



11.11.2
UNIVERSIDAD NACIONAL 4
AUTONOMA DE MEXICO 294

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Posgrado e Investigación
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

CARACTERISTICAS DE LA SECRECION PULSATIL
DE LA GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA
(HCG) DURANTE LOS DIFERENTES TRIMESTRES
DEL EMBARAZO

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el título de

Maestra en Ciencias Médicas

Presenta:

Laura Elena Díaz Cueto

MEXICO, D. F.

JUNIO DE 1992



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.

INDICE

I. INTRODUCCION.

A. ANTECEDENTES

B. HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA

1.- Biosíntesis de la HCG

2.- Mecanismo de Secreción de la HCG

3.- Regulación de la Secreción de la HCG

4.- Concentraciones de la HCG

5.- Funciones de la HCG en el embarazo

6.- Mediciones de la HCG

7.- Deteccion de Pulsatilidad

II. OBJETIVO

III. HIPOTESIS

IV. MATERIAL Y METODOS

V. RESULTADOS

A) Pulsatilidad de HCG

B) Bioactividad de HCG

VI. DISCUSION

VII. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

A. ANTECEDENTES.

Una vez que se lleva a cabo el proceso de fecundación, el cual se define como el momento en que un espermatozoide logra penetrar el óvulo, se suscitan una serie de cambios morfológicos en el óvulo maduro fecundado. Inicialmente se transforma en un cigoto, que experimenta una segmentación o división, dando lugar a las blastómeras; a medida que éstas continúan dividiéndose, se forma un conjunto sólido de células conocido como mórula. Posteriormente, existe una acumulación gradual de líquido en el interior de la mórula, para dar paso a la formación del blastocisto. En uno de los extremos de esta estructura se encuentra, un conjunto de células compactas, de las cuales la capa más interna da origen al embrión y la capa más externa al trofoblasto (1).

Durante un periodo de 4 a 6 días el blastocisto permanece libre, es decir sin fijarse a la pared endometrial; pero a medida que se establece este contacto, el trofoblasto se diferencia en citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, siendo de esta manera como morfológicamente el trofoblasto puede ser celular o sincitial, o aparecer como células gigantes mono o multinucleadas (2).

De todos los componentes placentarios, el trofoblasto es el que posee una estructura, una función y un desarrollo más variable, siendo el que determina la fijación del blastocisto al útero gracias a la capacidad que tiene de invadir el tejido endometrial (3). Además tiene un papel importante en la nutrición del óvulo fecundado, al constituir la fuente principal de esteroides placentarios, funcionando como un órgano endócrino indispensable para el mantenimiento del embarazo (4).

En estudios realizados por técnicas de ultraestructura y de inmunofluorescencia en tejidos placentarios

(5,6), se identificó a la Hormona Gonadotropina Coriónica (HCG) en explantes placentarios sincitiotrofoblásticos, por lo que se estableció que la síntesis y secreción de dicha hormona se da en el sincitiotrofoblasto y no en la hipófisis como se pensó en un inicio, cuando la hormona fué descubierta en 1927 por Ascheim y Zondek en la orina de mujeres embarazadas (7).

B. HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA.

La HCG es una glicoproteína con peso molecular de aproximadamente 36.000 Daltons, compuesta por 2 subunidades, la alfa (α) y la beta (β). Estas 2 cadenas peptídicas se encuentran unidas en forma no covalente en la molécula activa, pero son biológicamente inactivas como subunidades libres; sin embargo al ser recombinadas su actividad biológica se restablece (8,9).

La subunidad α es común a la de otras glicoproteínas [hormona luteinizante (LH), hormona folículo-estimulante (FSH) y tirotrópina (TSH)]. Dicha subunidad en todas las glicoproteínas consta de 89 a 92 aminoácidos en una misma secuencia; sin embargo, existen entre ellas diferencias en el tipo específico de oligosacáridos incorporados a las cadenas glicosídicas de dicho péptido (10,11).

Por lo que se refiere a la subunidad β , ésta es diferente en todas las glicoproteínas y es la que les confiere a cada una de ellas su especificidad tanto inmunológica como biológica (9,10). Sin embargo existe cierta homología estructural entre la β LH y la β HCG, ya que de los 115 aminoácidos en el extremo amino-terminal de la fracción β HCG, aproximadamente el 80% son idénticos en cuanto a su posición en la cadena β LH, pero en la fracción β HCG existe una secuencia única de 30 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal, en la cual se encuentran complejos laterales de oligosacáridos que poseen residuos terminales de ácido siálico; es decir, en esta secuencia existen 4 cadenas de oligosacáridos unidos por

enlaces O-glicosídicos a residuos de serina (aminoácidos 121,127,132, y 138) (12-14).

Algunos estudios han informado que ambas subunidades se sintetizan en forma individual y que su producción no está balanceada (12-16), este hecho pudiera deberse a que la síntesis de cada subunidad es controlada por varios genes localizados en diferentes cromosomas (17).

1.- Biosíntesis de la HCG.

En los últimos años algunos investigadores se han enfocado al estudio del proceso de glicosilación de las subunidades de HCG (18). En estos estudios se ha identificado que las cadenas polipeptídicas α y β de HCG, están glicosiladas en 2 residuos de asparagina de cada subunidad (residuos 52 y 75 en HCG, 13 y 30 en β HCG) por uniones N-glicosídicas de oligosacáridos y de manosas pesadas. Este proceso de glicosilación de HCG es llevado a cabo en el Retículo Endoplásmico y en el Aparato de Golgi de la célula (11).

Aproximadamente el 9% del peso de la molécula de HCG corresponde al contenido de ácido siálico, el cual parece tener 2 funciones importantes, la primera como regulador del mecanismo de acción de HCG y la segunda como protector de la molécula contra la degradación hepática, prolongando así su vida media de eliminación que es de 32 a 37 horas y su vida media plasmática la cual es de aproximadamente 6 horas. La vida media plasmática de la HCG es mayor que la de FSH y LH, las cuales son de 4 y 1 horas respectivamente debido al menor contenido de ácido siálico en su molécula (19).

Investigaciones realizadas acerca del papel que desempeñan los carbohidratos ligados a la molécula de HCG, han demostrado que éstos tienen una influencia importante en el efecto biológico de la misma y

de la membrana que a su vez conduce a la liberación de la hormona. Este mecanismo de secreción se denomina exocitosis constitutiva y se caracteriza por la presencia de un sistema de secreción que libera la hormona de forma continua y constante. Este mecanismo de secreción se denomina exocitosis constitutiva y se caracteriza por la presencia de un sistema de secreción que libera la hormona de forma continua y constante.

2.- Mecanismo de Secreción de la HCG.

Los resultados obtenidos de estudios realizados para estudiar los sistemas de secreción de otras glicoproteínas como la LH y FSH, han demostrado que su secreción se lleva a cabo a través de un sistema de exocitosis (23). Por este mecanismo, las proteínas recién sintetizadas son secretadas al espacio cisternal del Retículo Endoplásmico rugoso y almacenadas dentro de los gránulos secretorios en las vacuolas condensantes del Aparato de Golgi. Posteriormente con la participación del citoesqueleto se producen las contracciones en el sistema de microfilamentos microtubulares que permiten la translocación de los gránulos secretorios hacia la membrana celular, fusionándose con ella de modo que la hormona salga de la célula. Al parecer el tamaño y la cantidad de los gránulos secretorios se relacionan con las demandas fisiológicas de cada hormona en particular (24). En el caso de la HCG se ha observado que en la placenta humana existe un sistema de secreción de HCG que libera la hormona de forma continua y en los tejidos extraembrionarios existe un sistema de secreción de HCG que libera la hormona de forma continua (24).

Una característica de este sistema secretorio es que libera la hormona de forma continua y en los tejidos extraembrionarios existe un sistema de secreción de HCG que libera la hormona de forma continua.

se ha comprobado que al ser eliminados de la molécula, ésta se comporta como un antagonista, disminuyendo la producción de 3'. 5' monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), el cual actúa como el segundo mensajero de la hormona (20,21). La deglicosilación de la molécula de HCG interfiere con la actividad de unión al receptor; la molécula deglicosilada es incapaz de producir una respuesta hormonal en condiciones in vivo o in vitro, y su vida media se reduce a minutos (21,22).

2.- Mecanismo de Secreción de la HCG.

Los resultados obtenidos de estudios realizados para analizar los sistemas de secreción de otras glicoproteínas como la LH y FSH, han demostrado que su secreción se lleva a cabo a través de un sistema de exocitosis (23). Por este mecanismo, las proteínas recién sintetizadas son secretadas al espacio cisternal del Retículo Endoplásmico rugoso y almacenadas dentro de los gránulos secretorios en las vacuolas condensantes del Aparato de Golgi. Posteriormente con la participación del calcio intracelular, se producen las contracciones en el sistema de microfilamentos microtubulares que permiten la translocación de los gránulos secretorios hacia la membrana celular, fusionándose con ella, lo que permite que la hormona salga de la célula. Al parecer el tamaño y la cantidad de los gránulos secretorios se relacionan con las demandas fisiológicas de cada hormona en particular (23). Un estudio de ultraestructura de la placenta humana, mostró que los gránulos secretorios de HCG se encuentran esparcidos en este órgano y en los tejidos trofoblásticos productores de HCG, pero dichos gránulos no experimentan exocitosis (24).

Una característica de este sistema secretorio que involucra el proceso de exocitosis, es la liberación rápida de la hormona almacenada después de un estímulo, como en el caso de la liberación de las hormonas hipofisarias bajo el estímulo de los factores hipotálamicos (25). La liberación de las glicoproteínas LH

y FSH, es estimulada por el factor liberador hipotálamico de gonadotropinas (GnRH), cuyo efecto para la liberación de dichas hormonas ocurre en minutos, provocando un aumento en la exocitosis y en la descarga de los gránulos de las células hipofisiarias. La secreción de GnRH dentro de la circulación portal es de manera intermitente, y este proceso es gobernado por un pulso generador localizado a nivel del núcleo arcuato del hipotálamo medio basal. Esta forma de secreción de GnRH provoca una liberación pulsátil de ambas gonadotropinas (26), cuyo patrón y características pueden ser atribuibles a cambios en la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH y a la acción moduladora que ejercen los esteroides ováricos en el hipotálamo y la glándula hipofisiaria (27,28). En el caso de la HCG este fenómeno de secreción inmediata no se presenta, ya que al tratar de estimular su liberación con AMPc y teofilina (29), dicha liberación no es inmediata, requiriendo de hasta aproximadamente 3.5 horas para inducir su secreción. Estudios realizados in vitro en tejidos placentarios del primer trimestre, han mostrado que los procesos de glicosilación y secreción de la HCG, requieren de aproximadamente 2 horas para llevarse a cabo (30). Estos hallazgos sugieren que para estimular la secreción de HCG, se requiere de la síntesis de ARNs y de proteínas, además de que la secreción de la hormona prealmacenada no se realiza en forma significativa (31). Aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo de secreción de HCG, se piensa que la membrana celular esta implicada en los procesos de síntesis y secreción de esta hormona, dada la función que presenta dentro de la célula de determinar qué elementos ingresan o se exteriorizan del citoplasma (31,32).

La forma pulsátil de secreción hormonal, obedece a la necesidad de la célula blanco de ser estimulada intermitentemente y no de una forma continua, para evitar la desensibilización o regulación decreciente de sus receptores membranales (33). El término desensibilización o regulación decreciente, significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal elevada conlleva a una respuesta hormonal disminuída. Este fenómeno es dado por cambios en la concentración y/o afinidad del receptor (34,35), y tiene como función el prevenir la sobrestimulación de las células. Este fenómeno fue

demostrado originalmente por Roth y cols. (36) para el receptor de insulina en el hígado.

En cuanto al receptor de LH, ha sido demostrado plenamente que la exposición de las células de Leydig a concentraciones elevadas de LH/HCG ocasiona pérdida de receptores (37-40). De acuerdo con Catt y cols. (35,37), el mecanismo más plausible mediante el cual se produce la regulación decreciente es por medio de la internalización del complejo hormona-receptor, lo que significa que tanto el complejo como algunos receptores que no fueron ocupados son endocitados y posteriormente degradados por los lisosomas (41,42). La hormona es metabolizada o inactivada, mientras que el receptor se mantiene en condición de inactividad fisiológica (no unido). Además de este mecanismo, es posible que otros, aún no dilucidados, se encuentren relacionados con este proceso. Por otro lado, algunos investigadores han informado que para que se produzca la pérdida del receptor, es necesaria la síntesis de proteínas intracelulares específicas (43), fenómeno que no ha sido confirmado por otros autores (44).

A pesar de que la degradación del ligando y la regulación decreciente son procesos estrechamente relacionados, no siempre se presentan en el mismo momento; en el caso de la HCG, se ha demostrado que la internalización del complejo hormona-receptor y la regulación decreciente se presentan en forma simultánea (45).

Dada la forma pulsátil de secreción hormonal, la cual es necesaria para evitar una desensibilización o regulación decreciente de receptores, se pensó que al igual que la secreción de LH y FSH (33,46,47) la secreción de HCG pudiera ser intermitente. De las investigaciones realizadas para analizar esta posibilidad, se encuentra un estudio *in vitro*, en el cual se utilizaron explantes placentarios del primer y tercer trimestres del embarazo, el cual demostró que la HCG presentaba 2 patrones de secreción diferentes en los explantes del primer trimestre, un patrón corto que ocurría cada 8-9 minutos, y un patrón largo que se presentaba cada 18-25 minutos; sin embargo, en los explantes placentarios del tercer

trimestre sólo se detectó un patrón de secreción pulsátil cada 40 a 50 minutos (48). En un estudio realizado in vivo en hombres y mujeres (no embarazadas) sin patologías asociadas, se encontró que la secreción de HCG se presentaba de manera pulsátil al ser cuantificada cada 10 minutos durante 6 horas, especulándose que la hormona había sido secretada por la hipófisis de una manera intermitente (49). Otro estudio in vivo (50) realizado en 5 mujeres embarazadas, en la 5ª y 8ª semanas de gestación, mostró que la secreción de HCG era pulsátil (cada 2 a 4 horas) al ser cuantificada cada 10 a 60 minutos por un período de 4 a 24 horas, al igual que en otro más (51) realizado en 6 mujeres sanas en etapas iniciales del embarazo (menos de 8 semanas), detectándose hasta 5 pulsos de secreción de HCG en un período de 24 horas al ser cuantificada la HCG cada hora. Un estudio reciente en 19 mujeres embarazadas, sin complicaciones, con edad gestacional entre 16 y 71 días, mostró que la secreción HCG es pulsátil, al ser cuantificada cada 30 minutos por 24 horas. La pulsatilidad se presentó cada 1.5-2 horas en 16 de las pacientes; este fenómeno no se observó en las 3 pacientes restantes (52). A pesar de los estudios mencionados anteriormente, hasta el momento se desconocen las características de la secreción de HCG en los últimos dos trimestres del embarazo.

3.- Regulación de la Secreción de la HCG

Hasta el momento no se conocen con precisión los mecanismos fisiológicos existentes que regulan la secreción de HCG. Se piensa que existen algunos agentes que estimulan su secreción, pero no se han encontrado hormonas reguladoras primarias a excepción del efecto estimulador que induce GnRH en condiciones in vitro (53). Dicho factor ha sido identificado en tejidos placentarios por medio de técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) y de microscopía por inmunofluorescencia, estableciéndose que su síntesis es placentaria y conociéndose con el nombre de factor semejante a GnRH (GnRH-like) (54). El efecto estimulador de GnRH sobre la secreción de HCG ha sido valorado in vitro en tejidos placentarios.

demostrándose que la GnRH sintética puede estimular la liberación de subunidades α y β de una forma dosis-dependiente (55), además de estimular la producción de AMPc (53). Un estudio *in vivo* (56) en monos Rhesus en estado de gravidez, evidenció que al administrarse GnRH por vía intravenosa, se producía un aumento en las concentraciones de HCG alcanzando niveles máximos entre 10 y 15 minutos después de la administración de GnRH, con un subsecuente incremento en las concentraciones circulantes de estrona y estradiol.

Se ha mencionado que el AMPc pudiera ser otro probable agente regulador de la secreción de HCG al actuar como un segundo mensajero (11). Este fenómeno fue valorado en cultivos de trofoblasto procedentes de placentas a término a los cuales se les adicionó o un análogo de AMPc, observando un aumento en la síntesis y secreción de HCG total y de sus subunidades libres (57-60), se observó además que la acción de AMPc estimuló la síntesis de ARNm y de proteínas específicas, regulando de manera directa la síntesis de HCG.

Por otra parte se conoce que el trofoblasto humano posee receptores para el Factor de Crecimiento Epidérmico (61), el cual es un polipéptido que tiene funciones mitogénicas, así como de fosforilación de proteínas de membrana entre otras. Algunos estudios (62,63) que han valorado el efecto de este factor, han demostrado que posee capacidad de inducir la mayor liberación de HCG tanto en tejidos de coriocarcinoma (62) como en tejidos placentarios humanos de embarazos a término o de abortos terapéuticos (63). Asimismo, el trofoblasto también posee receptores para Interleucina 6 (IL-6), la cual es una citosina que tiene la capacidad de inducir múltiples efectos biológicos dentro de los procesos de proliferación y diferenciación celular en la respuesta inmune e inflamatoria. La IL-6 ha sido estudiada *in vitro* (64) y se ha observado que tiene la capacidad de inducir la secreción de HCG, al parecer activando diferentes señales de trasducción intracelular. Otra citosina como el Factor de Necrosis Tumoral α (FNT α), el cual es un mediador en el sistema inmunológico, ha sido detectado en el trofoblasto, el cual

posee receptores para este factor (65). Se ha encontrado que este FNT α tiene un efecto regulador inhibitorio en los sistemas endócrinos (66,67). y un estudio *in vitro* (68) en tejidos trofoblásticos de embarazos tempranos mostró que el FNT α inhibe la secreción de HCG y al parecer este efecto no es debido a su citotoxicidad.

4.- Concentraciones de la HCG.

En hombres y mujeres no embarazadas y sin patologías asociadas, se han podido identificar pequeñas concentraciones de HCG, detectadas con el empleo de análisis altamente sensibles (49,69), sugiriéndose que esta producción sea de origen hipofisario (70).

En el embarazo es posible detectar la HCG a los 9 días después del aumento de LH que se presenta a la mitad del ciclo menstrual, ésto es, un día después de la implantación (71). Sus concentraciones varían ampliamente a lo largo del embarazo, aumentando aproximadamente cada 2 días en forma exponencial (72). Al inicio del embarazo se experimenta un incremento rápido, ya que a las 6 semanas las concentraciones son de 6,000 mUI/ml y alrededor de la novena semana se alcanza el pico máximo de secreción, encontrándose entre 50,000 a 100,000 mUI/ml; estas concentraciones declinan posteriormente y a partir de la 20ª semana de gestación los valores oscilan entre 10,000 a 20,000 mUI/ml, permaneciendo así hasta el término del embarazo. Las concentraciones de HCG en suero guardan relación con las urinarias (73). En la actualidad se desconocen los mecanismos exactos que regulan la forma de secreción de dicha hormona a lo largo del embarazo.

5.- Funciones de la HCG en el embarazo.

La función primordial de la HCG es la de mantener el cuerpo lúteo, el cual producirá la progesterona requerida para el adecuado desarrollo decidual y mantenimiento del embarazo temprano (74). Entre la séptima y décima semanas de gestación, la función del cuerpo lúteo es reemplazada por la placenta, órgano endócrino en el cual se realizan procesos metabólicos, entre ellos la esteroidogénesis placentaria. Aún cuando se desconoce en la actualidad el mecanismo exacto de regulación de la esteroidogénesis placentaria, la HCG parece desempeñar un papel importante (75). Otra probable función de la HCG es la estimulación de la esteroidogénesis en los testículos fetales, produciendo andrógenos durante la época de la diferenciación sexual y posterior a ésta (76). La HCG parece tener también implicaciones en el proceso de esteroidogénesis de la corteza suprarrenal fetal en las primeras etapas del embarazo (75).

Por otro lado se ha informado que la HCG tiene importantes propiedades inmunosupresivas (77), sugiriéndose que probablemente tiene efectos paracrinos o autocrinos en la producción de las prostaglandinas placentarias implicadas en los procesos de implantación y prevención del rechazo embrionario.

6.- Mediciones de la HCG.

Las concentraciones circulantes de HCG han podido ser cuantificadas gracias al empleo de técnicas analíticas tales como el radioinmunoanálisis (RIA), el cual valora la actividad inmunológica de la hormona (78). El principio fundamental de este método de cuantificación hormonal, radica en que una muestra biológica que contiene una cantidad conocida o desconocida de la hormona no radiactiva (antígeno no marcado) se incuba con una cantidad fija conocida de hormona radiactiva (antígeno marcado)

y una cantidad constante de un antisuero específico que contiene una población de anticuerpos polivalentes (79). La hormona radiomarcada compete con la hormona no radiactiva (estándar o muestra problema) por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo, de manera que entre mayor sea la cantidad de hormona presente en el estándar o muestra biológica, menor será la cantidad de hormona radiactiva que se unirá al anticuerpo. El marcaje radiactivo de los antígenos se realiza con ^{125}I o con ^3H . La hormona unida al anticuerpo se separa de la hormona no unida o libre empleando varios procedimientos. La adsorción con carbón activado recubierto con dextrán se utiliza en las hormonas esteroides (testosterona), mientras que para las hormonas proteicas (HCG) se utiliza la precipitación, en la cual puede implicarse un segundo anticuerpo. Posteriormente se cuantifica el contenido de la radiactividad de las muestras, calculándose así el porcentaje de unión, construyéndose las curvas dosis-respuesta con base en las cuales se puede estimar la concentración de la hormona en las muestras problema.

Para valorar la actividad biológica de las diferentes gonadotropinas, se han utilizado métodos tales como unión al receptor y bioensayo *in vitro* (80,81). El método de unión al receptor es menos sensible que el RIA para detectar pequeñas concentraciones de HCG, dado que es más susceptible a presentar alteraciones por las interferencias que presentan las proteínas plasmáticas. Debido a esto, los valores obtenidos por este método son algunas veces mayores que los obtenidos por RIA (80).

Los bioensayos que emplean animales de laboratorio, se han aplicado más para el análisis cuantitativo de productos biológicos y específicamente para valorar la bioactividad (capacidad de producir un efecto biológico) de diversas muestras biológicas y compararias entre sí (82). Los bioensayos más sensibles para HCG y LH se han desarrollado en células intersticiales de testículos de roedores, específicamente en células de Leydig, después de su dispersión mecánica o enzimática (81). El receptor para HCG o LH en estas células, es una glicoproteína asimétrica e hidrofóbica (83,84). La unión de una u otra de estas 2 hormonas a los receptores en las células de Leydig constituye el evento inicial en la acción de

estimulación sobre testículo. Posterior a esta estimulación se genera una producción máxima de esteroides, principalmente testosterona, ya que su sitio específico de síntesis son las células de Leydig (85). En estas células, la síntesis de andrógenos se inicia a partir del colesterol intracelular o del sintetizado de novo a partir de glucosa y ácidos grasos. Posteriormente, las mitocondrias de las células de Leydig rompen la cadena lateral del colesterol produciendo pregnenolona, siendo este esteroide el principal precursor en la síntesis de testosterona. Al utilizar varios sistemas enzimáticos, la célula de Leydig es capaz de sintetizar varios precursores de la testosterona hasta llegar a la síntesis de ésta (45). Se ha observado una respuesta significativa en término de producción de testosterona al estimular dichas células con HCG o LH in vitro (81).

El estudio de la relación Bioactividad-Immunoactividad de LH ha demostrado que las concentraciones de LH cuantificadas por RIA, correlacionan altamente con la concentración de la hormona bioactiva en plasma (86). La actividad biológica e inmunológica de HCG ha sido valorada en mujeres embarazadas sanas y con diabetes en la 8ª y 14ª semanas de gestación, siendo esta muy similar entre ambos tipos de sujetos (87). En un estudio realizado por Wide y Hobson (88) para valorar la actividad biológica de la HCG y su carga media en mujeres embarazadas en el 1º y 3º trimestres de gestación, se encontró que la molécula de HCG del 1º trimestre (10 semanas de gestación) es más ácida que la molécula del 3º trimestre y presenta una actividad biológica in vivo mayor; la actividad biológica in vivo de la molécula del 3º trimestre fue menor debido al bajo contenido de ácido siálico. Hasta el momento no se han realizado estudios valorando la actividad biológica de la HCG a lo largo de todo el embarazo.

7.- Detección de la Pulsatilidad hormonal.

El desarrollo del RIA en la década de los setenta, ha permitido la cuantificación de aquellas hormonas

que circulan en cantidades reducidas. Este hecho ha contribuido a reconocer que varias hormonas son secretadas de manera pulsátil (89). Al analizar las concentraciones hormonales en muestras sanguíneas tomadas en forma seriada durante cierto intervalo de tiempo, es posible observar varias características, cuando dichas concentraciones son graficadas en función del tiempo. Entre estos datos es posible identificar 2 regiones diferentes, de las cuales una de ellas está dada por un incremento relativo de la concentración de la hormona, dando lugar a lo que se conoce como pico; dicho aumento es seguido por una disminución en la concentración de la misma hormona, dando lugar a la segunda región conocida como valle. A la presentación de estos 2 eventos se le ha denominado pulso (89).

La detección de la pulsatilidad hormonal ha sido posible gracias al empleo de razonamientos matemáticos, que han permitido el desarrollo de programas computacionales basados en algoritmos (90-94), los cuales se han validado en cuanto a su objetividad, reproducibilidad, exactitud y versatilidad. Con el empleo de dichos métodos se han podido analizar las diversas fluctuaciones que presentan las hormonas al ser cuantificadas en forma seriada, detectándose así los pulsos de secreción y los cuales pueden mostrar diferentes características. Para identificarlos y valorarlos se les han descrito varios parámetros (90) (figura 1) y dentro de ellos se encuentran:

- a) Frecuencia: Número de pulsos en el período de tiempo establecido.
- b) Altura: Es el promedio de la longitud del pico comprendida entre 2 puntos determinados.
- c) Anchura: Es el lapso de tiempo comprendido entre el primer incremento significativo y el primer decremento significativo.
- d) Area: Es el producto que se obtiene al multiplicar el promedio de la altura del pico comprendida entre dos puntos determinados y la duración del mismo.
- e) Incremento: Es el aumento progresivo del valor más alto y se expresa como el incremento entre dicho valor y la concentración media de la parte más baja (valle).

f) **Intervalo:** Es el tiempo que transcurre entre los valores máximos de 2 picos adyacentes.

Muchos investigadores han propuesto que el caracterizar el patrón pulsátil de secreción hormonal, permitirá en el futuro un mejor entendimiento de la fisiopatología y, en consecuencia, un mejor abordaje en el estudio de los mecanismos fisiológicos que controlan estos sistemas endocrinológicos interactivos tan complejos.

CARACTERISTICAS DE LOS PULSOS

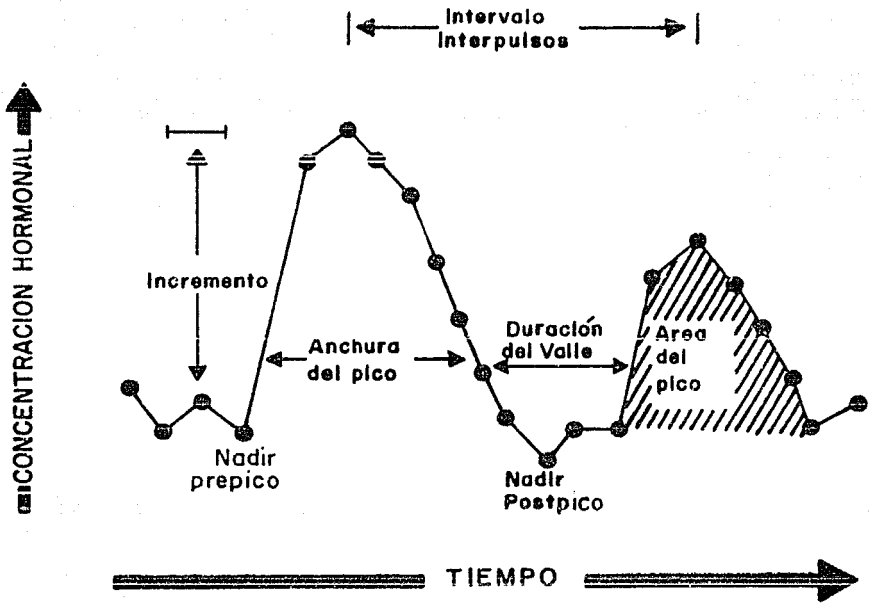


FIGURA 1

II. OBJETIVO

Con el fin de conocer la forma de secreción de HCG durante los diferentes trimestres del embarazo, se estudió la secreción de dicha hormona cada 20 minutos durante 24 horas, cuantificando sus concentraciones en suero mediante radioinmunoanálisis (RIA); asimismo se valoró su actividad biológica (AB) en sistemas in vitro durante cada uno de los trimestres estudiados.

III. HIPOTESIS

La secreción de HCG se presenta de manera pulsátil en los diferentes trimestres del embarazo; las características del patrón de su secreción pulsátil son diferentes en cada trimestre. La bioactividad de la HCG in vitro, varía de acuerdo a los trimestres del embarazo.

IV. MATERIAL Y METODOS

Se trata de un estudio descriptivo, observacional y prolectivo, en el cual previa evaluación y aprobación del protocolo de estudio por el comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de la Nutrición, éste se llevó a cabo en voluntarias embarazadas quienes con anterioridad asistían a la Consulta de Endocrinología Reproductiva e Infertilidad del INNSZ. El consentimiento voluntario fue por escrito, y en todos los casos se cumplieron con los siguientes criterios:

A. CRITERIOS DE INCLUSION.

- 1.- Presencia de embarazo, diagnosticado por ausencia de menstruación (8 semanas) y positividad en la determinación de HCG urinaria y confirmado mediante ultrasonido pélvico.
- 2.- Edad comprendida entre los 20 y los 32 años de edad.
- 3.- Peso y talla comprendidos entre la percentila 3 y 97 para mujeres adultas mexicanas.
- 4.- Ausencia de enfermedades crónicas debilitantes.
- 5.- Inexistencia de patologías concomitantes después de una evaluación clínica detallada.
- 6.- Valores de glucosa, urea, creatinina y pruebas de función hepática dentro de los intervalos de referencia.
- 7.- Presentar 3 días antes del estudio valor de hemoglobina superior a 12 g/dl, hematocrito mayor de 36% y concentraciones de hierro, folatos y vitamina B₁₂ dentro de los valores de referencia.
- 8.- Ausencia de cualquier tipo de sangrado.
- 9.- Consentimiento voluntario de participar en el estudio.

B. CRITERIOS DE ELIMINACION.

- 1.- Inicio de cualquier tipo de enfermedad que pudiese complicar el curso del embarazo o poner en peligro la vida de la madre y/o el feto.
- 2.- Alteración en alguno de los parámetros de laboratorio detallados en A6 o A7, de ser así se inició tratamiento necesario para corregir dicha alteración.
- 3.- Decisión de no continuar en el estudio.
- 4.- Si durante el momento del estudio se presentara alguna alteración en tensión arterial, frecuencia cardíaca o temperatura que indicara la posibilidad de alguna alteración física.
- 5.- Si durante el parto se determinara alguna alteración macroscópica de la placenta.

C. SUJETOS

En total fueron 11 mujeres embarazadas las que se incluyeron en el estudio, de éstas, 2 mujeres fueron eliminadas por razones médicas: una de ellas por presentar alteraciones hemodinámicas caracterizadas por hipotensión y taquicardia, mientras que la otra fue eliminada por presentar anemia grado 2. Así mismo por razones no médicas, otras 2 mujeres fueron retiradas del estudio, una de ellas por presentar parto prematuro en la semana 23 de gestación y la otra por baja voluntaria.

El estudio de la pulsatilidad y la bioactividad de la HCG se realizó en las 7 mujeres restantes, con edades entre 22 y 32 años, con peso y talla entre las percentilas 3 y 97 para mujeres mexicanas (Tabla 1). Tres de estas pacientes consultaban en el Departamento de Biología de la Reproducción de INNSZ por presentar los siguientes diagnósticos: Síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) en remisión 4 meses previos al estudio (n=1), historia de anorexia nervosa primaria 6 meses antes del estudio (n=1) y

esterilidad por factor tubario (n=1). Las otras 4, fueron mujeres normales que aceptaron participar voluntariamente en el estudio. En todas las pacientes el embarazo se logró de manera espontánea, excepto en la paciente con SOP que requirió de inductores de ovulación (citrato de clomifén) (Tabla 1). En todas ellas se realizó historia clínica completa, sin encontrarse ningún tipo de patología concomitante y 3 días previos a cada día de estudio, se les realizaron los estudios de laboratorio (BH, hierro, folatos, vitamina B¹², glucosa, urea, creatinina y PFH). Los resultados de estos estudios se encontraron dentro de los límites de referencia (Tabla 2 y 3). En cada paciente el embarazo cursó sin complicaciones llegando a término y durante el parto no se observaron anomalías placentarias.

D. PROTOCOLO DE ESTUDIO

Aquellas mujeres embarazadas que resultaron elegibles fueron estudiadas a las 12, 24 y 36 semanas de gestación. Doce horas antes al día de estudio, las pacientes fueron internadas en la Unidad Metabólica del Instituto Nacional de la Nutrición con la finalidad de que se habituaran al lugar físico donde se les practicaría la prueba. Cada estudio se inició a las 8:00 am. Media hora antes de su inicio a las mujeres se le instaló un catéter corto (mariposa # 21, Lab. Abbott) en una vena antecubital. Una vez iniciado el estudio las muestras sanguíneas se tomaron cada 20 minutos durante 24 horas, obteniéndose 2 ml en cada toma (146 ml totales) y previo a cada toma de muestra sanguínea, se desecharon las 5 primeras gotas correspondientes a la solución salina. Se ha demostrado que el extraer hasta 450 mls de sangre a mujeres embarazadas no produce alteración alguna ni a la madre ni al feto (95-97).

Durante las 24 horas del estudio, las mujeres permanecieron en posición de decúbito, tomaron sus alimentos y durmieron en horario habitual. A lo largo del estudio se tomaron signos vitales cada 30 minutos y en el último trimestre se valoró el foco fetal.

TABLA 1
CARACTERISTICAS CLINICAS

SUJETO No.	EDAD (años)	TALLA (cm)	DIAGNOSTICO PREVIO	PESO (Kg) 12 SEMANAS GESTACION	TIPO DE CONCEPCION
1	32	160	SANA	54,250	ESPONTANEA
2	32	156	SOP	58,000	INDUCIDA**
3	27	157	HISTORIA DE AN	46,090	ESPONTANEA
4	30	164	SANA	63,000	ESPONTANEA
5	30	166	INFERTILIDAD*	81,890	ESPONTANEA
6	22	156	SANA	50,100	ESPONTANEA
7	27	160	SANA	61,300	ESPONTANEA

SOP = Síndrome de Ovarios Poliquísticos

AN = Anorexia Nervosa

* = Factor Tubario

** = Citrato de Clomifen

TABLA 2

DATOS DE LABORATORIO I

ESTUDIO (Valores de Referencia)	1° TRIMESTRE (Intervalos)	2° TRIMESTRE (Intervalos)	3° TRIMESTRE (Intervalos)
Hb (12-16 g/dL)	12.5-14.1	12-13.1	12.2-14.0
Ht (36-47 %)	36.5-41.9	36.5-39.8	36.0-42.9
Hierro (60-160 µg %)	75-143	50-105	70-120
Folatos (6-20 ng/mL)	9-20	4-20	9.7-20
Vitamina B 12 (150-1150 ppb/mL)	204-346	120-1000	160-1100
Glucosa (70-110 mg/dL)	70-94	70-92	74-89
Urea (7-16 mg/dL)	7-11	7-9	7-8
Creatinina (.8-1.4 mg/dL)	.8-.9	.8-.9	.8-.9

TABLA 3
DATOS DE LABORATORIO II

ESTUDIO (Valores de Referencia)	1° TRIMESTRE (Intervalos)	2° TRIMESTRE (Intervalos)	3° TRIMESTRE (Intervalos)
Bilirrubina Total (0.1-0.9 mg/dL)	0.0-0.8	0.1-0.9	0.1-0.9
Bilirrubina Directa (0.0-0.2 mg/dL)	0.0-0.2	0.0-0.3	0.1-0.2
Fosfatasa Alcalina (49-164 U/L)	65-154	112-160	96-145
TGC* (14-34)	14-20	16-30	18-32
TGP** (2-54)	4-30	5-50	8-45
Proteínas Totales (6.2-8.4 g/dL)	6-7	6-8.4	6-8.4
Albumina (3.4-4.7 g/dL)	3.8-4.6	4-4.5	3-4.4
Globulina (2.6-4.0 g/dL)	3-4	3.2-4	2.8-3.8

- * Transaminasa Glutámico-oxaloacética
- ** Transaminasa Glutámico-piruvica

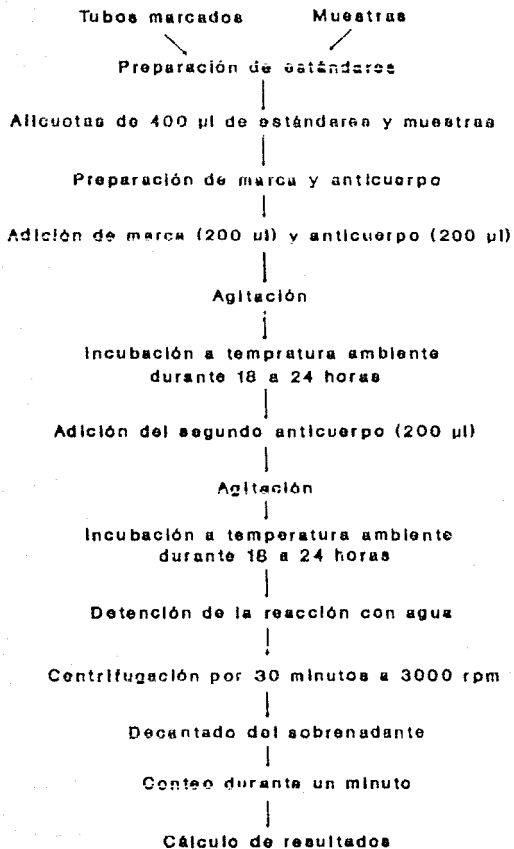
E. CUANTIFICACION HORMONAL.

La sangre obtenida de las 73 muestras se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos y se separó el suero, congelándose éste a -20 °C en viales de plástico hasta el momento en que se realizó la cuantificación de su HCG. El método utilizado para la cuantificación de HCG y de testosterona fue el radioinmunoanálisis.

1.- RIA de HCG.

Este RIA se realizó siguiendo la metodología descrita por Suñi y colaboradores (98), la cual se encuentra resumida brevemente en la figura 2. Todas las muestras de un día de estudio fueron incluidas en una misma corrida en incubaciones por triplicado. Para el RIA se utilizó como estándar una preparación altamente purificada de HCG (HCG CR 121), proporcionada por los Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EUA; ésta misma se utilizó como trazador al ser marcada con ^{125}I , siguiendo el método de la Cloramina T (99), el cual se encuentra resumido en la figura 3. Las concentraciones del estándar partieron de 0.125 ng hasta 30 ng/tubo, obteniendo así la curva estándar tipo que esta representada en la figura 4. El anticuerpo (anti-HCG-H180, batch #2, Institutos Nacionales de Salud, EUA) se utilizó a una dilución final de 1:100,000, con un porcentaje de reacción cruzada de 3.22% para la subunidad β libre y de 1.23% para la fracción α libre (figura 5a). La sensibilidad del análisis fue de 0.125 ng/tubo (60). Dada la concentración de HCG de las muestras séricas en los diferentes trimestres, éstas fueron diluidas previo a su análisis en amortiguador fosfato al 0.05 M conteniendo gelatina al 0.1%. En el primer trimestre el intervalo de las diluciones fue desde 1:200 a 1:400, en el 2º y 3º trimestre de 1:40 a 1:100. Las diluciones elegidas fueron las óptimas, para que las concentraciones de las muestras fueran leídas en la parte central de la curva estándar, donde la variabilidad es mínima (figura 5b). Como

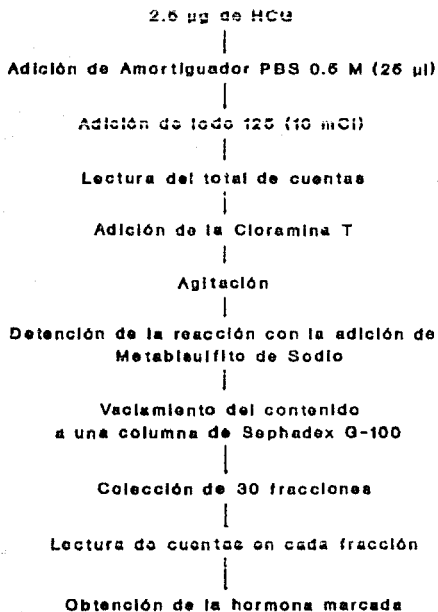
RIA DE HGG



Sufi y Cole., 1986 (96)

FIGURA 2

IODACION DE HCG POR EL METODO DE LA CLORAMINA T



Greenwood FC y Cole., 1965 (99)

FIGURA 3

CURVA ESTANDAR PARA CUANTIFICACION DE HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA

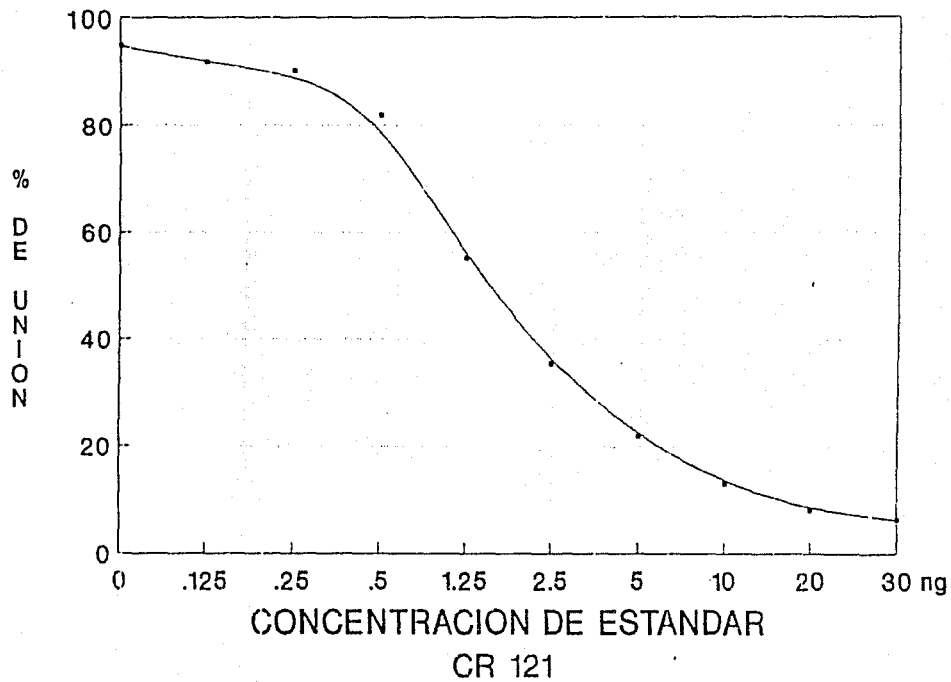


FIGURA 4

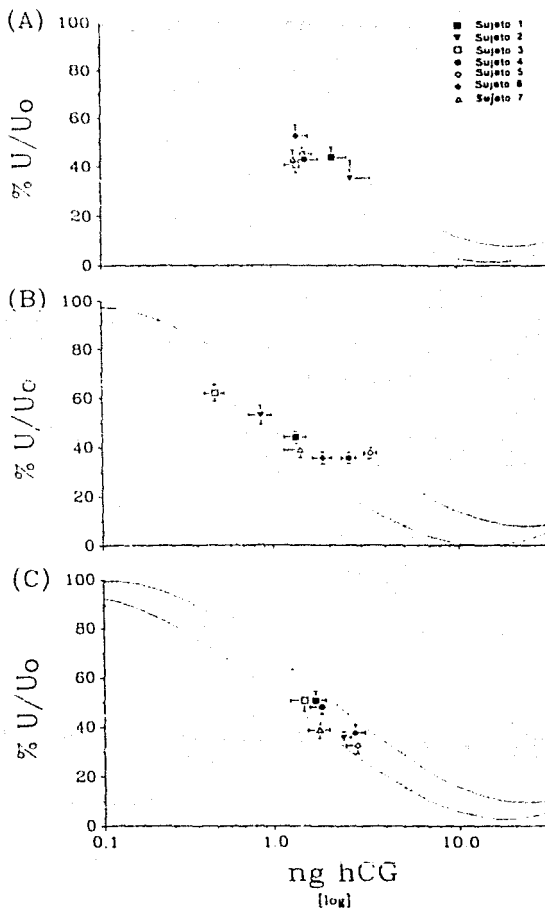


FIGURA 5b. Error envuelto de las curvas - dosis respuesta en en los $n = 14$ RIAs realizados durante el primero (A), segundo (B) y tercer (C) trimestres del embarazo. Las líneas punteadas representan los límites de 2 veces el coeficiente de variación entre los análisis. Los símbolos representan la media \pm de de las muestras problema.

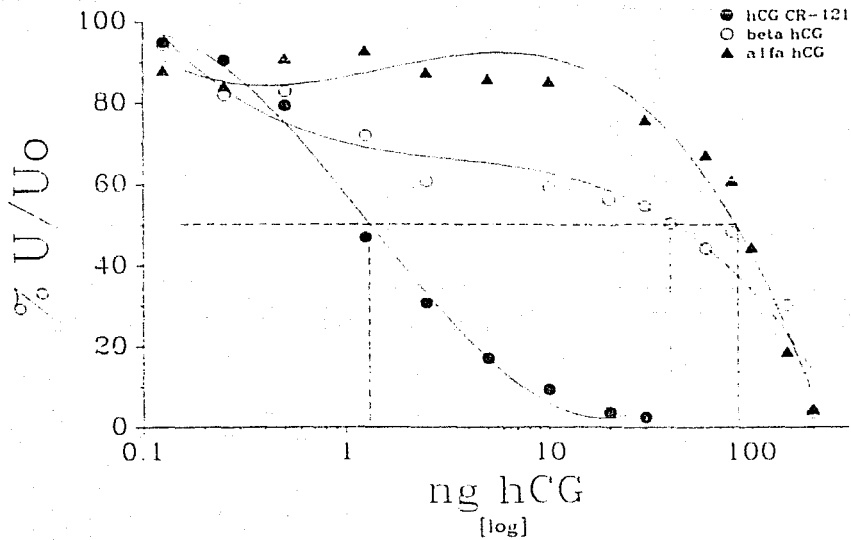


FIGURA 5a. Curvas dosis-respuesta de HCG CR-121, β -HCG CR-123 y α -HCG CR-123, empleando como anticuerpo al anti-HCG-H180. Los resultados son expresados como el log de la dosis (X) y la relación U/U_0 (Y). Las líneas discontinuas señalan las DE_{50} para cada una de las curvas.

parámetros de control de calidad, se calcularon el coeficiente de variación dentro y entre los análisis, los cuales fueron < 10% y < 14% respectivamente.

2.- RIA de Testosterona.

La cantidad de testosterona producida in vitro durante el bioensayo se determinó por RIA previa dilución 1:2 en amortiguador fosfato 0.05 M de las muestras, siguiendo la metodología descrita en la figura 6. Todas las muestras obtenidas de un bioensayo fueron incluidas en la misma corrida para minimizar las variaciones entre los análisis. El estándar que se utilizó (Testosterona [³H]; Amersham International, Inglaterra) y el anticuerpo se obtuvo del Programa Especial en Investigación en Reproducción de la OMS (Ginebra, Suiza). Las dosis de la curva estándar fueron desde 9.9 a 633.6 ng/ml, y la dilución final de anticuerpo fue de 1:210,000. Para evitar variaciones entre los análisis, todas las muestras correspondientes a los tres trimestres de embarazo de una paciente se incluyeron, así mismo, en la misma corrida. Como control de calidad se calcularon los coeficientes de variación dentro y entre los análisis, los cuales fueron < 10%.

F. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA HCG CIRCULANTE.

La actividad biológica de HCG se cuantificó mediante el bioensayo en células intersticiales de testículo de ratón, siguiendo el método descrito por Van Damme (100) y que se resume en las figuras 7a y 7b. Para la realización del bioensayo se utilizó un estándar altamente purificado (HCG CR 121), el cual fue incluido en concentraciones de 3.9 pg a 500 pg/tubo. Las muestras de suero de cada trimestre a las cuales se les valoraría su actividad biológica, fueron formadas a partir de una poza de 3 muestras tomadas

RIA DE TESTOSTERONA

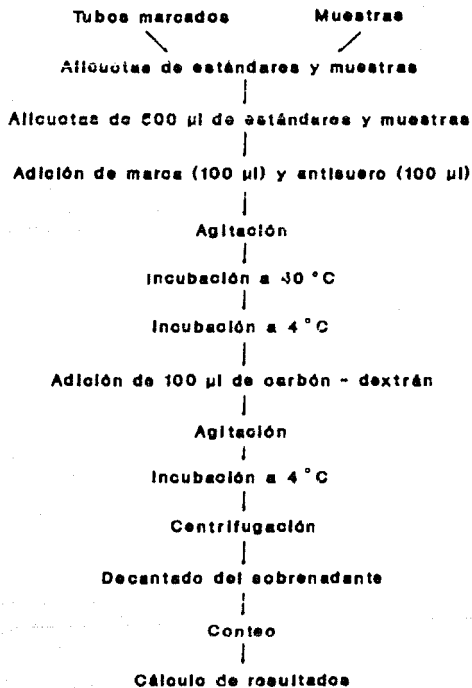
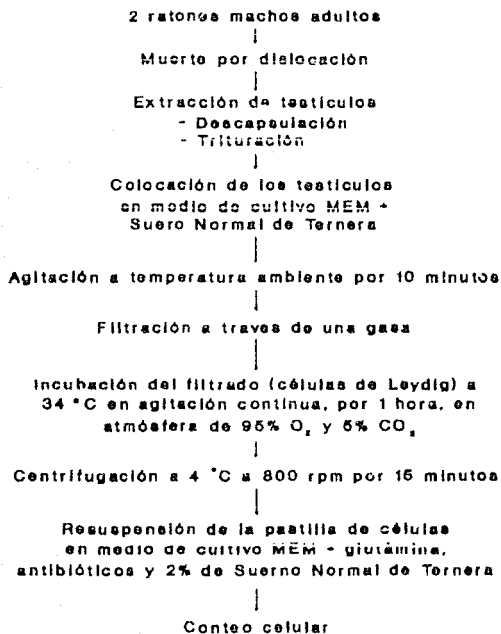


FIGURA 6

BIOENSAYO DE HCG in vitro

A) OBTENCION DE CELULAS



Van Damme MP y Cole., 1974 (100)

FIGURA 7 a

BIOENSAYO DE HCG in vitro

B) OBTENCION DE CELULAS

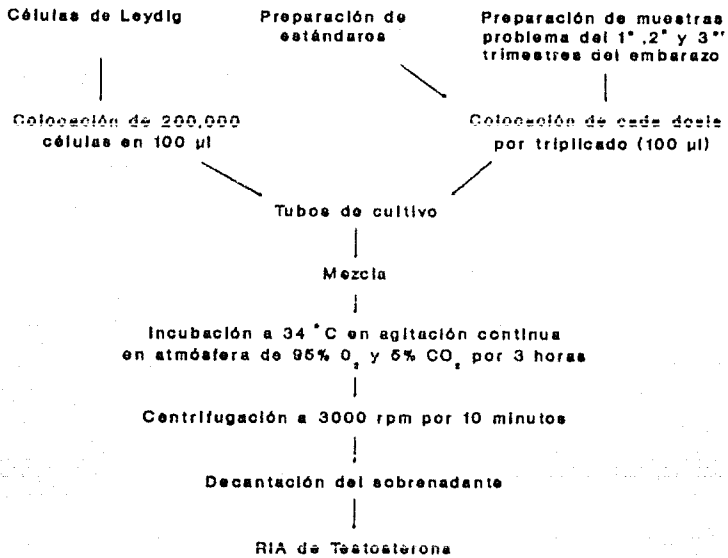


FIGURA 7 b

al azar; a cada una de éstas se les cuantificó sus concentraciones de HCG para incluirse en el bioensayo a las dosis de 3.9 a 250 pg/tubo cada una en incubaciones por triplicado.

La actividad biológica aparente de la HCG fue expresada como la relación bioactividad - inmunoactividad. Con el fin de evitar variaciones entre los análisis, todas las muestras correspondientes a los tres trimestres de estudio de cada paciente se incluyeron en un mismo ensayo. Como controles de calidad se calcularon los coeficientes de variación dentro de los análisis, el cual fué $< 10\%$.

G. ANALISIS ESTADISTICO.

1.- Pulsos de HCG.

Para el análisis de los pulsos de secreción de la gonadotropina, se utilizó el programa de cómputo CLUSTER, diseñado para detectar los incrementos y los decrementos significativos en una serie de datos. La discriminación de las variaciones experimentales se basa en un modelo de análisis de conglomerados por un análisis de varianza (ANOVA) corregida y pruebas no paramétricas para dos muestras (101), tomando en consideración que las fluctuaciones hormonales dependen de tres parámetros principales: a) pulsos finitos de secreción hormonal, b) niveles basales sistemáticos que representan a la secreción tónica o circadiana, c) variaciones experimentales inherentes al estudio (toma de muestra, variación en el procesamiento, etc).

Los resultados obtenidos se compararon tomando en cuenta los siguientes parámetros: a) el número de pulsos en 24 horas, b) la altura, c) la anchura, d) el área de los pulsos, e) el mayor incremento de los pulsos y f) el intervalo interpulsos. También se consideró en el análisis, la frecuencia de los valles y la

anchura de éstos. Dado que los valores obtenidos de todos los parámetros anteriormente mencionados no reúnan las características de una distribución normal, se determinó la mediana y el intervalo mínimo y máximo.

Para discriminar las diferencias entre el día y la noche de cada uno de los parámetros en cada trimestre, se utilizó una prueba no paramétrica (Wilcoxon) y un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis); estas pruebas se emplearon así mismo, para discriminar las diferencias entre los distintos trimestres del embarazo, utilizando un nivel alfa de significancia < 0.05 .

2.- Bioactividad de HCG.

Para el análisis de la bioactividad de HCG en los diferentes trimestres del embarazo, se utilizó el programa de compute ALLFIT (102) diseñado para el análisis de curvas dosis-respuesta, y que calcula la potencia relativa de cada bioensayos corrido, así como el paralelismo de las curvas dosis-respuesta basándose en un modelo logístico que utiliza 4 parámetros que son : a) Respuesta a dosis cero b) Pendiente de la curva c) Dosis efectiva al 50% (DE₅₀) d) Respuesta máxima.

La ecuación del modelo logístico es la siguiente:

$$Y = \frac{a - d}{1 + (x/c)^b} + d$$

X = dosis

a = Respuesta a dosis cero

Y = Respuesta

b = Pendiente

c = Dosis efectiva máxima al 50% o DE₅₀

d = Respuesta máxima

Los resultados se expresaron en términos de la potencia relativa al estándar HCG-CR 121 obtenida por la relación $DE_{30} \text{ HCG-CR 121} / DE_{30} \text{ muestras problema}$. Las potencias relativas de HCG de 5 sujetos completos (los 3 trimestres) y de una paciente en la que solo se incluyeron el 2º y 3º trimestres, se compararon por medio de una ANOVA y prueba de t pareada. Para valorar las diferencias existentes entre cada trimestre, se utilizó un nivel alfa de significancia de ≤ 0.05 .

V. RESULTADOS

Las concentraciones de HCG ($\mu\text{g/ml}$) fueron diferentes en cada uno de los trimestres (1^o, 2^o y 3^o) del embarazo para cada una de las pacientes. La mediana en el 1^o trimestre fue de 5.91 $\mu\text{g/ml}$ y sus intervalos de concentración mínimo y máximo fueron de 2.75 y 21.19 $\mu\text{g/ml}$. En el 2^o trimestre, la mediana fue de 0.84 $\mu\text{g/ml}$ y de 0.18 a 2.68 $\mu\text{g/ml}$ sus intervalos de concentración mínimo y máximo; la mediana en el 3^o trimestre fue de 1.44 $\mu\text{g/ml}$ fue y de 0.36 a 2.85 $\mu\text{g/ml}$ sus intervalos de concentración mínimo y máximo. La concentración de HCG significativamente más alta se presentó en el 1^o trimestre ($p < 0.01$) (Tabla 4).

A. PULSATILIDAD DE HCG.

En las figuras 8 a 14 se muestran los patrones de pulsatilidad de HCG obtenidos en cada una de las mujeres en los diferentes trimestres del embarazo, identificándose en cada uno de ellos la frecuencia, altura, anchura, área e incremento de los pulsos, así como intervalo entre pulsos. Por otra parte también se identificaron la frecuencia y anchura de los valles.

La mediana de la frecuencia de los pulsos de HCG en 24 horas fue de 10 en el 1^o trimestre, de 10 en el 2^o trimestre y de 14 en el 3^o trimestre, siendo la frecuencia de pulsos significativamente mayor en el 3^o trimestre ($p < 0.05$). La frecuencia de los pulsos de HCG también se valoró en las primeras 12 horas (día) del estudio, encontrando una mediana de 5 en el 1^o trimestre, de 4 en el 2^o trimestre y de 7 en el 3^o trimestre, no encontrando diferencias significativas al compararse los 3 trimestres. Sin embargo al comparar la frecuencia de los pulsos de HCG en las segundas 12 horas (noche) del estudio, cuyas medianas fueron de 5, 5 y 7 en el 1^o, 2^o y 3^o trimestre respectivamente, la frecuencia de pulsos fue

TABLA 4

CONCENTRACION PROMEDIO DE HCG ($\mu\text{g/ml}$)
EN LOS DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO

SUJETO No.	1° TRIMESTRE **	2° TRIMESTRE	3° TRIMESTRE
1	16.87	2.68	2.85
2	21.19	0.36	1.57
3	5.45	0.43	1.44
4	6.05	0.34	1.68
5	5.91	0.84	1.41
6	2.75	0.18	0.36
7	5.26	0.27	0.39
Mediana	5.91	0.84	1.44

** ANOVA (Kruskal-Wallis) $p = < 0.01$

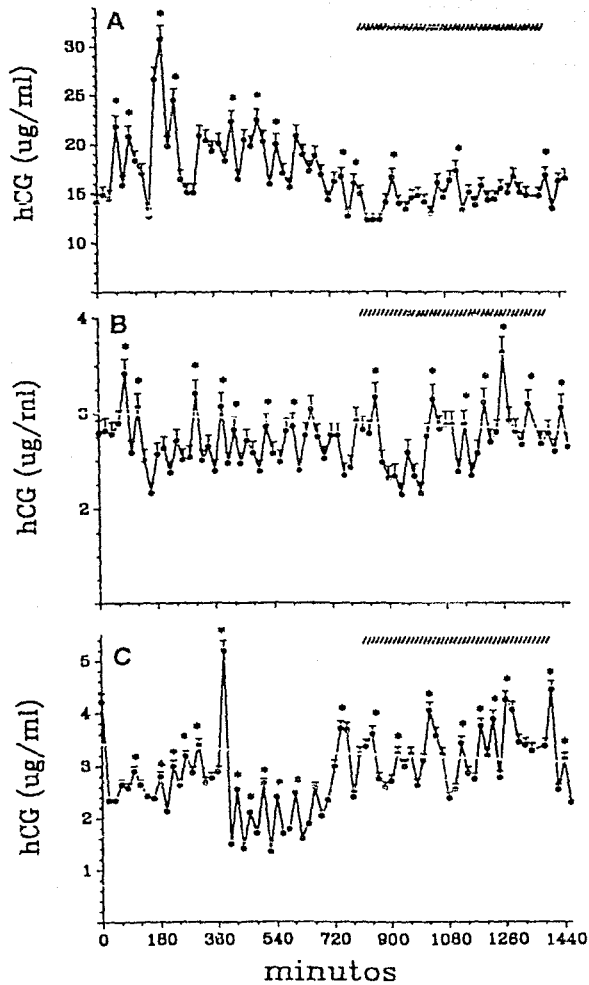


FIGURA 8. Patrón de secreción pulsátil de HCG durante 24 horas en el SUJETO 1 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. // // // // Horas de sueño; * Incrementos significativos (picos).

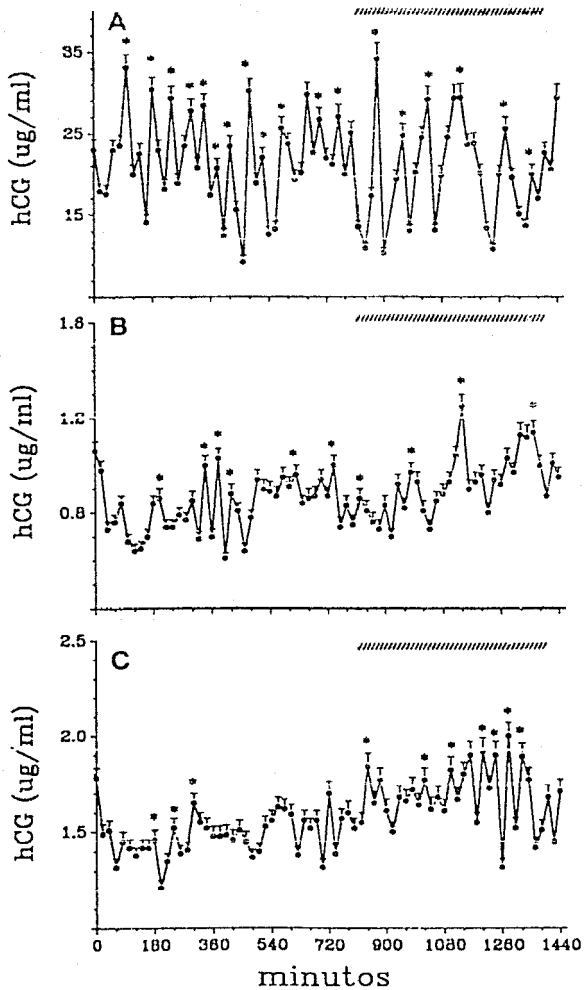


FIGURA 9. Patrón de secreción pulsátil de HCG durante 24 horas en el SUJETO 2 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. // Hours de sueño; * Incrementos significativos (picos).

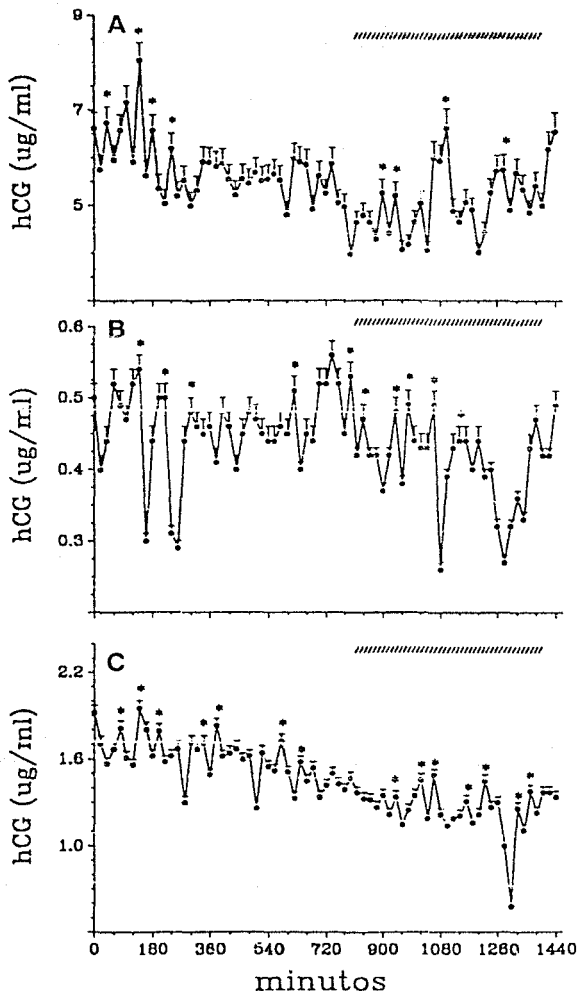


FIGURA 10. Patrón de secreción pulsátil de HCG durante 24 horas en el SUJETO 3 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. // Hours of sleep; * Increments significant (peaks).

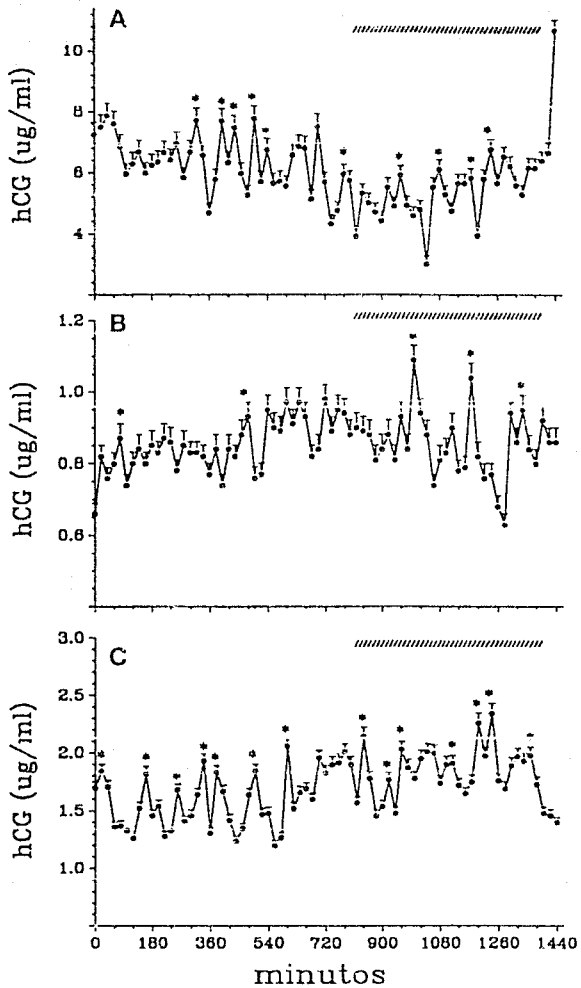


FIGURA 11. Patrón de secreción pulsátil de HCG durante 24 horas en el SUJETO 4 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. // // // // Horas de sueño; * Incrementos significativos (picos).

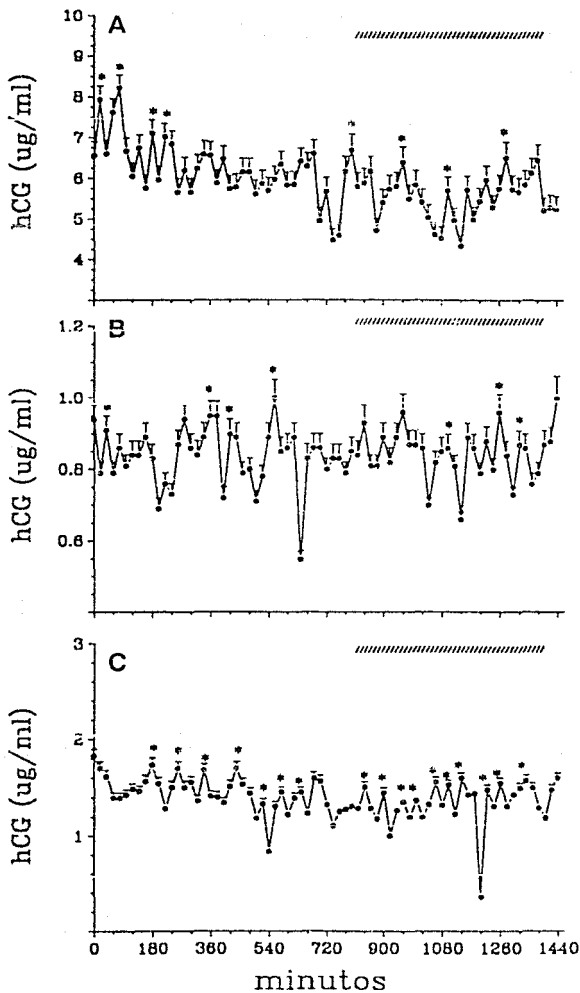


FIGURA 12. Patrón de secreción pulsátil de HCG durante 24 horas en el SUJETO 5 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. //// Horas de sueño; * Incrementos significativos (picos).

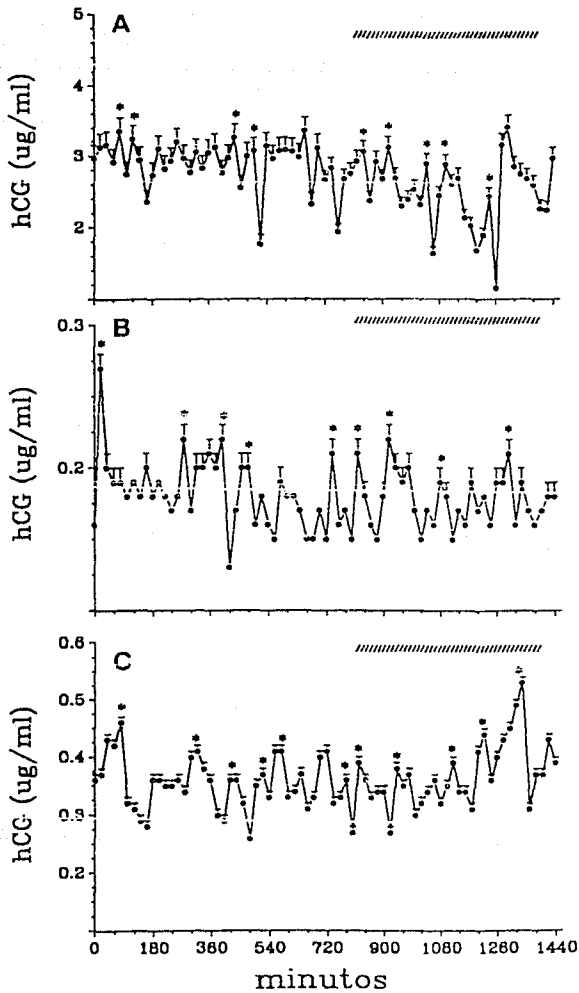


FIGURA 13. Patrón de secreción pulsátil de HCG durante 24 horas en el SUJETO 6 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. // // // // Horas de sueño; * Incrementos significativos (picos).

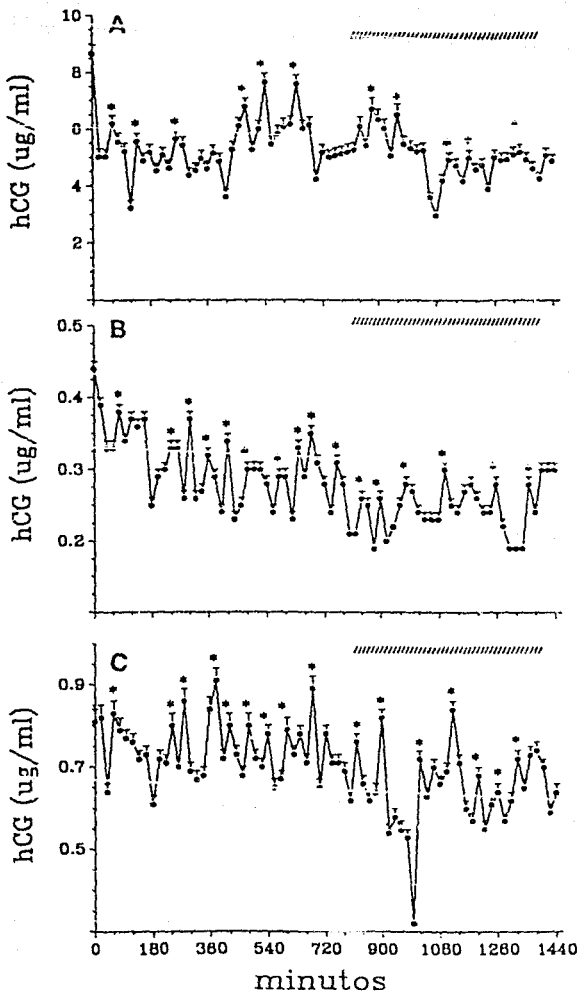


FIGURA 14. Patrón de secreción pulsátil de HCG durante 24 horas en el SUJETO 7 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. // Hours de sueño; * Incrementos significativos (picos)

significativamente mayor en el 3° trimestre ($p=0.01$) (Tabla 5). No se observó significancia estadística al comparar las diferencias encontradas en la frecuencia de pulsos en el día y la noche en cada uno de los trimestres.

La mediana de la altura de los pulsos de HCG fue de 6.8 $\mu\text{g/ml}$ en el 1° trimestre, de 0.92 $\mu\text{g/ml}$ en el 2° trimestre y de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ en el 3° trimestre, teniendo los pulsos del 1° trimestre una altura significativamente mayor ($p < 0.01$). La altura de los pulsos también se valoró por separado, en el día (primeras 12 horas) y en la noche (segundas 12 horas), encontrándose que las diferencias existentes fueron también significativas al comparar 1° vs 2° y 1° vs 3° ($p < 0.01$). Al compararse las diferencias encontradas entre el día y la noche de cada trimestre, éstas no fueron significativas (Tabla 5).

Por otra parte no se encontró significancia estadística en cuanto a las diferencias observadas en la anchura de los pulsos en los diferentes trimestres del embarazo, ya que la mediana de dicho parámetro fue de 72, 84 y 62 minutos en el 1°, 2° y 3° trimestre del embarazo respectivamente (Tabla 5).

Respecto a la mediana del área de los pulsos de HCG en 24 horas, esta fue de 88.19 $\mu\text{g/ml/min}$ en el 1° trimestre, en el 2° trimestre fue de 3.37 $\mu\text{g/ml/min}$ y de 11.27 $\mu\text{g/ml/min}$ en el 3° trimestre, siendo el área de los pulsos significativamente mayor en el 1° trimestre ($p < 0.01$) (Tabla 6). No se observaron diferencias significativas entre cada trimestre al comparar el área de los pulsos en el día y la noche

El incremento de los pulsos de HCG en 24 horas fue otro de los parámetros valorados. Este aumento presentó una mediana de 1.65 $\mu\text{g/ml}$ en el 1° trimestre, 0.19 $\mu\text{g/ml}$ en el 2° trimestre y de 0.29 $\mu\text{g/ml}$ en el 3° trimestre, encontrándose que los pulsos del 1° trimestre mostraron un incremento mayor en forma significativa ($p < 0.01$) (Tabla 6).

TABLA 5
CARACTERÍSTICAS DE LOS PULSOS
EN LOS DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO I

PULSOS	1° TRIMESTRE (Mediana e Intervalos)			2° TRIMESTRE (Mediana e Intervalos)			3° TRIMESTRE (Mediana e Intervalos)		
	D	N	TOTAL	D	N	TOTAL	D	N	TOTAL
FRECUENCIA	5 (4-11)	5 (4-8)	10 (8-18)	4 (2-9)	5 (3-7)	10 (5-16)	7 (4-11)	7** (6-10)	14* (11-21)
ALTURA (µg/ml)	7.5 (3.2-27.2)	6.1 (3.2-27)	6.8 *** (3-27.1)	0.9 (0.2-3)	0.8 (0.2-3.1)	0.92 (0.2-3.1)	1.5 (0.4-2.9)	1.4 (0.4-3.7)	1.5 (0.4-3.5)
ANCHURA (minutos)	41) (35-95)	85 (60-96)	72 (49-81)	64 (44-180)	84 (56-126)	84 (53-153)	51.4 (30.5-166)	46 (40-62.8)	62 (38.4-114)

Wilcoxon.

* p<0.05 (1° vs 3°) (2° vs 3°)

** p=0.01 (1° vs 3°) (2° vs 3°)

*** p<0.01 (1° vs 2°) (1° vs 3°)

D = Día

N = Noche

TABLA 6
CARACTERISTICAS DE LOS PULSOS
EN LOS DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO II

PULSOS	1° TRIMESTRE (Mediana e Intervalos)	2° TRIMESTRE (Mediana e Intervalos)	3° TRIMESTRE (Mediana e intervalos)
AREA ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$)	88.19 (52.01 - 428.19) *	3.37 (2.43 - 21.90)	11.27 (4.91 - 22.67)
INCREMENTO ($\mu\text{g/ml}$)	1.65 (0.84 - 12.39) **	0.19 (0.06 - 0.60)	0.29 (0.10 - 0.91)
INTERVALO (minutos)	108 (69.52 - 120)	130 (87.5 - 146.66) ***	80.41 (62.77 - 118.50)

Wilcoxon.

- * $p < 0.01$ (1° vs 2°) (1° vs 3°)
- ** $p < 0.01$ (1° vs 2°) (1° vs 3°)
- *** $p = 0.01$ (2° vs 3°)

La mediana de los intervalos de tiempo entre pulsos fue de 108 minutos en el 1° trimestre, de 130 minutos en el 2° trimestre y en el 3° trimestre de 80.41 minutos, siendo mayor este intervalo en el 2° trimestre al ser comparado con el intervalo de tiempo entre pulsos del 3° trimestre ($p=0.01$) (Tabla 6).

La frecuencia de los valles fue significativamente mayor en el 3° trimestre ($p=0.05$), dado que la mediana de la frecuencia de los valles de HCG en 24 horas fue de 10 en el 1° y 2° trimestre y de 15 en el 3° trimestre (Tabla 7). Las diferencias encontradas en la anchura de los valles no fueron significativas, siendo la mediana de la anchura de los valles de 33.33, 30 y 28.61 minutos en el 1°, 2° y 3° trimestre respectivamente (Tabla 7).

B. BIOACTIVIDAD in vitro DE LA HCG.

Dentro de los resultados de bioactividad de HCG no se incluyó al sujeto No. 4, dado que sus muestras de suero probablemente se dañaron (bioactividad extremadamente baja). Asimismo tampoco se incluyó el resultado de la bioactividad en el 1° trimestre del sujeto No. 6 ya que su curva dosis- respuesta no fue paralela con aquella generada por el estándar. Por lo demás, se observó una respuesta significativa en términos de producción de testosterona por las células de Leydig de testículo de ratón adulto, al ser estimuladas con las muestras de suero conteniendo HCG de los diferentes trimestres del embarazo. Se encontró una alta correlación ($r=0.84$) en las curvas dosis-respuesta, como se muestra en la figura 15, la cual es representativa de las curvas dosis-respuesta (estándar y HCG del 1°, 2° y 3° trimestre) obtenidas en cada bioensayo.

A través del análisis estadístico utilizado (ALLFIT) se encontró que las curvas dosis-respuesta no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre sus pendientes y por lo tanto fueron paralelas entre

TABLA 7
CARACTERISTICAS DE LOS VALLES
EN LOS DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO

VALLES	1° TRIMESTRE (Mediana e Intervalos)	2° TRIMESTRE (Mediana e Intervalos)	3° TRIMESTRE (Mediana e Intervalos)
FRECUENCIA	10 (7 - 19)	10 (6 - 8)	15 (12 - 21)
ANCHURA (minutos)	33.33 (20.90 - 64)	30 (20 - 58)	28.61 (24.16 - 32.57)

ANOVA (Kruskal-Wallis) $p = 0.05$

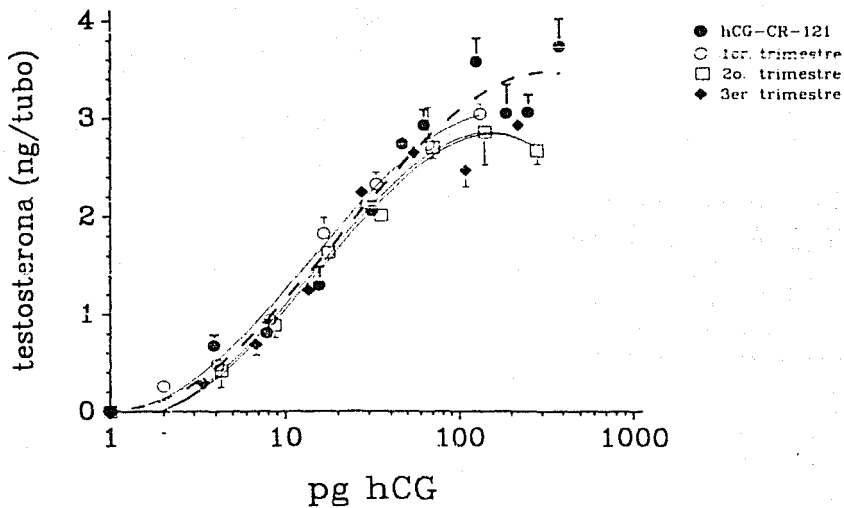


FIGURA 15. Curvas dosis - respuesta representativas de la producción de testosterona durante la estimulación de células de Leydig de ratón con HCG de los diferentes trimestres del embarazo y el estándar CR 121 ($r = 0.84$).

sí (Figura 16). Por lo que respecta a la respuesta máxima, expresada en ng de testosterona/tubo, se observó que la respuesta fue muy similar bajo el estímulo de la HCG de los diferentes trimestres del embarazo en cada una de las pacientes (Tabla 8). Sin embargo, se observaron diferencias en las dosis efectivas al 50% (DE_{50}) en cada una de las curvas dosis-respuesta, tendiendo a ser ésta menor en las curvas dosis-respuesta de HCG del 1^{er} trimestre del embarazo (Tabla 8).

El producto obtenido de la relación que se estableció entre la DE_{50} de la curva dosis-respuesta del estándar con cada una de las DE_{50} de las curvas dosis-respuesta de HCG de los diferentes trimestres, nos dio como resultado las potencias relativas para cada curva dosis-respuesta, cuyo valor varió en cada trimestre. El promedio \pm desviación estándar para el 1^{er} trimestre fue de 1.144 ± 0.14 , de 0.872 ± 0.22 para el 2^o trimestre y de 0.796 ± 0.12 para el 3^{er} trimestre, encontrando que la HCG del 1^{er} trimestre presentó una potencia relativa significativamente mayor ($p < 0.05$) que la HCG del 2^o y 3^{er} trimestres (Tabla 9).

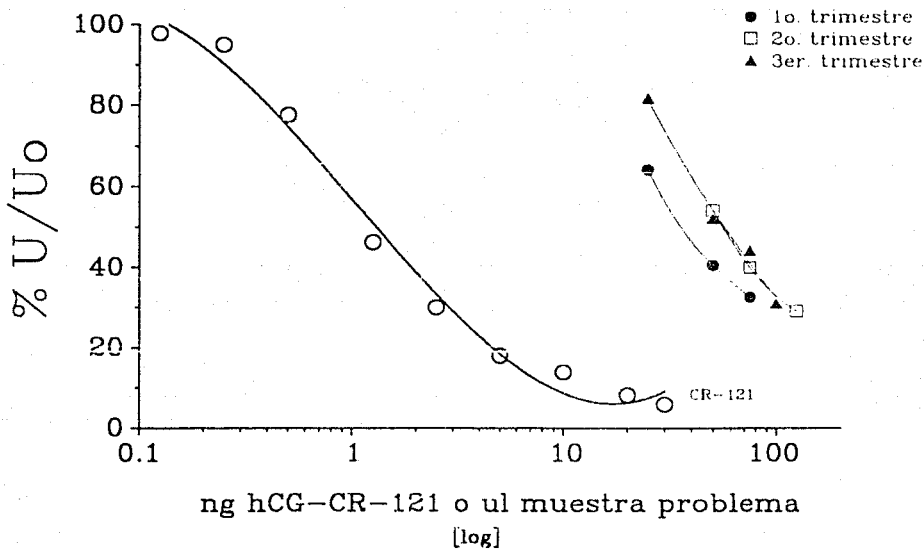


FIGURA 16. Comparación entre la curva estándar de la HCG CR-121 inmunoactiva expresada como el log de la dosis (X) y el porcentaje de unión (Y) y las curvas dosis - respuesta de la HCG circulante en los diferentes trimestres del embarazo. Las muestras problema fueron diluidas de tal forma que cada dosis incluída fuera identificada en la porción lineal de la curva estándar.

TABLA 8
VALORES OBTENIDOS DE 2 PARAMETROS LOGISTICOS

SUJETO No.	DE ₅₀ (ng HCG/tubo)			RESPUESTA MAXIMA (ng T/tubo)		
	TRIMESTRE			TRIMESTRE		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
1	11.4	14.6	16.5	3.8	3.4	3.0
2	16.5	21.9	19.7	3.0	2.8	2.8
3	40.3	65.9	71.6	1.9	1.6	1.8
5	21.4	27.8	25.8	1.3	1.4	1.3
6	--	24.4	29.9	--	5.8	5.3
7	10.6	11.2	16.9	4.2	3.2	3.6

DE₅₀ :: Dosis Efectiva a 50%.

T = Testosterona

TABLA 9
BIOACTIVIDAD DE HCG
POTENCIAS RELATIVAS *

SUJETO No.	TRIMESTRE		
	PRIMERO	SEGUNDO	TERCERO
1	1.010	0.803	0.703
2	1.090	0.826	0.909
3	1.110	0.684	0.630
5	1.120	0.868	0.936
6	--	0.743	0.725
7	1.390	1.310	0.784
$\bar{X} \pm DE$	$1.144 \pm 0.14^{**}$	0.872 ± 0.22	0.796 ± 0.12

* Potencia relativa = DE_{50} HCG-CR-121 / DE_{50} de muestras problema

** $p < 0.05$ (1° vs 2°) (1° vs 3°)

$\bar{X} \pm DE$ = Promedio \pm Desviación Estándar

VI. DISCUSION

Hasta el momento no existen datos en la literatura que informen el patrón de secreción de HCG en los tres trimestres del embarazo. Incluso en los estudios in vitro (48,103), éstos sólo se concretan al estudio de explantes placentarios de la primera o última etapa del embarazo. Nuestro estudio constituye el primero en informar las características precisas del patrón de secreción de HCG a lo largo del embarazo, las cuales de acuerdo a los resultados descritos, varían en cada trimestre.

Los resultados de este trabajo demuestran que la secreción de HCG se presenta de manera pulsátil en el 1º, 2º y 3º trimestres del embarazo. La frecuencia de pulsos de secreción de HCG en 24 horas fue mayor en forma significativa en el 3º trimestre (12 pulsos), con una frecuencia mayor de pulsos por la noche. Estos datos de pulsatilidad confirman y amplían los resultados de trabajos previos in vivo e in vitro (48,50-52,103). En estos estudios (48,50-52) la frecuencia de pulsos de secreción de HCG fue menor que la encontrada en nuestro trabajo; sin embargo, los autores solamente se concretaron al estudio del primer trimestre del embarazo y las características de los pulsos fueron analizadas mediante otros métodos. Así mismo, en el estudio realizado por Kaplan y cols. (103), de siete explantes placentarios estudiados, en dos no se detectó pulsatilidad. En otro estudio realizado in vivo (52), en donde los resultados fueron analizados con el mismo programa estadístico empleado en el presente trabajo, los autores detectaron secreción pulsátil de la HCG en 16 de 19 mujeres con edades gestacionales de 16 a 71 días. Dichos hallazgos no concuerdan con los resultados de nuestro estudio, en donde las 7 mujeres estudiadas a las 12, 24 y 36 semanas de gestación, presentaron patrones uniformes de pulsatilidad de HCG durante las 24 horas y en cada uno de los trimestres. Las diferencias encontradas entre éste último estudio y el nuestro, pueden deberse al tamaño de muestra utilizado, a la edad gestacional que presentaban las pacientes cuando se realizó el estudio o al intervalo de tiempo mayor con el que se obtuvieron las muestras sanguíneas en el estudio previo con respecto al nuestro (30 vs 20 minutos). Se ha propuesto que

a menor intervalo de tiempo entre una muestra sanguínea y la siguiente, mayor factibilidad de detectar pulsatilidad hormonal (89).

Al igual que con las otras hormonas glucoproteicas de la hipófisis anterior (26-28,46,47), de las cuales se conoce que su secreción es intermitente, la HCG se secreta de manera pulsátil a lo largo de todo el embarazo. Esto puede deberse a la necesidad de la glándula blanco (placenta, testículos y glándulas suprarrenales) de ser estimulada de una manera intermitente para evitar la desensibilización o regulación decreciente de sus receptores a nivel celular (34,35). Dicho fenómeno tendría como finalidad la de evitar la sobreestimulación de las células debido al exceso de hormona (33-35), como ha sido demostrado para el receptor de insulina en el hígado y para receptores de otros órganos tales como la hipófisis (26), ovario (27,28) y testículo (37-40) entre otros. Ahora bien, en cuanto a las células de Leydig se refiere, existen controversias al respecto ya que en un estudio realizado *in vitro* utilizando tejidos testiculares fetales humanos, se demostró que las células de Leydig fetales no experimentan desensibilización después de ser estimuladas en forma continua con HCG (76). Esto último sugiere que al estimular las células de Leydig fetales con HCG en forma continua, éstas poseen la capacidad de activar la síntesis de ARN o ADN por varios mecanismos a nivel nuclear (76). Por lo tanto las células de Leydig fetales no experimentan desensibilización, a diferencia de las células de Leydig del adulto, que sí presentan una regulación decreciente de los receptores dado que no tienen la capacidad de adaptación al estímulo continuo, como las células de Leydig fetales (104).

Las características de los pulsos variaron en los diferentes trimestres en cuanto a su incremento, altura y área. Estos parámetros reflejan la amplitud de los pulsos, la cual fue mayor en los pulsos del 1^{er} trimestre. Los resultados concuerdan con los informados por Kaplan (103), quien al detectar pulsatilidad de HCG en los explantes placentarios del 1^{er} y 3^{er} trimestres del embarazo encontró que su amplitud fue mayor en los pulsos del 1^{er} trimestre.

Los cambios en las características de los patrones de secreción de la HCG a lo largo del embarazo, pueden estar relacionados con los diferentes requerimientos biológicos de cada trimestre. Así, la HCG tiene implicaciones fisiológicas importantes sobre todo en las primeras etapas, en donde regula la producción de esteroides por el cuerpo lúteo, mismos que son necesarios para la sobrevivencia del embarazo. Por otra parte la HCG puede estar relacionada con la regulación endocrina del feto (74,75,105), dada la función que tiene de estimular la esteroidogénesis testicular y suprarrenal (106) en las primeras etapas del embarazo, produciendo andrógenos necesarios para que se lleve a cabo el proceso de virilización del feto masculino (107,108). Se desconoce el momento exacto en el que la HCG es necesaria para inducir la síntesis y secreción de testosterona, sin embargo, en las primeras etapas del embarazo, la producción de testosterona es dependiente de la secreción de la HCG placentaria (106,107), mientras que en etapas posteriores las gonadotropinas hipofisarias fetales son esenciales para continuar con el desarrollo testicular (109).

En relación a la actividad biológica, la HCG del primer trimestre del embarazo mostró una mayor bioactividad al compararse con aquellas del 2º y 3º trimestres. Las diferencias existentes entre la actividad biológica de la HCG en los diferentes trimestres, pudieran deberse a diferencias en la estructura molecular de la hormona, lo cual fue demostrado recientemente por Ulloa y cols. en un estudio in vitro (60).

En el estudio realizado por Wide y cols. (88) para analizar la carga media y la actividad biológica in vivo de la HCG en mujeres embarazadas en el 1º y 3º trimestres de gestación, se encontró que la molécula de HCG del 1º trimestre (10 semanas de gestación) es más ácida y exhibe una mayor actividad biológica que la molécula del 3º trimestre. Es posible que la molécula de HCG que contiene mayor cantidad de ácido siálico como lo es la del 1º trimestre, circule durante un período de tiempo más prolongado y por ello su actividad biológica in vivo sea mayor. Por el contrario, la molécula de HCG

del 3^{er} trimestre es menos ácida, por su menor contenido en ácido siálico y su actividad biológica in vivo es consecuentemente menor. Los resultados del presente estudio en el que encontramos que la potencia biológica in vitro de la molécula de HCG del 2^o y 3^{er} trimestres es menor que la del 1^{er} trimestre, concuerdan con los de Moyle (110) quien estudió la capacidad de HCG de estimular la producción de AMPc en células de Leydig de rata, encontrando que la molécula de HCG desializada enzimáticamente [y por lo tanto menos ácida (60)], pierde la capacidad de estimular la producción de AMPc y testosterona, presentando una actividad biológica in vitro menor. Los mismos resultados fueron observados en el estudio realizado por Channing y cols. (20) al estudiar el papel que desempeñan los carbohidratos de la molécula de HCG en su unión y estimulación de la producción de AMPc en células de la granulosa porcinas. Estas observaciones en conjunto sugieren que cierta variación en el contenido y/o la distribución de los carbohidratos en la molécula de HCG pueden producir una disminución en la capacidad de estimular la producción de AMPc (58), alterar la afinidad de la HCG a sus receptores (34,35), reducir la capacidad para estimular la esteroidogénesis (107,108) o bien modificar la vida media plasmática de la hormona (20,21). Es probable que la estructura molecular de la HCG del 1^o, 2^o y 3^{er} trimestres del embarazo varíe en su composición de oligosacáridos y que por ello su potencia biológica a nivel de la célula blanco sea diferente.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hertig AT: The placenta: some new knowledge about and lad organ. *Obstet Gynecol.* 20:859, 1962.
- 2.- Midgley AR Jr, Pierce GB Jr, Denea GA, Gosling JRS: Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science.* 141:349, 1963.
- 3.- Kaliman HJ, Coutifaris CH, Feinberg RE, Strauss III JF and Haimowitz JE: Implantation: in vitro models utilizing human tissues. In: Yoshinaga K (ed.), *Blastocyst Implantation*, Adams Publishing Group LTD., Boston USA., p 85-91, 1989.
- 4.- Pritchard JA, Mac Donald PC, Gant NF (Eds). The placental hormones. In *Williams Obstetrics*. Norwalk, Appleton-Croft, 1985, 119-148.
- 5.- Thiede HA, Choate JW: Chorionic gonadotropin localization in the human placenta by immunofluorescent staining: II. Demonstration of HCG in the trophoblast and amnion epithelium of immature and mature placentas. *Obstet Gynecol.* 22:433, 1963.
- 6.- Pierce GB Jr, Midgley AR Jr: The Origin and function of human syncytiotrophoblastic giant cells. *Am J Pathol.* 43:153, 1963.
- 7.- Ascheim S and Zondek B: Anterior pituitary hormone and ovarian hormone in the urine of pregnant women. *Klin Wochenschr.* 61:1322, 1927.
- 8.- Pierce JG: The subunits of pituitary thyrotropin - their relationships to other glycoprotein hormones. *Endocrinology.* 89:1331, 1971.
- 9.- Swaminathan N, Bahl OP: Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun.* 40:422, 1970.
- 10.- Ross GT: Clinical relevance of research on the structure of human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol.* 129:795, 1977.
- 11.- Husa RO: Biosynthesis of human chorionic gonadotropin. *Endocrin Rev.* 1:268, 1980.
- 12.- Morgan EJ, Birken S, Canfield RE: The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The α subunits and β subunits. *J Biol Chem.* 250:5247, 1975.
- 13.- Bahl OP, Carlsen RB, Bellisario R, Swaminathan N: Human chorionic gonadotropin: amino acid sequence of the α and β subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 48:416, 1972.
- 14.- Birken S and Canfield RE: Isolation and amino acid sequence of COOH-terminal fragments from the beta subunits of human choriongonadotropin. *J Biol Chem.* 252:5386, 1977.
- 15.- Rosen SW, Weintraub BD: Ectopic production of the isolated alpha subunit of the glycoprotein hormones. A quantitative marker in certain cases of cancer. *N Engl J Med.* 290:1441, 1974.

- 16.- Rosen SW, Weintraub BD, Vaitukaitis JL, Sussman HH, Hershman JM, Muggia FM: Placental proteins and their subunits as tumor markers. *Ann Intern Med.* 82:71, 1975.
- 17.- Talmadge K, Vamrakopoulos NC, Fiddes JC: Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature.* 307:37, 1984.
- 18.- Baenzinger JU and Green ED: Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides structure synthesis and function of the asparagine - linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem Biophys Acta.* 947:287, 1988.
- 19.- Tsuruhara TE, Dufau ML, Hickman J and Catt KJ: Biological properties of HCG after removal of terminal sialic acid and galactose residues. *Endocrinology.* 91:296, 1972.
- 20.- Chaning CP, Sakai CN and Bahl OMP: Role of the carbohydrate residues of human chorionic gonadotropin in binding and stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation by porcine. *Endocrinology.* 103:341, 1978.
- 21.- Kato K: Dextran-coupled deglycosylated HCG: I. Preparation and thermal stability. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl* 114: 283-123 abstr 141, 1983.
- 22.- Van Hall EV, Vaitukaitis JL, Ross GT, Hickman JW and Ashwell G: Effects of progressive desialylation on the rate of disappearance immunoreactive HCG from plasma in rats. *Endocrinology.* 89:11, 1971.
- 23.- Palade G: Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* 189:347, 1975.
- 24.- Wynn RM : Cytotrophoblastic specializations: and ultrastructural study of the human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 114:339, 1972.
- 25.- Lacy PE: Endocrine secretory mechanisms. A review. *Am J Pathol.* 79:170, 1975.
- 26.- Knobil E: The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol.* 163:1721, 1990.
- 27.- Clarke JJ, Cummins JT, Findlay JK, Burman KA and Daughton BW: Effects on plasma luteinizing hormone and follicle - stimulating hormone of varying frequency and amplitude of gonadotropin - releasing hormone pulses in ovariectomized ewes with hypothalamo - pituitary disconnection. *Neuroendocrinology.* 39:214, 1984.
- 28.- Veldhuis JD, Beitins IZ, Johnson ML, Serabian MA and Dufau ML. Biologically active luteinizing hormone is secreted in episodic pulsation that vary in relation to stage of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 58:1050, 1984.
- 29.- Patillo RA, Hussa RO: Early stimulation of human chorionic gonadotropin secretion by dibutyryl cyclic AMP and Theophylline in human malignant trophoblast cell in vitro: inhibition by actinomycin D, α - amanitin and cordycepin. *Gynecol Invest.* 6:365, 1975.
- 30.- Folman R, Ilan J, Shiklosh J, De Groot N, Segal S, Hochberg AA: The synthesis and secretion of human chorionic gonadotropin by tissue slices from first trimester placentas. *Mol Biol Rep.* 5:175, 1979.

- 31.- Ruddon RW, Hanson CA, Bryan AH, Putterman GJ, White EL, Perini F, Meade KS, Aldenderfer PH: Synthesis and secretion of human chorionic gonadotropin subunits by cultured human malignant cells. *J Biol Chem.* 255:1000, 1980.
- 32.- Hussa RO: Studies on human chorionic gonadotropin secretion: effects of EGTA, lanthanum and the ionophore A 23187. *J Clin Endocrinol Metab.* 44:520, 1977.
- 33.- Midgley Jr AR, Jaffe RB: Regulation of hormone gonadotropins: X, episodic fluctuation of LH during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 33:962, 1971.
- 34.- Baxter JD, Funder JW: Hormone receptors. *N Eng J Med.* 301:1149, 1979.
- 35.- Catt KJ, Harwood JP, Aguilera G, Dufau ML: Hormonal regulation of peptide receptor and target cell response. *Nature.* 280:109, 1979.
- 36.- Soll AH, Kahn CR, Neville DM, Roth JJ: Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity. *J Clin Invest.* 56:769, 1975.
- 37.- Hsueh AJW, Dufau ML, Catt KJ: Regulation of luteinizing hormone receptors in testicular cells by gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun.* 72:1145, 1976.
- 38.- Sharpe RM: HCG induced decrease in availability of rat testis receptors. *Nature.* 264:644, 1976.
- 39.- Haour F, Saenz JM: HCG dependent regulation of gonadotropin receptor sites: negative control in testicular Leydig cells. *Moll Cell Endocrinol.* 7:17, 1977.
- 40.- Huhtaniemi I, Rajaniemi H, Martikainen H, Tikkala L: Autoregulation of LH/hCG receptor and catabolism of hCG in rat testis. *Int J Androl. Suppl.* 2:276, 1978.
- 41.- Rajaniemi H, Manninen M, Huhtaniemi I: Catabolism of Human 125-I-iodochorionic gonadotropin in rat testis. *Endocrinology.* 105:1208, 1979.
- 42.- De Meyts P, Kahn CR, Roth JJ, Bar BS: Hormonal regulation of the affinity and concentration of hormone receptors in target cells. *Metabolism.* 25:1365, 1976.
- 43.- Mukherjee C, Caron MG, Lefkowitz RJ: Catecholamine-induced subsensitivity of adenylate cyclase associated with loss of beta-adrenergic receptor binding sites. *Proc Nat Acad Sci.* 72:1945, 1975.
- 44.- Hizuka N, Gordon P, Lesniak MA: Polypeptide hormone degradation and receptor regulation are coupled to ligand internalization. *J Biol Chem.* 256:4591, 1981.
- 45.- Bardin CW, Paulsen CA: The testes. In: Williams R (ed.), *Textbook of Endocrinology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA., p 199 - 317, 332-33, 1981.
- 46.- Jackacki RI, Kelch RP, Sander SE, Lloyd JS, Hopwood NJ, Marshall JC: Pulsatile secretion of luteinizing hormone in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:453, 1982.
- 47.- Santen RJ, Bardin CW: Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis clinical interpretation, physiologic mechanisms. *J Clin Invest.* 52:2617, 1973.

- 48.- Barnea ER, Kaplan M: Spontaneous, gonadotropin - releasing - hormone induced and progesterone - inhibited pulsatile secretion of human chorionic gonadotropin in the first trimester placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 69:215, 1987.
- 49.- Odell WD, Griffin J: Pulsatile secretion of human chorionic gonadotropin in normal adults. *N Engl J Med.* 317:1688, 1987.
- 50.- Owens O'Dell M, Ryan KJ and Tulchinsky D: Episodic secretion of human chorionic gonadotropin in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 53:1307, 1981.
- 51.- Ayala AR, Bustos H, Antúnez O, González E: Secreción pulsátil de la gonadotropina coriónica humana. *Arch. Invest. Méd. (Méx).* 15:147, 1984.
- 52.- Nakajima ST, McAuliffe T, Gibson M: The 24 hours pattern of the levels of serum progesterone and immunoreactive human chorionic gonadotropin in normal early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 71:345, 1990.
- 53.- Khodr GS, Siler-Khodr TM: Placental of luteinizing hormone-releasing factor and its synthesis. *Science.* 207:315, 1980.
- 54.- Siler-Khodr TM, Khodr GS: Content of luteinizing hormone - releasing factor in the human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 130:216, 1978.
- 55.- Khodr GS, Siler-Khodr TM: The effects of luteinizing hormone -releasing factor on human chorionic gonadotropin secretion. *Fertil Steril.* 30:301, 1978.
- 56.- Siler-Khodr TM, Khodr GS, Eddy CA, Pauerstein CJ: LRF stimulation of chorionic gonadotropin and oestrogen release in the pregnant monkey. *Endocrinology.* [Suppl] 104:122 (abstract) 1979.
- 57.- Handwerger SJ, Barrett J, Tyrey L, Schomberg D: Differential effect of cyclic adenosine monophosphate on the secretion of human placental lactogen and human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 36:1268, 1973.
- 58.- Husa RO, Patillo RA, Ruckert ACF, Schevermann KW: Effects of butyrate and dibutyrylcyclic AMP on HCG - secreting trophoblastic and non - trophoblastic cell. *J Clin Endocrinol Meth* 46:69, 1978.
- 59.- Feinman MA, Kliman HJ, Caltbiano S and Strauss III EF: 8-bromo-3', 5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 63:1211, 1986.
- 60.- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Cravioto A, Grojan F, Damian P, Espinoza R: Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotropin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Human Reproduction.* 5:661, 1990.
- 61.- O'Keefe E, Hollenberg MD, Cuatrecasas P: Epidermal growth factor: Characteristics of specific binding in membranes from liver, placenta and other target tissues. *Arch Biochem Biophys.* 164:518, 1974.

- 62.- Benveniste R, Speeg Jr KV, Carpenter G, Cohen S, Lindner J, Rabinowitz D: Epidermal growth factor stimulates secretion of human chorionic gonadotropin by cultured human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 46:169, 1978.
- 63.- Lai WH and Guyda HJ: Characterization and regulation of epidermal growth factor receptors in human placental cell cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 58:344, 1984.
- 64.- Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Takagi T, Saji F and Tanizawa O: Trophoblast-derived Interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 71:436, 1990.
- 65.- Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, et al: Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 161:336, 1989.
- 66.- Walton PE, Cronin MJ: Tumor necrosis factor- α inhibits growth hormone secretion from cultured anterior pituitary cell. *Endocrinology.* 125:925, 1989.
- 67.- Walton PE, Cronin MJ: Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma reduce prolactin release *in vitro*. *Am J Physiol.* 259:672, 1990.
- 68.- Kazutomo O, Fumitaka S, Munehiro K, Akinori W and Osamu T: Tumor necrosis factor- α inhibits human chorionic gonadotropin secretion.
- 69.- Stenman UH, Althman H, Ranta T, Vartiainen E, Jalkansen J, Sepälä J: Serum levels of human chorionic gonadotropin in non-pregnant women and men are modulated by gonadotropin-releasing hormone and sex steroids. *J Clin Endocrinol Metab.* 64:730, 1987.
- 70.- Hoermann R, Spoettl G, Moncayo R and Mann K: Evidence for the presence of human chorionic gonadotropin (HCG) and free β - subunits of HCG in the human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab.* 71:179, 1990.
- 71.- Yen SSC and Jaffe RB (eds). *Protein Hormones of the placenta decidua and fetal membranes. Reproductive Endocrinology.* 2nd edition. Philadelphia, Saunders, 1985, 758-769.
- 72.- Fritz MA, Guo S: Doubling time of human chorionic gonadotropin (hCG) in early normal pregnancy: Relationship to HCG concentration and gestational age. *Fertil Steril.* 47:584, 1987.
- 73.- Pittaway DE, Wentz AC: Evaluation of early pregnancy by serial chorionic gonadotropin determinations: A comparison of methods by receiver operating characteristic curve analysis. *Fertil Steril.* 43:529, 1985.
- 74.- Csapo AL, Pulkkinen MO, Wiest WG: Effects of luteectomy and progesterone replacement in early pregnant patients. *Am J Obstet Gynecol.* 115:759, 1973.
- 75.- Speroff L, Glass RH and Kase NG (eds). *The Endocrinology of pregnancy. In Clinical Gynecologic Endocrinology and infertility.* Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 1989, 317-350.

- 76.- Leinonen PJ, Jaffe RB: Leydig cell desensitization by human chorionic gonadotropin does not occur in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 61:234, 1985.
- 77.- North RA, Whitehead R and Larkins RG: Stimulation by human chorionic gonadotropin of prostaglandin synthesis by early human placental tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 73:60, 1991.
- 78.- Diczfalusy E and Diczfalusy A: Immunoassay of gonadotropins. *Acta Endocrinol (Kbh), suppl.* 63:142, 1969.
- 79.- *Manual de Laboratorio de Hormonas.* Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán. Departamento de Biología de la Reproducción. México, D.F. 1983.
- 80.- Catt KJ, Dufau ML and Tsuruhara T: Radioligand - receptor assay of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 34:123, 1972.
- 81.- Dufau ML, Mendelson CR and Catt KJ: A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing - hormone and chorionic gonadotropin: Testosterone production by dispersed Leydig cell. *J Clin Endocrinol Metab.* 39:610, 1974.
- 82.- Van Noordwijk Jacobus: Bioassay in whole animals. *J Pharmac and Biomed Anal.* 7:139, 1989.
- 83.- Dufau ML, Charreau EM, Catt KJ: Characteristics of a soluble gonadotropin receptor from the rat testis. *J Biol Chem.* 248:6973, 1973.
- 84.- Metsikko K, Rajaniemi H: Purification of Human chorionic gonadotropin-receptor complex by immunoaffinity chromatography. *FEBS Lett.* 106:193, 1979.
- 85.- Mendelson C, Dufau ML, Catt KJ: Gonadotropin-binding and stimulation of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J Biol Chem.* 250:8818, 1975.
- 86.- Dufau ML, Hodgen GD, Goodman AL and Catt KL: Bioassay of circulating luteinizing hormone in the rhesus monkey: Comparison with radioimmunoassay during physiological changes. *Endocrinology.* 100:1557, 1977.
- 87.- Ranta T, Ylinen K, Stenman U-H, Nikula H and Huhtaniemi I: Biological and immunological activity of human chorionic gonadotropin in maternal serum during early pregnancy. *Clinical Endocrinology.* 29:495, 1988.
- 88.- Wide L, Hobson B: Some qualitative differences of HCG in serum from early and late pregnancies and trophoblastic diseases. *Acta Endocrinologica (Copenh).* 116:465, 1987.
- 89.- Urban RJ, Evans WS, Rogol AD, Kaiser DL, Johnson ML and Veldhuis J D: Contemporary aspects of discrete peak - detection algorithms. I. The paradigm of the luteinizing hormone pulse signal in men. *Endocrin Rev.* 9:3, 1988.
- 90.- Veldhuis JD, Johnson ML: Cluster analysis: a simple versatile and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol.* 250:E486, 1986.

- 91.- Merriam GR, Wachter KW: Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am J Physiol.* 243:E310, 1982
- 92.- Urban RJ, Kaiser DL, Van Cauter E, Johnson ML, Veldhuis JD: Comparative assessments of objective peak-detection algorithms. II. Studies in men. *Am J Physiol.* 254:E113, 1988.
- 93.- Veldhuis JD, Ragol AD, Johnson ML: Minimizing false-positive errors in hormonal pulse detection. *Am J Physiol.* 248:E475, 1985.
- 94.- Urban RJ, Johnson ML, Veldhuis JD: In vivo biological validation and biophysical modeling of the sensitivity and positive accuracy of endocrine peak detection. I. The LH pulse signal. *Endocrinology.* 124:2541, 1989.
- 95.- Sandler SG, Beyth Y, Laufer N, Levence C: Autologous blood transfusions and pregnancy. *Obstet Gynecol.* 53:625, 1979.
- 96.- Kruskal MS, Leonard S, Klapholz H: Autologous Blood donation during pregnancy: analysis of safety and blood use. *Obstet Gynecol.* 70:938, 1987.
- 97.- Herbert WNP, Owen HG, Collins ML: Autologous blood storage in obstetrics. *Obstet Gynecol.* 72:166, 1988.
- 98.- Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL: World Health Organization Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. Programme for the provision of matched reagents for radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology. Method Manual, Tenth Edition, WHO, Geneva Switzerland. 1986.
- 99.- Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of ¹²⁵I-labeled human growth of high specific radioactivity. *Biochem J.* 89:114, 1963.
- 100.- Van Damme MP, Robertson DM, Diezfelusy E: An Improved in vitro bioassay method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse leydig cell preparations. *Acta Endocrinologica.* 77:655, 1974.
- 101.- Veldhuis JD, Johnson ML: A novel general biophysical model for stimulating episodic endocrine gland signaling. *Am J Physiol.* 254:E749, 1988.
- 102.- De Lean A, Munson PJ and Rodbard D: Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay radioligand assay and physiological dose - response curves. *Am J Physiol.* 235(2):97, 1978.
- 103.- Kaplan M, Barnea ER and Bersinger NA: Patterns of spontaneous pulsatile secretion of human chorionic gonadotropin and pregnancy specific β 1 glycoprotein by superfused placental explants in first and last trimester. Lack of episodic human placental lactogen secretion. *Acta Endocrinologica (Copenh).* 124:331, 1986.
- 104.- Catt KJ, Harwood JP, Clayton RN, Davies TF, Chan V, Katikineni M, Nozu K, Dufau ML: Regulation of peptide hormone receptor and gonadal steroidogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 36:557, 1980.

- 105.- Siiteri Pk, Mac Donald PC: Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 26:751, 1966.
- 106.- H uhtaniemi IT, Korenbrot CC, Jaffe RB: Content of chorionic gonadotropin in human fetal tissues. J Clin Endocrinol Metab. 46:994, 1978.
- 107.- H uhtaniemi IT, Korenbrot CC, Jaffe RB: HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. J Clin Endocrinol Metab. 44:963, 1977.
- 108.- Kaplan SL, Grumbach MM: Pituitary and placental gonadotropins and sex steroid in the human and sub-human primate fetus. J Clin Endocrinol Metab. 7:487, 1978.
- 109.- Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML: The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. Recent Prog Horm Res. 32:243, 1976.
- 110.- Moyle RW, Bahl OP and M arz L: Role of the carbohydrate of human Chorionic Gonadotropin in the Mechanism of hormone action. J of Biol Chem. 250:9163, 1975.