

## Actividad luteotrófica de preparados de hormona placentaria lactogénica

M. Morell, C. Ferrer, F. Recio y C. Osorio

Departamento de Fisiología y Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Granada (España)

(Recibido el 7 de enero de 1971)

M. MORELL, C. FERRER, F. RECIO y C. OSORIO. *Luteotrophic Effect of Human Placental Lactogen*. R. esp. Fisiol., 27, 179-182. 1971.

The luteotrophic effect of a pure preparation of Human Placental Lactogen (HPL) was assayed by prolonging dioestrus in intact immature Wistar rats with different doses. The doses were between 1 mg and 0.060 mg. The ED<sub>50</sub> was obtained with 0.175 mg (0.124-0.249). All pure extracts used were free of insuline Human Growth Hormone (HGH) and Human Chorionic Gonadotrophin (HCG). The authors try to establish a unit of biological activity for their own preparations.

Desde 1962, en que JOSOMOVICH y MC LAREN (7) aislaron la hormona placentaria lactogénica (HPL) de la placenta humana, se han hecho múltiples intentos (2, 3, 5, 6) para conseguir la purificación completa de esta hormona, manteniendo la actividad biológica e inmunológica al mismo tiempo. Nosotros hemos puesto a punto una técnica (11, 12) a base de precipitaciones sucesivas, mediante la cual se ha conseguido un grado de pureza superior al de las preparaciones existentes; ninguno de los preparados mencionados en estos trabajos ofrece evidencia definitiva de su pureza como tal proteína. Quizás esta circunstancia nos explique el desacuerdo existente sobre diversas propiedades de esta hormona (2, 5, 9) y, en concreto, sobre su actividad biológica, aún no bien definida.

El presente trabajo está en relación con este último aspecto, constituyendo una aportación al conocimiento de la actividad

biológica de nuestra preparación hormonal pura y con la intención de objetivar y poder así compararla con otras similares. Se estudia a continuación la actividad luteotrófica de la hormona placentaria lactogénica, de procedencia humana (HPL) en comparación con los resultados obtenidos por otros autores (5, 7, 8, 9).

### Material y métodos

La extracción se realiza a partir de placentas congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) según el método descrito en trabajos anteriores (11, 12). Al final de cada extracción se comprueba la pureza de la correspondiente preparación mediante electroforesis en poli-acrilamida y doble inmunodifusión en agar; en todas las preparaciones se comprobó especialmente la ausencia de contaminantes del tipo de la hormona de crecimiento (HGH) y hormona coriónica (HCG) e insulina.

Tabla I. *Actividad biológica de la hormona placentaria lactogénica.*

Grupo *	Dosis (mg)	N.º de respuestas positivas
1	1,000	6
2	0,500	6
3	0,350	5
4	0,250	4
5	0,125	2
6	0,060	0

ED<sub>50</sub> = 0,175 mg; límites de confianza = 0,124-0,249 mg (95 %).

\* Número de animales por grupo, 6.

La actividad luteotrófica de estos preparados se estudió según el método de Evans, descrito por ASTWOOD (1) y ligeramente modificado por nosotros, según la siguiente pauta:

Se utilizaron ratas vírgenes, de raza Wistar, y de un peso comprendido entre 140 y 160 g. Estas ratas se mantuvieron en iluminación (12 horas de iluminación continua y otras 12 de oscuridad) y temperatura ( $22 \pm 2^\circ$  C constante). Se dividieron en grupos experimentales de 6 ratas cada uno, seleccionadas durante 2 semanas mediante el estudio de su ciclo del estro en cuanto a duración y regularidad, y según lo descrito por uno de nosotros (10). En estos grupos de ratas se observó la prolongación de la fase del diestro después de inyectar dosis decrecientes de hormona placentaria lactogénica (HPL) inmediatamente después de finalizada la fase del estro y en comparación con los correspondientes controles; las dosis oscilaron entre 1 mg y 0,060 mg. Los extractos hormonales se disolvieron en solución salina y fueron preparados en el momento de su utilización. Se consideraron positivas aquellas respuestas en las que el diestro se prolongó durante 5 o más días; las demás, negativas.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la transformación *probit* con objeto de determinar la dosis efectiva

al 50 %, es decir, la que es capaz de producir respuesta positiva en la mitad de las ratas del correspondiente grupo; asimismo se determinaron los límites de confianza de los valores obtenidos (4).

### Resultados

En la tabla I se expresan las dosis, grupos experimentales y número de respuestas positivas en cada uno de ellos. Los resultados obtenidos se tabulan y se realiza la transformación *probits*, dando una recta provisional de transformación, de la siguiente forma:

$$Y = 5,33 + 0,97(x - 2,83)$$

a partir de la cual se elaboran los *probits* definitivos, quedando:

$$Y' = 4,975 + 1,23(x - 2,47)$$

con lo que se determina la dosis ED<sub>50</sub>, que resulta ser 0,175 mg. Se estudian después los valores tabulados, encontrándose que corresponden a los de una distribución normal. Se determinan los límites de confianza para una probabilidad del 95 % y se encuentra que la dosis efectiva en el 50 % de los casos oscila entre 0,124 y 0,249 mg.

### Discusión

Los resultados presentados fueron obtenidos con una preparación hormonal extraída y purificada mediante un procedimiento original, muy simple y económico, a base de precipitaciones sucesivas (12). Hemos comprobado que el preparado obtenido es totalmente puro (11, 12), libre de contaminantes, aunque posee una gran inestabilidad, ya que en solución pierde su actividad a las pocas horas si no se le añaden pequeñas cantidades de albúmina. Precisamente esta fue la preparación hormonal utilizada por nosotros para estudiar una de entre sus discutidas acciones biológicas, la luteotrófica. Esto ya había sido

intentado por otros autores (5, 7, 9), aunque con resultados diversos. Además, las pruebas de pureza presentadas por estos autores resultaban poco convincentes.

El que el método empleado por nosotros para el estudio de la actividad luteotrófica no sea totalmente específico, tiene una importancia relativa, debido a la pureza de nuestras preparaciones, en las que se comprobó sistemáticamente la ausencia de contaminación de hormona de crecimiento (HGH), así como de hormona coriónica (HCG), que podrían haber interferido los resultados de nuestros experimentos. Por esto, el método no sólo ha sido suficiente para probar la presencia de actividad biológica, sino que también nos ha servido para objetivar dicha actividad en relación con el peso de los extractos mediante el estudio del  $ED_{50}$ , que fue de 0,175 mg (0,124-0,249). Esta cantidad es, comparativamente, bastante más baja que la obtenida por otros autores (9), lo que va a favor de la pureza y potencial biológico de nuestra preparación. Además, los valores obtenidos nos dan la posibilidad de establecer una unidad de actividad biológica para nuestras preparaciones, lo que facilita la comparación de las distintas extracciones entre sí y con las otras preparaciones existentes en la actualidad.

### Resumen

Se estudia una preparación pura de hormona placentaria lactogénica de origen humano (HPL), buscando su actividad luteotrófica en la prolongación del diestro de ratas Wistar vírgenes. A los animales se les inyectaron dosis

decrecientes, comprendidas entre 1 mg y 0,060 mg, encontrando que 0,175 mg de la propia preparación es la dosis eficaz mínima en el 50 % de los casos, con unos límites de confianza entre 0,124 y 0,249 mg, con el 95 % de probabilidades. Los extractos hormonales empleados no tenían contaminación de hormona de crecimiento (HGH), ni de hormona coriónica (HCG). Con este experimento se intenta comprobar la presencia de actividad biológica en estas preparaciones y establecer una unidad de medida de dicha actividad.

### Bibliografía

1. ASTWOOD, E. B.: Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. Churchill, Londres, 1953.
2. CATT, K. J., MOFFAT, B., NIAAL, H. D. y PRESTON, B. N.: *Biochem. J.*, 102, 27c, 1967.
3. COHEN, H., GRUMBACH, M. M. y KAPLAN, S. L.: *Proc. Exp. Biol. Med.*, 117, 438, 1964.
4. FINNEY, D. J.: Statistical methods in biological assays. Griffin and Cie., Londres, 1952.
5. FLORINI, J. R., TONELLI, G., BREUER, C. B., COPPOLA, J., RINGLER, I. y BELL, P. H.: *Endocrinology*, 79, 692, 1966.
6. FRIESEN, H.: *Endocrinology*, 76, 369, 1965.
7. JOSOMOVICH, J. B. y MC LAREN, J. A.: *Endocrinology*, 71, 209, 1962.
8. KOVACIC, N.: *J. Endocr.*, 24, 227, 1962.
9. KOVACIC, N.: *J. Endocr.*, 35, 25, 1966.
10. MORELL, M., OSORIO, C. y RODRÍGUEZ, E.: Col. Inter. Gonadotrofinas Humanas, 1, 283, 1969.
11. OSORIO, C. y FERRER, C.: 6th. Meeting of the F.E.B.S. Abstract, 888, 1969.
12. RECIO, F.: Tesis doctoral. Granada, 1970.

