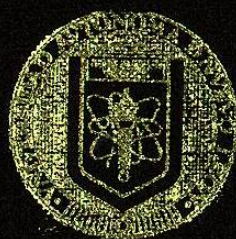


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UTILIZACION DE LA REACCION INMUNOLOGICA  
CRUZADA ENTRE HORMONA LUTEINIZANTE (LH)  
Y GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG)  
MEDIANTE UN METODO DE CONCENTRACION  
PARA SU DETERMINACION EN DIFERENTES  
CONDICIONES CLINICAS.

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN BIOLOGIA CELULAR  
POR  
Q.B.P. LILI RODRIGUEZ BLANCO

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1987



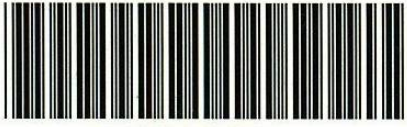
TM

Z532

FCB

1987

R6



1020066501

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UTILIZACION DE LA REACCION INMUNOLOGICA  
CRUZADA ENTRE HORMONA LUTEINIZANTE (LH)  
Y GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG)  
MEDIANTE UN METODO DE CONCENTRACION  
PARA SU DETERMINACION EN DIFERENTES  
CONDICIONES CLINICAS.

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN BIOLOGIA CELULAR

POR

Q. B. P. LILI RODRIGUEZ BLANCO

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1987

FM  
25320  
FCB  
1987  
R6



161765

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

UTILIZACION DE LA REACCION INMUNOLOGICA CRUZADA ENTRE HORMONA LUTEINIZANTE (LH) Y GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG), MEDIANTE UN METODO DE CONCENTRACION PARA SU DETERMINACION EN DIFERENTES CONDICIONES CLINICAS.

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA CELULAR

POR

Q.B.P. LILI RODRIGUEZ BLANCO


COMISION DE TESIS:

APROBADA:

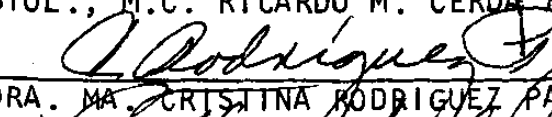
DIRECTOR:

  
DR. RAUL GARZA CHAPA

SECRETARIO:

  
BIOL., M.C. RICARDO M. CERDA FLORES

VOCAL:

  
DRA. MA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

DIRECTOR EXTERNO:

  
DR. GERARDO FORSBACH SANCHEZ

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1987

## DEDICATORIA

A mi Esposo, con amor y respeto:

Ya que gracias a su apoyo y comprensión,  
he logrado alcanzar una meta más en mi  
formación profesional.

LUIS HERNANDEZ SANCHEZ

A mis Padres:

Por su amor y cariño, que me dieron la  
confianza y seguridad en la vida.

SOCORRO BLANCO DE RODRIGUEZ

LEONARDO RODRIGUEZ SOBREVILLA

A mis Hermanos:

Por el cariño y comprensión que siempre  
me han brindado.

ROSALINDA Y JOSE LUIS

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Forsbach Sánchez, Director de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, por todo el apoyo brindado durante mi formación profesional como Becaria de Investigación, por su ayuda y asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Joffre Velázquez, Jefa del Departamento Clínico del Hospital de Ginecoobstetricia Dr. Ignacio Morones Prieto del IMSS, por su amistad y todo el apoyo brindado para que se llevara a cabo este trabajo, en el Laboratorio de Hormonas a su cargo en dicho Hospital.

Al Dr. Raúl Garza Chapa, Jefe de la División de Genética de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, por todos sus consejos y atenciones durante la revisión de este trabajo, además del apoyo brindado durante mi formación profesional y como Becaria de Investigación.

Al Biól., M.C. Ricardo Martín Cerda Flores, por el apoyo brindado en el análisis estadístico y las sugerencias en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Ma. Cristina Rodríguez Padilla, por las sugerencias en la revisión de esta tesis, además de su comprensión y amistad.

A la Srta. Q.F.B. Ramona de Hoyos Garza, por su linda amistad, su gran capacidad de análisis, y el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.



A la Srita. Q.C.B. Magdalena Mota Morales, por su gran amistad, ayuda desinteresada y estímulo brindados durante la realización de este trabajo.

A la Srita. Ma. Asunción Ruiz Rocha, por su amistad sincera y camaradería, la comprensión y ayuda brindadas durante el desarrollo de este trabajo.

A la Sra. Yolanda Benavides, por su amistad, comprensión y ayuda desinteresada, durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Jesús Contreras Soto, por su amistad sincera, estímulo y confianza en la realización de este trabajo.

Al Q.B.P. Guillermo González Quiroga, por su gran amistad y estímulo durante el desarrollo de este trabajo, y la revisión de la tesis.

A la Srita. Ma. de los Angeles Tamez Pedraza, por su gran amistad, comprensión y ayuda invaluable durante mi formación como Becaria de Investigación.

Al Q.B.P. Zacarías Jiménez Salas, por su amistad durante nuestra formación profesional y sugerencias en el análisis de los resultados de esta tesis.

A la Q.B.P. Adriana Sampayo Reyes, por su amistad y camaradería durante nuestra formación profesional.

Al Sr. Luis Rodríguez Rodríguez y al Sr. Ignacio Atristáin Alarcón, Jefe del Departamento de Personal y Administrador de la Uni-

dad de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS respectivamente, mi agradecimiento sincero por todas sus atenciones y ayuda brindadas como Becaria de Investigación.

Al Dr. Juan Antonio Luna de la Rosa, por su amistad y la elaboración del material fotográfico para la presentación de este trabajo.

A la Sra. Rosa Nelly Flores Gonzalez por sus finas atenciones y la realización del trabajo mecanográfico de esta tesis.

A mis Maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas, a mis Compañeros y Amigos, y a quienes de una manera u otra hicieron posible la realización de esta tesis, mi más sincero agradecimiento.

# I N D I C E

	Página
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
HIPOTESIS .....	4
OBJETIVOS .....	6
ANTECEDENTES .....	7
- Gonadotropina Coriónica Humana en Embarazo Normal y Enfermedades del Trofoblasto .....	7
- Hormona Luteinizante en Ovulación y Clima- terio .....	11
MATERIAL Y REACTIVOS .....	15
METODOS .....	17
RESULTADOS .....	22
DISCUSION .....	29
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	34
LITERATURA CITADA .....	35
FIGURAS Y CUADROS .....	43

## RESUMEN

En el presente trabajo, se desarrolló un método simplificado para concentración de gonadotropinas (MCG), con el cual se obtuvo un 79% de recuperación de HCG, concentrando la orina durante 24 horas, el cual difiere en forma significativa a la recuperación de HCG en una hora ( $P < 0.05$ ). Se obtuvo un 6% de reacción cruzada de LH con HCG por EIA, tanto con Pergonal como con estándares purificados de LH (2nd-IRP, HMG); esto se hizo con el objeto de interpretar correctamente la actividad HCG en los concentrados urinarios. Respecto a la aplicación del MCG:

- Se logró detectar actividad HCG por EIA, exclusivamente en el 66% de las mujeres sanas sin antecedentes de neoplasia, y su presencia no fué causada por la reacción cruzada con LH. La LH por RIA, se comportó similar en hombres y mujeres, excepto en aquellas en días cercanos a su ovulación o en premenopausia.
- En la determinación de LH en climaterio y ovulación por reacción cruzada con HCG, se logró una positividad de actividad LH/HCG, del 85 y 80% respectivamente, mediante IH para HCG.
- En la determinación de actividad trofoblástica en embarazo normal y enfermedad del trofoblasto, se aumentó la sensibilidad para IH de ocho a 16 veces (en base a diluciones 1:2), respecto a la concentración inicial de HCG, dependiendo de la sensibilidad del estuche diagnóstico usado (Gravindex o Pregnosticon).

El MCG, dá otras alternativas, puede ser utilizado en cualquier laboratorio clínico, y ser aplicado en cualquier condición clínica que presente bajas concentraciones de gonadotropinas, que pueden ser determinadas por IH, RIA o EIA.

## INTRODUCCION

La gonadotropina coriónica humana (HCG) y la hormona luteinizante (LH), son hormonas glicoprotéicas con actividades biológicas e inmunológicas similares. La HCG es secretada por la placenta y circula normalmente durante el embarazo, aunque se ha detectado en algunas neoplasias. En cambio, la LH es secretada por la adenohipófisis y puede detectarse fácilmente en la circulación después de la pubertad en ambos sexos.

Ambas hormonas, están compuestas por dos subunidades distintas, subunidad alfa ( $\alpha$ ) y subunidad beta ( $\beta$ ), unidas en forma no covalente por enlaces disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  de HCG y LH, poseen estructuras primarias semejantes y consecuentemente son inmunológicamente similares. En cambio, existen diferencias importantes entre la estructura primaria de sus subunidades  $\beta$ , especialmente en el extremo carboxilo - terminal de la  $\beta$ -HCG, que no se encuentra en la  $\beta$ -LH; esta diferencia pequeña pero determinante, ha dado lugar al desarrollo de métodos inmunológicos altamente sensibles y específicos, como el radioinmunoanálisis (RIA) y métodos inmunoenzimáticos (EIA, anteriormente llamados ELISA), que permiten la detección selectiva de HCG, aún en presencia de LH.

Sin embargo, pese a la alta sensibilidad de estos métodos, existe una gran variedad de condiciones clínicas, en las cuales las gonadotropinas se encuentran en concentraciones menores que el



límite de la sensibilidad de los ensayos utilizados actualmente para su determinación. Con el propósito de eliminar esta limitación, se han desarrollado métodos para concentrar gonadotropinas urinarias, y aumentar la sensibilidad de los ensayos. Sin embargo, su alto costo y laborioso proceso, los ha hecho útiles solo a nivel de hospitales de especialidades y centros de investigación, no siendo utilizados aún a nivel de rutina.

La importancia del presente trabajo, radica en la evaluación y aprovechamiento de la reactividad inmunológica cruzada que presentan LH y HCG, para su determinación por las técnicas convencionales de inhibición de la hemaglutinación (IH), tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, así como el incremento en la sensibilidad de estos ensayos mediante procedimientos sencillos para la concentración de gonadotropinas, que puedan realizarse en cualquier laboratorio de análisis clínicos.

En base a esto, se planteó la siguiente hipótesis: mediante un método simplificado para la concentración de gonadotropinas en orina, y la utilización de la reacción cruzada entre LH y HCG, se aumentará la sensibilidad de las técnicas convencionales para su determinación.

Si la capacidad de recuperación del método es conocida y pueden utilizarse los métodos de IH, RIA y EIA, el incremento en la sensibilidad permitirá detectar concentraciones de HCG en individuos normales y posteriormente, se puede aplicar en la detección tem-

prana de actividad trofoblástica, así como también para detectar LH en ovulación y climaterio principalmente. El límite de la sensibilidad vá a depender del tipo de ensayo usado.

**OBJETIVOS**

- 1) Desarrollar un método sencillo y reproducible para la concentración de gonadotropinas urinarias (LH y HCG).
- 2) Evaluación y comparación del método para concentración de gonadotropinas, en la determinación de LH y HCG por los métodos convencionales de IH, RIA y EIA.
- 3) Aplicación y evaluación clínica del método en la detección de LH y HCG, en las condiciones clínicas siguientes: ovulación, climaterio y enfermedades del trofoblasto.

## ANTECEDENTES

### Gonadotropina Coriónica Humana en Embarazo Normal y Enfermedades del Trofoblasto.

La gonadotropina coriónica humana, es una glicoproteína secretada por la placenta (sincitiotrofoblasto), que aparece en circulación después de la implantación embrionaria, tiene un peso molecular de 57 000 daltons (Colston, 1981). Dicha hormona, está compuesta por dos subunidades diferentes unidas en forma no covalente por enlaces disulfuro. La subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$ , (Vaitukaitis et al., 1976b). La primera es bioquímica e inmunológicamente similar a la subunidad  $\alpha$  de otras hormonas glicoprotéicas, tales como: la hormona luteinizante, la hormona estimulante del folículo (FSH) y la tirotropina (TSH), mientras que las subunidades  $\beta$ , responsables de la especificidad biológica para cada una de estas hormonas, son diferentes entre sí en la secuencia de aminoácidos (Morgan y Canfield, 1971). El patrón de secreción de HCG durante el embarazo, es similar cuando se utilizan métodos biológicos e inmunológicos para su determinación, siguiendo un comportamiento pulsátil (Owens et al., 1981; Ayala et al., 1984a), su concentración máxima se presenta de la séptima a décima semana de gestación y declina a niveles bajos durante el resto del embarazo, desapareciendo de circulación normalmente una semana después del parto (Marshall et al., 1968; Owens et al., 1981). Entre las funciones biológicas de la HCG más importantes pueden mencionarse las siguientes (Colston,

1981; Zárate et al., 1982):

- 1) Función Luteotrópica. La HCG estimula al cuerpo lúteo para que produzca progesterona y estrógenos, esenciales para el mantenimiento del embarazo temprano, constituyendo así un buen marcador del embarazo.
- 2) Diferenciación Sexual. Las células de Leydig de los testículos fetales, son estimuladas por la HCG en el embarazo temprano, para la secreción de testosterona que juega un papel importante en la diferenciación sexual del feto.
- 3) Se cree también, que la HCG protege al embrión contra el rechazo inmunológico, formando una barrera molecular entre la unidad fetoplacental y los tejidos maternos.

La metodología para el diagnóstico del embarazo, se ha basado desde hace aproximadamente 58 años en la detección de HCG. A partir de esta fecha, se ha avanzado en el conocimiento de su molécula, así como, en el desarrollo de nuevas técnicas para su determinación; las cuales han evolucionado desde el bioensayo, métodos inmunológicos, radioinmunoanálisis, radioreceptores (RRA), hasta los métodos inmunoenzimáticos.

En 1928, Aschheim y Zondek desarrollaron el primer bioensayo confiable para la determinación de HCG, constituyendo así, la primera generación de pruebas para el diagnóstico del embarazo, basadas en las propiedades luteinizante y luteotrópica de dicha hor-

mona, la cual produce cambios importantes en los órganos sexuales de animales prepúberes de laboratorio, a los que se les inyectaba orina de mujeres embarazadas, aprovechando la característica de lograr el efecto biológico en otras especies. Estas representan gran especificidad pero son laboriosas y tardadas (Burr, 1975; Krieg y Henry, 1979).

Wide y Gemzell (1960) introdujeron la primera prueba inmunológica para la HCG, basada en una reacción de inmunohemaglutinación (IH). Dicha prueba se basa en la capacidad de la HCG para estimular la producción de anticuerpos, que son capaces de neutralizar HCG en sangre y orina de mujeres embarazadas.

Posteriormente, se desarrollaron métodos más sensibles y específicos, como el RIA (Vaitukaitis et al., 1972a) y el de RRA (Saxena et al., 1974), capaces de detectar concentraciones extremadamente bajas de HCG, que se presentan en el embarazo temprano y con capacidad discriminatoria para LH, en el caso del RIA. El RIA, está basado en el mismo principio de los métodos inmunológicos, solo que aquí se utilizan preparaciones purificadas de HCG marcadas con Yodo radiactivo. Otro de estos métodos, con sensibilidad y especificidad elevada, es el inmunoenzimático, como su nombre lo indica los anticuerpos están conjugados a enzimas, en lugar de usar radioisótopos, lo cual le da ventaja sobre el RIA (Engvall y Perlmann, 1971; Forsbach et al., 1984).



Sin embargo, aunque estos métodos son muy sensibles y específicos, su uso está limitado a laboratorios equipados para el manejo de material radiactivo (en caso del RIA y RRA), y a la importación de los estuches diagnósticos (RIA, RRA y EIA).

La HCG, además de secretarse durante el embarazo, se secreta en forma ectópica en enfermedades del trofoblasto y algunas enfermedades no trofoblásticas (Vaitukaitis, 1976a; Mitchell y Bagshawe, 1976; Ayala et al., 1984b), por lo cual constituye un marcador tumoral eficiente en estas enfermedades.

La enfermedad del trofoblasto, es un proceso del corion de la placenta, dentro de sus variantes se encuentran la mola hidatiforme o embarazo molar, el corioadenoma destruens y el coriocarcinoma (Buckeley, 1984). La mola que invade el miometrio, se le llama corioadenoma destruens. El coriocarcinoma, es un tumor anaplásico compuesto de sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto que invade el miometrio causando hemorragia y necrosis, puede producir metástasis, a diferencia de las anteriores, no contiene vellosidades. El coriocarcinoma se origina en el 50% de los casos, de un embarazo molar y en el otro 50% proviene de abortos, embarazos normales y ectópicos (Zárate et al., 1982). Independientemente de su origen, el coriocarcinoma se caracteriza por su diseminación rápida, de aquí la importancia de un diagnóstico temprano para tener un tratamiento oportuno.

En nuestro País, la frecuencia de mola hidatidiforme es de uno

por cada 200 embarazos; mientras que en los Estados Unidos de Norteamérica es de uno por cada 1700 embarazos (Buckeley, 1984). La secreción de HCG en estas enfermedades, ha tenido una importancia clínica relevante, utilizándola como un marcador en el seguimiento de individuos con tumores trofoblásticos (Khoo y Daunter, 1980; Khoo, 1982; Ayala et al., 1984c). La persistencia de niveles anormales de HCG en el seguimiento de estos pacientes, es un indicador para la continuación del tratamiento, y el mantenimiento de niveles normales (menores de 10mUI/ml, por EIA) cuando menos durante un año, es criterio de curación de la enfermedad (Wehmann et al., 1981).

#### Hormona Luteinizante en Ovulación y Climaterio.

La hormona luteinizante, es una glicoproteína producida por la adenohipófisis junto con la FSH, su peso molecular es de 30 000 daltons, y al igual que en la HCG (con la que presenta gran similitud), la subunidad  $\beta$  es la que le confiere su actividad biológica específica (Wide, 1976). Sin embargo, existe una diferencia marcada entre la subunidad  $\beta$  de ambas hormonas, ésta consiste en una secuencia de aminoácidos localizados en la fracción carboxilo - terminal de la  $\beta$ -HCG, que no se encuentran en la  $\beta$ -LH (Vaitukaitis et al., 1976b). Por consiguiente, los antisueros generados para la forma nativa de HCG, LH o sus subunidades  $\alpha$ , poseen una especificidad menor que los antisueros producidos para la  $\beta$ -HCG, que discriminan entre LH nativa y HCG.

En base a esta diferencia selectiva, se desarrollaron los métodos del RIA y EIA, eliminando así la reacción cruzada entre ambas hormonas (Vaitukaitis et al., 1972a).

La LH estimula la maduración del folículo de De Graff, la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo, induciendo la producción de estrógenos y progesterona por los ovarios. En la mujer, durante su período de vida reproductivo, se produce una interacción muy compleja entre el hipotálamo, la hipófisis y la gónada (Zárate et al., 1982). La LH es secretada a concentraciones muy variables durante todo el ciclo menstrual y presenta un aumento máximo antes de iniciarse la ovulación (Mishell, 1966). En casos de castración o pérdida de función gonadal, se observan niveles muy elevados de LH y FSH, que sobrepasan de cinco a 15 veces los niveles normales (Wide, 1976).

El climaterio, es la etapa fisiológica en la vida de la mujer que se caracteriza por la terminación de la capacidad reproductiva de los ovarios, seguida por una serie de ajustes endócrinos que se manifiestan por alteraciones menstruales, anovulación y el cese de la menstruación. El término menopausia, solo indica la fecha de la última menstruación que ocurre durante el climaterio. La edad promedio en que ocurre la menopausia, varía entre los 45 y 50 años, se considera que ha ocurrido la menopausia precozmente cuando aparece antes de los 35 años (Zárate et al., 1982). El climaterio se divide en manifestaciones premenopáusicas y postmenopáusicas. La postmenopausia, se acompaña de un

aumento progresivo en la secreción de gonadotropinas (LH y FSH), niveles elevados de éstas, se presentan aún antes de la menopausia, detectándose en orina concentraciones muy por encima de las observadas en edad reproductiva (Fernández del Castillo y Ayala, 1983).

El primer método inmunológico para el análisis de gonadotropinas hipofisiarias, usó una prueba basada en la inhibición de la hemaglutinación (Mishell, 1966). Posteriormente apareció el RIA que desplazó estas técnicas.

Desde el inicio del bioensayo, ya se utilizaban técnicas de concentración para las gonadotropinas en orina y suero, las cuales eran laboriosas y complicadas; subsecuentemente se desarrollaron otras técnicas más perfeccionadas, algunas de éstas sencillas, que se han utilizado bajo ciertas condiciones clínicas, principalmente por IH y RIA (Marshall et al., 1968; Schreiber et al., 1976; Kulin y Santner, 1977). Debido a lo complicado y en algunos casos su costo elevado, el uso de estas técnicas de concentración se ha restringido casi totalmente a nivel de investigación; además, han sido consideradas innecesarias con el desarrollo del RIA y EIA. Sin embargo, estos métodos no pueden ser utilizados en cualquier laboratorio, además bajo ciertas condiciones clínicas éstos son incapaces de detectar gonadotropinas, por encontrarse éstas en concentración más baja que el límite de sensibilidad de dichos métodos (Schreiber et al., 1976; Kulin y Santner, 1977). Por lo que, nuevamente se han

utilizado y desarrollado técnicas de concentración para gonadotropinas en orina, principalmente con el propósito de aumentar la sensibilidad del RIA, siendo de gran utilidad en el área clínica y experimental (Ayala et al., 1978; Wehmann et al., 1981).

Una de las razones principales para utilizar concentrados urinarios en la determinación de gonadotropinas, es que el nivel de HCG en orina de 24 horas, equivale al de HCG detectada en 1 000 ml de suero (Marshall et al., 1968). Además, se ha observado que estos concentrados son potencialmente más efectivos que las determinaciones en suero, ya que se puede detectar la persistencia de cantidades pequeñas de tejido trofoblástico secretor de HCG; aún cuando esta hormona todavía no es detectable en el suero (Schreiber et al., 1976; Ayala et al., 1978; Whemann et al., 1981).

## MATERIAL Y REACTIVOS

### A. Material Biológico

Primera orina de la mañana de individuos voluntarios, normales y en diferentes condiciones: ovulación, climaterio, enfermedades del trofoblasto y embarazo normal.

### B. Equipo y Reactivos

- Contadores de radiación gamma, Gamacord II Ames-Miles.
- Espectrofotómetro Quantum II, Abbott Laboratories.
- Balanza Analítica Sartorius, Werke GMBH Göttingen.
- Centrifuga refrigerada automática, Sorvall General-Purpose.
- Centrifuga clínica, International Equipment Co.
- Refrigerador normal (4°C), Kelvinator.
- Congelador (-20°C), American.
- Bomba de distribución Gorman-Rupp TM, Abbott Laboratories.
- Pentawash II, Abbott Laboratories.
- Rotador clínico con movimiento circular 3/4", Clay Adams.
- Agitador vortex, Lab-Line Instruments, Inc.
- Pipetas de precisión de 100 y 200 ul, Oxford Laboratories Inc.; 300 y 1 000 ul, Helena Laboratories.
- Baño de agua (37°C) Thelco, Precision Scientific Co.
- Esponja para decantar, Diagnostic Products Corporation.
- Vidriería común de laboratorio.
- Estuches para LH-RIA, Diagnostics Products Corporation.



- Estuches para  $\beta$ -HCG-EIA, Abbott Laboratories.
- Estuches para HCG Gravindex, Ortho Diagnostics.
- Estuches para HCG Pregnosticon, Organon Teknika.
- Buffer de fosfatos pH 7.4.
- Acetona y Etanol, Merck.

## MÉTODOS

Los procedimientos desarrollados para IH, RIA y EIA, fueron los descritos por cada casa comercial en los estuches diagnósticos para HCG,  $\beta$ -HCG y LH, utilizados convencionalmente en el área clínica y de investigación.

A. Análisis Preliminar. Selección de la muestra biológica adecuada. En el estudio de las gonadotropinas urinarias, siempre ha habido controversia para utilizar la muestra adecuada en su determinación, esto es debido principalmente al tipo de secreción pulsátil que presentan (Kulin y Santner, 1975; Owens et al., 1981; Ayala et al., 1984a); en general se utiliza orina de 24 horas, aunque ya se han hecho estudios sobre esto, utilizando orina de periodos cortos (Kulin et al., 1975; Kulin y Santner, 1977; Urban et al., 1977) con buenos resultados; otro de los inconvenientes es la difícil obtención, en el caso de la orina de 24 horas.

Para fines de este estudio, se analizó el comportamiento de la HCG en el transcurso del embarazo, simultáneamente en primera orina de la mañana y orina de 24 horas, en un grupo de cinco mujeres con embarazo normal. A éstas, se les hicieron titulaciones de HCG simultáneamente en primera orina de la mañana y orina de 24 horas cada semana, a partir de la séptima semana de gestación, hasta la semana 16. Las muestras se procesaron de la siguiente forma:

- 1) Medir el volúmen de las dos muestras de orina.
- 2) Tomar una alícuota (5 ml) de la primera orina de la mañana, y el resto se mezcló con la orina de 24 horas; tomando también una alícuota igual.
- 3) Centrifugar las dos alícuotas.
- 4) Titular la HCG con Gravindex (sensibilidad: 3 500 UI HCG/1), haciendo diluciones seriadas e intermedias.
- 5) Los resultados se almacenaron para su interpretación posterior.

El primer paso del trabajo experimental consistió en:

B. Desarrollar un Método de Concentración para Gonadotropinas (MCG). Para esto se seleccionaron dos solventes (etanol y acetona), ya descritos en otros trabajos como agentes precipitantes de gonadotropinas urinarias (Mitchell y Bagshawe, 1976), se probaron simultáneamente para seleccionar el mejor precipitante, utilizando estándares de HCG de concentración conocida (Gonadotropeyl Roussel, 5 000 UI). Una característica del MCG, es que debe ser lo más simple posible para utilizarlo en el laboratorio como rutina para hormonas glicoprotéicas, la metodología fué la siguiente:

- 1) El estándar de HCG (5, 15 y 50 UI), se diluyó en orina de un varón, la cual era negativa para HCG, ajustada a un pH de 4.5.

- 2) Unas muestras (orina más HCG), se precipitaron con alcohol (etanol) al 96% y otras con acetona, ambos solventes en una relación 4:1, respecto al volumen de orina, se dejaron reposar a 4°C durante una hora.
- 3) Se centrifugó la mezcla anterior para obtener el precipitado, que se disolvió (previamente seco) en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, obteniéndose finalmente la HCG en el sobrenadante, que se tituló con Pregnosticon (sensibilidad; 1 000 UI/l).
- 4) Este procedimiento se repite hasta obtener resultados adecuados, eliminando interferencias que se presenten, hasta su completa estandarización.

C. Determinación de la Capacidad de Recuperación del Método.

Para este punto, se utilizaron estándares de concentración conocida (Gonadotropl Russell y HCG purificada de Ortho Diagnostics), que se sometieron al MCG, teniendo como base la concentración inicial del estándar y la concentración final (después de procesado), para determinar el porcentaje de HCG que se recupera durante el proceso. La HCG se midió por IH (Pregnosticon) y EIA.

- D. Determinación de la Reacción Cruzada entre LH y HCG. Con el uso de estándares purificados de LH (2nd IRP, HMG) de concentración conocida (Diagnostic Products Corporation (DPC), Cis-Sorin,

Clinical Assays (CA) y Pergonal (Gonadotropina Menopáusica Humana (HMG)), mediante un ensayo de EIA para  $\beta$ -HCG, se determinó el porcentaje de reacción cruzada que presentan LH y HCG en ese ensayo. Con este dato, es posible conocer el efecto de ambas hormonas en los concentrados urinarios.

E. Aplicación del MCG en Individuos Testigo, Determinando su Reproducibilidad y Efectividad. Para este punto, a todos los individuos se les pidió, colectaran la primera orina de la mañana, para efectuar la determinación correspondiente.

- Individuos Normales. Estos comprendieron un grupo de 12 hombres y 12 mujeres, para determinar los valores urinarios normales de LH y HCG por RIA y EIA respectivamente, tomando en cuenta su edad; en las mujeres su fecha de última menstruación (FUM) y fecha esperada de la siguiente menstruación (FEM), para su interpretación final.
- Detección del Pico Ovulatorio de LH. Se seleccionó un grupo de 20 mujeres sanas que no recibieron medicamentos, menores de 35 años, menstruando regularmente. Cada una colectó la orina correspondiente a las días 12, 13, 14, 15 y 16, dependiendo de su ciclo menstrual (generalmente ciclos de 28 a 30 días), calculados en base a la FUM y FEM. Se utilizó IH para HCG (Pregnosticon), mediante reacción cruzada con LH.
- Determinación de LH en Climaterio. Se seleccionaron 20

mujeres mayores de 45 años o con más de dos años sin menstruar, y sin tratamiento hormonal, determinándose LH por IH para HCG (Pregnosticon) mediante su reacción cruzada.

- Determinación de HCG en Embarazo Normal (EN) y Enfermedades del Trofoblasto (ET). Se seleccionaron dos pacientes con EN y cuatro pacientes con ET, con determinaciones previas de HCG, titulándose por IH (Gravindex y Pregnosticon), después de someterse al MCG.

F. Análisis Estadístico. Para analizar el comportamiento de la HCG durante el embarazo normal, de cinco mujeres sanas en la primera orina de la mañana y la orina de 24 horas, se utilizó Análisis de Varianza Bifactorial y Comparación de Medias por el Método de Newman - Keuls (Zar, 1974); de igual forma se utilizó el Análisis de Varianza Bifactorial para determinar la capacidad de recuperación del MCG, con estándares de HCG (Roussell y Ortho Diagnostics) durante una y 24 horas de concentración.

## RESULTADOS

### A. Desarrollo de un Método Sencillo y Reproducible para la Concentración de Gonadotropinas Urinarias (LH y HCG).

- Selección de la muestra biológica adecuada. En la Fig. 1, se muestra el comportamiento de la HCG durante el embarazo normal de cinco mujeres, con edad promedio de 30 años (límites de 23 a 35 años), en la primera orina de la mañana y en la orina de 24 horas. En ésta, se puede observar el comportamiento típico de la HCG durante el embarazo normal en ambas muestras, presentando un pico máximo de la séptima a la octava semana de gestación, declinando sus niveles durante el transcurso del embarazo. El análisis estadístico de ambas muestras se hizo por Análisis de Varianza Bifactorial (Cuadro 1A), observándose que el tipo de orina (primera orina de la mañana y orina de 24 horas) y las semanas de gestación (séptima a 16ava. semana de gestación), influyen en las concentraciones detectadas de HCG en el transcurso del embarazo ( $P < 0.05$ ), las concentraciones de HCG en primera orina de la mañana, son mayores que en la orina de 24 horas. Cuando se compararon los niveles promedio de HCG en las mujeres estudiadas ( $n=5$ ), durante las semanas de gestación en ambas muestras por el método Newman - Keuls, se encontró que únicamente las concentraciones de HCG en la octava y novena semana de gestación eran diferentes (Cuadro 1B y C); durante el pico máximo

de HCG se observaron niveles promedio de 67 200 UI HCG/l en primera orina de la mañana y 50 400 UI HCG/l en orina de 24 horas. Respecto a esto, se observó una variación mayor en los niveles de HCG para orina de 24 horas (7.50 a 66.67%) que en primera orina de la mañana.

- Para el desarrollo del MCG, se utilizó etanol (96%) y acetona como agentes precipitantes; en el Cuadro II (A,B y C), se observa la secuencia de pasos para estandarizar y seleccionar el MCG. Cuando se empezaron a probar los dos solventes, se obtenía poca recuperación de la hormona agregada inicialmente (dependiendo también, de la sensibilidad del estuche diagnóstico utilizado, Pregnosticon, sensibilidad de 1 000 UI HCG/l), además se presentaron otros problemas, tales como la interferencia del alcohol - eter en la reacción antígeno-anticuerpo (produciendo lisis de los eritrocitos); para eliminar estos inconvenientes, se aumentó la concentración de la hormona, eliminándose el lavado con alcohol - eter y disminuyendo el solvente, hasta quedar finalmente como se describe en el Cuadro II C.
- En el Cuadro III, se comparan las diferencias entre el MCG modificado con dos métodos tradicionales para concentrar gonadotropinas; entre las diferencias principales de éste, están el tipo de espécimen utilizado (primera orina de la mañana), que no requiere ningún pretratamiento, a diferencia de los otros dos; se requiere poco volumen inicial de



orina y poco solvente, facilitando esto el manejo de la muestra durante el proceso; no se requiere ningún lavado del precipitado, y al final del proceso se obtiene una concentración mayor de la muestra original. En el Cuadro IV, se muestra el procedimiento del método modificado para concentración de gonadotropinas urinarias, en el cual se observa la sencillez del mismo, así como también los pocos reactivos y material requerido para llevarlo a cabo.

B. Evaluación y Comparación del MCG en la Determinación de LH y HCG, por los Métodos Convencionales de IH, EIA y RIA.

- Determinación de la capacidad de recuperación del método. Por Análisis de Varianza Bifactorial, Cuadro V A, se encontró gran influencia de los tiempos de concentración (una y 24 horas) y los estándares adicionados inicialmente, sobre la concentración de HCG (Gonadotrophi Roussel) recuperada después del proceso. Las diferencias observadas en la recuperación del HCG (Cuadro VB y VC) en una hora y 24 horas, fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), obteniéndose una recuperación para HCG de 31.13 a 34.75% y un 73.70 a 86.47% respectivamente, independientemente de la concentración de HCG adicionada. Se obtuvo un Coeficiente de Determinación ( $R^2$ ) de 1.00 y 0.99 ( $P < 0.05$ ) respectivamente.

La HCG de Ortho-Diagnostics, se comportó similar a la an-

terior; por Análisis de Varianza Bifactorial (Cuadro VI A), también se encontró influencia de los tiempos de concentración y estándares adicionados, sobre la concentración de HCG recuperada después del proceso. Las diferencias observadas en la recuperación de HCG (Cuadro VI B y C) en una hora y 24 horas, fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ); la recuperación obtenida para HCG (Ortho Diagnostics), fué de 32.17 a 34.98% y un 72.43 a 87.89% respectivamente. El Coeficiente de Determinación fué de 1.00 y 0.99 ( $P < 0.05$ ), respectivamente.

Por IH (Pregnosticon), se encontró un 33.50% de recuperación para HCG (Gonadotrophi Rousell), después de concentrar una hora y un 67% durante 24 horas.

- Determinación de la reacción cruzada entre LH y HCG por EIA. Cuando se utilizó HMG como estándar de LH (Cuadro VII), se obtuvo de un 5.70 a 6.19% de reacción cruzada; en el caso de los estándares purificados de LH (2nd-IRP,HMG) (Cuadro VIII), se encontró un 5.67 a 6.96% de reacción cruzada, similar a la anterior. En el caso contrario, cuando se determinó la reacción cruzada de HCG con LH por RIA (Cuadro IX), utilizando estándares de HCG purificados, de Abbott Laboratories, se detectó de un 41.30 a 54.80% de cruce, valor muy alto, ya que los antisueros de LH están dirigidos contra la molécula completa de LH:

C. Aplicación y Evaluación Clínica del MCG en la Determinación de los Niveles de LH y HCG en diferentes Condiciones: Testigos (hombres y mujeres), climaterio, ovulación y enfermedades del trofoblasto.

En el Cuadro X, se observan los niveles promedio de HCG y LH para el grupo testigo de hombres, con edad promedio de 35 años (límites de 24 a 45 años), no se detectó actividad de HCG; presentaron un promedio de 3.79 mUI  $\beta$ -HCG/ml ( $\pm$  4.29 desviación estándar), que es un valor ubicado dentro de los límites normales de HCG (inferiores de 10 mUI/ml para  $\beta$ -HCG, EIA en suero). En relación a LH, se observaron dos individuos con valores bajos (10 mUI/ml) respecto a los límites normales (superior a 25 mUI/ml para LH, RIA en suero), que se excluyeron para el promedio de LH; los demás presentaron niveles normales. El promedio de LH fué de 83.60 mUI/ml ( $\pm$  48.98 desviación estándar).

Respecto a las mujeres del grupo testigo, Cuadro XI, éstas presentaron una edad promedio de 34 años (límites de 23 a 43 años). La actividad de HCG, se detectó en ocho (66.7%) de las 12 mujeres estudiadas, de las otras cuatro, dos estuvieron dentro de los límites normales y dos por arriba. En promedio se detectó 35.08 mUI  $\beta$ -HCG/ml ( $\pm$  32.75 desviación estándar), para el cual no se incluyeron las mujeres con  $\beta$ -HCG superior a 200 mUI/ml. Respecto a LH, se detectaron niveles promedio de 141 mUI LH/ml ( $\pm$  121 desviación es-

tándar), para este promedio se excluyó una mujer con LH muy alta (393 mUI LH/ml), probablemente en la premenopausia.

Tres mujeres presentaron concentraciones de LH altas, comparables a las observadas en los días cercanos a la ovulación.

Cuando se determinó LH en climaterio, Cuadro XII, en un grupo seleccionado de 20 mujeres con edad promedio de 47.61 años (límites de 40 a 54 años, para este promedio se excluyeron dos mujeres jóvenes con diagnóstico de menopausia precoz, que dieron actividad LH/HCG positiva); 17 de ellas fueron positivas para actividad LH/HCG, correspondiendo al 85% de positividad LH/HCG.

En el caso de las mujeres evaluadas para detectar pico ovulatorio de LH, Cuadro XIII, con edad promedio de 27 años (límites de 22 a 35 años), 16 de ellas dieron actividad LH/HCG positiva (correspondiente al 80% de positividad LH/HCG), en dos a cuatro días, de los cinco seleccionados para el pico ovulatorio, éstos concuerdan con la FEM y el tipo de ciclo menstrual para cada una de ellas. Las otras cuatro fueron negativas para actividad LH/HCG, observándose en ellas irregularidades de su ciclo menstrual.

Finalmente, en el Cuadro XIV, se describe la aplicación del MCG para determinar HCG en embarazo normal y enfermedad del trofoblasto. En este Cuadro, se observa que la sensibilidad obtenida después de procesar las muestras, vá a depender del

estuche de diagnóstico usado; cuando se utilizó Gravindex (sensibilidad: 3 500 UI HCG/l) para titulación de concentraciones elevadas a HCG, se encontró un aumento en la sensibilidad de ocho veces, respecto a las diluciones seriadas de la titulación inicial de las muestras tratadas. En cambio, cuando se utilizó Pregnosticon (sensibilidad: 1 000 UI HCG/ml) se observó un aumento de 16 veces, respecto a las diluciones de la titulación inicial de las muestras tratadas. Como se puede observar, los valores obtenidos con ambos estuches diagnósticos son equivalentes, variando en  $\pm$  una dilución.

## DISCUSION

El comportamiento de la gonadotropina coriónica humana urinaria, observado en este estudio fué similar al descrito en otros trabajos (Marshall et al., 1968; Colston, 1981; Ayala et al., 1984a). La concentración máxima de HCG, se observó de la séptima a la octava semana de gestación; detectándose niveles más altos en la primera orina de la mañana ( $P < 0.05$ ). Definida la muestra biológica a utilizar en este trabajo, se inició este con el desarrollo del MCG modificado, obteniendo la sencillez requerida; logrando con éste una capacidad de recuperación para HCG de un 79% por EIA, cuando se dejó precipitar la HCG toda la noche ( $P < 0.05$ ), valor más alto, al obtenido por Ayala et al. (1978) utilizando kaolin - acetona y concanavalina A para concentrar HCG, determinada por RIA. La capacidad de recuperación del método aquí implementado, fué similar a la obtenida por Chipman et al. (1981), de un 77 a 89% de LH marcada con  $I^{125}$  como estándar, precipitada con acetona y determinada por RIA. El MCG modificado, presenta ventajas considerables, las cuales se describen en el Cuadro III; las principales son que utiliza poco volumen de muestra para el proceso, que la constituye la primera orina de la mañana, a diferencia de otros estudios que utilizan orina de 24 o 48 horas (Marshall et al., 1968; Ayala et al., 1978), la sencillez de su procedimiento, pocos reactivos y equipo utilizado (Cuadro IV), además de que puede usarse para IH, RIA y EIA. Así pues, la sencillez y costo mínimo del método,

lo hace útil para cualquier laboratorio que tenga necesidad en la determinación de gonadotropinas, principalmente LH y HCG, que no dispongan de RIA o EIA.

Es conocida la reacción cruzada que presentan LH y HCG, debido a la similitud inmunológica y biológica que poseen (Mishell, 1966; Vaitukaitis et al., 1972b). Sin embargo, con el desarrollo de métodos más específicos que utilizan anticuerpos contra la subunidad  $\beta$  de HCG, se ha eliminado en gran parte este inconveniente (Vaitukaitis et al., 1972a), aunque no en su totalidad. Para fines de los objetivos de este estudio, se determinó la reacción cruzada de ambas hormonas, mediante  $\beta$ -HCG de EIA, detectándose un 6% de inmunoreactividad cruzada, porcentaje ligeramente mayor al descrito para EIA, ya que especifican el 1% de cruce para LH y HCG. Sin embargo, el valor obtenido (6%), no genera confusión en los resultados, ya que normalmente los días en que se toman las muestras para determinar HCG, en suero u orina, están seleccionados y puede descartarse fácilmente fechas de pico ovulatorio, o en caso contrario tomarlas en cuenta para la interpretación de los resultados; además se necesitarían concentraciones relativamente altas de LH para dar lugar a la reacción cruzada con HCG (Ayala y Reyes, 1983). Sin embargo, en los concentrados urinarios, el nivel de LH aumenta considerablemente, produciendo con facilidad la reacción cruzada deseada mediante métodos con especificidad menor que la del RIA o EIA, en este caso IH.

Cuando se probó la aplicación clínica del MCG modificado, se encontró lo siguiente:

- En el grupo de individuos normales, solo en el 66.7% de las mujeres sin antecedentes de algún tipo de neoplasia, se detectó actividad HCG urinaria ( $\beta$ -HCG, EIA); de las doce mujeres estudiadas, dos presentaron actividad HCG debida a la reacción cruzada con LH, otras dos presentaron niveles normales de HCG. Existe suficiente información que apoya la presencia de HCG en orina y tejidos de individuos normales, de la cual no se sabe su origen (Chen et al., 1976; Good et al., 1977; Borkowski y Muquardt, 1979; Braunstein et al., 1979, 1984). Se han propuesto varias teorías para explicar su presencia, algunas de estas son las siguientes: Consideran que esta sustancia semejante a HCG, sea de origen hipofisiario o endócrino, secretada como un precursor de LH (Chen et al., 1976; Borkowski y Muquardt, 1979), o que sea producida localmente en diferentes tejidos periféricos no endócrinos (Borkowski y Muquardt, 1979; Borkowski et al., 1984; Braunstein et al., 1984). También puede considerarse la presencia de esta hormona, como una función trofoblástica persistente después del nacimiento (Braunstein et al., 1979), o un reflejo rápido de la renovación celular (Vaitukaitis et al., 1976b). Otra hipótesis propone, que la secreción de HCG por células no endócrinas no malignas, puede ser considerada como una secreción parácrina primitiva, persistiendo a través de la evolución (Roth et al., 1982), y real-



mente, la  $\beta$ -HCG parece ser una proteína muy antigua y preservada, codificada al menos por ocho genes (Fiddes y Goodman, 1980; Boorstein et al., 1982).

A pesar de que hay varias hipótesis que tratan de explicar la presencia de HCG en tejidos y fluidos normales, aún no se llega a un acuerdo convincente sobre ello. No obstante, se sigue observando una amplia distribución de actividad HCG en el organismo humano. Así pues, probablemente exista secreción fisiológica de HCG a concentraciones bajas, que los métodos convencionales para su determinación son incapaces de detectar, y que con la ayuda de métodos de concentración se ha observado esta actividad en diferentes tejidos y fluidos normales. Esto es importante, ya que como es sabido se considera a la molécula de HCG como un marcador tumoral, y cuando las concentraciones de ésta sobrepasan el umbral fisiológico (10 mUI HCG/ml, EIA), debe investigarse su origen, buscando actividad neoplásica con secreción de HCG.

- Para la determinación de LH por reacción cruzada con HCG por IH, en climaterio y pico ovulatorio, se obtuvo una efectividad de un 85 y 80% respectivamente. Dando así, otra alternativa para detectar la ovulación, ya que normalmente se determina indirectamente por la detección de progesterona por RIA, hormona que aumenta después de ocurrida la ovulación. Así también, la LH en climaterio es determinada por RIA, y su detección por reacción cruzada con HCG por IH es útil cuando no se cuenta con este método.

- La concentración de gonadotropinas, también se probó en muestras urinarias de pacientes con embarazo normal y pacientes con enfermedad del trofoblasto; mostrando ser útil en ambas condiciones, lográndose aumentar la sensibilidad de la IH, de ocho a 16 veces, respecto a la concentración original de la muestra. Esto tiene importancia, en el seguimiento de las enfermedades del trofoblasto, ya que hay estudios que han confirmado, que la determinación de HCG en concentrados urinarios, permite detectar actividad tumoral antes de que esté presente en suero (Schreiber et al., 1976; Ayala et al., 1978; Wehmann et al., 1981).

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos, de acuerdo a los objetivos se apoya la hipótesis planteada inicialmente. Se desarrolló un MCG urinarias muy simplificado, y aprovechando con éste la reacción cruzada entre LH y HCG, fué posible determinar LH cualitativamente, sin necesidad del RIA como se hace generalmente. Además, se fué capaz de detectar actividad HCG ( $\beta$ -HCG, EIA) en individuos normales, lo cual es útil principalmente en el seguimiento de enfermedades del trofoblasto u otras neoplasias secretoras de HCG, siendo posible detectar cambios en la actividad de HCG, antes que ésta aparezca en sangre. La concentración de gonadotropinas urinarias, puede ser utilizada por cualquier laboratorio clínico, como prueba de rutina para gonadotropinas o condiciones clínicas en que éstas se encuentren a concentraciones bajas, aumentando así la sensibilidad de LH, RIA y EIA.

## LITERATURA CITADA

- Ayala, A.R., Nisula, B.C., Hodgen, G.D., Ross, G.T. 1978. Highly sensitive radioimmunoassay for Chorionic gonadotropin in human urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47:767-773.
- Ayala, A.R., Reyes, V. 1983. Caracterización inmunológica de los preparados comerciales de LH, FSH y HCG. *Ginecol. Obstet. Mex.* 51:61-66.
- Ayala, A.R., Bustos, H., Antunez, O., González, E. 1984a. Secreción pulsátil de la gonadotropina coriónica humana. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*. 15:147-153.
- Ayala, A.R., Saad, G.A., González, M.E., Vázquez, C.X. 1984b. Producción de gonadotropina coriónica (HCG) en el carcinoma cervicouterino. *Ginecol. Obstet. (Méx.)*. 52:165-170.
- Ayala, A.R., González, E., Castorena, G., Montoya, J.J. 1984c. Seguimiento de neoplasias del trofoblasto mediante radioinmunoanálisis del fragmento carboxiterminal de beta-coriogonadotropina (COOH - beta - HCG - RIA) en orina. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*. 15:139-145.
- Boorstein, W.R., Vamvakopoulos, N.C., Fiddes, J.C. 1982. Human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit is encoded by at least eight

genes arranged in tandem and inverted pairs. *Nature* 300:419-422.

Borkowski, A., Muquardt, C. 1979. Human chorionic gonadotropin in the plasma of normal, nonpregnant subjects. *N. Engl. J. Med.* 301:298-302.

Borkowski, A., Puttaert, V., Gyling, M., Muquardt, C., Body, J.J. 1984. Human chorionic gonadotropin - like substance in plasma of normal nonpregnant subjects and women with breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58:1171-1178.

Braunstein, G.D., Kamdar, V., Rasor, J., Swaminathan, N., Wade, M.E. 1979. Widespread distribution of a chorionic gonadotropin like substance in normal human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:917-925.

Braunstein, G.D., Rasor, J., Mc Cready, J., Wade, M.E. 1984. Varying bioactive to immunoactive ratios of the human chorionic gonadotropin like substance present in normal human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58:170-175.

Buckeley, J. D. 1984. The epidemiology of molar pregnancy and choriocarcinoma. *Clin. Obstet. Gynecol.* 27:153-159.

Burr, H.W. 1975. Pregnancy Tests, the current status. *Populat. Rep. J.*: 109-124.

Chen, H-C., Hodgen, G.D., Matsuura, S., Lin, L.J., Gross, E., Reichert, L.E. Jr., Birken, S., Canfield, R.E., Ross, G.T. 1976. Evidence for a gonadotropin from nonpregnant subjects that has physical, immunological, and biological similarities to human chorionic gonadotropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73:2885-2889.

Chipman, J.J., Moore, R.J., Marks, J.F., Fevre, M., Segel, T., Ramsey, J., Boyar, R.M. 1981. Interrelationships of plasma and urinary gonadotropins: Correlations for 24 hours, for sleep/wake periods, and for three hours after luteinizing hormone-releasing hormone stimulation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 52:225-230.

Colston, W.A. 1981. Protein hormones. En: Endocrinology of Early Pregnancy. Genesis J.R. ed. Yearbook Medical Publishes Chicago p. 18-34.

Engvall, E., Perlmann, P. 1971. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochimistry 8:871-874.

Fernández del Castillo, C., Ayala, A.R. 1983. Problemas endócrinos del climaterio y la menopausia. Ginecol. Obstet. Méx. 51:99-109.

Fiddes, J.C., Goodman, H. 1980. The cDNA for the  $\beta$ -subunit of

human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by read through into the 3'-untranslated region. *Nature* 286:684-687.

Forsbach, G., Rodríguez, L., Motta, M., De Hoyos, R. 1984. Comparación de dos métodos comerciales para la determinación de  $\beta$ -HCG (RIA y ELISA). En: Memorias de la Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. Durango, Dgo. Méx. p. 33.

Good, A., Ramos-Urbe, M., Ryan, R.J., Kempers, R. 1977. Molecular forms of human chorionic gonadotropin in serum, urine, and placental extracts. *Fertil. Steril.* 28:846-850.

Khoo, S.K., Daunter, B. 1980. The beta-subunit of chorionic gonadotrophin as a tumour marker in gestational trophoblastic disease. *Aust. N.Z.J. Obstet. Gynaec.* 20:35-42.

Khoo, S.K. 1982. Recent progress in the management of gestational trophoblastic disease. *Aust. N.Z.J. Obstet. Gynaec.* 22:141-150.

Krieg, A.F., Henry, J.B. 1979. Pruebas de embarazo: Análisis de la gonatropina coriónica. En: Diagnóstico Clínico para el Laboratorio. Davidsohn, I., Henry, J.B. (eds.), Salvat, Barcelona España. p. 325-335.

Kulin, H.E., Bell, P.M., Santen, R.J., Ferber, A.J. 1975. Integration of pulsatile gonadotropin secretion by timed urinary measurements: An accurate and sensitive 3 - hour test. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40:783-789.

Kulin, H.E., Santner, S.J. 1977. Timed urinary gonadotropin measurements in normal infants, children and adults, and patients with disorders of sexual maturation. *J. Pediatr.* 90:760-765.

Marshall, J.R., Hammond, C.B., Ross, G.T., Jacobson, A., Rayford, P., Odell, W.D. 1968. Plasma and urinary chorionic gonadotropin during early human pregnancy. *Obstet. Gynec.* 32:760-764.

Mishell, D.R. 1966. Daily urinary assay of luteinizing hormone by an immunologic method. *Am. J. Obstet. Gynec.* 95:747-758.

Mitchell, H.D.C., Bagshawe, K.A. 1976. Human chorionic gonadotrophin. In: *Hormone Assays and Their Clinical Applications*. Loraine, J.A., Bell, E.T. (eds.). Fourth edition. Churchill Livingstone, Edinburgh London and New York, p. 142-189.

Morgan, F.G., Canfield, R.E. 1971. Nature of subunits of human chorionic gonadotrophins. *Endocrinology* 88:1045-1053.

Owens, O.M., Ryan, K.J., Tulchinsky, D. 1981. Episodic secretion



of chorionic gonadotropin in early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53:1307-1309.

Roth, J., Le Roith, D., Shiloah, J., Rosenzweig, J., Lesniak, M., Havrankova, J. 1982. The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, and other extracellular messengers: Implications for mammalian biology. *N. Engl. J. Med.* 306:523-527.

Saxena, B.B., Hasan, S.H., Haour, F., Schmidtgollwitzer, M. 1974. Radioreceptor assay of human chorionic gonadotropin: detection of early pregnancy. *Science* 184:793-795.

Schreiber, J.R., Rebar, R.W., Chen, H-C., Hodgen, G.D., Ross, G.T. 1976. Limitation of the specific serum radioimmunoassay for human chorionic gonadotropin in the management of trophoblastic neoplasm. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125:705-707.

Urban, M.D., Lee, P.A., Kowarski, A.A., Plotnick, L.P., Migeon, C.T. 1979. Comparison of estimates of gonadotropin levels by isolated blood samples, integrated blood concentrations, and timed urinary fractions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48:732-735.

Vaitukaitis, J.L., Braunstein, G.D., Ross, G.T. 1972a. A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. *Am. J.*

Obstet. Gynecol. 113:751-758.

Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Reichert, L.E., Ward, D.N. 1972b. Immunologic basis for within and between species cross reactivity of luteinizing hormone. *Endocrinology* 91:1337-1342.

Vaitukaitis, J.L. 1976a. Peptide hormones as tumor markers. *Cancer* 37:567-572.

Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T., Braunstein, G.D., Rayford, P.L. 1976b. Gonadotropins and their subunits: Basic and clinical studies. *Recent. Prog. Horm. Res.* 32:289-331.

Wehmann, R.E., Ayala, A.R., Birken, S., Canfield, R.E., Nisula, B.C. 1981. Improved monitoring of gestational trophoblastic neoplasia using a highly sensitive assay for urinary human chorionic gonadotropin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140:753-757.

Wide, L., Gemzell, C.A. 1960. An immunological pregnancy test. *Acta Endocrinol.* 35:261-263.

Wide, L. 1976. Human pituitary gonadotrophins. En: *Hormone Assays and their Clinical Applications*. Loraine, S.A., Bell, E.T. (eds.). Fourth edition. Churchill Livingstone. Edinburgh London and New York. p. 88-132.

Zar, J.H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall Inc.  
Englewood Cliffs N.J. p. 163-168.

Zárate, A., Canales, E.S., Mac Gregor, C., Castelazo, A.L. 1982.  
Endocrinología Ginecológica y del Embarazo. 2a. edición. La Prensa Médica Mexicana S.A. p. 110-119, 131-143.

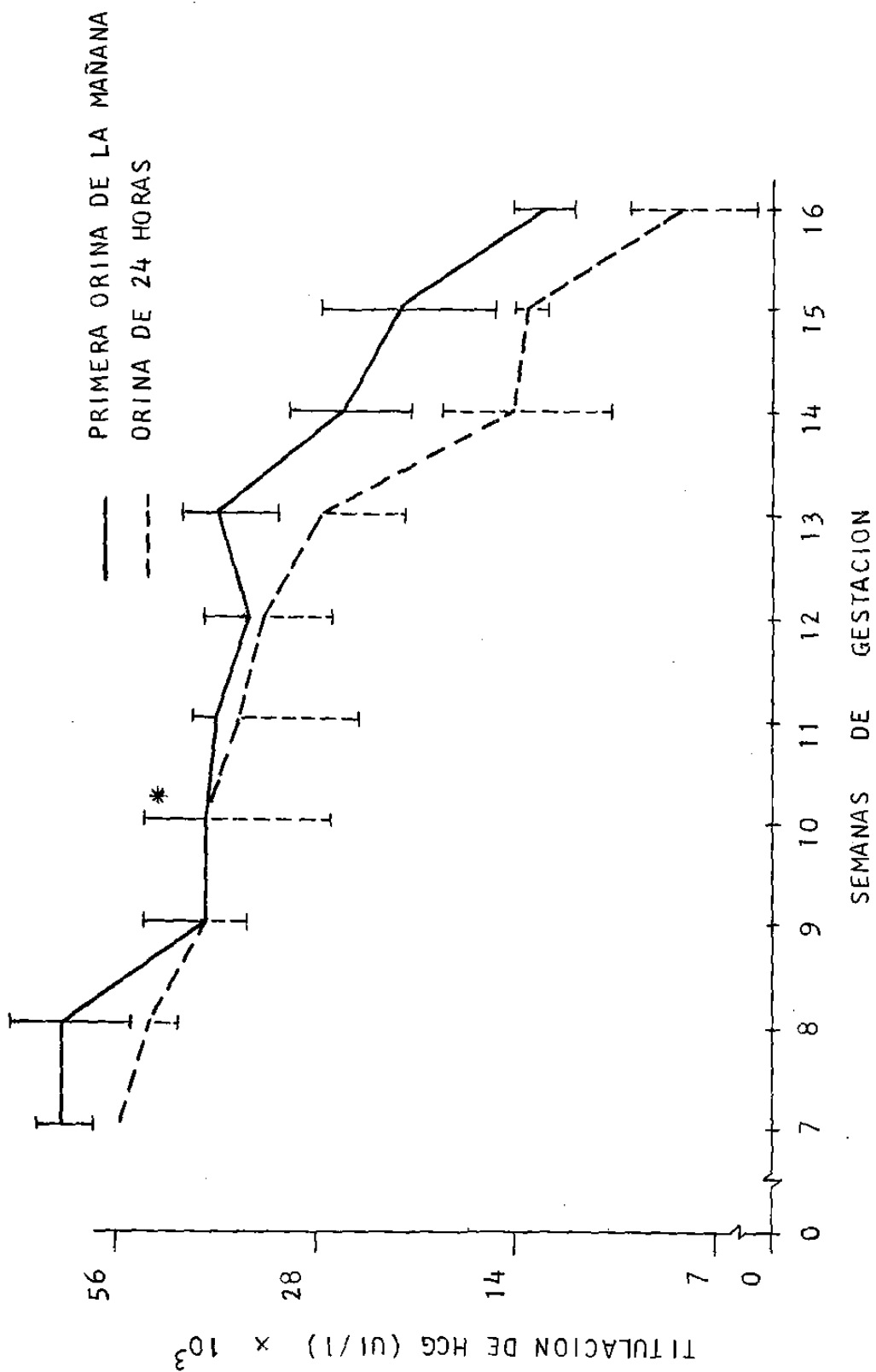


FIG. 1. COMPORTAMIENTO DE LOS NIVELES PROMEDIO DE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG), DURANTE 'EL EMBARAZO NORMAL DE CINCO MUJERES SANAS, EN PRIMERA ORINA DE LA MAÑANA Y ORINA DE 24 HORAS.

CUADRO IA. RESUMEN DEL ANALISIS DE VARIANZA BIFACTORIAL, PARA EL COMPORTAMIENTO DE LOS NIVELES DE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG), EN PRIMERA ORINA DE LA MAÑANA Y ORINA DE 24 HORAS, DURANTE EL EMBARAZO NORMAL DE CINCO MUJERES.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F calculada	F teórica ( $\alpha=0.05$ )
Total	$4.9294 \times 10^{10}$	99			
Celdas	$2.73861 \times 10^{10}$	19			
Factor "A" (Tipo de Orina)	$1.12896 \times 10^9$	1	$1.12896 \times 10^9$	4.12*	4.00
Factor "B" (Semanas de Gestación)	$2.550695 \times 10^{10}$	9	$2.8341056 \times 10^9$	10.35*	2.04
A x B	$7.5019 \times 10^8$	9	$8.3354444 \times 10^7$	0.30	2.04
Dentro de las Celdas ( Error )	$2.19079 \times 10^{10}$	80	$2.7384875 \times 10^8$		

\* Significativa

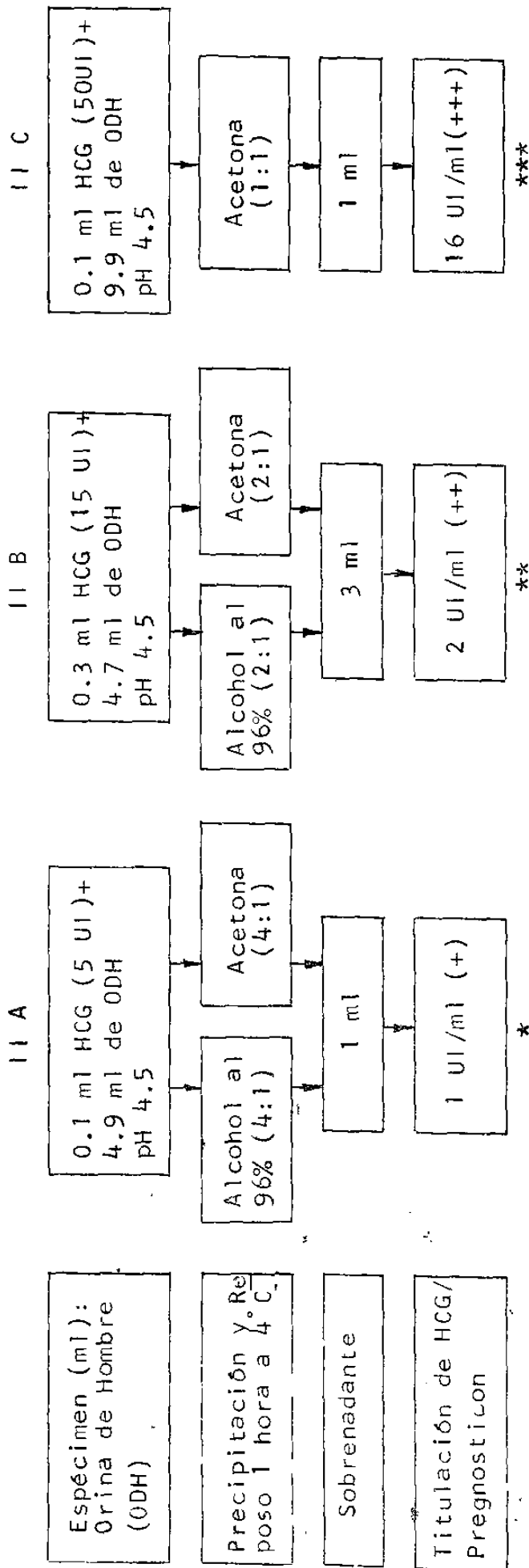
CUADRO I (B Y C). COMPORTAMIENTO DE LOS NIVELES DE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG), DURANTE EL EMBARAZO NORMAL. MEDIAS EN PRIMERA ORINA DE LA MAÑANA (IB) Y ORINA DE 24 HORAS (IC) DE CINCO MUJERES NORMALES.

Semana de Gestación Número	I B Primera Orina de la Mañana			Semana de Gestación Número	I C Orina de 24 Horas		
	HCG( $\bar{X}$ / l)	ESM	CV(%)		HCG( $\bar{X}$ / l)	ESM	CV(%)
7	67200	6858.78	22.82	7	56000	0.00	0.00
8*	67200	14277.69	47.50	8*	50400	12521.98	24.84
9	42000	8854.64	47.14	9	42000	14000.00	33.33
10	42000	8854.64	47.14	10	42000	28000.00	66.67
11	39200	6858.78	39.12	11	36400	27291.02	7.50
12	35000	6194.69	40.00	12	33600	15962.46	47.50
13	39200	5238.48	29.88	13	28000	17146.42	61.23
14	25200	5238.48	46.48	14	14000	8923.28	63.73
15	21000	6261.18	66.67	15	13300	1565.24	11.17
16	12600	1400.04	24.84	16	7700	3834.06	49.80

$\bar{X}$ : Media Aritmética; S: Desviación Estándar; ESM: Error Estándar de la Media; CV: Coeficiente de Variación. \* Por Comparación de Medias con el Método de Newman-keuls:

$$7 = 8 \neq 9 = 10 = 11 = 12 = 13 = 14 = 15 = 16$$

CUADRO 11 (A,B,C). PASOS USADOS EN LA ESTANDARIZACION Y SELECCION DEL METODO PARA CONCENTRACION DE GONADOTROPINAS URINARIAS.



\* Se Observó Interferencia de la Mezcla Alcohol-Eter, con la Reacción Antígeno-Anticuerpo, Produciendo Lisis de los Eritrocitos.

\*\* Se Eliminó el Lavado con Alcohol-Eter y se Disminuyó el Solvente. En la Precipitación con Alcohol, aún se Observa Interferencia en la Reacción Antígeno-Anticuerpo, lo que no Sucede con la Acetona.

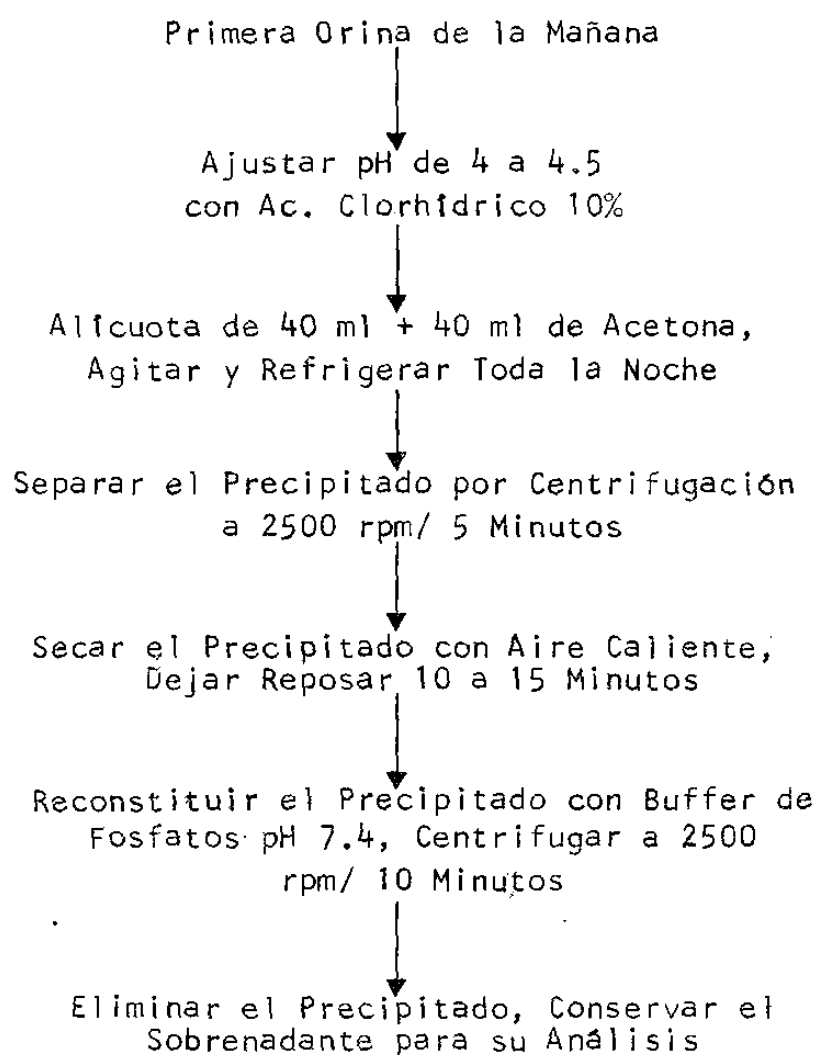
\*\*\* Se Disminuyó el Solvente, Seleccionándose la Precipitación con Acetona. Los Pasos para cada Ensayo (A,B,C), se Efectuaron Independientemente y en Forma Simultánea para cada Solvente.

CUADRO III. COMPARACION DEL METODO MODIFICADO CON DOS METODOS TRADICIONALES, PARA CONCENTRACION DE GONADOTROPINAS URINARIAS.

Método	Precipitación con Alcohol al 96%	Precipitación con Acetona	Precipitación con Acetona Modificado
Espécimen	Orina de 24 Horas	Primera Orina de la Mañana u Orina de 24 Horas	Primera Orina de la Mañana
Ajuste de pH	Ac. Acético Conc.	Ac. Acético Conc.	Ac. Clorhídrico 10%
Pretratamiento	Refrigeración y Filtración	Refrigeración	Ninguno
Volúmen Inicial Usado	1/4 del Volúmen Total de la muestra	50 a 80 ml	20 a 40 ml
Relación Orina-Solvente	1 a 4	1 a 4	1 a 1
Reposo a 4° C para Precipitar Gonadotropinas	24 Horas	1 ó 24 Horas	24 Horas
Extracción del Sobrenadante	Bomba de Vacío	Centrifugación	Centrifugación
Lavado del Precipitado	Alcohol-Eter (1 a 1)	Alcohol-Eter(1 a 0.5)	Ninguno
Concentración final de la Muestra Original	10 Veces	10 Veces	40 Veces
Utilidad	Bioensayo	RIA	IH, RIA, EIA



CUADRO IV. PASOS USADOS EN EL METODO MODIFICADO PARA CON-  
CENTRACION DE GONADOTROPINAS URINARIAS, POR  
PRECIPITACION CON ACETONA.



CUADRO VA. ANALISIS DE VARIANZA BIFACTORIAL PARA LA CAPACIDAD DE RECUPERACION DEL METODO MODIFICADO, CONCENTRANDO GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG, GONADOTROPYL - ROUSSELL) DURANTE UNA HORA Y 24 HORAS.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F calculada	F teórica ( $\alpha=0.05$ )
Total	14296.08	39			
Celdas	14288.12	9			
Factor "A" (Tiempos de Concentración)	3316.22	1	3316.22	12488.91*	4.17
Factor "B" (Estándares Adicionados)	9390.54	4	2347.63	8841.20*	2.69
A x B	1581.35	4	395.34	1489.02*	2.69
Dentro de las Celdas ( Error )	7.97	30	0.27		

\* Significativa.

CUÁDRO V (B Y C). CAPACIDAD DE RECUPERACION DEL METODO MODIFICADO, CONCENTRANDO GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG , GONADOTROPYL-ROUSSELL) UNA HORA (VB) Y 24 HORAS (VC).

HCG (mUI/ml)	V B				V C						
	$\bar{X}$	S	ESM	CV(%)	Recuperación (%)	HCG (mUI/ml)	$\bar{X}$	S	ESM	CV(%)	Recuperación (%)
90.00	29.69	0.836	0.41	3.13	32.99	90.00	70.08	0.204	0.37	0.29	77.87
45.00	15.63	0.449	0.22	2.87	34.75	45.00	38.91	0.660	0.33	1.70	86.47
30.00	10.25	0.377	0.19	3.68	34.17	30.00	22.11	0.708	0.35	3.20	73.70
22.50	7.79	0.254	0.12	3.26	34.60	22.50	18.23	0.338	0.17	1.85	81.02
11.25	3.50	0.460	0.23	13.14	31.13	11.25	8.58	0.492	0.24	5.73	76.27
*R <sup>2</sup> = 1.00;		$\bar{X}$ = 0.26 + 0.33		HCG	$\bar{X}$ = 33.52	*R <sup>2</sup> = 0.99;		$\bar{X}$ = 0.36 + 0.79	HCG	$\bar{X}$ = 79.07	

$\bar{X}$ : Media Aritmética; S: Desviación Estándar; ESM: Error Estándar de la Media; CV: Coeficiente de Variación. En la Comparación de Medias por el Método de Newman-Keuls, Todas las Medias Fueron Diferentes.

R<sup>2</sup> = Coeficiente de Determinación.

\*: P < 0.05

CUADRO VI A. ANALISIS DE VARIANZA BIFACTORIAL PARA LA CAPACIDAD DE RECUPERACION DEL METODO MODIFICADO, CONCENTRANDO GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG, ORTHO-DIAGNOSTICS) DURANTE UNA Y 24 HORAS.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F calculada	F teórica ( $\alpha=0.05$ )
Total	14233.12	39			
Celdas	14226.30	9			
Factor "A" (Tiempos de Concentración)	3394.07	1	3394.07	14932.11*	4.17
Factor "B" (Estándares Adicionados)	9270.40	4	2317.60	10196.21*	2.69
A x B	1561.83	4	390.46	1717.81*	2.69
Dentro de las Celdas ( Error )	6.82	30	0.23		

\* Significativa.

CUADRO VI (B Y C). CAPACIDAD DE RECUPERACION DEL METODO MODIFICADO, CONCENTRANDO GONADOTROPINA CORIO-NICA HUMANA (HCG, ORTHO-DIAGNOSTICS) POR UNA HORA (VIB) Y 24 HORAS (VIC).

VI B						VI C							
Cantidad Observada de HCG (mUI/ml) por Cantidad ELISA, Después de Concentrar Una Hora Adicionada			Cantidad Observada de HCG (mUI/ml) por Cantidad ELISA, Después de Concentrar 24 Horas.			Cantidad Adicionada							
HCG (mUI/ml)	$\bar{X}$	S	ESM	CV(%)	Recuperación (%)	HCG (mUI/ml)	$\bar{X}$	S	ESM	CV(%)	Recuperación (%)		
90.00	29.51	0.749	0.37	2.54	32.79	90.00	69.75	0.627	0.31	0.90	77.50		
45.00	15.74	0.340	0.17	2.16	34.98	45.00	39.55	0.699	0.35	1.77	87.89		
30.00	9.65	0.242	0.12	2.50	32.17	30.00	21.73	0.622	0.31	2.86	72.43		
22.50	7.86	0.289	0.14	3.68	34.94	22.50	18.86	0.125	0.06	6.62	83.82		
11.25	3.69	0.264	0.13	7.15	32.80	11.25	8.68	0.316	0.16	3.66	77.16		
$*R^2 = 1.00;$			$\bar{X} = 0.27 + 0.33$			HCG		$*R^2 = 0.99;$		$\bar{X} = 0.74 + 0.78$		HCG	$\bar{X} = 79.76$

$\bar{X}$ : Media Aritmética; S: Desviación Estándar; ESM: Error Estándar de la Media; CV: Coeficiente de Variación. En la comparación de Medias por el Método de Newman-Keuls, Todas las Medias Fueron Diferentes.

$R^2$ = Coeficiente de Determinación.

\*:  $P < 0.05$

CUADRO VII. DETERMINACION DE REACCION CRUZADA ENTRE HORMONA LUTEINIZANTE (LH) Y GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG), UTILIZANDO GONADOTROPINA MENOPAUSICA HUMANA (HMG) COMO ESTANDAR DE LH.

LH (HMG) mUI/ml	$\beta$ -HCG, ELISA (mUI/ml)		$\bar{X}$	Reacción Cruzada (%)*
1250	83.10	71.67	77.38	6.19
375	25.56	20.06	22.81	6.08
125	8.21	6.07	7.14	5.70

$$* \text{ Reacción Cruzada} = \frac{\text{Cantidad de HCG Detectada}}{\text{Cantidad de LH Adicionada}} \times 100$$

CUADRO IX. DETERMINACION DE REACCION CRUZADA ENTRE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA Y HORMONA LUTEINIZANTE, UTILIZANDO ESTANDARES DE HCG ALTAMENTE PURIFICADOS, DE ABBOTT LABORATORIES.

HCG mUI/ml	LH, RIA (mUI/ml)		$\bar{X}$	Reacción Cruzada (%)*
50	26.80	28.00	27.40	54.80
100	40.20	42.40	41.30	41.30

$$* \text{ Reacción Cruzada} = \frac{\text{Cantidad de LH Detectada}}{\text{Cantidad de HCG Adicionada}} \times 100$$

CUADRO X. NIVELES DE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG) Y HORMONA LUTEINIZANTE (LH), EN CONCENTRADOS URINARIOS DE HOMBRES ADULTOS NORMALES, DETERMINADOS POR ELISA Y RIA RESPECTIVAMENTE.

Clave	$\beta$ -HCG, ELISA (mUI/ml)			LH, RIA (mUI/ml)		
			$\bar{X}$			$\bar{X}$
01	6.70	8.62	7.66	139	137	138
02	2.22	2.22	2.22	37	39	38
03	0.00	1.11	0.56	62	64	63
04	0.00	0.00	0.00	38	36	37
05	0.00	0.00	0.00	11	9	10*
06	6.06	7.13	6.60	161	159	160
07	7.34	6.91	7.13	107	105	106
08	8.83	10.48	9.65	137	139	138
09	0.00	0.00	0.00	11	9	10*
10	1.11	0.00	0.56	85	83	84
11	0.00	0.00	0.00	27	29	28
12	11.01	11.11	11.06	45	43	44
			$\bar{X}_t=3.79$			$\bar{X}_t=83.60$
			S=4.29			S=48.98
			ESM=1.24			ESM=15.50

$\bar{X}$  : Media Aritmética Total; S: Desviación Estándar;

ESM: Error Estándar de la Media.

\* No se incluyeron para el Promedio de LH.



CUADRO XI. NIVELES DE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA Y HORMONA LUTEINIZANTE, EN CONCENTRADOS URINARIOS DE MUJERES NO EMBARAZADAS, DETERMINADOS POR ELISA Y RIA RESPECTIVAMENTE.

Clave	$\beta$ -HCG, ELISA (mUI/ml)			LH, RIA (mUI/ml)		
			$\bar{X}$			$\bar{X}$
13	2.16	4.38	3.27	100	98	99
14	10.05	8.19	9.12	70	68	69
15	14.72	17.47	16.09	256	258	257*
16	> 200.00	> 200.00	> 200.00**	146	148	147
17	26.05	24.99	25.52	26	24	25
18	> 200.00	> 200.00	> 200.00**	394	392	393**
19	15.99	16.94	16.46	42	44	43
20	71.66	72.70	72.18	39	37	38
21	23.62	22.98	23.30	258	256	257*
22	12.38	13.66	13.02	56	54	55
23	82.49	88.58	85.53	256	258	257*
24	83.38	89.17	86.28	53	51	52
			$\bar{X}_t=35.08$			$\bar{X}_t=141$
			S =32.75			S =121
			ESM = 9.09			ESM = 36.33

\* Mujeres en Días Cercanos a la Ovulación.

\*\* No se Incluyeron para el Promedio de HCG y LH.

$\bar{X}_t$ : Media Aritmética Total; S: Desviación Estándar;

ESM: Error Estándar de la Media.

CUADRO XII. DETERMINACION DE HORMONA LUTEINIZANTE EN CLIMATERIO, A PARTIR DE CONCENTRADOS URINARIOS MEDIANTE REACCION CRUZADA DE LH CON HCG, UTILIZANDO PREGNOSTICON CON SENSIBILIDAD DE 1000 UI HCG/l

Clave	Edad (Años)	Actividad LH/HCG
C-01	50	+
C-02	48	+
C-03	53	+
C-04	54	+
C-05	29*	+
C-06	48	+
C-07	53	+
C-08	50	+
C-09	46	+
C-10	52	+
C-11	47	+
C-12	35*	±
C-13	45	+
C-14	46	+
C-15	41	+
C-16	40	+
C-17	42	+
C-18	49	-
C-19	48	-
C-20	45	-

$$\bar{X} = 47.61 \quad \text{Proporción (+/-)} = 5.00 = \frac{15}{3}$$

$$S = 4.09$$

\* No se incluyeron en el Promedio de Edad y en la Proporción de Actividad LH/HCG.

$\bar{X}$ : Media Aritmética      S: Desviación Estándar.

CUADRO XIII. DETERMINACION DEL PICO OVULATORIO DE HORMONA LUTE-  
INIZANTE EN CONCENTRADOS URINARIOS, MEDIANTE REAC-  
CION CRUZADA DE LH CON HCG, UTILIZANDO PREGNOSTICON  
CON SENSIBILIDAD DE 1000 UI DE HCG/l.

Clave	Edad (Años)	Actividad LH/HCG Días del Ciclo Menstrual					FUM*	FEM**
		-2	-1	0	+1	+2		
0-01	35	+	+	+	-	-	16-12-84	11-01-85 26x4
0-02	29	-	-	+	+	+	30-12-84	28-01-85 30x4
0-03	27	-	+	+	+	-	30-12-84	26-01-85 28x4
0-04	29	-	-	-	+	+	30-12-84	29-01-85 31x7
0-05	35	-	-	+	+	-	26-01-85	25-02-85 30x4
0-06	35	+	+	-	-	-	5-02-85	28-02-85 28x4
0-07	28	+	+	+	-	-	1-02-85	2-03-85 30x3
0-08	22	+	+	-	-	-	15-02-85	13-03-85 28x4
0-09	35	-	+	+	+	-	1-03-85	29-03-85 28x4
0-10	28	-	-	-	+	+	27-02-85	1-04-85 31x4
0-11	25	-	-	-	+	+	24-02-85	26-02-85 31x4
0-12	35	-	-	+	+	-	28-02-85	25-03-85 26x4
0-13	33	+	+	+	+	-	19-03-85	13-04-85 26x4
0-14	26	-	+	+	-	-	6-04-85	4-05-85 30x4
0-15	31	+	+	+	+	-	19-04-85	18-05-85 30x4
0-16	28	+	+	-	-	-	5-04-85	2-05-85 28x4
0-17	26	-	-	-	-	-	22-04-85	19-05-85 30x4
0-18	20	-	-	-	-	-	3-04-85	4-05-85 30x4
0-19	32	-	-	-	-	-	6-04-85 30x4	24-04-85 (19x4)
0-20	33	-	-	-	-	-	23-02-85 30x4	19-03-85 (25x4)
	$\bar{X} = 27$	0.54,	1.00,	1.00,	1.00,	0.25		
	S = 4.52	Proporción (+/-)						

\* Fecha de la Última Menstruación.

\*\* Fecha Esperada de la Menstruación.

CUADRO XIV. APLICACION DEL METODO MODIFICADO PARA DETERMINAR GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA, EN EMBARAZO NORMAL (EN) Y ENFERMEDAD DEL TROFOBLASTO (ET).

Diagnóstico	HCG Inicial UI/l	HCG Final (Concentrada) UI/l	No. Veces del Aumento de la Cantidad HCG
EN	56000	448000	8*
EN	7000	56000	8*
ET	7000	56000	8*
ET	1000	16000	16**
ET	1000	32000	32**
ET	500	8000	16**

\* Gravindex (Ortho, Diagnostics), Sensibilidad  
3500 UI/l

\*\* Pregnosticon (Organon Teknika), Sensibilidad  
1000 UI/l

