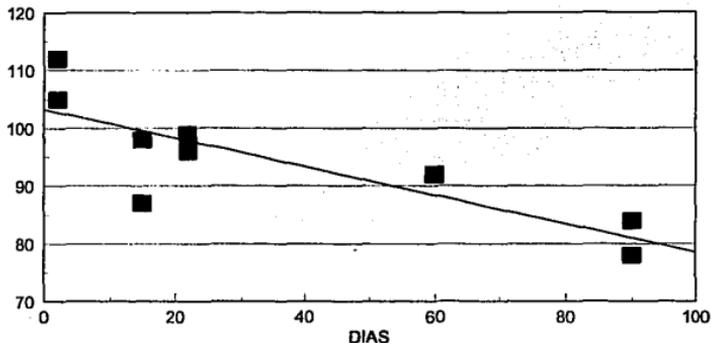


FIG 14.- ESTABILIDAD DE UNA SOLUCION CONCENTRADA DE HCG ( 1850 UI / ml ) EN SSI CONSERVACION EN CONGELACION 30° C

%DE LA CONCENTRACION INICIAL

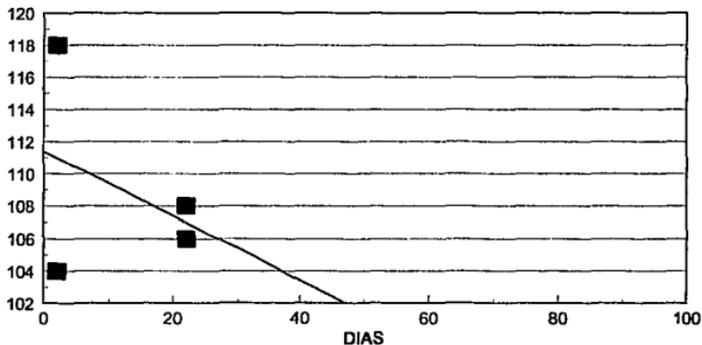


FIG 15.- ESTABILIDAD DE UNA SOLUCION CONCENTRADA DE HCG ( 1859 UI / ml ) EN SSI CONSERVACION EN REFRIGERACION 5° C

### 3.4 SELECCION DEL INMUNOENSAYO MAS APROPIADO PARA LA VALORACION DE HCG EN UN MEDICAMENTO Y LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO CORRESPONDIENTE

#### 3.4.1 Criterios para la selección de un inmunoensayo

El objetivo del análisis de varios inmunoensayos para la cuantificación de gonadotropina coriónica humana (HCG) es la selección del reactivo cuyos resultados presenten la mejor correlación con los resultados obtenidos por valoración biológica.

En términos de validación, hablamos del concepto de exactitud, siendo el valor verdadero o de referencia, el resultado de la valoración biológica.

Los reactivos fueron previamente seleccionados por su capacidad para medir la HCG intacta. Además todos los ensayos se realizan tomando el mismo estándar como referencia, es decir el estándar de referencia de laboratorio que fue calibrado contra el Segundo Estándar Internacional de la OMS: 2nd IS 1963 WHO y cuyo título biológico es de 2915 UI / mg.

Por razones de costo, se analizan solamente por duplicado las muestras siguientes: tres materias primas, tres productos terminados nacionales y dos productos terminados extranjeros. Con tan pocos resultados, es difícil llevar a cabo un análisis estadístico completo por lo que nos limitaremos a calcular para cada reactivo la media de los resultados, expresados en por ciento del título biológico, y el coeficiente de variación correspondiente. El criterio de selección del mejor reactivo es por lo tanto una media más cercana al 100% junto con un coeficiente de variación bajo.

#### 3.4.2 METODO

Los métodos empleados para la valoración de HCG (materia prima y producto terminado) por varios inmunoensayos, corresponden, a excepción del "UCG TITRATION SET, a los procedimientos presentados en los instructivos de uso de cada reactivo, con las modificaciones que aparecen a continuación:

#### NEO-PREGNOSTICON 75 DUOCLON

Se determina la sensibilidad del lote de reactivo con el estándar de laboratorio. Para la determinación del punto crítico, se calcula el promedio entre el título que presenta la imagen número "3" y el título que presenta la imagen número "4".

UCG-TITRATION-SET

El método que se utiliza para estas valoraciones, se describe en el capítulo IV, el cual corresponde al método cuantitativo desarrollado en este trabajo, con la diferencia de que en esta etapa del trabajo aún no se consideraban los criterios de aceptabilidad que aparecen en el "Procedimiento de Titulación" para juzgar la validez de los resultados, sino que solamente se empleaba una interpolación sobre la recta de regresión para determinar el punto de equivalencia de la prueba.

TANDEM-E-HCG, IRMA COAT-A-COUNT, DELFIA-TR-HCG

Los cálculos de los resultados se efectúan a partir de las fórmulas siguientes:

$$\text{Resultado en } \frac{\text{UI}}{\text{mg}} = \frac{\text{I} \times \text{FD}}{\text{Pm} \times 1000}$$

$$\text{Resultado en } \frac{\text{UI}}{\text{frasco}} = \frac{\text{I} \times \text{FD} \times \text{PP}}{\text{Pm} \times 1000}$$

Donde: I : resultado obtenido por interpolación a partir del estándar de referencia del reactivo

FD: factor de dilución en ml

PP: peso promedio en mg

Pm: peso de la muestra mg

TANDEM-E-HCG

Se realizan las pruebas según dos procedimientos diferentes:

- 1) Incubación en baño María (90 minutos) (Laboratorio Roussel)
- 2) Agitación a 170 rpm ( 30 minutos) (Hospital Juárez)

Además para todos los ensayos, se cuidan los aspectos siguientes:

1.- Precisión en la realización de diluciones: Siempre se usa material de vidrio aforado (pipetas, bureta, matraces) y calibrado. Solamente la toma de muestra final se realiza con pipeta automática, también calibrada, pero cuya precisión es menor a la de una pipeta volumétrica.

2.- Estabilidad de la muestra: Las muestras se diluyen en SSI, a excepción de la última dilución que se realiza en el diluyente propio de cada reactivo. Por lo tanto, una vez hecha la dilución, se procede inmediatamente a realizar el análisis.

3.- Uso de solución salina isotónica estéril: Ya que el número de diluciones a realizar es grande ( análisis simultáneo de 6 muestras y un estándar en pruebas de RIA, IRMA, ELISA y IFMA), se requiere mucho tiempo para ello, por lo tanto se rotula el material necesariamente con anticipación y se trabaja con solución salina isotónica estéril para evitar una posible degradación de la hormona (proteasas).

4.- Uso del mismo estándar para cada reactivo: A fin de poder comparar los resultados de los diferentes inmunoensayos, se utiliza el mismo estándar de referencia. Para pruebas de IRMA, ELISA y IFMA, se corre el estándar a dos niveles de concentración, cada uno por duplicado.

5.- Adición de solución de excipientes al estándar para valorar producto terminado:

Se adicionan excipientes al estándar de tal manera que queden en la misma proporción con la HCG que en el producto terminado.

### 3.4.3 RESULTADOS

La tabla 15 presenta los resultados obtenidos en porciento de la actividad biológica, en términos del estándar de laboratorio.

La tabla 15 presenta los resultados obtenidos en porciento de la actividad biológica, en términos del estándar de referencia de cada reactivo.

Se analizaron por duplicado tres materias primas, tres productos terminados nacionales, y dos productos terminados extranjeros, con los reactivos: " Neo Pregnosticon " en tubo, " UCG-Titration-Set " en tubo, " Delfia TR-HCG ", " Coat-a-count IRMA HCG ", " Tandem-E HCG " y " Total-beta-HCG-Imx ".

Tabla 15a VALORACION DE MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS TERMINADOS CON DIFERENTES INMUNOENSAYOS

(Resultado en porcentaje de la actividad biologica en terminos del estandar de referencia de laboratorio calibrado contra el 2nd IS 1963 WHO (pruebas por duplicado))

RESULTADOS													
REACTIVO	FABRICANTE	LUGAR DE ANALISIS	MATERIA PRIMA			P.T. Nacional			P.T. extranjero			MEDIA CV	
			A	B	C	X	Y	Z	M	N			
UCG	CARTER	LABOR.	*101		*103	*92	*81	*75				92	15
TITRATION	WALLACE	ROUSSEL	*82		*112								
NEO-PREGNOSTI-CON 75	ORGANON	LABOR. ROUSSEL	*99	*104	*108	*595	*(93)	*284				105	6
DELTA TR HCG	PHARMACIA NACIONAL DE LA NUTRICION	INSTITUTO	86	78	92	88	67	78	60	85		79	14
COAT-a-COURT	DIAGNOSTIC PRODUCTS	AGN Y CIADOS	150	151	*156	92	43	55	70	91		101	45
IRMA HCG	CORPORA-TION	HOSPITAL ANGELES	1999	68	90	97	73	91		*157		96	30
TANDEM-E HCG	HVERITECH	1)HOSPITAL JUAREZ 2)HOSPITAL	2)188		2)188	107	68	112				119	42
TOTAL	ABBOTT	AGN.HOSP. ANGELES			*152	*77	*96	*94				105	31
BETA-HCG	IMX												
promedio:		de variacion	105	102	123	94	68	84	65	102		[100	12]
Coefficiente			23	34	30	10	23	24	9	30			
MEDIO GENERAL:			110±**			82±**			81±				
*prueba sencilla, ( estimacion			MATERIA PRIMA			P.T. NACIONAL			P.T. EXTRANJERO				
**ver comentarios p 86													



#### 3.4.4 ANALISIS DE RESULTADOS

A continuación se analizan los resultados obtenidos con diferentes inmunoensayos ( tabla 15 ) con el fin de seleccionar el mejor reactivo para valoración de HCG en un medicamento . Las ventajas y desventajas de cada reactivo se resumen en la tabla 16.

- El reactivo Neo-Pregnosticon 75 Duoclon con una media de resultados de 105% y un coeficiente de variación de 6% sobresale como el mejor reactivo de acuerdo a los criterios de selección preestablecidos. Este reactivo por estar constituido con anticuerpos monoclonales tanto contra la subunidad beta, como contra el punto de unión de las cadenas alfa y beta valora hormona HCG intacta de manera muy específica y por lo tanto esperabamos conseguir con él una buena correlación con el valor biológico, hecho que fue confirmado con las pocas pruebas que se pudieron llevar a cabo. Desgraciadamente las características de los últimos lotes no permitieron una valoración adecuada, la medición esta realmente imposibilitada por un fenómeno de desplome de los eritrocitos y ruptura de la malla. Se contactó al proveedor sobre nuestro problema, especificando además que la sensibilidad real del reactivo determinada en nuestro laboratorio no correspondía de manera exacta a la que se indicaba en el estuche ya que se encontró una sensibilidad de aproximadamente 350UI/ml en vez de 75UI/ml. Como resultado de esta consulta se puede concluir que el proveedor aceptó la existencia de este desplome con base en pruebas adicionales realizadas en su laboratorio, y subrayó el hecho de que este reactivo utiliza anticuerpos monoclonales y está destinado a pruebas de embarazo en orina, por lo que no se puede asegurar su buen funcionamiento con hormona diluida en una solución que no fuera orina como es una SSI y que en estas condiciones también puede variar la sensibilidad del reactivo.

-El reactivo Tandem-E-HCG con una media de 96% y 119%, y un coeficiente de variación de 30% y 42%, ( según el método de incubación en baño María o con agitación ) se aleja mucho de los criterios ideales. Este reactivo, por presentar un sistema de anticuerpos dirigidos contra la subunidad alfa y beta permite en teoría detectar de manera muy específica HCG intacta. Además es un reactivo cuantitativo que fácilmente puede utilizarse en un laboratorio de control de calidad de la industria farmacéutica. Desgraciadamente los resultados obtenidos hasta el día de hoy no lo hacen elegible sobre todo por su coeficiente de variación muy elevado. Quizás exista una posibilidad de normalizar más el ensayo a fin de reducir este alto coeficiente de variación. Sin embargo, como sucede con otros reactivos debido a que su uso sería distinto al que se destina comercialmente sería difícil solicitar apoyos adicionales al fabricante.

- El reactivo UCG-Titration Set presenta un coeficiente de variación relativamente bajo (15%) y una media de 92%. Estas características lo hacen un reactivo elegible. Este reactivo es comercializado para uso clínico y según el instructivo

del fabricante permite solamente una valoración semi-cuantitativa de la gonadotropina coriónica humana en un medicamento.

**SIN EMBARGO, EL PRESENTE TRABAJO DESCRIBE LAS MODIFICACIONES QUE PERMITEN HACER QUE ESTE REACTIVO FUNCIONE DE MANERA CUANTITATIVA MEDIANTE LA INTRODUCCION DE CINCO MODIFICACIONES PRINCIPALES:**

- 1) LA MEDICION DEL DIAMETRO DEL ANILLO DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACIÓN. (QUE NUNCA SE HABIA PROPUESTO ANTERIORMENTE) ( 57 ).**
- 2) EL ESTABLECIMIENTO DE UNA RELACIÓN LINEAL ENTRE EL DIÁMETRO DEL ANILLO Y LA INVERSA DE LA CONCENTRACION FINAL ANALIZADA.**
- 3) EL DESARROLLO DE FORMULAS PERMITIENDO TANTO PLANIFICAR LA PRUEBA COMO CALCULAR EL TITULO FINAL DE LA MUESTRA ANALIZADA.**
- 4) LA IMPLANTACION DEL USO DE MATERIAL PRECISO Y CALIBRADO (PIPETAS AUTOMATICAS Y MATERIAL DE VIDRIO).**
- 5) LA NORMALIZACION DE LA TECNICA EN CUANTO A ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR**

El 15% de coeficiente de variación conseguido( que todavía es posible mejorar ), es la resultante de un trabajo de normalización de la técnica y del desarrollo de un sistema de cuantificación de la hormona en un medicamento y en materia prima (ver método desarrollado). La base de este sistema de cuantificación radica en el establecimiento de una linealidad entre la inversa de la concentración de hormona y el diámetro del anillo de inhibición de hemaglutinación, según la relación siguiente:

$$d = a(S/Cf \times 100) + b$$

Donde: **d = diámetro del anillo en mm**

**S = sensibilidad del reactivo en UI/ml**

**Cf= concentración final de la HCG en solución en UI/ml**

Los anticuerpos del UCG-Titration Set son policlonales, por lo que teóricamente no permiten hacer una valoración muy específica de la hormona HCG intacta. Con el uso de un antisuero policlonal se corre el riesgo de tener interferencias por

parte de la hormona luteinizante LH o por parte de subunidades alfa-HCG o beta-HCG libres. Estas últimas, no son biológicamente activas por lo que su presencia aumentaría falsamente el título de la hormona analizada. Debido a esta situación, la única prueba del proceso de validación que sería difícil de comprobar con este reactivo sería la prueba de especificidad. Sin embargo, se sabe que en la orina de mujeres embarazadas, después de la quinta semana de gestación, la máxima cantidad de subunidad beta libre es de 5% en relación con la cantidad de HCG intacta (56). La interferencia es por lo tanto pequeña, pero se debe valorar.

Además el propósito de la valoración de HCG en los productos terminados de los productos terminados es el de comprobar el título de la hormona y no tanto su composición, que es avalada por la valoración biológica que aparece en el certificado de origen. Durante el transporte y durante el proceso de fabricación del medicamento solamente podría suceder una degradación ligera de la hormona, lo que bajaría su título, pero en ningún momento puede cambiar la composición de esta por introducción de otras sustancias tales como hormona LH o subunidades libres.

En cuanto a las otras pruebas del proceso de validación, los resultados obtenidos con el UCG-Titration Set permiten esperar resultados bastante satisfactorios (precisión, linealidad y exactitud). En pruebas preliminares, se constatan coeficientes de variación de aproximadamente 10% en la repetibilidad, coeficientes de regresión de 0.80 a 0.99 para la linealidad y un índice:

$$\left[ \frac{\text{Título inmunológico X 100}}{\text{Título biológico}} \right] \text{ de } 92\%. \text{ ( ver 3.5 )}$$

- El reactivo Delfia TR HCG presenta resultados con un coeficiente de variación de 14% y una media de 79%. A pesar de no haberse normalizado la técnica para valoración en un medicamento, este sistema presenta una repetibilidad relativamente buena. Los resultados sin embargo, son siempre inferiores al valor biológico. Aunque los aparatos de medición sean muy sofisticados para un laboratorio de control de calidad de la industria farmacéutica, el reactivo presenta la ventaja de ser cuantitativo y de no manejar radioisótopos. También existe con este reactivo una posibilidad de normalizar el ensayo a fin de bajar el coeficiente de variación y sobre todo de utilizar sustancias de referencia y rangos de concentraciones que permitan obtener una mayor exactitud del sistema.

-El reactivo Coat-A-Count IRMA HCG presenta resultados con un coeficiente de variación de 45% y una media de 101%. Es el reactivo que presenta mayor variación y definitivamente no puede ser elegido para nuestro propósito. Aunque su empleo en un laboratorio de control de calidad de la industria farmacéutica es casi imposible por ser muy aparatoso y manejar radioisótopos, se han realizado estas pruebas con la finalidad de comparar las ventajas ofrecidas por cada tipo de reactivo hoy existente en el mercado nacional. Los reactivos marcados con

radioisótopos han sido considerados en el área clínica por mucho tiempo, como los "mejores", es decir que fueron los primeros realmente cuantitativos y muy sensibles. Hoy en día fueron alcanzados por métodos menos peligrosos como los ensayos enzimáticos o fluorescentes. Por lo tanto no representan ninguna solución ideal para la medición de la HCG en medicamentos, ya que estos presentan concentraciones altas, por lo que no requieren de métodos muy sensibles, sino de métodos exactos, precisos y lineales.

\*\* Como comentario general se observa en las tablas 15a y 15b que los títulos inmunológicos obtenidos en productos terminados, se encuentran en los límites de las especificaciones del producto ( 80%-125% ). las posibles causas de esto, podrían ser las siguientes:

1) Estas determinaciones se realizaron con el propósito de seleccionar el reactivo que mejor respondiera a las necesidades de la industria farmacéutica, es decir principalmente un coeficiente de variación bajo y una buena correlación con el título biológico.

Sin embargo, aún no se dominaban de manera óptima todas las técnicas que habiendo sido diseñadas para uso clínico tendrían que ser normalizadas para uso farmacéutico.

2) y ya que se consideró como valor de referencia el título biológico, hay que señalar igualmente que las valoraciones biológicas determinadas en materias primas y en productos terminados, no fueron realizadas en los mismos laboratorios, de aquí pueden surgir diferencias en cuanto al título biológico obtenido. Tampoco los estándares utilizados en estos dos laboratorios fueron los mismos. (2nd IS para M. P. y 3rd IS 75/537 para P.T)

3) Los diferentes ensayos destinados a comparar valoraciones biológicas e inmunológicas que aparecen en la literatura científica, llegan a conclusiones muchas veces opuestas en relación con la obtención de títulos biológicos mayores o menores a los títulos inmunológicos.

En el presente estudio obtenemos, a partir de pruebas realizadas por duplicado, resultados de 110% para materias primas y 82% para productos terminados (relación del título inmunológico entre el título biológico) por lo que es necesario después de normalizar la técnica inmunológica seleccionada, realizar un número elevado de pruebas para poder comparar de manera estadística las valoraciones inmunológicas contra las valoraciones biológicas ( este trabajo se presenta en el plan de validación) solo así se podrá tomar la decisión final, en cuanto a la correlación entre la valoración biológica e inmunológica, tanto en materia prima como en producto terminado.

### 3.4.5 CONCLUSION

El reactivo seleccionado para la valoración de HCG en materia prima y producto farmacéutico terminado ha sido el UCG-Titración Set de Carter Wallace, en base a que se conjuntan los dos requisitos de un coeficiente de variación relativamente bajo en las pruebas efectuadas (15%) y un media de resultados de 92% ( tabla 15a ) en relación con la valoración biológica.

Cuando no se calibra el reactivo antes de cada uso, se obtienen resultados más elevados, con una media de 105% y un coeficiente de variación mayor, que resultó ser de 25% ( tabla 15b ), lo que confirma la necesidad de calibrar el reactivo antes de cada uso.

Para garantizar resultados satisfactorios , se debe de manejar el reactivo según el método cuantitativo desarrollado en el presente trabajo, es decir principalmente calibrar el reactivo en cada uso y llevar a cabo el sistema de medición del diámetro del anillo de inhibición de hemaglutinación para determinar el resultado del análisis por interpolación a partir de la regresión lineal calculada.

Con base en estos resultados,el método de cuantificación desarrollado con el reactivo UCG-Titration Set se seleccionó para llevar a cabo en un futuro próximo, su validación como método analítico de cuantificación de HCG en un medicamento.

La tabla 16 presenta las ventajas y desventajas de cada reactivo para la valoración de HCG en un medicamento. A partir de los elementos que ahí se presentan se puede escoger uno o dos reactivos alternos para esta valoración. Cualquiera que sea la elección, es necesario realizar un trabajo de normalización antes de poder utilizarlo con confiabilidad.

Finalmente, parece que el tipo de reactivo que puede cumplir con los requerimientos de la industria farmacéutica, después del de inhibición de hemaglutinación, es un ensayo tipo ELISA.

Conviene también mencionar, que en la literatura científica, se presenta un ensayo de tipo  fijación del complemento que da buena correlación con la valoración biológica, aunque parece que ya no se comercializa. ( 19 )

**TABLA 16: VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS REACTIVOS EVALUADOS PARA VALORAR HCG EN UN MEDICAMENTO**

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>UCG TITRATION SET (CARTER WALLACE) " REACTIVO SELECCIONADO "</b> Prueba en tubo con el principio de inhibición de hemaglutinación	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- No necesita inversión en equipo.</li> <li>2.- Da buena correlación con la valoración biológica.</li> <li>3.- Muy económico.</li> <li>4.- El método de cuantificación desarrollado ha sido normalizado.</li> <li>5.- Producto estable.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- La calidad de los eritrocitos varía en las ovejas según el momento de la recolección, lo que puede influir en la calidad de los lotes.</li> <li>2.- Uso comercial no cuantitativo.</li> <li>3.- Requiere hacer una serie de diluciones precisas (6 a 8) para tener una curva de calibración con el estándar y otra serie igual para la muestra.</li> <li>4.- Necesita el uso de un estándar de laboratorio para calibrar el reactivo de cada análisis.</li> <li>5.- Requiere de un lugar libre de toda vibración</li> </ol>
<b>TANDEM-E HCG ( ICN FARMACEUTICA PARA HYBRITECH )</b> Determinación cuantitativa por ensayo inmunoenzimático ( ELISA )	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Reactivo cuantitativo</li> <li>2.- Valora solamente HCG total por ser una prueba tipo sandwich.</li> <li>3.- Necesita relativamente poca inversión ( un agitador orbital y dos microceldas de 1 ó 2 ml, para el espectrofotómetro ).</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- La repetibilidad observada (CV 36%) y presentada en el instructivo (CV= 3.7%-9.3%) no es muy buena.</li> <li>2.- No da buena correlación con la valoración biológica.</li> <li>3.- No se ha analizado ni normalizado para uso farmacéutico.</li> <li>4.- Parece ser necesario el uso de un estándar de laboratorio, cuyo título sea semejante a la muestra de la hormona a analizar, ya que de esta manera existe una mejor correlación con la valoración biológica.</li> </ol>

**TABLA 16. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS REACTIVOS EVALUADOS PARA VALORAR HCG EN UN MEDICAMENTO**

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<u><b>DEL FIA HCG TR-FIA ( PHARMACIA )</b></u>	
<u>Determinación cuantitativa por ensayo inmunofluorométrico tipo sandwich</u>	
<u>Opción A: compra del analizador</u>	
1.- Reactivo cuantitativo 2.- Manejo no peligroso 3.- Sistema computarizado indica automáticamente el resultado. 4.- Da bastante buena correlación con la valoración biológica. aunque los resultados son siempre un poco inferiores a los títulos biológicos. 5.- Valora solamente HCG intacta. 6.- La repetibilidad es buena según el instructivo ( 4.6%-5.9% de CV ) y los resultados obtenidos.	1.- Costo muy elevado del analizador computarizado 2.- Aparente reacción cruzada con HCG subunidad alfa ( 1.9% ) y subunidad beta ( 2.4% ).
<u>Opción B: Dar las muestras a analizar a un Laboratorio de tercería.</u>	
1.- No requiere inversión en equipo. 2.- No existe merma en la utilización de reactivos poco estables.	1.- Uso adicional de un estándar de laboratorio. 2.- Se tiene que definir la responsabilidad ante las autoridades sanitarias. 3.- La precisión y la exactitud de las mediciones realizadas en un laboratorio clínico es menor a la que se requiere en un laboratorio farmacéutico, por lo que se tendría que normalizar todo el proceso de análisis.
<u><b>NEO PREGNOSTICON 75 DUOCLON ( ORGANON )</b></u>	
<u>Prueba en tubo con el principio de hemaglutinación inversa</u>	
1.- Manejo sencillo. 2.- No necesita inversión en equipo. 3.- buena correlación valoración biológica. 4.- valora HCG intacta solamente. 5.- Reactivo liofilizado, da estabilidad y homogeneidad al producto.	1.- Puede presentar problemas de ruptura de malla por desplome de eritrocitos lo que imposibilita la lectura del resultado. 2.- Uso comercial no cuantitativo 3.- Requiere hacer serie de diluciones ( 6 a 8 ) para el estándar y otra serie ( 6 a 8 ) para la muestra.

**TABLA 16. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS REACTIVOS EVALUADOS  
PARA VALORAR HCG EN UN MEDICAMENTO**

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
	<p>4.- Necesita el uso de un estándar de laboratorio para su calibración.</p> <p>5.- Requiere de un lugar libre de toda vibración.</p> <p>6.- La calibración del reactivo con HCG diluida en SSI da una sensibilidad diferente a la sensibilidad indicada en el estuche.</p> <p>7.- Relativamente costoso</p>
<b>COAT-A-COUNT HCG IRMA ( DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION)</b>	
<u>Ensayo cuantitativo inmunoradiométrico</u>	
<p>1.-Determinación automática de resultados.</p> <p>2.-Doble sistema de anticuerpos contra HCG, anticuerpos policlonales marcados con Iodo 125 y anticuerpos monoclonales en la fase sólida.</p>	<p>1.- No da buena correlación con la valoración biológica. Al parecer, la exactitud de sistema difiere según la concentración final ensayada</p> <p>2.- Sistema no validado según las normas de la industria farmacéutica.</p> <p>3.- Manejo peligroso por el uso de radioisótopos.</p> <p>4.- Analizador muy costoso</p> <p>5.- Requiere una capacitación especial del personal así como de una autorización gubernamental por manejo de sustancias radioactivas.</p> <p>6.- Caducidad corta(1 mes)</p> <p>7.- Posibilidad de dar las muestras a analizar a un laboratorio de tercería con el riesgo de delegar la responsabilidad del análisis.</p>

**TABLA 11. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS REACTIVOS EVALUADOS PARA VALORAR HCG EN UN MEDICAMENTO**

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>TOTAL BETA-HCG IMx ( ABBOTT)</b>	
<u>Nota : Tomar los resultados con reserva, ya que se efectuó el análisis solamente una vez. ( Principio enzimático )</u>	
1.- Parece dar resultados cercanos a los de la valoración biológica, aunque quizás ligeramente más altos. 2.- Sistema cuantitativo.	1.-La detección de la cadena beta ofrecida por este reactivo, no asegura una valoración de la hormona intacta total, siendo esta la única biológicamente activa, sino también de la subunidad beta libre. 2.- Requiere el uso adicional de un estándar de laboratorio 3.- Sistema no validado según norma industria farmacéutica. 4.- Analizador muy costoso 5.- Posibilidad de dar muestras a analizar a un laboratorio de tercería, con el riesgo de delegar la responsabilidad del análisis. 6.- Da resultados superiores a la valoración biológica, si la muestra contiene subunidad beta libre.

### 3.5 DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO PARA LA VALORACION DE HCG POR METODO DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION CON EL REACTIVO "UCG TITRATION SET"

#### 3.5.1 Calibración del gotero del estuche para medir la solución de eritrocitos

Se calibraron 8 goteros diferentes a razón de 5 determinaciones para cada uno ( ver tabla 17 ) mediante la pesada de sus contenidos en agua destilada. El promedio de todos lo resultados nos da un peso de 0.03303g a 23 grados centígrados, por lo que el volumen es de 0.03315 ml (48). Para la determinación cuantitativa de la hormona se establece la necesidad de usar una cantidad de 35 mcl de solución de eritrocitos, cantidad medida con una pipeta automática.

Nota: Para determinaciones cuantitativas se necesita igualmente medir una cantidad de 250 mcl con una pipeta automática, tanto para la muestra a analizar como para la cantidad de antisuero a añadir.

**TABLA 17: Calibración de los goteros para solución de eritrocitos**  
**( Peso de 1 gota en gramos, uso de 8 goteros diferentes )**

1	2	3	4	5	6	7	8
0.0313	0.0333	0.0314	0.0348	0.0314	0.0283	0.0342	0.0347
0.0340	0.0305	0.0318	0.0352	0.0328	0.0308	0.0360	0.0346
0.0352	0.0325	0.0327	0.0371	0.0332	0.0292	0.0357	0.0346
0.0334	0.0290	0.0323	0.0334	0.0334	0.0288	0.0344	0.0379
0.0353	0.0338	0.0320	0.0364	0.0351	0.0207	0.0346	0.0358
$\bar{x}$ : 0.0338	0.0318	0.0320	0.0354	0.0332	0.0276	0.0350	0.0355

#### 3.5.2 Determinación de una linealidad entre la concentración de la HCG y el diámetro del anillo en la prueba de inhibición de hemaglutinación.

A fin de determinar la existencia de una relación lineal entre la concentración final de hormona y el diámetro del anillo de la prueba de inhibición de hemaglutinación se determinaron los coeficientes de regresión de 4 pruebas independientes de determinación de la sensibilidad del reactivo con una materia prima estandarizada. A partir de estos mismos resultados se determinaron también los coeficientes de regresión considerando una relación entre la inversa de la concentración final de la hormona y el diámetro del anillo. Los resultados obtenidos muestran que existe una mejor relación lineal entre la inversa de la

concentración final y el diámetro del anillo que entre la concentración final y el diámetro del anillo.(ver tabla 18).

Por lo tanto se concluye que el diámetro del anillo es inversamente proporcional a la concentración final, pero proporcional a la relación ( sensibilidad entre concentración final ).

**TABLA 18:** Comparación del coeficiente de regresión en las relaciones:  
Cf contra diámetro y 1/Cf contra diámetro del anillo de inhibición.

X = Cf	Y = diam.		X =1/Cf	Y = diam.	
0.65	6	r=-0.9573	1.54	6	r=0.9799
0.75	5.375	A=7.968	1.33	5.375	A=2.081
0.85	5.125	B=-3.32	1.18	5.125	B=2.51
0.95	4.5		1.05	4.5	
1.05	4.625		0.95	4.625	
1.15	4.25		0.86	4.25	
0.65	7.75	r=-0.9128	1.54	7.75	r=0.9519
0.75	6.75	A=10.75	1.33	6.75	A=2.673
0.85	6.25	B=-5.0	1.18	6.25	B=3.198
0.95	6.25		1.05	6.25	
0.75	7.0	r=-0.9993	1.33	7.0	r=0.9999
0.85	6.0	A=14.010	1.18	6.0	A=1.904
0.95	5.125	B=-9.375	1.05	5.125	B=6.696
1.05	6.25	r=-0.9064	0.95	6.25	r=0.9176
1.15	5.375	A=11.0476	0.87	5.375	A=0.187
1.26	5.25	B=-4.701	0.79	5.25	B=6.250

### 3.5.3 VALIDACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

La determinación del punto de equilibrio de la prueba desarrollada se basa en una interpolación sobre una recta de regresión construida a partir del diámetro obtenido de 8 concentraciones finales diferentes cercanas a la sensibilidad del reactivo. Por lo tanto se requiere, antes que todo, validar la linealidad del sistema de medición. A continuación se presenta el análisis estadístico de la regresión lineal obtenida a partir de una determinación de sensibilidad con 6 concentraciones finales analizadas por duplicado ( ver 3.3 ). La figura 16 representa la recta de regresión obtenida, la cual tiene un coeficiente de determinación de 0.9709.

### 3.5.4 Validación de la repetibilidad del método analítico (prueba preliminar con materia prima.

Procedimiento: Se consideran los datos obtenidos en la determinación de la sensibilidad de un lote de un reactivo a partir de 6 cajas diferentes (ver 3:3.1.)

**TABLA 19. Prueba preliminar de repetibilidad**

Prueba	Resultado Sensibilidad en UI/ml
1	0.79
2	0.64
3	0.70
4	0.67
5	0.82
6	0.76

MEDIA:  $\bar{x}=0.73$   
 COEFICIENTE DE VARIACION: CV=9.72%

#### Análisis y conclusión:

El coeficiente de variación obtenido ( CV= 9.72% ) es un valor aproximado, ya que las condiciones de realización de la prueba no son las óptimas para una prueba de repetibilidad, además el método todavía no estaba totalmente normalizado cuando se realizó este ensayo.

Por lo tanto, se puede esperar que el método presente un coeficiente inferior al 9.42%, en cuanto se realice la prueba de acuerdo a la técnica descrita en el capítulo IV.

## LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION (VALORACION DE HCG POR INMUNOENSAYO)

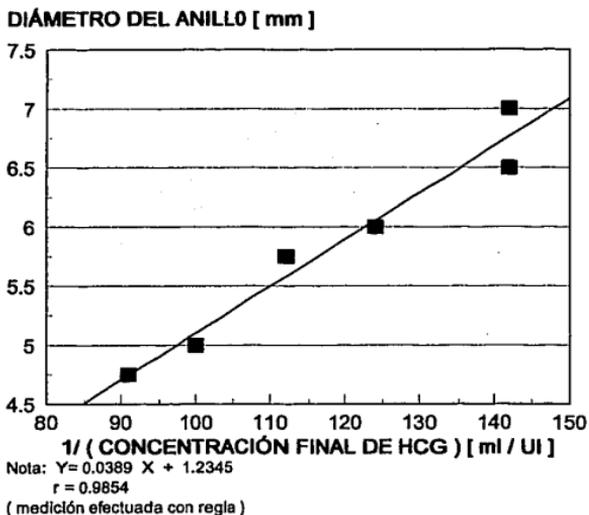


FIG 16. LINEALIDAD DEL SISTEMA

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

INFORMACION

METODO:..... Valoración de HCG por inmunoensayo (HI)  
ANALISTA:..... Marianna S.Romo  
FECHA:..... 13-08-91  
CANTIDAD ADICIONADA:... 1/Cf x 100 [ml/UI]  
PROPIEDAD MEDIDA:..... Diámetro del anillo de inhibición [mm]  
NIVELES DE CANT.ADIC.:. 6  
LISTADO IMPRESO (S/N)?: s

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

INFORMACION

VALOR DEL NIVEL 1 DE 1/Cf x 100 [ml/UI]: 142.0000  
# DE REPLIC. DEL NIVEL 1 DE 1/Cf x 100 [ml/UI]: 2  
TECLEAR VALORES DE Diámetro del anillo de inhibición [mm]  
Y( 1, 1)= 6.5000  
Y( 1, 2)= 7.0000

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

INFORMACION

VALOR DEL NIVEL 2 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 124.0000  
# DE REPLIC. DEL NIVEL 2 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 2  
TECLEAR VALORES DE Diámetro del anillo de inhibición [mm]

Y( 2, 1)= 6.0000  
Y( 2, 2)= 6.0000

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

INFORMACION

VALOR DEL NIVEL 3 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 112.0000  
# DE REPLIC. DEL NIVEL 3 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 2  
TECLEAR VALORES DE Diámetro del anillo de inhibición [mm]

Y( 3, 1)= 5.7500  
Y( 3, 2)= 5.7500

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

INFORMACION

VALOR DEL NIVEL 4 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 100.0000  
# DE REPLIC. DEL NIVEL 4 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 2  
TECLEAR VALORES DE Diámetro del anillo de inhibición [mm]

Y( 4, 1)= 5.0000  
Y( 4, 2)= 5.0000

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

INFORMACION

VALOR DEL NIVEL 5 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 91.0000  
# DE REPLIC. DEL NIVEL 5 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 2  
TECLEAR VALORES DE Diámetro del anillo de inhibición [mm]

Y( 5, 1)= 4.7500  
Y( 5, 2)= 4.7500

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

INFORMACION

VALOR DEL NIVEL 6 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 83.0000  
# DE REPLIC. DEL NIVEL 6 DE  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]: 2  
TECLEAR VALORES DE Diámetro del anillo de inhibición [mm]

Y( 6, 1)= 4.5000  
Y( 6, 2)= 4.5000

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

METODO:..... Valoración de HCG por inmunoensayo (HI)  
ANALISTA:..... Marianna S.Romo  
FECHA:..... 13-08-91  
CANTIDAD ADICIONADA:...  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]  
PROPIEDAD MEDIDA:..... Diámetro del anillo de inhibición [mm]

PENDIENTE = .0389  
LIMITE SUP. INTERVALO DE CONFIANZA = .0436  
LIMITE INF. INTERVALO DE CONFIANZA = .0341  
t cal = -452.3239

ORDENADA AL ORIGEN = 1.2345  
LIMITE SUP. INTERVALO DE CONFIANZA = 1.7576  
LIMITE INF. INTERVALO DE CONFIANZA = .7114  
t cal = 5.258

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

LA ORDENADA DE LA RELACION LINEAL

$1/cf \times 100$  [ml/UI] Y

Diámetro del anillo de inhibición [mm]

NO PASA POR EL ORIGEN

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION = REGRESION  
SUMA DE CUADRADOS = 7.2618  
GRADOS DE LIBERTAD = 1  
MEDIA DE CUADRADOS = 7.2618  
Fcal = 334.6085  
P(Fcal) = 2.806618E-06

FUENTE DE VARIACION = ERROR DE REGRESION  
SUMA DE CUADRADOS = .2173  
GRADOS DE LIBERTAD = 10  
MEDIA DE CUADRADOS = .0217

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION = FALTA DE AJUSTE  
SUMA DE CUADRADOS = .0923  
GRADOS DE LIBERTAD = 4  
MEDIA DE CUADRADOS = .0231  
Fcal = 1.1078  
P(Fcal) = .433367

FUENTE DE VARIACION = ERROR PURO  
SUMA DE CUADRADOS = .125  
GRADOS DE LIBERTAD = 6  
MEDIA DE CUADRADOS = .0208

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
INTERPRETACION DE LA TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

EXISTE RELACION ALTAMENTE SIGNIFICATIVA DE:  
 $1/C_f \times 100$  [ml/UI] Y  
Diámetro del anillo de inhibición [mm]

EL MODELO LINEAL REPRESENTA DE MANERA CORRECTA LA  
RELACION ENTRE Diámetro del anillo de inhibición [mm]  
CON  $1/C_f \times 100$  [ml/UI]

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

MODELO EMPIRICO

COEFICIENTE	EFECTO
1.2345	ORDENADA AL ORIGEN DE Diámetro del anillo de inhibición [mm]
.0389	LINEAL DE 1/cf x 100 [ml/UI]

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

C A F E T

CAPACIDAD PREDICTIVA DEL MODELO EMPIRICO

CANTIDAD ADICIONADA PREDICCIÓN

142	6.753983
124	6.05433
112	5.587894
100	5.121459
91	4.771632
83	4.460675

COEFICIENTE DE DETERMINACION (R<sup>2</sup>) = .9709

## CAPITULO IV

### METODO DESARROLLADO

#### VALORACION DE HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA POR METODO DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION EN TUBO

Reactivo: UCG -TITRATION SET

Proveedor: Carter Wallace

Sensibilidad aproximada: 1 UI/ml

Principio: UCG-Test se basa en el principio de la inhibición de la aglutinación hemática. En presencia del antisero anti-HCG, los eritrocitos recubiertos con HCG se aglutinan y sedimentan formando un tapiz de células en el fondo del tubo. Cuando la HCG de la muestra se incorpora a este sistema, se inhibe la combinación de los eritrocitos recubiertos con los anticuerpos y el resultado es la formación de un "anillo" de células, similar al que aparece en el tubo de control.

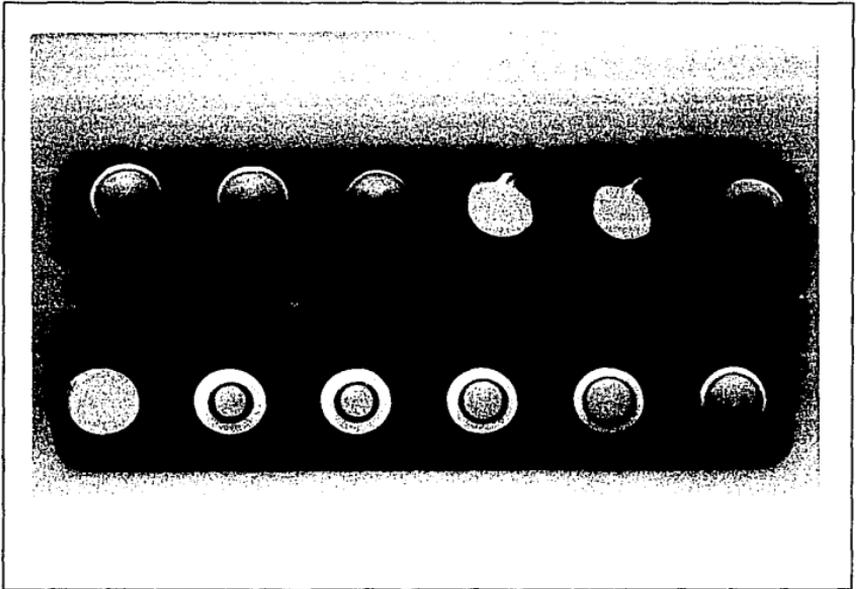
Interpretación de los resultados: El punto de equilibrio se alcanza en aquella dilución en la que se observa un anillo periférico difuso, en vez de la imagen anular perfectamente definida que se obtiene mientras exista un exceso de HCG que inhibe la hemaglutinación. Para uso cuantitativo se considera como punto de equilibrio a la dilución que proporciona un anillo de 6 mm de diámetro.

Determinación del punto de equilibrio: A partir de la muestra se constituye una serie de diluciones (8) de concentración final cercana a la sensibilidad del reactivo. A partir de los resultados, se construye una recta por regresión lineal, de las relaciones (Sensibilidad / Concentración final ) contra diámetro del anillo. El punto de equilibrio se determina por interpolación sobre la recta para aquella abscisa cuyo diámetro sea de 6 mm.

#### CONTENIDO:

- 4.1 DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO
- 4.2 VALORACION DE MATERIA PRIMA DE HCG
- 4.3 VALORACION DE PRODUCTO TERMINADO (5000 UI/FRASCO)
- 4.4 PROCEDIMIENTO GENERAL DE TITULACION
- 4.5 DEMOSTRACION DE FORMULAS
- 4.6 HOJAS DE DATOS Y RESULTADOS

DETERMINACION CUANTITATIVA DE HCG POR METODO DE  
INHIBICION DE HEMAGLUTINACION EN TUBO



FOTOGRAFIA 1: DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO  
CON UN PATRON DE REFERENCIA

De izquierda a derecha, empezando en la fila de abajo, se observa una curva de calibración en la que van aumentando los diámetros de los anillos de alrededor de 3.5 mm a 8 mm, conforme disminuye la concentración de HCG en los tubos.

El punto de equilibrio se encuentra por interpolación sobre la línea de regresión determinada a partir de los resultados para un anillo de 6mm. El último tubo arriba a la derecha corresponde al tubo de control.

## MATERIAL

- .- Tubos de ensayo ( incluidos en el estuche ) con diámetro exterior de 9.5 mm y espesor de 0.60 mm.
- .- Bureta de 10 ml ( precisión 0.05 ml ) ( 1 ).
- .- Pipeta automática de volumen ajustable de 10 mcl a 100 mcl o pipeta de 35 mcl.
- .- Pipeta automática de volumen ajustable de 100 mcl a 1000 mcl o pipeta de 250 mcl.
- .- Vernier digital o regla transparente ( 20cm ).
- .- Papel de aluminio.
- .- Baño de agua.
- .- Vaso de precipitado 500 ml ( 1 ) 100 ml ( 1 )

### Material necesario para una prueba:

- .- Frascos de aproximadamente 50 ml ( 8 ).
- .- Pipeta graduada: 2ml ( 1 ), 10 ml ( 1 ).
- .- Pipeta volumétrica 1 ml ( 1 ).
- .- Gradilla con espejo ( 1 ).

### .-Matraces aforados para:

- a) Determinación de sensibilidad: 10 ml ( 1 ) 100 ml ( 1 ) 50 ml ( 8 )
- b) Determinación del título de una materia prima: [ 10 ml ( 1 ) 50 ml ( 1 ) 100 ml ( 8 ) ]  
ó [ 10 ml ( 1 ) 200 ml ( 1 ) 25 ml ( 8 ) ]
- c) Determinación del título de un producto terminado ( 5000 UI frasco ) : [ 100 ml ( 9 ) ] ó [ 200 ml ( 1 ) 50 ml ( 8 ) ].

#### 4.1 DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO

Antes de cada valoración se determina la sensibilidad del reactivo con el estándar de laboratorio, de la manera siguiente:

- a) La determinación de la sensibilidad del reactivo se realiza con el estándar diluido en SSI cuando se destina a una valoración de materia prima.
- b) La determinación de la sensibilidad del reactivo se realiza con el estándar adicionado de excipientes cuando se destina a una valoración de producto terminado, de tal manera que las concentraciones relativas de estos sean iguales a las concentraciones existentes en el medicamento.

**NOTA IMPORTANTE:** Al trabajar con un nuevo lote de reactivo, es muy recomendable realizar una prueba preliminar de estimación de la sensibilidad de este, a fin de no realizar la prueba de determinación de sensibilidad en vano y estudiar un rango de concentraciones finales alejadas de la sensibilidad real. Para tal efecto probar las tres concentraciones finales siguientes: 0.7 , 1.0 y 1.3 UI/ml. Según los resultados obtenidos escoger el rango de concentraciones finales adecuado para poder determinar la sensibilidad del reactivo.

**Ejemplo:** Título biológico del estándar (Tb)= 3500 UI/mg Peso de la muestra (Pm)= 5.0 mg. Se pesa 5.0 mg de una materia prima estandarizada y se diluye a 10 ml con SSI. De esta solución se toma una alícuota de 1 ml y se afora con SSI a 100 ml. Se llena una bureta de 10 ml con precisión de 0.05 ml y se colocan las alícuotas siguientes en 3 matraces de 50 ml:

- 1) 2.00 ml para tener una Cf de 0.7 UI / ml
- 2) 2.85 ml " " " " " 1.0 UI / ml
- 3) 3.75 ml " " " " " 1.3 UI / ml

Se aforan con SSI. Se realiza la prueba de acuerdo al procedimiento general ( ver parte 4.4 de este capítulo).

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinará el rango de concentraciones finales a probar para la determinación de la sensibilidad. Comparando los resultados obtenidos con la tabla que viene a continuación, se estima la sensibilidad del reactivo y se determina el rango de concentraciones finales a probar en la prueba de determinación de la sensibilidad:

Cf analizada	Posibles resultados (diámetro anillo en mm)										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
1) 0.7		5.5	6.5		-		-		-		-
2) 1.0		4.5	5.0		6.0		6.75		-		-
3) 1.3		4.0	4.25		5.0		5.5		6.75		7.00
<hr/>											
Sensibilidad probable (UI/ml)	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6

#### A/ CALCULOS PRELIMINARES

99

1.- Determinar las 8 concentraciones finales (Cf) a analizar. Para este fin tomar 3 concentraciones inferiores a la sensibilidad teórica o estimada y 4 sensibilidades superiores, cada una de ellas equidistante de la otra por un valor de 0.1 UI / ml ejemplo: sensibilidad teórica=1 UI/ml, las concentraciones finales a analizar son: 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8 y 0.7 UI/ml.

2.- Determinar los aforos a utilizar según el título biológico del estándar de laboratorio. En general conviene utilizar las series de aforos siguientes: 10 ml, 100 ml y 50 ml ó 10 ml, 200 ml y 25 ml, para un título de aproximadamente 4,000 UI/ml.

3.- Determinar las alícuotas de solución (S2) que se utilizan en la preparación de las diluciones por medio de la fórmula siguiente:

$$AI = f \times Cf$$

Donde:

$$f = \frac{AF}{Tb \times Pm}$$

Donde: AF= Producto de todos los aforos utilizados para llegar a la concentración final deseada.

ejemplo:  $AF = 10 \text{ ml} \times 100 \text{ ml} \times 50 \text{ ml} = 50\,000 \text{ (ml)}^3$

Cf= Concentración final en UI / ml.

AI= Producto de todas las alícuotas utilizadas para llegar a la concentración final deseada.

Tb= Título biológico en UI / mg

Pm= Peso de la muestra en mg

f= Factor de conversión para calcular las alícuotas

Nota: ajustar la alícuota a una cantidad múltiple de 0.05, ya que es la máxima precisión que nos permite la bureta.

4.- Colocar los datos obtenidos en la tabla 20 como se muestra en el ejemplo siguiente:

**TABLA 20:** Ejemplo de colocación de datos para los cálculos preliminares de la determinación de la sensibilidad.

tubo	Cf	AF	f	Al	Pm	Tb
		10	2.61		5	3831.8
		100		1.0		
1)	1.6	50		4.2		
2)	1.5	50		3.90		
3)	1.4	50		3.65		
4)	1.3	50		3.40		
5)	1.2	50		3.15		
6)	1.1	50		2.90		
7)	1.0	50		2.60		
8)	0.9	50		2.35		

#### **B/ PREPARACION DEL ESTANDAR**

i.- Pesar con precisión unos 5.00 mg de estándar de laboratorio. ( materia prima HCG estandarizada ) en un papel encerado, tomando la muestra con una espátula estéril.

2.- Transferir cuantitativamente el contenido del papel a un matraz aforado perfectamente seco de 10 ml.

3.- Diluir la muestra con SSI, después de haber enjuagado perfectamente el papel (3 x 2ml). Con suavidad, homogeneizar la mezcla efectuando una rotación horizontal sobre la mesa y evitando una agitación vertical y la consecuente formación de espuma.

4.-Aforar a 10ml y mezclar la solución (S1). Recubrir el matraz con papel de aluminio y dejarlo 15 minutos en un baño de agua( con hielo si hace mucho calor) para que se homogeneice bien la mezcla. Mezclar.

5.- Tomar 1 ml de esta solución y aforar a 100 ml con SSI, en el caso de una valoración de materia prima, o con SSI adicionada de excipientes en el caso de la valoración de un producto terminado. Mezclar la solución(S2).

6.- Llenar una bureta de 10 ml (precisión 0.05) con esta solución (S2) y preparar una serie de diluciones en matraces de 50 ml según el esquema de la tabla 20 del inciso 4 de la parte 4.1.A

7.- Aforar a 50 ml cada solución (S3) con SSI.

8.- Recubrir cada matraz con papel de aluminio y dejarlo en un baño de agua (con hielo si hace mucho calor) mientras se monta la prueba.

### C/ PROCEDIMIENTO

Ver (4.4) PROCEDIMIENTO GENERAL DE TITULACION

### D/ CALCULOS

1.- Colocar los resultados en la tabla 21 utilizando las formulas siguientes:

$$f^* = AF / (Tb \times Pm)$$

$$1 / Cf = f^* / AI$$

**TABLA 21.** Ejemplo de colocación de datos para la determinación de la sensibilidad

tubo	f*	Tb	Pm	AF	AI	X=1/Cf	Y=diam.anillo
	2.61	3831.8	4.99	10,100,50			
1)					4.2	0.62	5.25
2)					3.9	0.67	6.0
3)					3.65	0.71	5.75
4)					3.40	0.77	6.75
5)					3.15	0.83	7.25
6)					2.90	0.90	8.0
7)					2.60	1.00	-

2.- Por medio de una regresión lineal, introducir en la calculadora los pares (x,y) de datos anteriores.

3.- Determinar la ecuación de la recta así como su coeficiente de regresión (r).  
ejemplo:  $r = 0.9795$   $A = -0.7301$   $B = 9.64$

4.- Determinar el Punto de equilibrio (PE) por medio de una interpolación sobre la recta buscando la x correspondiente a un anillo de 6 mm.  
Ejemplo: para una  $Y=6$  mm obtenemos una  $X=0.6981 = PE$

5.- Calcular la SENSIBILIDAD (S) DEL REACTIVO con la siguiente fórmula:

$$S = 1/PE = \dots \text{ UI/ml}$$

Ejemplo:  $S = (0.691)^{-1} = 1.43 \text{ UI/ml}$

#### 4.2 VALORACION DE MATERIA PRIMA DE HCG

##### A/ CALCULOS PRELIMINARES

1.- Se analizan una serie de diluciones (8) cuyas concentraciones finales diferentes y cercanas a la sensibilidad del reactivo permiten el establecimiento de una recta de regresión. El punto de equilibrio será determinado por interpolación sobre la regresión lineal obtenida a partir de estos 8 puntos. Se recomienda el análisis de un rango comprendido entre el 130% y el 60% del título biológico. En los casos donde se espera un título diferente, conviene escoger otro rango de porcentajes a probar (%P).

2.- Calcular los títulos analizados (Ta) en base a los porcentajes probados (%P) del título biológico con la fórmula siguiente:

$$T_a = \frac{\%P \times T_b}{100}$$

3.- Determinar los aforos a utilizar para llegar a una concentración final igual a la sensibilidad del reactivo (anteriormente determinada). En general, conviene utilizar la combinación de los aforos siguientes: 10 ml, 50 ml y 100 ml. (para materias primas cuyo título sea cercano a 4000 UI / mg).

4.- Determinar las alícuotas de solución (M2) necesarias para la preparación de las diluciones (M3), con la fórmula siguiente:

$$A_i = f' / \%P$$

Donde:

$$f' = \frac{AF \times S \times 100}{T_b \times P_m}$$

Donde : AF= Producto de todos los aforos utilizados para llegar a la concentración final deseada

Ejemplo: AF= 10 ml x 50 ml x 100 ml=50 000 (ml)<sup>3</sup>

Al= Producto de todas las alícuotas utilizadas para llegar a la concentración final deseada.

Ejemplo: Al= 1 ml x 2.70 ml= 2.70 (ml)<sup>2</sup>

- S= Sensibilidad del reactivo en UI/ml  
 %P= Porcentaje del título biológico que se desea probar  
 Pm= Peso de la muestra en mg  
 f' = Factor de conversión para determinar la alícuota

**Nota:** ajustar las alícuotas a cantidades múltiples de 0.05, ya que es la máxima precisión que nos permite la bureta.

5.- Colocar los datos obtenidos en la tabla 22 de datos con las formulas:

**TABLA 22.** Ejemplo de colocación de datos, para calculos preliminares en la determinación del título de una materia prima.

tubo	%P	( Ta )	AF	f'	Al	Pm	Tb	S estimada
			10	301		5	3320	1.0
			50		1.00			
1)	130	4316	100		2.30			
2)	120	3984	100		2.50			
3)	110	3652	100		2.75			
4)	100	3320	100		3.00			
5)	90	2988	100		3.35			
6)	80	2656	100		3.75			
7)	70	2324	100		4.30			
8)	60	1992	100		5.0			

#### B/ PREPARACION DE LA MUESTRA

- 1.-Pesar con precisión unos 5.00 mg de materia prima a analizar, colocándola en papel encerado con una espátula estéril.
- 2.-Transferir cuantitativamente el contenido del papel a un matraz aforado perfectamente seco de 10 ml.
- 3.- Diluir la muestra con SSI después de haber enjuagado perfectamente el papel (3 x 2 ml). Homogeneizar con suavidad la mezcla por rotación horizontal del matraz sobre la mesa, evitando una agitación vertical y la consecuente formación de espuma. Aforar a 10 ml (M1).
- 4.-Recubrir el matraz con papel de aluminio y dejarlo 15 minutos en un baño de agua(con hielo si hace mucho calor) para que se homogeneice bien la mezcla. Mezclar.

5.- Tomar 1 ml de esta solución y aforar a 50 ml con SSI. Llenar una bureta de 10 ml (precisión 0.05ml) con esta solución (M2) y preparar una serie de diluciones en matraces de 100 ml según el esquema de la tabla 22 del inciso 5 de la parte 4.2 A /.

6.-Aforar a 100 ml cada solución (M3) con SSI.

7.- Dejar los matraces en un baño de agua (con hielo si hace mucho calor) mientras se monta la prueba y protegerlos de la luz con una hoja de papel de aluminio o tapando el recipiente que los contiene.

### C / PROCEDIMIENTO

Ver ( 4.4 ) PROCEDIMIENTO GENERAL DE TITULACION.

### D/ CALCULOS

1.- Reajustar los valores "%P" en base al peso exacto de la muestra, a las alícuotas tomadas y a la sensibilidad exacta del reactivo, utilizando la fórmula siguiente:

$$\%P = f^{**} / AI$$

Donde:

$$f^{**} = \frac{AF \times S \times 100}{Tb \times Pm}$$

2.- Colocar los datos en la tabla 23:

**TABLA 23.** Ejemplo de colocación de datos para la determinación del título de una materia prima

tubo	X=%P	AF	AI	Pm	Tb	S	f**	Y = diámetro
		10		5.01	3320	1.43	430	
		50	1.0					
1)	187	100	2.30					-
2)	172	100	2.50					-
3)	156	100	2.75					7.5
4)	143	100	3.00					6.75
5)	128	100	3.35					6.25
6)	115	100	3.75					5.75
7)	100	100	4.30					5.5
8)	85	100	5.05					4.75

3.- Por medio de una regresión lineal, introducir en la calculadora los pares (x,y) de datos anteriores.

4.- Determinar la ecuación de la recta así como su coeficiente de regresión (r).

Ejemplo:  $r = 0.9902$   $A=1.7022$   $B= 0.03616$

5.- Determinar el Punto de Equilibrio (PE) por medio de una interpolación sobre la recta, buscando la "x" correspondiente a un anillo de 6 mm.

Ejemplo: PE= 118.86%

6.- Calcular el título inmunológico (Ti) de la materia prima con la siguiente fórmula:

$$Ti = \frac{PE \times Tb}{100}$$

Ti = ..... UI/mg

Ejemplo:  $Ti = (118.86 \times 3320 \text{ UI/mg})/100 = 3946 \text{ UI/mg}$

#### 4.3 VALORACION DE PRODUCTO TERMINADO

##### A/ CALCULOS PRELIMINARES

1.- Se analizan una serie de diluciones (8) cuyas concentraciones finales diferentes y cercanas a la sensibilidad del reactivo permiten el establecimiento de una recta de regresión. El punto de equilibrio será determinado por interpolación sobre la regresión lineal obtenida a partir de estos 8 puntos. Se recomienda el análisis de un rango comprendido entre el 130% y el 60 % del título teórico (5000 UI/ frasco) cuando se espera encontrar un título experimental del 100%. En los casos donde se espera una título diferente, conviene escoger otro rango de porcentajes a probar(%P). Colocar los datos en la tabla 5.

2.- Calcular los títulos analizados (Ta) en base a los porcentajes probados (%P) del título teórico (Tt), con la fórmula siguiente:

$$Ta = \frac{\%P \times Tt}{100}$$

3.- Determinar los aforos a utilizar para llegar a una concentración final igual a la sensibilidad del reactivo (anteriormente determinada ). En general conviene utilizar la combinación de los aforos siguientes: 100 ml, 100 ml. ( para un producto de 5000 UI / frasco ).

4.- Determinar las alícuotas de solución (G1) necesarias para la preparación de las diluciones (G2), mediante la fórmula que sigue, donde se supone que el peso de la muestra ( Pm ) es igual al peso promedio ( PP ) del contenido del frasco.

$$AI = f'' / \%P$$

Donde:

$$f'' = \frac{AF \times S^* \times 100}{Tt}$$

Donde: AF= Producto de todos los aforos utilizados para llegar a la concentración final deseada.

Ejemplo: AF = 100 ml X 100 ml = 10 000 (ml)<sup>2</sup>

AI= Producto de todas las alícuotas utilizadas para llegar a la concentración final deseada. Ejemplo: AI = 2 ml

S\*= Sensibilidad del reactivo en UI/ml(determinada con un estándar adicionado de excipientes

Ta=Título analizado en UI / frasco ( Ta = %P X Tt )

Tt=Título teórico en UI/frasco( título membretado)

Nota: ajustar la alícuotas a cantidades múltiples de 0.05, ya que es la máxima precisión que nos permite la bureta.

5.-Colocar los datos obtenidos en la tabla 24:

Ejemplo:

**TABLA 24.** Ejemplo de colocación de datos para cálculos preliminares a la determinación del título de un producto terminado.

tubo	%P	(Ta)	AF	AI	Pm	Tb	f''	S estimado
			100		pp	5000	200	1.0
1)	130	6500	100	1.55				
2)	120	6000	100	1.70				
3)	110	5500	100	1.80				
4)	100	5000	100	2.00				
5)	90	4500	100	2.25				
6)	80	4000	100	2.50				
7)	70	3500	100	2.85				
8)	60	3000	100	3.35				

**B/ PREPARACION DE LA MUESTRA**

1.- Mezclar dos frascos de **PRODUCTO TERMINADO**. Pesar con precisión la cantidad correspondiente al peso promedio (PP) del lote a analizar. Otra opción consiste en utilizar un frasco del producto y por diferencias de peso entre el frasco vacío y lleno, se determina el peso de la muestra.

2.- Diluir en 100 ml con SSI (G1). Agitar con suavidad evitando la formación de espuma.

3.- Llenar una bureta de 10 ml (precisión 0.05 ml) con esta solución (G1) y preparar una serie de diluciones en matraces de 100 ml según el esquema de la tabla 24 del inciso 5.- de la parte 4.3 A. /

4.- Aforar a 100 ml cada solución ( G2 ) con SSI.

5.- Dejar los matraces en un baño de agua( con hielo si hace mucho calor) mientras se monta la prueba y proteger de la luz con una hoja de papel de aluminio o tapando el recipiente que los contenga.

**C / PROCEDIMIENTO ver 4.4 PROCEDIMIENTO GENERAL DE TITULACION****D/ CALCULOS**

1.- Reajustar los valores " %P " en base al peso exacto de la muestra, a las alícuotas tomadas y a la sensibilidad del reactivo, utilizando la fórmula siguiente:

$$\%P = f^{**} / AI$$

Donde:

$$f^{**} = \frac{AF \times S \times PP \times 100}{Tt \times Pm}$$

2.- Colocar los datos obtenidos en la tabla 25 :

**TABLA 25.** Ejemplo de colocación de datos para la determinación del título del producto terminado.

tubo	%P	AF	Al	Pm	Tt	PP	S	f**	Y= diam.
		100		132.4	5000	106.1	1.54	246.8	
1)	159	100	1.55						
2)	145	100	1.70						8.0
3)	137	100	1.80						6.75
4)	123	100	2.00						6.5
5)	110	100	2.25						5.5
6)	99	100	2.50						5.1
7)	87	100	2.85						4.25
8)	74	100	3.35						4.0

3.-Por medio de una regresión lineal, introducir en la calculadora los pares (x,y) de los datos anteriores:

4.- Determinar la ecuación de la recta así como su coeficiente de regresión (r)  
Ejemplo  $r = 0.9802$   $A = -0.2697$   $B = 0.054$

5.- Determinar el Punto de Equilibrio (PE) por medio de una interpolación sobre la recta, buscando la "x" correspondiente a un diámetro de anillo de 6 mm.

Ejemplo: PE= 115.72%

6.- Calcular el título experimental ( inmunológico ) del producto terminado mediante la fórmula siguiente:

$$Tt = \frac{PE \times Tt}{100} = \dots\dots \text{UI/frasco}$$

Ejemplo:  $Tt = (115.72 \times 5000) / 100 = 5786 \text{ UI / frasco}$

#### 4.4 PROCEDIMIENTO GENERAL DE TITULACION

1.- Sacar el reactivo del refrigerador, aproximadamente 30 minutos antes de su empleo para que esté a temperatura ambiente.

2.- Agitar perfectamente la "suspensión de células" (frasco N° 3) utilizando una agitación rotacional del frasco sobre la mesa.No agitar verticalmente a fin de no formar espuma.

3.- Rotular los 8 tubos de ensayo para análisis de la muestra, y 2 tubos para los controles :

a) tubo de control: 1 gotero de solución control + 250 mcl de SSI + 35 mcl de suspensión de células ( debe de dar a las 2 hrs un anillo o un botón).

b) tubo de dilución:250 mcl de antisuero + 250 mcl de SSI + 35 mcl de suspensión de células ( debe de dar a las 2 hrs un fondo homogéneo).

4.- Introducir 250 mcl de "antisuero HCG" (frasco N° 2) en el fondo de cada uno de los 8 tubos de la muestra, mediante una pipeta automática.

5.- Introducir en el fondo de los tubos respectivos, 250 mcl de solución (S3),(M3) o (G2), cambiando de punta entre cada solución.

6.- Introducir 35 mcl de "suspensión de células" (frasco N° 3) en cada uno de los 8 tubos de muestra,cambiando de punta entre cada tubo.

7.- Mezclar los tubos uno a uno, de 6 a 7 segundos, sosteniendo el tubo entre el pulgar y el índice de la mano izquierda y dando golpecitos con el índice de la mano derecha en la parte baja del tubo para obtener una muestra homogénea. Al final dar una agitación a toda la gradilla.

8.- Dejar reposar exactamente 2.00 horas en una superficie plana, libre de vibraciones y no expuesta a la luz directa del sol.

9.- Medir con un vernier digital o con una regla transparente, los anillos formados en el fondo del tubo,procediendo en el mismo orden en que fueron colocadas las muestras.

Para realizar las mediciones, tener lista una silla enfrente de la gradilla, sacar con cuidado el primer tubo, elevarlo encima de uno y medir desde abajo el diámetro del anillo, mediante un vernier digital o en su defecto con una regla transparente de aproximadamente 20 cm, Proceder de la misma manera con los siguientes tubos, procurando no alterar el anillo de sedimentación de eritrocitos.

Nota: en caso de tener un anillo de bordes muy anchos, se mide el diámetro en el interior del anillo en forma equidistante de su parte interna y externa.

#### CRITERIOS PARA ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos se pueden considerar válidos, solamente si los criterios de aceptabilidad se cumplen.

- 1.- Se consideran medibles solamente los anillos cuyos diámetros estén comprendidos entre 8 y 4 mm o iguales.
- 2.- Se considera aceptable la serie de resultados siempre y cuando se tenga por lo menos un valor superior a 6 mm y un valor inferior a 6 mm .
- 3.- Se considera aceptable la regresión lineal solamente si el coeficiente de regresión es mayor o igual a 0.90.
- 4.- La regresión lineal se debe de calcular por lo menos a partir de 5 resultados.
- 5.- En el caso en que los resultados no fueran aceptables se tiene que volver a hacer el análisis por completo. Solamente es válido volver a utilizar las soluciones (M1) y (S1) conservadas en refrigeración, ya que por su alta concentración son estables por lo menos 48 hrs. Todas las otras soluciones se desechan ya que son inestables.
- 6.- La determinación de la sensibilidad del reactivo se tiene que realizar siempre, justamente antes del análisis de una muestra, ya que materialmetne no es posible realizar estas pruebas simultáneamente.

Nota: Por las condiciones climáticas que prevalecen en México, se recomienda hacer el análisis de HCG por inhibición de hemaglutinación durante el período del día en que no haga demasiado calor en el laboratorio.

4.5. DESARROLLO Y DEMOSTRACION DE FORMULAS UTILIZADAS PARA LA VALORACION CUANTITATIVA DE HCG POR INHIBICION DE HEMAGLUTINACION EN TUBO.

$\text{Título analizado} = \frac{S \times FD}{Pm} \quad [1]$	<p style="text-align: center;">ANALISIS DIMENSIONAL</p> $UI / mg = \frac{UI \times ml \times 1}{ml \quad mg}$
$\frac{\text{Título Analizado}}{\text{Título biológico}} = \frac{S \times FD}{Pm \times Tb} \quad [2]$	
$Cf = \frac{Al \times Tb \times Pm}{AF} = \frac{Tb \times Pm}{AF (Al)^{-1}} = \frac{Tb \times Pm}{FD} \quad UI / mg = \frac{UI \times mg \times 1}{mg \quad ml}$	
$Cf = \frac{Tb \times Pm}{FD} \quad [3]$	
$Fd = \frac{Tb \times Pm}{Cf} \quad [4]$	$ml = \frac{UI \times mg \times 1}{mg \quad UI (ml)^{-1}}$
<p>Sustituyendo la ecuación (4) en la ecuación (2) nos da:</p>	
$\frac{Ta}{Tb} = \frac{S \times Tb \times Pm}{Pm \times Tb \times Cf} = \frac{S}{Cf}$	
$\frac{Ta}{Tb} = \frac{S}{Cf} \quad [5]$	$\frac{UI / mg}{UI / mg} = \frac{UI / m}{UI / ml}$
<p>% Probado = <math>\frac{Ta \times 100}{Tb} = \frac{S \times 100}{Cf} \quad [6]</math></p>	
<p>Donde: S = Sensibilidad del reactivo en UI / ml          FD = Factor de dilución = <math>\frac{\text{Producto de todos los aforos}}{\text{Producto de todas las alicuotas}}</math></p>	
<p>Pm = Peso de la muestra          Tb = Título biológico          Cf = Concentración final en UI / ml          Al = Producto de todas las alicuotas en ml          Af = Producto de todos los aforos en ml          %P = Título analizado en por ciento del título biológico ( materia prima ) o en por ciento del título teórico ( producto terminado ).</p>	

En el cuadro anterior se presenta la demostración de las fórmulas utilizadas para valorar una materia prima cuyo título en UI / mg se expresa en términos del porciento del título biológico. La demostración es válida también para un producto terminado cuyo título en UI / frasco se expresa en términos del porciento del título teórico o sea el título que aparece en el marbete.

**Explicación:**

Queda demostrado con esta fórmula ( 5 ) que el factor de proporción que permite determinar el título biológico ( materia prima ) o título teórico ( producto terminado), es igual al cociente de la sensibilidad del reactivo ( S ) entre la concentración final de la muestra ( Cf ). Por lo tanto, haciendo variar la concentración final ( según el método desarrollado, 8 concentraciones ) alrededor de la sensibilidad del reactivo, se conoce el título de la muestra cuando la concentración final iguala a la sensibilidad del reactivo, situación que corresponde al punto de equilibrio ( P.E. ) y que se traduce en un anillo de 6mm de diámetro.

## 4.6 VALORACION DE GONADOTROPINA CORIONICA- HOJA DE DATOS Y RESULTADOS

(1) DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO  
 PARA VALORACION DE: a) MATERIA PRIMA b) PRODUCTO TERMINADO

A) CALCULOS PRELIMINARES

TABLA N° 20

fecha:		lote reactivo:			lote muestra:	
Tubo	Cf	AF	f	Al	Pm	Tb
1)						
2)						
3)						
4)						
5)						
6)						
7)						
8)						
9)						

D) CALCULO DE RESULTADOS

TABLA N° 21

HORA DE LECTURA

Tubo	AF	Tb	Pm	Al	f°	X=1 / Cf	Y= Diám. anillo
1)							
2)							
3)							
4)							
5)							
6)							
7)							
8)							
9)							

r= \_\_\_\_\_ A= \_\_\_\_\_ B= \_\_\_\_\_ PE= \_\_\_\_\_ S= \_\_\_\_\_ UI / ml  
 Criterios de aceptabilidad: \_\_\_\_\_ Satisf. \_\_\_\_\_ No satisf. \_\_\_\_\_  
 Observaciones: \_\_\_\_\_

**VALORACION DE GONADOTROPINA CORIONICA- HOJA DE DATOS Y RESULTADOS****A) CALCULOS PRELIMINARES****( II ) VALORACION DE MATERIA PRIMA****TABLA N° 22**

fecha:		lote reactivo:			lote muestra:			
Tubo	%P	Ta	AF	Pm	Tb	S estimada	f'	Al
1)								
2)								
3)								
4)								
5)								
6)								
7)								
8)								
9)								

**D) CALCULO DE RESULTADOS****TABLA N° 23****HORA DE LECTURA:**

Tubo	AF	Tb	S	Al	f''	X=%P	Y= Diám. anillo
1)							
2)							
3)							
4)							
5)							
6)							
7)							
8)							
9)							

r= \_\_\_\_\_ A= \_\_\_\_\_ B= \_\_\_\_\_ PE= \_\_\_\_\_ Ti= \_\_\_\_\_ UI / ml  
 Criterios de aceptabilidad: \_\_\_\_\_ Satisf. \_\_\_\_\_ No satisf. \_\_\_\_\_  
 Observaciones: \_\_\_\_\_

**VALORACION DE GONADOTROPINA CORIONICA- HOJA DE DATOS Y RESULTADOS****A) CALCULOS PRELIMINARES****( III ) VALORACION DE PRODUCTO TERMINADO****TABLA N° 24**

fecha:		lote reactivo:			lote producto:			
Tubo	%P	Ta	AF	Pm	Ti	S estimada	f''	Al
1)								
2)								
3)								
4)								
5)								
6)								
7)								
8)								
9)								

**D) CALCULO DE RESULTADOS****TABLA N° 25****HORA DE LECTURA:**

Tubo	AF	Pm	Tt	PP	S	f''	AL	X=%P	Y= Diám. anillo
1)									
2)									
3)									
4)									
5)									
6)									
7)									
8)									
9)									

r= \_\_\_\_\_ A= \_\_\_\_\_ B= \_\_\_\_\_ PE= \_\_\_\_\_ Ti= \_\_\_\_\_ UI / Frasco  
 Criterios de aceptabilidad: \_\_\_\_\_ Satisf. \_\_\_\_\_ No satisf. \_\_\_\_\_  
 Observaciones: \_\_\_\_\_

## CAPITULO V

### 5.1 PLAN DE VALIDACION DEL METODO DE VALORACION DE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG) POR EL PRINCIPIO DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION EN TUBO

En el capítulo III, se presentó el análisis estadístico de dos parámetros del método desarrollado: La linealidad del sistema con un coeficiente de determinación de 0.9709 y la prueba preliminar de repetibilidad con materia prima que dio un coeficiente de variación de 9.72%. Estas pruebas preliminares respaldan el método en cuanto a su confiabilidad, sin embargo, ya que no es un método farmacopéico, se necesita analizar el comportamiento de otros parámetros, tanto con materia prima como con producto terminado, así como rehacer el análisis de la linealidad y de la repetibilidad.

A continuación se presenta el plan de validación:

- 5.1.1 Ensayos preliminares
- 5.1.2 Linealidad del sistema de medición
- 5.1.3 Estabilidad de la muestra analítica
- 5.1.4 Precisión del sistema de medición
- 5.1.5 Linealidad del método analítico
- 5.1.6 Exactitud del método analítico y repetibilidad
- 5.1.7 Reproducibilidad del método analítico
- 5.1.8 Especificidad del sistema de medición
- 5.1.9 Comparación del método biológico e inmunológico

#### 5.1.1 ENSAYOS PRELIMINARES

- 1.- Determinación de la sensibilidad inicial de un lote de reactivo a fin de realizar todas las pruebas de validación con este lote.

2.-Estandarización de una materia prima a partir de un estándar internacional a fin de constituir un estándar de referencia de laboratorio.

DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD INICIAL DE UN LOTE DE REACTIVO.(con una materia prima)

Determinar la sensibilidad a partir de tres series de diluciones independientes.

La sensibilidad del reactivo para estimación de los cálculos es =  $(S1 + S2 + S3)/3$

$$S = \dots\dots\text{UI/ml}$$

ESTANDARIZACION DE UNA MATERIA PRIMA A PARTIR DE UN ESTANDAR INTERNACIONAL

Realizar 6 determinaciones del título de la materia prima a estandarizar a partir de un estándar internacional.

a) Determinación de la sensibilidad del reactivo con el Estándar Internacional ( 3rd IS 1986 ).

Calculos Preliminares

Cf	AF	f	Al (mcl)	SSI ( mcl )	Pm	Tb
1.4	10,10	0.1538	215	35	1 ampolleta	<u>650 U.I.</u>
1.3			200	50		Ampolleta
1.2			185	65		
1.1			170	80		
1.0			155	95		
0.9			140	110		
0.8			125	125		
0.7			110	140		

b) Determinación del título de la materia prima a estandarizar.

Paralelamente a cada determinación, se determina el título de la materia prima a estandarizar.

Notas: 1.- Sería conveniente estandarizar una cantidad de materia prima suficiente para realizar las valoraciones del laboratorio, durante 5 años; para tal efecto es necesario que la materia prima se encuentre en condición estable, es decir, en ampollita sellada con un contenido mínimo de 10mg, suficiente para 2 valoraciones (una materia prima y un producto terminado).

2.- Los resultados que se obtienen de estas valoraciones se compararán con los resultados obtenidos en la estandarización de la misma materia prima por valoración biológica, según el método de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Al realizar los cálculos, considerar la fórmula corregida siguiente, ya que en la 5a edición de la Farmacopea mexicana la fórmula presenta un error.

$$R = \text{antilog} \left\{ \left[ \log \frac{(PA)^{-1} \cdot [(Y3+Y4-Y1-Y2)]}{(Pb)^{-1} \cdot [(Y3-Y4+Y1-Y2)]} \right] \right\}$$

#### 5.1.2.- LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

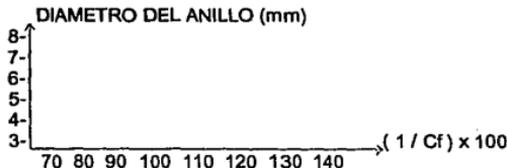
**DEFINICION:** Es la relación que se establece mediante una recta entre una propiedad física, química o biológica con la cantidad del fármaco.

Se determina construyendo una curva de calibración ( diámetro del anillo de inhibición de hemaglutinación contra la relación ( 1 / concentración final) ,utilizando 8 concentraciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis por triplicado.

**Pasos a seguir:** Por triplicado

- Determinación de la linealidad del sistema con una materia prima y con placebo cargado.

#### **GRAFICA**



### 5.1.3.- Estabilidad de la muestra analítica

**DEFINICION:** Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Las condiciones que mostraron tener un efecto sobre la estabilidad de la muestra en solución son : esterilidad del medio de dilución, luz, temperatura ,concentración de HCG y tiempo.Ya que se realizaron pruebas preliminares de estabilidad y que estos estudios son costosos por la necesidad de utilizar una substancia de referencia para cada determinación de sensibilidad del reactivo, las pruebas de estabilidad mínimas son las siguientes:

1.- Estabilidad de la hormona en solución a las 24 y 48 horas a una concentración final alta, es decir de 1500 a 2000 UI/ml.La finalidad de esta prueba es saber si una materia prima estandarizada diluida en una cantidad mínima de 10 ml de SSI puede utilizarse para determinación de sensibilidad durante varios días, lo que representaría un ahorro sobre todo en protocolos largos como son las validaciones o determinaciones de estabilidad de productos terminados.

2.- Estabilidad de la hormona en solución a una concentración final cercana a 1 UI/ml a las 3 horas. La finalidad de esta prueba es determinar la rapidez con la cual es necesario trabajar para realizar las diluciones y montar la prueba y en un momento dado aumentar o disminuir el número de concentraciones finales a analizar.

**Procedimiento:**

Se procede según las tablas siguientes, determinando en cada prueba la sensibilidad del reactivo . Cada determinación se realiza 3 veces con materia prima sola.

1) Estabilidad de una solución concentrada (1800UI/ml) a los 24 hrs y 48 hrs.

concentración inicial	concentración final	
	24 hrs	48 hrs
1.		
2.		
3.		

- 1.
- 2.
- 3.

2) estabilidad de una solución diluida (1UI/ml) a las 3 horas

concentración inicial	concentración final 3 horas
1.-	
2.-	
3.-	

- 1.-
- 2.-
- 3.-

**5.1.4.- PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION**

**Definición:** Es el grado de concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista. Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar.

**(A) DETERMINACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA CON MATERIA PRIMA**

A partir de una misma solución concentrada ( 5 mg en 10 ml ) conservada en refrigeración, se procura realizar las pruebas en un plazo de 2 días. Este procedimiento esta sujeto a la validación anterior de la prueba de estabilidad.

TITULO DE LA MATERIA PRIMA: 3750 UI/mg

(S/Cf) x100	aforados (ml)	alícuotas (ml)	Pm (mg)	resultado (diámetro anillo)					
				R1	R2	R3	R4	R5	R6
140	10,50,100	1,1.9	5						
130	"	2.05							
120	"	2.20							
110	"	2.40							
100	"	2.70							
90	"	2.95							
80	"	3.30							
70	"	3.80							
60	"	4.45							

**(B) DETERMINACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA CON PRODUCTO TERMINADO**

Mezclar el contenido de 8 frascos del mismo lote de un producto terminado; Pesar exactamente, 6 veces el peso promedio y colocarlo en 6 matraces diferentes (limpios y secos ) conservándolos bien tapados en refrigeración. Se deberán de realizar las 6 pruebas en 2 días.

Es importante que el peso de las muestras sea el mismo en los seis casos aunque se haya redondeado el peso promedio.

Tabla de resultados						
(S/Cf) x100	aforos (ml)	alícuotas (ml)	Pm (mg)	resultado( diámetro anillo)		
				R1	R2	R3 R4 R5 R6
143(7143)	100,100	1,1.40	PP			
129(6452)	"	1.55				
121(6061)	"	1.65				
111(5555)	"	1.80				
100(5000)	"	2.00				
91(4545)	"	2.20				
80(4000)	"	2.50				
70(3509)	"	2.85				
60(2985)	"	3.35				
PE						

**5.1.5.- LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO**

**DEFINICION:** Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la substancia de interés(placebo cargado), cada uno de manera independiente deben de estar dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

**Nota:** No es necesario realizar esta prueba ya que no aportaría ninguna información adicional porque ya se determinó la linealidad del sistema anteriormente y el método no usa ningún tratamiento de la muestra , solamente se hacen diluciones para llegar siempre a una misma concentración final cercana a la sensibilidad del reactivo, independientemente de la concentración del producto a analizar.

### 5.1.6. EXACTITUD DEL METODO ANALITICO

**Definición:** Es la concordancia absoluta entre el valor de una propiedad medida experimentalmente y su valor real de referencia. Se expresa como el porcentaje de recuperación obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se determina con 6 materias primas (A) y con 6 placebos cargados (B) de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto, haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

En esta prueba de inhibición de hemaglutinación en tubo, el valor de referencia es el título biológico de la materia prima valorada sólo o en forma de placebos cargados.

**Nota:** Los resultados obtenidos en la estandarización de una materia prima, se pueden utilizar en la determinación de exactitud con materia prima.

#### TABLA DE RESULTADOS:

<b>(I) MATERIA PRIMA</b>		
<b>UI ADICIONADAS</b>	<b>UI RECUPERADAS</b>	<b>% RECOBRO</b>
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		

<b>(II) PLACEBO CARGADO</b>		
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		

### 5.1.7. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO ANALITICO

**DEFINICION:** Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones realizadas por diferentes analistas en el mismo y/o en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes lotes de reactivos, utilizando el mismo y/o diferentes estándares de referencia.

Se determina analizando una muestra homogénea del producto terminado del mismo lote de producción, y materia prima del mismo lote de origen, cercana al 100% de la concentración teórica analizada por 2 analistas en 3 laboratorios diferentes. Cada analista realiza 6 determinaciones.

#### FUENTES DE VARIACION

- 1.- Analista
- 2.- Laboratorio

		ANALISTA	
		1	2
L A B O R A T O R I O	1	1)	
		2)	
		3)	
		4)	
		5)	
		6)	
	2	1)	
		2)	
		3)	
		4)	
		5)	
		6)	
	3	1)	
		2)	
		3)	
		4)	
		5)	
		6)	

**Nota:** para un estudio más amplio se pueden analizar otras fuentes de variación como son:

a).-Mañana / tarde. Existe en el laboratorio una diferencia de temperatura causada por la luz solar que puede influir en los resultados de las pruebas.

b).-Número de lote de reactivo.

#### 5.1.8.- ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO

**DEFINICION:** Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la substancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

**NOTA:** Los componentes que pueden interferir en la valoración de HCG son las subunidades libres alfa o beta, ya que su presencia puede dar lugar a una respuesta inmunológica; más como estas subunidades no presentan actividad biológica son substancias indeseables en las muestras a analizar.

La mejor manera de comprobar la especificidad es añadir hormona HCG subunidad beta y subunidad alfa por separado a una materia prima de HCG y cuantificar la interferencia.

La OMS proporciona patrones de referencia de estas subunidades, que se pueden utilizar para la prueba.

Se realizan las pruebas tres veces como mínimo y se colocan los resultados en la tabla siguiente, se considera la materia prima sólo como el 100% y se efectua un análisis para determinar si el promedio obtenido a partir de hormona adicionada con subunidad libre es significativamente diferente al 100%.

	HCG	HCG + subunidad libre
1		
2		
3		

### 5.1.9.- COMPARACION DEL METODO BIOLOGICO E INMUNOLOGICO

Los parámetros a comparar para establecer la igualdad de los métodos biológicos e inmunológicos son:

- A) REPETIBILIDAD
- B) EXACTITUD
- C) LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

#### A) REPETIBILIDAD

Se analizan por método biológico e inmunológico 6 muestras de producto terminado del mismo número de lote:

método inmunológico	método biológico
1)	
2)	
3)	
4)	
5)	
6)	

#### C) EXACTITUD

Se analizan por método biológico e inmunológico 6 muestras de placebo cargado al 100%

método inmunológico		método biológico	
% adicionado	% recuperado	% adicionado	% recuperado
1)			
2)			
3)			
4)			
5)			
6)			

**C) LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION**

Método inmunológico		Método biológico	
Sensibilidad conc. final	diámetro anillo	concentración HCG	peso ovario
1)			
2)			
3)			
4)			
5)			
6)			

**NOTA:** Los datos de esta prueba se pueden tomar de los resultados obtenidos en los demás análisis.

**5.2.- CRONOGRAMA Y ESTIMACION DE COSTO DEL PROGRAMA DE VALIDACION****5.2.1 Cronograma para programa de validación**

PRUEBA	TIEMPO MINIMO APROXIMADO
Conseguir un estandar de referencia en unidades internacionales	8 semanas-indeterminado
Estandarización materia prima determinación de sensibilidad	12 semanas
Linealidad sistema medición	1 semana
Precisión del sistema medición	2 semanas
Exactitud	1 semana
Reproducibilidad	10 semanas
Comparación entre método biológico e inmunológico (10 valoraciones biológicas)	20 semanas
<b>Total:</b>	<b>54 semanas</b>

### 5.2.2 CANTIDAD DE MATERIA PRIMA DE HCG NECESARIA PARA LA VALIDACION

Donde: (m) = MATERIA PRIMA COMO MUESTRA DE ANALISIS  
(STD) =MATERIA PRIMA COMO ESTANDAR DE REFERENCIA

- Ensayo preliminares:

det. sensibilidad:  $3 \times 5 \text{ mg} = 15 \text{ mg}(\text{std})$   $15\text{mg}(\text{m})$

estandarizacion materia prima:  $6 \times 5 = 30 \text{ mg}(\text{Std})$   
 $6 \times 5 = 30 \text{ mg}(\text{STD})$

- Linealidad del sistema

materia prima:  $3 \times 5 \text{ mg} = 15 \text{ mg}(\text{std})$  ,  $3 \times 5 \text{ mg} = 15 \text{ mg}(\text{m})$

placebo:  $3 \times 5 \text{ mg} = 15 \text{ mg}(\text{STD})$  ,  $3 \times 5 \text{ mg} = 15 \text{ mg}(\text{m})$

- Precisión del sistema

materia prima:  $6 \times 5 \text{ mg} = 30 \text{ mg}(\text{STD})$   $6 \times 5 \text{ mg} = 30 \text{ mg}(\text{m})$

producto terminado:  $6 \times 5 \text{ mg} = 30 \text{ mg}(\text{STD})$  6 frascos producto term.

- Exactitud

materia prima:  $6 \times 5 = 30 \text{ mg}(\text{std})$   $6 \times 5 \text{ mg} = 30 \text{ mg}(\text{m})$

placebo:  $6 \times 5 = 30 \text{ mg}(\text{std})$   $6 \times 5 \text{ mg} = 30 \text{ mg}(\text{m})$

- Reproducibilidad

Materia prima: 2 analistas x 3 laboratorios x 6 x 5mg= 180 mg (STD),  
180mg(m)

producto terminado: 12 análisis x 3 labo. x 5mg= 180 mg(std)  
36 frascos producto terminado

- Estabilidad: 1)  $12 \times 5 \text{ mg} = 60 \text{ mg}(\text{STD})$   $4 \times 5 \text{ mg} = 20 \text{ mg}(\text{m})$

2)  $8 \times 5 \text{ mg} = 40 \text{ mg}(\text{STD})$   $4 \times 4 \text{ mg} = 20 \text{ mg}(\text{m})$

Considerando que se hacen pruebas sencillas el total de materia prima de HCG es:  
STD:705 mg + 355 mg = 1060 mg.

Total en producto terminado:42 frascos

Costos: materia prima de HCG total:  $1060 \text{ mg} \times 3500 \text{ UI/mg} = 3,710,000 \text{ UI}$

Ya que 1,000,000 UI cuestan N\$1,700.- el costo total es de N\$6,307.-

**5.2.3 CANTIDAD DE REACTIVO "UCG - TITRATION SET  
NECESARIA PARA LA VALIDACION**

1 caja de 45 tubos cuesta N\$124.00  
t= tubos necesarios

Ensayos preliminares:

det. sensibilidad: 54 tubos

estandarización: 54 t(sens) 54t (STD) total: 4 cajas

Linealidad del sistema de medición

12 x 9 t= 108 t total : 3 cajas

Precisión del sistema

24 x 9t=216 t total : 5 cajas

Exactitud

24 x 9t= 216 t total: 5 cajas

Reproducibilidad

120 x 9 t= 1080 t total: 24 cajas

Estabilidad

1) 12 x 9t= 108 t (STD)  
108 t (m)

2) 8 x 9t= 72 t (STD)  
72 t (m) total: 8 cajas

Total de cajas de reactivo: 49 cajas

Costo: 49 cajas x N\$124.00/cajas= N\$ 6,076.-

**5.2.4 Cantidad de producto terminado necesario para la validación**

42 frascos x N\$22.45/frasco= N\$942.90

**5.2.5 Costo total de la validación del método analítico:**

Materia prima: N\$6,307.00

Reactivo: N\$6,076.00

P. terminado: N\$ 943.00

**Total** N\$13,326.-

Nota: este precio se refiere al costo de la validación haciendo las pruebas sencillas, para pruebas por duplicado el costo obviamente es exactamente el doble.

#### 5.2.6 Costo de las valoraciones biológicas necesarias para comparación de métodos:

6 pruebas para determinar la repetibilidad con producto terminado, más 6 pruebas para determinar la exactitud con placebo cargado, y 6 pruebas para estandarización de una materia prima representan un costo de N\$54,000.00

### 5.3 ANALISIS Y CONCLUSION

Al analizar el plan de validación, el cronograma y los costos correspondientes salta a la vista la complejidad de este trabajo.

En primer lugar la dificultad de conseguir un estandar internacional. Durante este trabajo se ha solicitado a la OMS un estándar internacional de referencia a través del National Institute For Biological Standards and Control en Londres, sin embargo, al igual que otros laboratorios farmacéuticos de México que actuaron directamente o a través de sus casas matrices en Europa, el intento fue infructuoso. En consecuencia se pensó utilizar el estandar USP de Estados Unidos de Norte America, sin embargo las unidades USP no tienen equivalencia con las unidades internacionales (UI) y además no existe factor de conversión oficial que pueda facilitar su uso como lo especifica la convención farmacopeica de la USP (ver anexo No 1).

En segundo lugar la hormona es una substancia tan costosa que cualquier estudio que la requiera debe de planificarse con cuidado, con más razón un estudio de validación que requiere un número elevado de datos para su análisis estadístico. Hablando de costos el estudio planeado requiere, solamente para gastos materiales, es decir materia prima, para reactivos y pruebas biológicas, una cifra que alcanza aproximadamente N\$100,000.00 si las pruebas se realizan por duplicado.

Ante estas situaciones, animados por el interés de poder substituir la prueba biológica por el método desarrollado de cuantificación de HCG por inhibición de hemaglutinación, varios laboratorios farmacéuticos de México con el aval de la Secretaría de Salud (ver anexo No 2) han decidido reunir sus esfuerzos para concluir los trabajos de validación necesarios, ya que las pruebas preliminares de validación en producto terminado utilizando materia prima como substancia de referencia han demostrado la utilidad del método desarrollado y su capacidad para cuantificar HCG en un medicamento.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES GENERALES

1.- La gonadotropina coriónica humana es una glucoprotéina que requiere para su buena conservación y estabilidad un manejo estéril, una protección contra la luz, la oxidación y la humedad.

2.- La estabilidad de la gonadotropina coriónica humana en una solución salina isotónica (SSI) es mejor cuando su concentración en ella es alta. Cuando la concentración es cercana a 1 UI/ml se constata una baja de concentración a las tres horas llegando a tener a las 24 horas menos del 50% de su título inicial. Por otra parte, cuando se tiene una concentración por lo menos igual a 1850 UI/ml la hormona es más estable conservando el 90% de su título después de 15 días de almacenamiento en refrigeración.

3.- La presencia de excipientes o de conservador no es un factor de importancia para prolongar la conservación de la HCG en solución salina isotónica. ( 1UI / ml )

4.- La estabilidad de la hormona en un buffer fosfato-albúmina pH 7.2 es muy buena ya que el título se conserva aproximadamente 3 meses. Con este diluyente sin embargo la interferencia en la valoración inmunológica (inhibición de hemaglutinación) se acerca a un 10%, por lo que su uso implica una fuente adicional de variación.

5.- El uso de un mismo estándar de referencia en UI que además tenga un título similar a la muestra a analizar, asegura mejores resultados en la comparación de pruebas, ya que existen varios estándares de pureza variable, producidos aún por la misma Organización Mundial de la Salud.

6.- El análisis de 6 muestras ( 3 materias primas y 3 productos terminados) con diferentes ensayos inmunológicos reveló algunos coeficientes de variación altos : 45% para una prueba de IRMA, 36% para un ELISA, 14% para un ensayo fluoroinmunométrico, 15% para una prueba de inhibición de hemaglutinación y 6% para un ensayo de hemaglutinación inversa, probado este último, solamente con 3 muestras.

La mejor correlación con la valoración biológica se consiguió con pruebas de hemaglutinación en tubo, destacándose el Neo-Pregnosticon 75 Duoclon con 105% y el UCG-Titration-Set con 92%. Para este último reactivo se utilizó un nuevo método de cuantificación desarrollado y presentado en este trabajo.

7.- El reactivo inmunológico seleccionado para valorar HCG en un medicamento fue el UCG-TITRATION-SET, por proporcionar un coeficiente de variación relativamente bajo y también una relativamente buena correlación con la valoración biológica. Estos resultados fueron obtenidos gracias al uso del método desarrollado, que permite lograr que este reactivo funcione de manera cuantitativa mediante la introducción de 6 modificaciones principales:

- 1) La medición del diámetro del anillo de inhibición de hemaglutinación, que nunca se había propuesto anteriormente.
- 2) El establecimiento de una relación lineal entre el diámetro del anillo y la inversa de la concentración final analizada. Esto se lleva a cabo con una serie de 8 diluciones de concentración final cercana a la sensibilidad del reactivo, a fin de determinar por interpolación el punto de equilibrio de la prueba, el cual corresponde a un anillo de 6 mm de diámetro.
- 3) El desarrollo de fórmulas que permiten tanto planificar la prueba como calcular el título final de la muestra analizada.
- 4) Es necesaria la determinación de la sensibilidad del reactivo justo antes de realizar un análisis de muestra, ya que la sensibilidad es un factor muy variable.

Se comprobó que la sensibilidad de estuches ya utilizados anteriormente presentan una sensibilidad de 10% menor a la que presenta un estuche nuevo del mismo lote.

- 5) La implantación del uso de material preciso y calibrado (pipetas automáticas y material de vidrio)
- 6) La normalización de la técnica en cuanto a estabilidad de las muestras a analizar.

8.- La validación parcial del método desarrollado ha determinado que existe una linealidad del sistema de medición cuyo coeficiente de determinación es de 0.9706. Una prueba preliminar de validación de la repetibilidad dio un coeficiente de variación de 9.72%, al determinar la sensibilidad de un lote de reactivo durante 6 análisis independientes.

9.- El método de cuantificación de HCG en un medicamento por el principio de inhibición de hemaglutinación en tubo, desarrollado como materia de esta tesis, ha sido probado por diferentes laboratorios farmacéuticos de México, quienes animados por el interés de contar con una prueba alterna para la valoración de HCG en un medicamento, actualmente están efectuando trabajos para ver la posibilidad de oficializar dicho método con la validación correspondiente, y con el aval de la Secretaría de Salud (ver Anexo 2).

10.- Finalmente, para concluir este trabajo, se presenta a continuación algunos objetivos ulteriores relacionados con la valoración de Gonadotropina Coriónica Humana en un medicamento:

### OBJETIVOS ULTERIORES

1.- Contar con un método inmunológico validado , representa una oportunidad de realizar pruebas adicionales tanto sobre producto intermedio como sobre producto terminado (estabilidad durante la fase de disolución, estabilidad durante la liofilización, estabilidad de los productos terminados en las condiciones climáticas, de almacenamiento y de distribución que prevalecen en México ). Esto a un costo menor y con una rapidez mucho mayor que la permitida por las pruebas biológicas.

2.- En caso de no obtener resultados de validación del método de inhibición de aglutinación suficientemente aceptables, se puede dirigir la investigación hacia el posible uso de un método de fijación del complemento para valorar HCG en el área farmacéutica. Este reactivo ya no se comercializa actualmente, pero si varios laboratorios estuvieran interesados en su uso, se podría solicitar nuevamente a un fabricante. En efecto se ha observado en varias publicaciones que los resultados obtenidos por este método dan una buena correlación con los valores obtenidos por valoración biológica. ( 19 )

3.- Sería muy práctico que a nivel mundial, todas las materias primas y por consiguiente todos los estándares tuvieran una pureza y un título comprendido dentro de un rango que fijaría la OMS. Para tal efecto se tendría que determinar un rango de recolección de orina de mujeres embarazadas en relación con el avance del embarazo, el grado de purificación requerido y finalmente pedir la anexación ,a todas las especificaciones ya aceptadas ,de una fotografía de la electroforesis que representaría una garantía de pureza de la muestra, sobre todo en cuanto a la presencia de subunidades libres.

Este tipo de normalización, aunque necesite tiempo para su establecimiento, limitaría la obtención de resultados aberrantes al comparar métodos y también evitaría la necesidad de realizar posteriormente las pruebas de pureza en cuanto al contenido de estrógenos.

4.- Analizar cual de los ensayos biológicos destinados a valorar la Gonadotropina Coriónica Humana, es el más preciso, exacto y específico. Los métodos varían según los países y se miden los aumentos de peso tanto en ovarios y útero como en vesículas seminales o próstata, situación que obviamente también genera una variabilidad entre los ensayos biológicos, que finalmente constituyen el único sistema de referencia aceptable en el área farmacéutica.

5.- Uniformar los diluentes utilizados en las valoraciones biológicas. Aunque la mayoría de las Farmacopeas utilizan una solución isotónica con buffer fosfato-albúmina pH 7.2, no todas la prescriben, entre ellas la Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos , y algunos solamente la prescriben para materia prima pero no para producto terminado. Esto permitiría comparar resultados con una mayor confiabilidad .

6.- Realizar pruebas de comparación entre valoraciones biológicas e inmunológicas con técnicas actualizadas para deducir en que rango de pureza de la HCG se consigue la mejor correlación, ya que estudios realizados en los años sesenta lo localizaban cerca de 2500 UI/mg. ( 59 )

## BIBLIOGRAFIA

- 1.-BOWMAN..C., Rand M.J., Farmacología, Nueva Editorial Interamericana, Barcelona 984p ( 1985 )
- 2.-LITTER Manuel, Compendio de Farmacología, Editorial El Ateneo, Buenos Aires (1984)
- 3.-TALAMANTES Frank, Ogren Linda, The placenta as an endocrin organ: polypeptides, The Physiology of Reproduction,Raven Press, Ltd,New York (1988)
- 4.-BAULIEU Etienne-Emile, Les Hormones, (1977)p18-19,p124-126
- 5.-HORMONE CHEMISTRY, Vol.1, (1973-1974) pps119,129,140,141,151-156
- 6.-Amer.J.Obstet Gynecol. 1977:129:785-808
- 7.-DRUG INFORMATION FOR THE HEALTH CARE PROFESSIONAL, Vol.IA, and Drug Information in Lay Language Vol.II ,9th. Ed, United States Pharmacopeial Convention Inc. (1989)pp1268-1269
- 8.- Findlay L.R. Alan, La Reproducción y el Feto, Ed. El Manual Moderno, México D.F. 239 p.(1987)
- 9.-OPTION BIO, LE JOURNAL DE L'ANALYSE MEDICALE ET DE LA BIOLOGIE CLINIQUE, Editions Scientifiques Elsevier,Paris  
9/1:# 74 (1992)  
9/2:# 55 (1991)  
9/3:# 66 (1991)
- 10.-RODRIGUEZ CARRANZA R.,Vademécum Académico de Medicamentos, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.(1984)
- 11.-GRIFF T, Ross, M.D.,Clinical Relevance of Research on the Structure of Human Chorionic Gonadotropin, Am.J.Obstet Gynecol. 129:795.(1977)
- 12.-NATHANSON,I.T., Towne.L.E. and Aub,J.C.,Endocrinology 28,851- 65(1941)
- 13.-BUTT W.R.,Hormone Chemistry, D.Van Nostrand Company Ltd, London (1967) 397p.
- 14.-BRADBURY,J.T., Brown E., and Brown W.E., Proc. Soc. Exptl.Biol. Med, 71,228-232 (1949)

- 15.-JOHNSEN, S.G. ,Acta Endocrinolo. , 20,101-105 (1955)
- 16.-VAN HELL et all, Bell et all, (1968-1969)
- 17.-MEERA CHATTERJEE and Hamish N. Munro, Structure and Biosynthesis of Human Placental Peptides Hormones, Vitamines an Hormones, (1977)
- 18.-Dictionnaire Vidal,11, Rue Quentin-Banchard,75384 Paris Cedex 08, 64 Ed (1988)
- 19.-STORRING p.l., Gaines-Das Rose E. and Bangham D.R. 2International Reference Preparation of Human Chorionic Gonadotrophin for Immunoassay: Potency estimates in various bioassay and protein binding assay systems, and International Reference Preparations of the alpha and beta subunits of HCG for immunoassay,Journal of Endocrinology(1980) 84, 295-310
- 20.-HELLMAN, L.M., Pritchard, J.A., Wynn, M.R., Obstetricia , 6a reimp, Salvat Editores, Barcelona,151-152 (1979)
- 21.-BULL.World Health Organ, Vol 54, 463-470 , Genève, OMS (1976)
- 22.-FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5a Ed, México, Secretaría de Salud. (1988)
- 23.-UNITED STATES PHARMACOPEIA XX, (1980)
- 24.-BRITISH PHARMACOPEIA, London ,Her Majesty's Stationery Office (1988)
- 25.-PHARMACOPEE FRANCAISE, X, Commission Nationale de Pharmacopée, Maisonneuve S.A. Editeur, 1986.
- 26.-JAWETZ E.,Melnick J.L., Adelberg E.A.,Microbiología Médica, Editorial El Manual Moderno,(1985)
- 27.-GUNARS, Inmunoconcentration-A New Format for Solid-Phase Inmunoassays, Clin. Chem.Sep 31(9) 1427-31 ( 1985)
- 28.- HELMAN Jose, Farmacotecnia Teórica y Práctica. Editorial Continental SA de CV, México, (1984)
- 29.- World health Organizaction , Biological Substances, International Standards and Reference Reagents,WHO,(1991)
- 30.- Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos , México.A.C. (1990)

- 31.- STEINBERG K.K., Cooper G.R, Graiser S:R., Some Considerations of Methodology and Standardization of Apolipoprotein A-I Immunoassays", Clin. Chem. 29/3/415-426, (1983)
- 32.-CHOH HAO LI, Hormonal proteins and peptides, Volume XI, Academic Press, Inc New York (1983)
- 33.-LITTER Manuel, Farmacología Experimental y Clínica, 7a ed. , El Ateneo, Argentina ,1986
- 34.-TALWAR G.P., Immunological Approach to Contraception and Promotion of Fertility, Plenum Press, NY and London, 1986
- 35.-ALEXANDER Nancy J., Gamete Interaction Prospects for Immunocontraception, Wiley-Liss Inc., New York, 1990
- 36.- GUYTON ARTHUR C. Dr., Tratado de Fisiología Médica , 2a ed., Ed . Interamericana, 1963
- 37.- PHARMACOPEIA OF JAPAN, XII ED., Society of Japanese Pharmacopeia, Yakusi Nippon, LTD, pp 32,271-273, 947, English (1978)
- 38.- PELCZAR MICHAEL J. Jr., Cham E.C.S. , Mc Graw-Hill, 1984
- 39.- NOEL R-ROSE, Friedman Herman, Fahey John L., Manual of Clinical Laboratory Immunology, Third Ed., American Society for Microbiology, Washington, 1986
- 40.-Bruanstein Glenn D., HCG Testing, Abbott Diagnostics Educational Services, Abbott Park Illinois, 1987
- 41.- BANGHAM D.R. and Grab B., The Second International Standard for Chorionic Gonadotrophin, Bull. Wld Hlth Org., 31, 111-125, (1964)
- 42.- J. Endocrinology (1980) , 84, 295-310
- 43.- OMS: Serie de Informes Técnicos: 1) 79 (638) 29,30  
2) 81(658) 24  
3) 87(760) 23,24
- 44.- PESCE J. Amadeo, Kaplan A. Lawrence, Methods in Clinical Chemistry, The C.V: Mosby Company, Washington , 1987
- 45.- ROSSENEN M, Vercaemst R., Steinberg K. and Cooper G.R., Some considerations of Methodology and Standardization of Apolipoprotein, B /immunoassay, Clin Chem, 29/3 427-433 (1983)

- 46.- LEUVERING J.H.W., Thal P.J.H.M., Schuurs A.H.W.M., Optimization of a Sandwich Chorionic Gonadotrophin, Journal of Immunological Methods, 62 ( 1985) 175-184
- 47.- WIDE Leif, An Immunological Method for the Assay of Human Chorionic Gonadotrophin, Uppsala 1962, Acta Endocrinologica supplementum 70, 1962
- 48.-VOGEL Arthur I., Quimica Analítica Cuantitativa , Volumen I, Ed. Kapelus, Buenos Aires, 1960, 779p
- 49.- PELCZAR Michael J., Chan Jr.E.C.S.; Elementos de microbiología, Mc Graw Hill, México, 1981, 730p
- 50.-DELFINA HCG, Instrucciones de uso del fluoroinmunoensayo a tiempo de resolución, Pharmacia, Wallac Oy, Turku, Finland, 1991
- 51.- HUSSA O.Robert, Clinical Utility of Human Chorionic Gonadotropin and alfa-subunit Measurements, Obstet Gynecol 60:1, 1982
- 52.- BOWMAN W.C.,Rand M.J.; Farmacología, Nueva Editorial Interamericana, México D:F., 1985
- 53.- HEMMILA Ilkka, Dakubu Salifú, Mukkala Veli-Matti, Siitari Harri and Lovgren Timo, Europium as a Label in Time-Resolved Immunofluorometric Assays, Analytical Biochemistry, 137, 335-343 (1984)
- 54.- HELL Van H., Matthijsen R. and Homan J.D.H. Studies on human Corionic Gonadotrophin, Acta Endocrinologica 59 (1968) 89-104
- 55.- TRAVIS Jeffrey C., Ligand Assay Update, Radioassay-Ligand Assay News, Vol .8, Nº 1, 1981
- 56.- OZTURK Mehmet, Berkowitz Ross, Goldstein Donald, Bellet Dominique and Wands Jack R., Differential Production of HCG and Free Subunits in Gestacional Trophobalstic Disease, Obstet Gynecol, 1988, 158:193-8
- 57.- SCHUURS A:H.W.M., Delver A., Van Wijngaarden C.J. and Verbon F.J., Statistically designed haemagglutination inhibition Tests, Journal of Immunological Methods, 1(1972) 133-144
- 58.- ROSENBERG Eugenia, GONADOTROPINS 1968, Geron-X INC.; Los Altos California, 1968, p227-237
- 59.-Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st symposium, Immunnoassays of gonadotropins. sept 23-25 1959.

November 9, 1990

## anexo 1

The United States  
Pharmaceutical Convention, Inc.

QFB Marianna Romo  
Servicios Technico  
Grupo Roussel S.A. De C.V.  
AV. Universidad 1738  
0400 Mexico D.F., MEXICO

FAX: 5-50 3579

Dear Ms. Romo:

We have received your inquiry on the USP Human Chorionic Gonadotropin Reference Standard (Cat. No. 29700, current lot: G).

1. The USP Chorionic Gonadotropin Unit is equal to the International Unit, if you compare it to the First International Unit of Human Chorionic Gonadotropin. However, the USP Unit is not equal to the current International Unit (2nd International Human Chorionic Gonadotropin Unit).
2. There is no official conversion factor to express the current IU in terms of the current USP Units.
3. Note in USP XXII, p. 614 the following statement under Reference Standard in the monograph for Chorionic Gonadotropin.

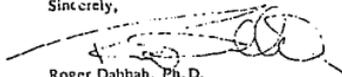
"USP Chorionic Gonadotropin Reference Standard - store in a refrigerator and do not dry before use. Use a fresh ampul for each group of assays, and discard any unused portion".

On the basis of this statement the reconstituted solution should not be stored for further usage.

The cost of one reference standard is \$85. The total cost for delivery to Mexico is \$185.00. The delivery time to Mexico is about 2 weeks following receipt of your order that has to be pre-paid. I am enclosing the page of the 1991 Catalog that gives you the address for your order.

Let me know if you need additional information.

Sincerely,



Roger Dabbah, Ph.D.  
Senior Scientist  
Drug Standards Division

Enclosure

RD:ew



SECRETARIA  
DE SALUD

## anexo 2

C.G.-2

DEPENDENCIA:	DIRECCION GENERAL DE CONTROL DE INSUMOS PARA LA SALUD
SECCION:	DIRECCION DE REGULACION SANITARIA DE ESTABLECIMIENTOS
NÚMERO DEL OFICIO:	402-
EXPEDIENTE:	M. ESCOBEDO No. 373, 5o. PISO, MEX. D.F.

### ASUNTO:

REUNION CELEBRADA EN LA DIGECIS - DIRECCION DE REGULACION SANITARIA DE ESTABLECIMIENTOS EL DIA PRIMERO DE OCTUBRE DE MIL NOVECIENTOS NOVENTA Y TRES, CON EL OBJETO DE VERIFICAR EL AVANCE EN EL METODO ALTERNIO PROPUESTO PARA LA VALORACION DE LA GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA EN PRODUCTO TERMINADO.

POR PARTE DE LA DIRECCION DE REGULACION SANITARIA DE ESTABLECIMIENTOS:

I.Q. EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ  
DIRECTOR DE REGULACION SANITARIA DE ESTABLECIMIENTOS

Q.F.B. ROSA B. JOSEFINA LISCI GARMILLA  
JEFE DEL DEPTO. DE COORDINACION TECNICA Y SUPERVISION

Q.F.B. ELOISA MARTINEZ MENDEZ  
DICTAMINADORA DE LA SECCION DE ANTIBIOTICOS

Q.F.I. RODOLFO GOMEZ SIERRA  
DICTAMINADOR DE LA SECCION DE ANTIBIOTICOS

POR PARTE DE LA INDUSTRIA FARMACEUTICA:

Q.F.I. EDITH IZQUIERDO MALAGON  
LABORATORIOS ORGANON MEXICANA, S. A.  
GARANTIA DE CONTROL DE CALIDAD

Q.F.B. ANTONIO ROLDAN MENDOZA  
LABORATORIOS ORGANON MEXICANA, S. A.  
RESPONSABLE SANITARIO

AL FAVORABLE EN EL OFICIO, CÍTASE POR  
ANSUARIO SUPERIOR DIRECTIVO.



SECRETARIA  
DE SALUD

C.G.-2

DEPENDENCIA:	_____
SECCIÓN:	_____
MESA:	_____
NÚMERO DEL OFICIO:	_____
EXPEDIENTE:	_____

ASUNTO:

- 2 -

Q.F.B. VELIA LOPEZ ORTIZ  
GRUPO ROUSSEL, S. A. DE C. V. *VL*  
RESPONSABLE SANITARIO

Q.F.B. MARIANA ROMO  
GRUPO ROUSSEL, S. A. DE C. V. *MR*  
DEPTO. DE SERVICIO TECNICO

Q.F.I. GUILLERMO DOMINGUEZ  
LABORATORIOS SERONO DE MEXICO, S.A. DE C.V.  
RESPONSABLE SANITARIO

Q.F.B. ESTHER GONZALEZ DE JIMENEZ  
LABORATORIOS SAIFER, S. A. DE C. V.  
RESPONSABLE SANITARIO

Q.F.B. JUANA MARTINEZ GONZALEZ  
CARTER WALLACE, S. A.  
RESPONSABLE SANITARIO *JMG*

DR. JESUS FAINSOD L.  
CARTER WALLACE, S. A.,  
DIRECTOR DE LA DIVISION FARMA

I.Q. RAUL ARROYO OSORIO  
QUIMICA ESTEROIDAL, S. A. DE C. V.  
DIRECTOR TECNICO

Q. MA. LILIA GARCIA *MLG 8-11-93*  
GRUPO ROUSSEL, S. A. DE C. V.  
GERENTE DE SERVICIOS TECNICOS



SECRETARIA  
DE SALUD

C.G.-2

DEPENDENCIA:	_____
_____	_____
SECCIÓN:	_____
MESA:	_____
NÚMERO DEL OFICIO	_____
EXPEDIENTE	_____

ASUNTO:

- 3 -

EN ESTA REUNION SE PRESENTO EL TRABAJO INMUNOLOGICO REALIZADO POR EL METODO DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION EN TUBO. EL CUAL FUE DESCRITO POR LA Q.F.B. MARIANA ROMO, QUIEN LO HA VENIDO DESARROLLANDO DESDE SUS INICIOS, DICHO ESTUDIO NO SE HA PODIDO CONCLUIR DEBIDO A LA FALTA DE ESTANDAR, SE DECIDIO CONJUNTAMENTE SOLICITAR AL FABRICANTE DE LA MATERIA PRIMA (DIOSYNTH B.V.) UNA CANTIDAD DE DICHA MATERIA PRIMA A FIN DE HABILITARLA COMO ESTANDAR Y ASI PODER CONTINUAR CON LOS ESTUDIOS CORRESPONDIENTES.

SE EFECTUARA UNA REUNION PARA PODER SEGUIR DE CERCA LOS AVANCES EN EL -- DESARROLLO DEL NUEVO METODO EL DIA VEINTIOCHO DE ENERO DE MIL NOVECIENTOS NOVENTA Y CUATRO A LAS NUEVE HORAS EN LA DIGECIS - MARIANO ESCOBEDO No.373 So. PISO, COL. CHAPULTEPEC MORALES, MEXICO, D.F.