

14
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIONES TEMPORALES EN LA AMPLITUD DE
LOS PULSOS DE SECRECION, ACTIVIDAD
BIOLOGICA Y HETEROGENEIDAD POR CARGA DE LA
CORIOGONADOTROPINA HUMANA DE LA
GESTACION.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
JORGELINA BARRIOS DE TOMASI



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio "Mecanismo de Acción Hormonal II" del Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"; bajo la dirección y asesoría del Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre, Investigador titular C de esta Institución e Investigador Nacional Nivel III.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer profundamente al Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre por su asesoría y dirección, básica en esta etapa de mi desenvolvimiento profesional, así como a cada uno de mis compañeros del laboratorio de MAH-II.

Expreso mi gratitud a los biólogos Pablo Damián y Aleida Olivares, a la Q.F.B. Elena Zambrano, por su consejo, apoyo y alegría que demostraron en todo momento y muy especialmente a la Dra. Laura Díaz por guiar mis pasos en el estudio de la Biología de la Reproducción.

Finalmente a la UNAM, así como a todos mis maestros por haber participado en mi formación tanto académica como personal.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
A. Antecedentes.	1
B. Hormona Coriogonadotropina (hCG).	2
II. OBJETIVOS	12
III. HIPOTESIS	13
IV. MATERIALES Y METODOS	14
A. Criterios de inclusión.	14
B. Criterios de eliminación.	15
C. Sujetos y protocolo de estudio.	15
D. RIA de 17 β -estradiol y progesterona.	16
E. Determinación de la forma de secreción de hCG.	17
F. Estudio de la actividad biológica <i>in vitro</i> de la hCG.	18
G. Heterogeneidad por carga.	19
H. Análisis estadístico.	21
V. RESULTADOS	24
A. Detección de pulsatilidad.	24
B. Bioactividad.	26
C. Cambios en la heterogeneidad por carga de la hCG durante el embarazo.	27
VI. DISCUSION	28
VII. REFERENCIAS	33

I. INTRODUCCION

A. ANTECEDENTES.

Una vez ocurrida la fecundación, en el cigoto se suscitan una serie de divisiones mitóticas que llevan a la formación de la mórula, una masa sólida en forma de esfera que contiene entre 12 y 16 blastómeros. La mórula penetra al útero mientras está en formación. Conforme se acerca a la cavidad uterina, entra líquido a la mórula y ocupa los espacios intercelulares. Al aumentar el líquido separa las células en dos partes: una capa celular externa, el trofoblasto, el cual originará parte de la placenta, y un grupo de células de situación central, la masa celular interna o embrioblasto, que originará al embrión. Los espacios llenos de líquido se fusionan formando un espacio único de gran tamaño, la cavidad del blastocisto o blastocelo. Esta etapa del desarrollo se le conoce como blástula y es en este momento cuando el blastocisto comienza a estar en contacto con el epitelio endometrial, el cual se encuentra en su fase secretoria. Tan pronto como el trofoblasto se fija a este epitelio, comienza a proliferar con rapidez y se diferencia de manera gradual en dos capas: una interna, el citotrofoblasto, y la externa el sinciotrofoblasto, que consiste en una masa protoplásmica multinuclear en la cual se han perdido los límites celulares. Para el final de la primera semana de gestación, el blastocisto comienza su implantación superficial en la capa compacta del endometrio (1). La implantación dispara la síntesis de la hormona gonadotropina coriónica o coriogonadotropina (hCG) por el sinciotrofoblasto.

En estudios realizados con técnicas de ultraestructura y de inmunofluorescencia en tejidos placentarios, se identificó a la hCG en explantes placentarios sinciotrofoblásticos, 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 fue descubierta en 1927 por Ascheim y Zondek en la orina de mujeres embarazadas (2).

B. HORMONA CORIOGONADOTROPINA.

La hCG es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 36,000 daltones que presenta una estructura cuaternaria con dos subunidades: la alfa (α) y la beta (β), unidas en la hormona por enlaces no covalentes (3,4) (Figura 1a).

La estructura de la subunidad α es común con aquella de las hormonas hipofisarias: la hormona luteinizante (LH), la hormona folículoestimulante (FSH) y la tirotrópina (TSH). Dicha subunidad en estas glicoproteínas consta de 89 a 92 aminoácidos en una misma secuencia (5,6) (Figura 1b). Por otro lado, la subunidad β difiere en estas glicoproteínas y es la que otorga a cada una de ellas su especificidad tanto inmunológica como biológica (4,5).

Se pueden considerar dos funciones principales para la subunidad α después de combinarse con la β ; una es que la subunidad α contiene todos o la mayor parte de los sitios de reconocimiento necesarios para la unión con el receptor en la célula blanco, en tanto que la conformación activa de la subunidad β se logra únicamente después de su asociación con la subunidad α (7).

La estructura en tercera dimensión de cada subunidad es mantenida por medio de puentes disulfuro, cinco en la subunidad α y seis en la subunidad β . Debido a que cada subunidad β se puede combinar con una subunidad α común, algunas porciones de la estructura tridimensional de las subunidades β de las glicoproteínas deben ser muy parecidas. Las regiones que no son similares probablemente le confieren la especificidad a la hormona y participan en la unión al receptor (8).

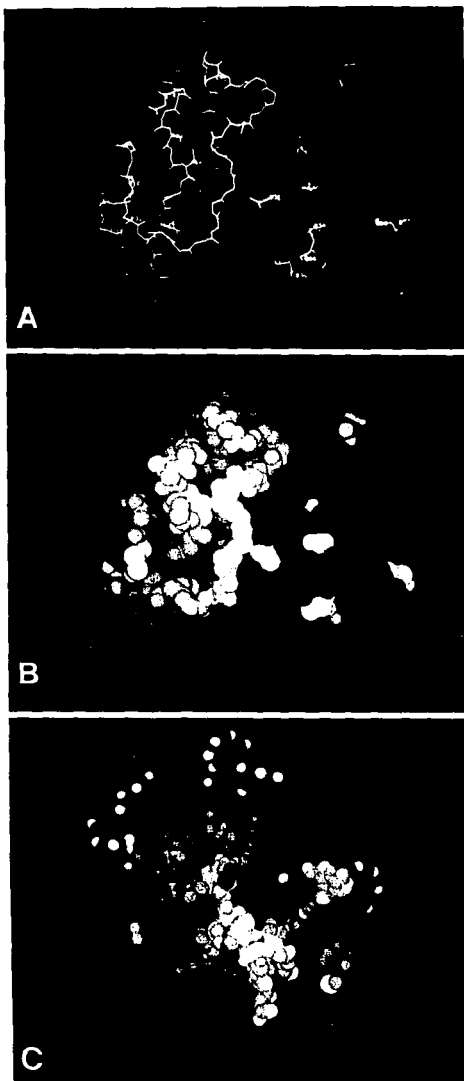


FIGURA 1a. Disposición relativa de las subunidades α y β de la hCG (se representan los residuos 1-112 de la subunidad β). A, Modelo esquelético de la columna vertebral atómica, coloreados de acuerdo al siguiente esquema: cadena α , azul; cadena β , rojo; cisteínas, amarillo; cadenas de carbohidratos unidos a asparagina, blanco. B, Modelo CPK (Corey, Pauling y Koltun) representando los átomos del panel A. C, Modelo CPK, representación de la hCG incluyendo cadenas laterales: hidrógeno, blanco (solamente para residuos de azúcares); carbono, verde; nitrógeno, azul oscuro; oxígeno, naranja; azufre, amarillo; cadenas de carbohidratos unidos a asparagina, morado. (De: Lustbader, J.W., Yarmush, D.L., Birken, S., Puett, D. and Canfield, R.E. (1993) *Endocr Rev.* 14(3), 291-311).

Las propiedades químicas de la molécula de hCG son dadas entre otras, por la localización de residuos de oligosacáridos en sitios específicos de ambas subunidades. La hCG posee cuatro cadenas laterales de carbohidratos que están unidos a residuos de Asparagina (Asn) por enlaces glicosídicos (tipo N), en las posiciones 52 y 78 de la subunidad α y en la 13 y 30 de la subunidad β (6). Existe cierta homología estructural entre la β LH y β hCG, ya que de los 115 aminoácidos terminales aproximadamente un 80% están en posiciones idénticas, aunque β hCG contiene además una secuencia en el extremo carboxilo terminal de 30 aminoácidos que es única (145 aminoácidos totales en β), en la que se encuentran complejos laterales de oligosacáridos que poseen residuos terminales de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico); es decir, en esta secuencia existen cuatro cadenas de oligosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos a residuos de serina (posiciones: 121, 127, 132 y 138)(9-11) (Figura 1c).

En resumen, la hCG es una glicoproteína con cuatro grupos de oligosacáridos en uniones N-glicosídicas con el aminoácido asparagina (Asn) y cuatro uniones O-glicosídicas con el aminoácido serina (Ser). Cada una de estas cadenas terminan en dos residuos de ácido siálico.

1. OLIGOSACARIDOS EN hCG.

Los oligosacáridos en hCG que se encuentran unidos a través de enlaces N-glicosídicos a asparagina, presentan una estructura biramificada, en la cual el ácido siálico está unido a una galactosa mediante un enlace α 2,3, siendo más común encontrar enlaces tipo α 2,4 en el resto de las glicoproteínas en suero (Figura 2a). La mayoría de estos oligosacáridos contienen dos residuos de ácido siálico encontrándolos tanto en la fracción α como en la β ;

```

1          10          20          30          40
NH2 SER ARG GLU PRO LEU ARG PRO TRP CYS HIS PRO ILE ASN ALA ILE LEU ALA VAL GLU LYS GLU GLY CYS PRO VAL CYS ILE THR VAL ASN THR THR ILE CYS ALA GLY TYR CYS PRO THR
HCGE ... LYS ... .. ARG ... ARG ... .. THR ... ..

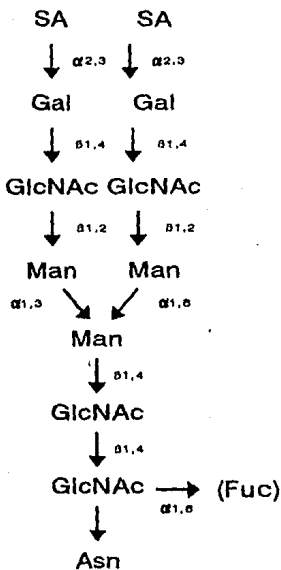
50          60          70
NH2 MET MET ARG VAL LEU GLN ALA VAL LEU PRO LEU PRO GLN ARG VAL CYS THR TYR ARG ASP VAL ARG PHE GLU SER ILE ARG LEU PRO GLY CYS PRO ARG GLY VAL ASP PRO VAL
HCGE ... THR ... .. GLY ... .. ASN ... ..

80          90          100          110
NH2 VAL SER PHE PRO VAL ALA LEU SER CYS ARG CYS GLY PRO CYS ARG ARG SER THR CYS ASP CYS GLY GLY PRO LYS ASP HIS PRO LEU THR CYS ASP HIS PRO GLN LEU SER GLY LEU
HCGE ... TYR ALA ... .. GLN ... ALA LEU ... .. THR ... .. ASP ... ARG PHE GLN ASP SER

120          130          140
NH2 LEU PHE SER COOH
HCGE SER SER ... LYS ALA PRO PRO PRO SER LEU PRO SER PRO SER ARG LEU PRO GLY PRO SER ASP THR PRO ILE LEU PRO GLN COOH

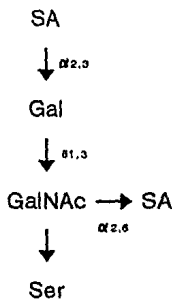
```

FIGURA 1c. Secuencias de aminoácidos de la fracción B de las hormonas humanas luteinizante (hLH) y coriogonadotropina (hCG). Los guiones indican los aminoácidos idénticos en ambas secuencias. Los sitios correspondientes a la N-glicosilación y a la O-glicosilación se muestran con asteriscos y círculos respectivamente.



SA= Acido siálico
 Gal= Galactosa
 GlcNAc= N-acetilglucosamina
 Man= Manosa
 Fuc= Fucosa
 Asn= Asparagina

FIGURA 2a. Estructura de oligosacáridos N-glicosídicos unidos a residuos de Asparagina 52 y 78 en α -hCG, 13 y 30 de β -hCG. L-Fucosa se encuentra únicamente en la subunidad β .



SA= Acido siálico
 Gal= Galactosa
 GalNAc= N-acetilgalactosamina
 Ser= Serina

FIGURA 2b. Estructura de oligosacáridos O-unidos a los residuos 121, 127, 132 y 138 de Serina en β -hCG.

los oligosacáridos monosializados se encuentran en la subunidad α , y los oligosacáridos fucosilados en la subunidad β . El esqueleto fundamental o región central consiste en dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc₂) y tres residuos de manosa (Man₃). A esta región central se le añaden residuos de manosa, glucosa y ácido siálico, dependiendo del tipo de oligosacárido que se vaya a formar (12) (Figura 2a).

Por otro lado se encuentran cuatro oligosacáridos en la extensión carboxilo terminal unidos a serina (O-glicosilación) en la subunidad β , los cuales pueden presentar dos residuos de ácido siálico (12) (Figura 2b).

En la placenta dos formas de α -hCG son producidas, una capaz de asociarse con la fracción β para producir el dímero y una subunidad α -libre, incapaz de unirse a esta fracción β debido a la presencia de un oligosacárido extra unido por un enlace O-glicosídico (12).

2. HETEROGENEIDAD DE LA hCG.

La hCG es producida y secretada en varias formas moleculares (isoformas), las cuales se originan por la presencia de oligosacáridos en las cadenas α y β con diferentes grados de sialización, lo que le confiere heterogeneidad por carga a la molécula (13-17). Recientemente se han empleado diversas técnicas de separación para demostrar esta heterogeneidad. Entre ellas están la cromatografía por afinidad, electroforesis en suspensión de agarosa, el isoelectroenfoque y el cromatoenfoque (18-23); las tres últimas detectan el polimorfismo con base en las variaciones en el contenido de ácido siálico, fundamentalmente.

El contenido de ácido siálico es variable en las diferentes glicoproteínas; en la hCG se pueden encontrar de 16 a 20 residuos por molécula. Estas diferencias son en gran parte, las responsables de las variaciones en los puntos isoeléctricos (pI) de las gonadotropinas, definido

como el pH en el cual la molécula es eléctricamente neutra. La presencia de estos oligosacáridos sializados juega un papel sumamente importante en la expresión de la bioactividad y la vida media de la hormona. (Figura 2a, 2b). En estudios realizados con la coriogonadotropina equina se ha encontrado que la vida media plasmática de la molécula, es prolongada gracias a la extensión carboxilo terminal glicosilada (24). Por otro lado, si se remueve el ácido siálico de la hormona se incrementa su potencia biológica *in vitro* de dos a tres veces más debido a que la presencia de ácido siálico probablemente impide la unión al receptor (24). Se ha observado que las formas más alcalinas (menor contenido de ácido siálico) de la LH tienen una alta actividad biológica *in vitro*, pero son eliminadas rápidamente de la circulación (24). Sin embargo, las formas más ácidas son menos activas *in vitro*, pero más potentes *in vivo*, probablemente por que son eliminadas lentamente de la circulación. Al remover enzimáticamente los residuos terminales de ácido siálico, se reduce la vida media plasmática de la hormona, pero no se afecta su unión al receptor. Por esta razón, la actividad biológica de LH, hCG y FSH humana desializadas está considerablemente reducida *in vivo*, pero no *in vitro*. Por otra parte se ha observado que al remover los grupos de carbohidratos internos al ácido siálico no se afecta (y aún aumenta) la unión de la hormona al receptor, pero se reduce sin embargo, de manera significativa su capacidad para inducir una respuesta biológica (8).

En la actualidad se desconocen los cambios en el patrón de heterogeneidad de la hCG circulante a lo largo del embarazo, así como el significado fisiológico de esta heterogeneidad.

3. SINTESIS DE hCG.

La hCG es producida fundamentalmente por el sincitiotrofoblasto y en menor grado por

el citotrofoblasto de la placenta humana. Sus subunidades son sintetizadas independientemente y son ensambladas en un heterodímero antes de ser secretadas a la circulación. Las subunidades son codificadas por diferentes genes; la subunidad α es codificada por un gen localizado en el cromosoma 6 y la subunidad β por una serie de 6 genes en el cromosoma 19. La expresión de los genes que codifican a cada una de las subunidades está controlada por elementos responsivos al AMPc. Existe una amplia variedad de agentes que regulan y modulan la síntesis y secreción de hCG en sistemas *in vitro*, entre ellos, el GnRH (25), ácido gamma-aminobutírico (26), factor de crecimiento epidérmico (27), factor de crecimiento fibroblástico (28), factor- β de crecimiento transformante (29), inhibina (30), activina (31), hormona paratiroidea (32), agonistas adrenérgicos (33), factor estimulante de colonias de macrófagos (34), factor de necrosis tumoral (35), interleucina 1 y 6 (36), opiáceos endógenos (37), progesterona (38), glucocorticoides (39), ácido retinoico (40), prolactina (41), péptido intestinal vasoactivo (42) e insulina (43).

Se ha propuesto un mecanismo de síntesis para LH y FSH que consiste en la síntesis independiente de sus dos subunidades en el retículo endoplásmico rugoso, y su glicosilación subsecuente conforme van penetrando al lumen del mismo. Una vez sintetizadas, se da la asociación de ambas subunidades y en el aparato de Golgi se continúa el procesamiento de los oligosacáridos hasta que resulta finalmente la molécula glicosilada y sializada en el trans-Golgi, lista para ser transportada al exterior mediante exocitosis (12). Se han observado gránulos de almacenamiento de LH y FSH y al parecer el tamaño y la cantidad de estos se relacionan con las demandas fisiológicas para cada hormona en particular (44). En el caso de estas hormonas la liberación de los gránulos de secreción es regulada por el factor liberador de gonadotropinas (GnRH) sintetizado y secretado por el hipotálamo. A diferencia de estas glicoproteínas la secreción de hCG requiere de la síntesis de RNAs así como de proteínas y no

se ha observado el almacenamiento y la liberación de hormona prealmacenada (6).

4. EVIDENCIA DE SINTESIS DE hCG EN OTROS ORGANOS.

La hCG existe en gran abundancia en la placenta humana. Puede ser también detectada en pequeñas cantidades en otros tejidos, incluyendo testículos, colon, hígado e hipófisis. Avances recientes en técnicas de cuantificación hormonal han permitido la detección de hCG en el suero de hombres y mujeres sanas no embarazadas (45).

5. CONCENTRACIONES Y SECRECIÓN DE hCG.

Los cambios en la secreción de la hCG durante el embarazo están relacionados con los cambios maduracionales de la placenta en el embarazo temprano; la hCG es empleada para mantener el cuerpo lúteo y así, la producción de progesterona. Conforme progresa el embarazo se observa un aumento en las concentraciones de hCG presentándose el pico de secreción entre la novena y la doceava semana, para posteriormente declinar y mantenerse en concentraciones constantes hasta el final del embarazo (46). En el embarazo es posible detectar inmunoreactividad de la hCG en suero nueve días después del pico ovulatorio de LH; esto es, aproximadamente un día después de la implantación. Al inicio del embarazo ocurre un incremento rápido de las concentraciones de hCG, alrededor de la 6ª semana; posteriormente se alcanza el pico máximo de secreción alrededor de la 9ª semana, encontrándose sus concentraciones entre 50,000 y 100,000 UI/L; estas concentraciones declinan posteriormente y a partir de la 20ª semana de gestación los valores oscilan entre 10,000 y 20,000 UI/L, permaneciendo así hasta el final del embarazo (47).

En un estudio previo (48) se propuso un mecanismo de desactivación de la hCG, por el cual la molécula intacta es fragmentada entre los residuos 44 y 45 ó 47 y 48 de la subunidad β (forma hendida), cambiando su estructura terciaria, disminuyendo su actividad biológica y limitando el reconocimiento de la hormona por ciertos anticuerpos, concluyéndose que el grado de fragmentación varía conforme progresa el embarazo (ya que la proporción de formas hendidas aumentó progresivamente con el tiempo) y que por inestabilidad de la molécula fragmentada se disocia más rápidamente en las subunidades α y β -fragmentada. Una vía que involucre fragmentación y disociación podría desactivar progresivamente la hCG conforme avanza el embarazo y contribuir a la disminución de sus concentraciones circulantes en el 2° y 3° trimestre.

Durante el embarazo temprano, el cuerpo lúteo estimulado por la hCG es el sitio de mayor producción de progesterona (49). Alrededor de la octava semana ocurre un cambio, durante el cual la placenta pasa a ser el mayor productor de este esteroide (49). En explantes placentarios, se ha observado que la progesterona suprime la producción de hCG. Sin embargo, en estudios *in vivo*, la administración de progesterona a mujeres en el primer trimestre del embarazo induce un incremento en la hCG en suero (49).

Cuando la hCG se une a su receptor membranal, es introducida por una endocitosis mediada por el receptor. Las vesículas de endocitosis vacían su contenido a los lisosomas, donde el ligando y el receptor son degradados por enzimas hidrolíticas. Al inducir la endocitosis, algunos ligandos incrementan notablemente la velocidad de degradación de los receptores de forma que cuando la concentración del ligando es elevada, disminuye el número de receptores membranales. El resultado es una disminución de la sensibilidad de la célula blanco para la hormona. Esto ha sido demostrado en cultivos *in vitro* de placentas a término (50). Por otro lado esta pérdida de sensibilidad puede ocurrir también a través de una

inactivación reversible de los receptores inducido por el ligando (50). Dada la forma pulsátil de secreción hormonal de la LH y FSH (51-53), la cual es necesaria para evitar la desensibilización o regulación decreciente de los receptores y procurar un estímulo adecuado a la célula, se ha sugerido que la secreción de hCG pudiera ser también intermitente.

En estudios realizados *in vitro* con explantes placentarios de edades gestacionales tempranas y tardías, se ha observado que la secreción de hCG es pulsátil y que la cantidad secretada así como su pulsatilidad (número de pulsos) disminuyen conforme el embarazo progresa (54).

Nakajima y colaboradores (55) estudiaron la secreción pulsátil de la hCG y de la progesterona de mujeres en el primer trimestre del embarazo. Observaron que las concentraciones en suero de ambas hormonas varían en un período de 24 horas y que esta variación podría deberse a un patrón de secreción de tipo episódico (55). Hasta el momento se desconoce el patrón de secreción de la hCG en el segundo y tercer trimestres. Es probable que la pulsatilidad sea el reflejo de la liberación de gránulos de almacenamiento; sin embargo, como se mencionó anteriormente, no se han observado gránulos de almacenamiento (54). Se ha sugerido que un factor liberador de gonadotropinas (GnRH) o algún análogo de éste, el cual ha sido identificado en la placenta humana (25), podría ser el responsable de su secreción episódica. Este decapeptido es secretado por el citotrofoblasto y se une a receptores presentes en la membrana celular del sinciotrofoblasto (25). El mecanismo por el cual ocurre el incremento en la liberación de la hCG inducido por el GnRH, aparentemente tiene una mayor eficacia al principio del embarazo, a juzgar por estudios en cultivos de células placentarias (25).

Al graficar las variaciones en la concentración de ciertas hormonas durante un intervalo de tiempo determinado, es posible identificar dos regiones bien definidas. Una de ellas es dada

por el incremento relativo de la concentración de la hormona (pico), y la otra por una disminución en la concentración de la hormona (valle). A la presentación de estos dos eventos se le denomina pulso (56). Para identificarlos y estudiar sus características se han descrito los siguientes parámetros (57) (Figura 3):

a) Frecuencia; que es el número de pulsos en un período de tiempo establecido.

b) Altura; expresada como el promedio de la longitud del pico comprendida entre dos puntos determinados.

c) Anchura; que es el lapso de tiempo comprendido entre el primer incremento y el primer decremento significativo.

d) Area; definida como el producto de la altura del pico en unidades de masa multiplicado por la duración del mismo.

e) Incremento; el cual es el aumento progresivo de la concentración media de un valle y el valor más alto del pico correspondiente.

f) Intervalo; tiempo que transcurre entre los valores máximos de dos picos adyacentes.

El estudio de estos parámetros de los pulsos de determinadas hormonas (por ejemplo: la hormona luteinizante, de crecimiento, prolactina, etc) ha permitido conocer y caracterizar las variaciones temporales en su secreción y dilucidar algunos de los mecanismos que las regulan.

6. CUANTIFICACION Y VALORACION DE LAS PROPIEDADES BIOLOGICAS DE LA hCG.

Para la determinación cuantitativa de las concentraciones hormonales de la hCG se emplea, entre otras técnicas, el radioinmunoanálisis (RIA). Este método se basa en las propiedades inmunológicas de la molécula por identificar; la hormona es el antígeno que

CARACTERÍSTICAS DE LOS PULSOS

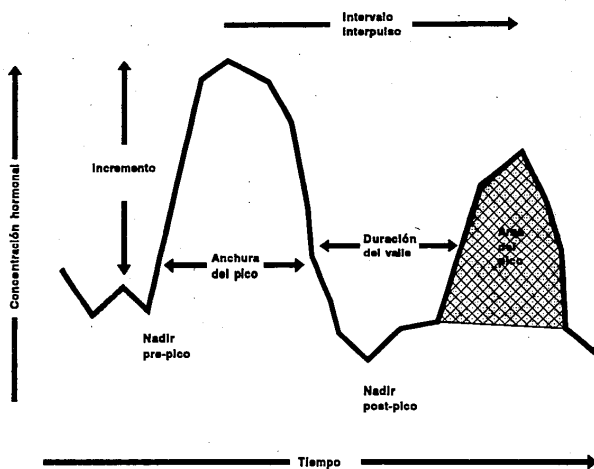


FIGURA 3.

inducirá la formación de anticuerpos específicos al ser inyectada repetidamente en ciertos animales como el conejo. En el RIA, el anticuerpo se incuba con una cantidad conocida de hormona radiomarcada y una cantidad conocida (curva estándar) o desconocida (muestras problema) de hormona radioinerte, las cuales competirán entre sí para unirse al anticuerpo y formar complejos. Una vez que la reacción ha alcanzado el equilibrio, se mide la cantidad de antígeno radiactivo unido al anticuerpo, y a partir de este valor se calcula la concentración de la hormona no marcada. Cuanto mayor sea la concentración de la hormona radioinerte que se va a cuantificar, menor será la cantidad de radiactividad detectada en forma de complejos antígeno-anticuerpo.

El marcaje radiactivo de la hormona se realiza con ^{125}I o con ^3H . La separación de las moléculas unidas de las no unidas al anticuerpo se puede hacer mediante precipitación agregándose anticuerpo contra la IgG presente. Otro método empleado particularmente para los RIAs de los esteroides es la adsorción de la hormona libre con carbón-dextrán.

Para determinar la potencia biológica se ha utilizado entre otras técnicas, el bioensayo *in vitro*. El método está basado en la producción de testosterona por células de Leydig de testículo de rata o ratón al ser estimuladas LH o hCG. La interacción de alguna de estas hormonas con el receptor de la membrana celular de las células de Leydig desencadena una respuesta esteroideogénica, en éste caso la producción de testosterona (58), que al ser cuantificada permite la medición de la potencia biológica de la hormona.

Para la separación de las isoformas de las glicoproteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico se emplea el método de cromatoenfoco, descrito por primera vez por Sluyterman et al (59-61). El principio básico del cromatoenfoco se basa en la creación de un gradiente de pH en una columna de intercambio iónico en el cual las proteínas eluirán de acuerdo a su punto isoeléctrico.

II. OBJETIVOS

- 1. Determinar la forma de secreción de la hCG inmunoactiva durante los tres trimestres del embarazo.**
- 2. Estudiar los cambios en la actividad biológica *In vitro* de dicha hormona en los diferentes trimestres del embarazo.**
- 3. Determinar el patrón de heterogeneidad por carga de la hCG durante la 8ª, 10ª, 24ª y 36ª semanas de embarazo (1º, 2º y 3º trimestres).**

III. HIPOTESIS

La hCG es secretada por la placenta de manera episódica durante los tres trimestres del embarazo. La potencia biológica de la hCG varía a lo largo de éste ya que su presencia es fundamental particularmente al principio del embarazo. Por tal motivo se espera encontrar una mayor potencia biológica en los primeros dos trimestres, así como un predominio de isoformas más ácidas de mayor vida media plasmática.

IV. MATERIALES Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en mujeres voluntarias embarazadas que asistían a la Consulta de Endocrinología Reproductiva e Infertilidad del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. El consentimiento voluntario fue por escrito, tomándose en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión que fueron evaluados por personal médico especializado:

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.- Peso y talla comprendidos entre la percentila 3 y 97 para mujeres adultas mexicanas.
- 3.- Ausencia de enfermedades crónicas debilitantes.
- 4.- Ausencia de patologías concomitantes después de una evaluación clínica detallada.
- 5.- Concentraciones en sangre de glucosa, urea, creatinina y pruebas de función hepática dentro de los intervalos normales de referencia.
- 6.- Presentar 3 días antes del estudio una hemoglobina superior a 12 g/dl, hematocrito mayor de 36% y concentraciones de hierro, folatos y vitamina B₁₂ dentro de los valores de referencia.
- 7.- Ausencia de cualquier tipo de sangrado.
- 8.- Consentimiento voluntario de participar en el estudio.

B. CRITERIOS DE EXCLUSION O ELIMINACION.

- 1.- Inicio de cualquier tipo de enfermedad que pudiese complicar el curso del embarazo o poner en riesgo la vida de la madre y/o el feto.
- 2.- Alteración en alguno de los parámetros de laboratorio.
- 3.- Presentación de alteraciones en la tensión arterial, frecuencia cardíaca o temperatura que indicara la posibilidad de alguna alteración física durante el estudio.
- 4.- Si durante el parto se determinara alguna alteración macroscópica de la placenta.
- 5.- Decisión de no continuar en el estudio.
- 6.- Pérdida del producto.

C. SUJETOS Y PROTOCOLO DE ESTUDIO.

Para el desarrollo de los objetivos 1 y 2 (Figura 4) se incluyeron 7 mujeres con edades de 22 a 32 años de edad, las cuales fueron estudiadas a las 10.2-13.0, 21.2-24.5 y 33.7-36.5 semanas de embarazo (1^{er}, 2^o y 3^{er} trimestre).

Para fines del estudio se tomaron muestras de 11 mujeres embarazadas, de las cuales cuatro fueron eliminadas: dos por presentar problemas médicos, otra por presentar parto prematuro y una por baja voluntaria. De las siete mujeres restantes, una de ellas tenía síndrome de ovarios poliquísticos (SOP). El resto fueron mujeres con embarazos normales que aceptaron participar voluntariamente en el estudio. Todas las pacientes tuvieron un embarazo espontáneo, excepto la paciente con SOP que requirió de inductores de ovulación (citrato de clomifén). En todas las pacientes el embarazo cursó sin complicaciones y al final del mismo no se observaron anomalías placentarias.

ESQUEMA DE TRABAJO

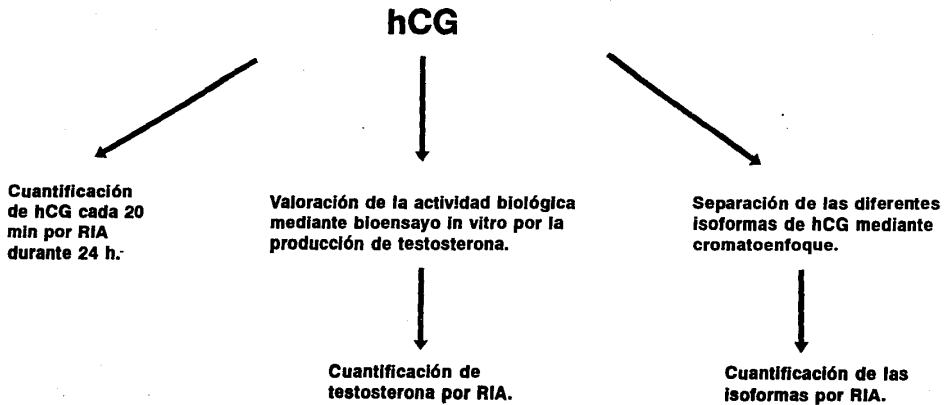


FIGURA 4.

Las mujeres que resultaron elegibles fueron estudiadas a las 10.2-13.0, 21.2-24.5 y 33.7-36.5 semanas de gestación (1^{er}, 2^o y 3^{er} trimestre), internándolas en la Unidad Metabólica del Instituto desde la noche anterior al estudio. El estudio se inició a las 8:00 hrs; media hora antes se les instaló un catéter corto (mariposa #21, Laboratorios Abbott) en una vena antecubital. Se obtuvieron muestras (2ml) sanguíneas cada 20 minutos, durante 24 horas (146 ml en total). Durante este tiempo las mujeres permanecieron en posición de decúbito, tomando sus alimentos y durmiendo en horario habitual.

La sangre obtenida de las 73 muestras se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos; posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, extrayéndose el sobrenadante (suero). Finalmente cada uno de éstos se congeló a -20°C en tubos de plástico hasta el momento de su análisis.

Cinco mujeres más con edades de 22 a 30 años y que cursaban la 8.0-8.8 semanas de embarazo se incluyeron en el estudio para el desarrollo del tercer objetivo. En estas mujeres se obtuvo una muestra sanguínea (20 ml) en ayunas. La sangre obtenida se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos y se siguió el mismo procedimiento antes mencionado, congelando el suero a -20°C hasta su procesamiento. En todas las pacientes, el embarazo cursó sin complicaciones y al final del mismo no se observaron anomalías placentarias.

D. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA) DE 17 β -ESTRADIOL (E₂) Y PROGESTERONA (P).

La cantidad de E₂ y P contenidos en cada muestra de suero obtenida a las 08:00 horas, fue determinada por RIA después de su extracción del suero con disolventes orgánicos; los antisueros empleados fueron donados por el programa de Reactivos de la Organización

Mundial de la Salud (OMS; Ginebra, Suiza). Para evitar variaciones entre los análisis, todas las muestras fueron analizadas en una sola corrida. Las variaciones dentro de los análisis fueron \leq 8.6%.

E. DETERMINACION DE LA FORMA DE SECRECION DE hCG.

1.- RIA DE hCG.

Los RIAs se realizaron de acuerdo al método descrito por Suff y colaboradores (62), el cual se resume en la figura 5. Se empleó como estándar una hCG altamente purificada (hCG CR-121, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD, USA) y se utilizó esta misma como trazador después de ser radiomarcada con ^{125}I mediante el método de Cloramina T tal y como se muestra en la figura 6 (63).

Las concentraciones para realizar la curva estándar partieron de 0.125 ng/tubo hasta 30 ng/tubo (Figura 7). Se empleó el 1^{er} anticuerpo (anti-hCG-H180, lote 2, Institutos Nacionales de la Salud, EUA) a una dilución final de 1:100,000 el cual mostró una reacción cruzada de 3.22% con la subunidad β -libre (β -hCG CR-123) y de 1.23% con la subunidad α -libre (α -hCG CR-123) (Figura 8).

Debido a la alta concentración circulante de hCG durante el embarazo, se realizaron diferentes diluciones en cada muestra de tal manera que las concentraciones cuantificadas por RIA correspondieran a la parte central de la curva estándar, donde la variabilidad es mínima. Para el 1^{er} trimestre el intervalo de las diluciones fue de 1:200 a 1:400; en tanto que en el 2^o y el 3^{er} trimestres de 1:40 a 1:100. Las diluciones se realizaron con un amortiguador salino de fosfatos (PBS) 0.05M con gelatina al 0.01%.

Para evitar las variaciones entre los análisis, todas las muestras de un mismo estudio

RIA DE hCG

Preparar estándar

Descongelar muestras problema

Agregar 400 μ l de cada dobla a cada tubo por duplicado

Añadir primer anticuerpo con PBS 0.05M y EDTA 0.05M

Añadir marca con PBS 0.05M y gel al 0.1% (20,000 cpm en 200 μ l)

Agitar

Incubar de 18 a 22 horas a temperatura ambiente

Agregar segundo anticuerpo con PBS 0.05M

Incubar de 18 a 22 horas a temperatura ambiente

Detener reacción con 2 ml de agua fría

Centrifugar 30 min a 3,000 rpm a 4°C

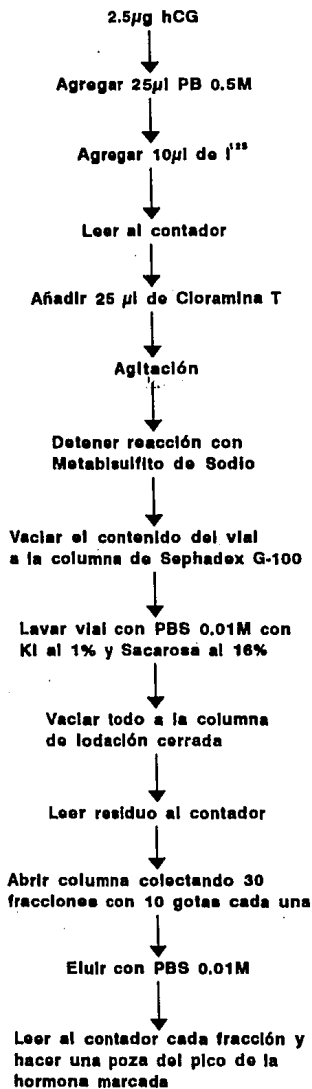
Decantar y secar tubos

Desechar sobrenadante

Leer al contador de radiaciones gamma por un minuto

Sell y cols., 1986.

FIGURA 5.

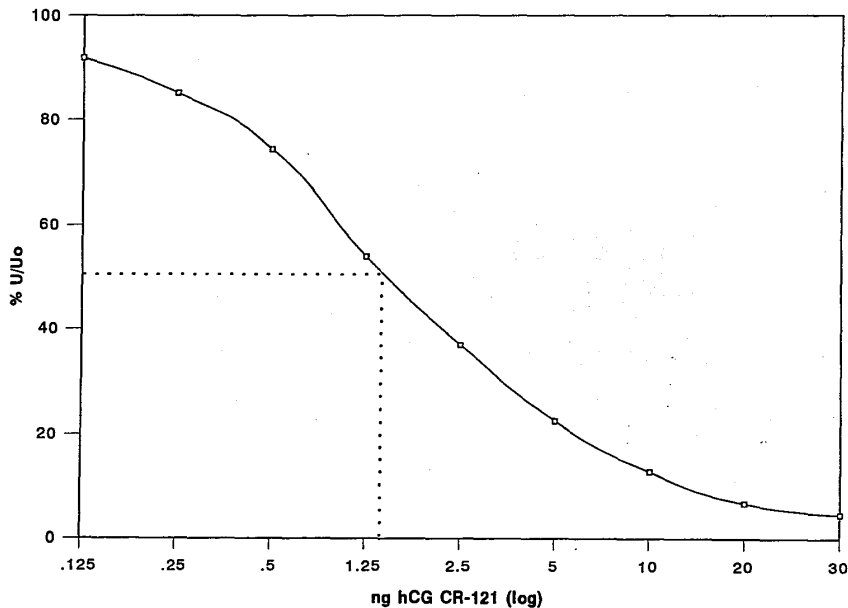


Greenwood FC y cols, 1962.

FIGURA 6.

CURVA ESTANDAR

HORMONA CORIOGONADOTROPICA CR-121



* Las líneas discontinuas señalan la dosis efectiva al 50%.

FIGURA 7.

□- hCG

CURVA DOSIS-RESPUESTA

hCG CR-121, beta-hCG CR-123 Y alfa-hCG CR-123

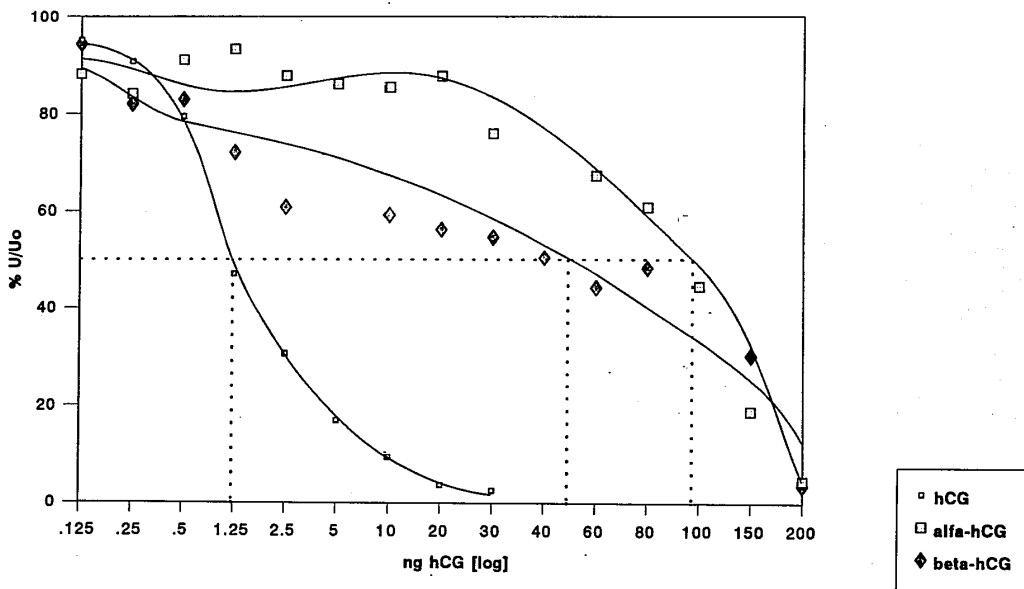


FIGURA 8. Curva dosis-respuesta de hCG CR-121, beta-hCG CR-123 y alfa-hCG CR-123, empleando como anticuerpo al anti-hCG H180. Los resultados son expresados como el log de la dosis (X) y la relación U/Uo (Y).

se incluyeron en el mismo análisis por triplicado. El coeficiente de variación dentro del análisis fue menor del 10% y entre los análisis menor de un 14%.

F. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA in vitro DE LA hCG.

El método de estudio de la actividad biológica de la hCG descrito por Van Damme y colaboradores (64) se basa en la cuantificación de testosterona producida por células de Leydig de testículo de ratón en presencia LH o hCG. Este método se encuentra resumido en la Figura 9. Para este procedimiento se utilizó una preparación altamente purificada (hCG CR-121) como estándar; la curva estándar comprendió dosis desde 3.9 pg/tubo hasta 500 pg/tubo.

De las 73 muestras de suero provenientes de cada voluntaria y obtenidas en cada uno de los trimestres de estudio, se tomaron 3 muestras al azar y con ellas se formaron diferentes pozas. En cada poza (una poza por paciente por trimestre) se determinó la concentración de hCG por RIA y bioensayo. En cada bioensayo se incluyeron las mismas dosis del desconocido que del estándar de hCG. Todas las muestras de los tres trimestres de cada paciente se incluyeron en un mismo bioensayo o RIA. Así mismo, se estudió la actividad biológica de la hCG presente en muestras de picos y valles del primer trimestre ($n = 1$ pico y 1 valle/sujeto). El coeficiente de variación dentro de los análisis fue $< 10\%$.

1.- RIA DE TESTOSTERONA.

La cuantificación de testosterona producida en los bioensayos in vitro se llevó a cabo por RIA empleando un estándar de testosterona tritiada (Amersham International, Inglaterra), y un anticuerpo proporcionado por el Programa Especial de Investigación en Reproducción de la OMS (Ginebra, Suiza). Las concentraciones de la curva estándar partieron de 9.9 ng/ml

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE hCG

in vitro

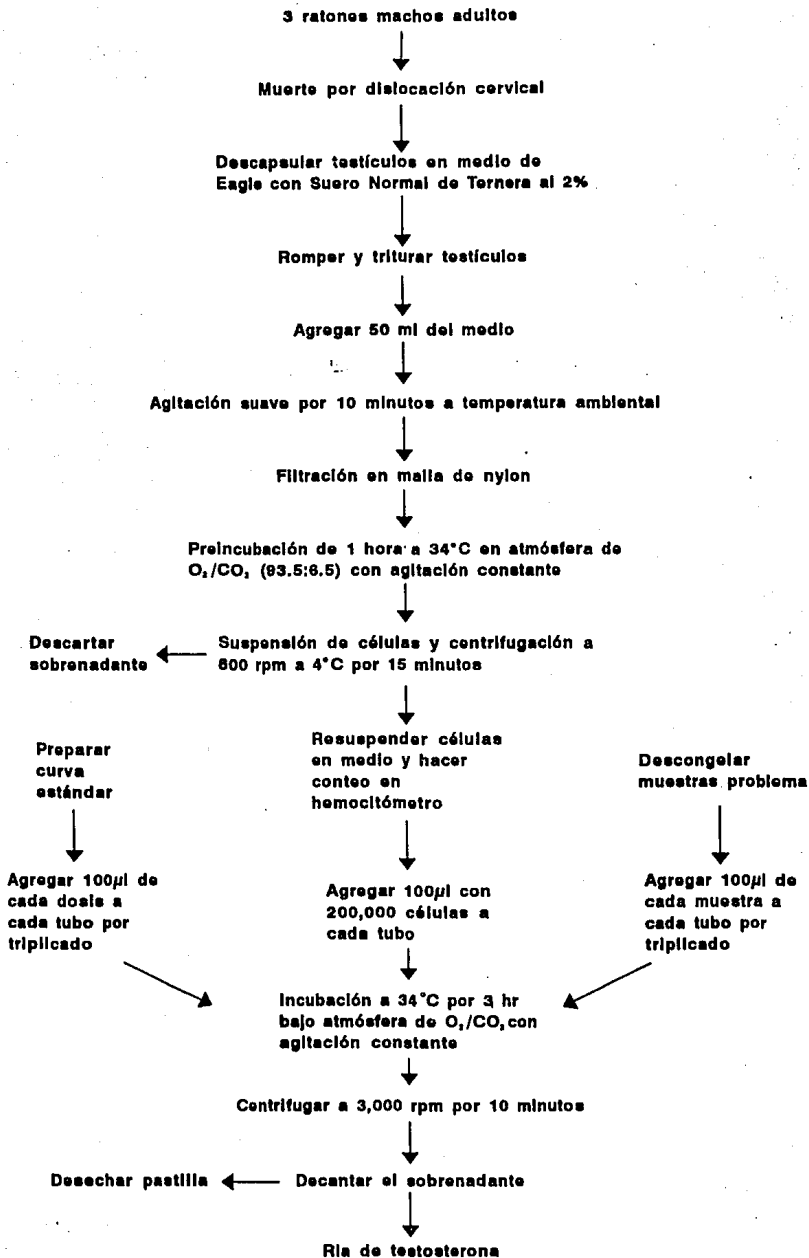


FIGURA 9.

hasta 633.6 ng/ml, utilizándose el anticuerpo a una dilución final de 1:210,000. El método se encuentra resumido en la figura 10. Los coeficientes de variación dentro y entre los análisis fueron < 10%.

G. HETEROGENEIDAD POR CARGA DE LA hCG.

Una vez determinada la concentración de hCG en cada una de las muestras de suero obtenidas cada 20 minutos (73 muestras), se procedió a mezclarlas, formando una poza para cada uno de los trimestres de cada paciente, analizándose así 5 muestras de la 8.0-8.8 semanas de embarazo y 7 muestras del 1^{er} (10.2-13.0 semanas), 2^o (21.2-24.5 semanas) y 3^{er} (33.7-36.5 semanas) trimestres de embarazo.

1.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Previo estandarización de la técnica, se utilizaron 7 ml de suero de la 8.0-8.8 semanas y 1^{er} trimestre (10.2-13.0 semanas) y 14 ml del 2^o (21.2-24.5 semanas) y 3^{er} (33.7-36.5 semanas) trimestres, debido a las diferentes concentraciones de hCG a lo largo del embarazo. Una vez descongeladas, cada poza fue transferida por separado a membranas de diálisis con un límite permisible de permeabilidad de 12-14,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA) y dializadas por 48 horas contra agua bidestilada y desionizada y posteriormente durante 24 horas contra una solución de carbonato de amonio 0.01M en agitación constante a 4°C. Posteriormente se mantuvieron congeladas a -70°C por 24 horas para finalmente ser liofilizadas (65).

2.- EXTRACCION DE ALBUMINA DEL SUERO.

Debido a la presencia de cantidades significativas de albúmina en las muestras de suero, se procedió a extrearla mediante un gel de afinidad (Azul de affigel, Bio Rad, Richmond,

CA, USA) durante una hora. Este gel consiste en cuentas de agarosa entrecruzadas y unidas covalentemente al colorante azul de cibacron, con una capacidad de unión a la albúmina \geq 11 mg/ml. Después de la extracción, cada muestra se dializó nuevamente en membranas con un límite de permeabilidad de 6-8,000 Mr (Spectrum Medical Industries), durante 24 horas contra una solución amortiguadora de Imidazol-HCl (0.025M, pH 7.4) en agitación constante a 4°C.

3.- CROMATOENFOQUE DE hCG.

El Cromatoenfoco de hCG se realizó de acuerdo al método descrito previamente por Ulloa-Aguirre y colaboradores (66), para lo cual se instalaron columnas de 30 x 1 cm de la resina de intercambio PBE-94 (Farmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA). Posteriormente cada columna fue equilibrada con 15 volúmenes de solución amortiguadora de Imidazol-HCl (pH = 7.4). A continuación la muestra (previamente dializada) se depositó en la superficie de la columna y después de su penetración en la resina se cambió el amortiguador de Imidazol-HCl por el poliamortiguador (Polybuffer) 74 (Farmacia Fine Chemicals) a una dilución 1:8 en agua desionizada (a pH = 4.0). Se colectaron fracciones de 2 ml cada una, a una velocidad de flujo de 2 ml por aproximadamente 20 minutos a 4°C. Posteriormente se determinó el pH de cada una de las fracciones y cuando se registró un pH de 4.0 se cambió el amortiguador eluyente a una solución 1M de NaCl, con el fin de obtener el material que no se recuperó en el rango de pH de 7.4-4.0. Cada fracción obtenida se mantuvo a -20°C hasta el día de su cuantificación mediante RIA. El porcentaje de recuperación de la hCG por este método fue mayor del 70% del total depositado en la columna.

Los RIAs realizados para la cuantificación de cada una de las fracciones obtenidas en el cromatoenfoco se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Figura 6). Sin embargo, se modificó la sensibilidad de la curva estándar, ya que sus concentraciones

partieron de 0.025 ng/ml hasta 16 ng/ml y la dilución final del anticuerpo fue de 1:200,000. Todas las muestras de una misma columna fueron incluidas en una misma corrida de RIA.

4.- IDENTIFICACION DE LAS ISOFORMAS.

Una vez identificados los patrones de distribución por carga de la hCG, se procedió a dividirlos en intervalos de una unidad de pH, calculando el porcentaje de hormona recuperada en cada uno de ellos en relación al total recuperado. Los intervalos fueron los siguientes:

REGION I	>7-6.50
REGION II	6.49-5.50
REGION III	5.49-4.50
REGION IV	4.49-3.50
REGION V	Pico de sal

Cabe mencionar que la región V estaba constituida por la hormona no recuperada en ninguna de las otras cuatro regiones, debido a que su punto isoeléctrico o pH de elución se encontró en valores de pH <4.0.

H. ANALISIS ESTADISTICO.

1.- PULSOS DE hCG.

La detección y caracterización de los pulsos de la hCG circulante, se llevó a cabo mediante un programa de conglomerados (CLUSTER), el cual se basa en algoritmos matemáticos para la detección de picos. El programa está diseñado para localizar y cuantificar incrementos y decrementos significativos en una serie de datos. Incrementos significativos combinados con decrementos significativos constituyen los picos. Este programa se basa en un modelo de análisis de conglomerados que emplea como pruebas estadísticas un análisis de

varianza corregida (ANOVA) y pruebas no paramétricas para dos muestras (67).

De los resultados se compararon los siguientes parámetros: a) el número de pulsos en 24 horas (frecuencia), b) su amplitud, c) su área, d) el mayor incremento de los pulsos y e) las concentraciones integradas de hCG en 24 horas. Estos parámetros fueron a la vez correlacionados con las concentraciones en suero de progesterona y estradiol empleando el coeficiente de correlación por rangos de Spearman.

2.- BIOACTIVIDAD DE hCG.

Para el análisis de la bioactividad *in vitro* de la hCG en los diferentes trimestres del embarazo, se empleó el programa ALLFIT (68) diseñado para el análisis de curvas dosis-respuesta, calculándose la potencia relativa de cada curva mediante un modelo logístico de 4 parámetros: a) respuesta a dosis cero, b) pendiente de la curva, c) dosis efectiva al 50% (DE_{50}) y d) respuesta máxima.

La ecuación es la siguiente:

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

Donde:

Y = respuesta

x = dosis

a = respuesta a dosis cero

b = pendiente

c = dosis efectiva máxima al 50%

d = respuesta máxima

Los resultados se expresaron en relación a la potencia del estándar hCG CR-121. La potencia relativa de las muestras problema se expresó mediante la relación DE_{50} hCG CR-121/ DE_{50} muestra problema. Las diferencias en las potencias relativas se calcularon mediante un ANOVA seguido de una t pareada, con un nivel de significancia < 0.05 .

3.- HETEROGENEIDAD POR CARGA DE LA hCG .

La comparación entre los porcentajes de recuperación de la hCG en cada una de las regiones de pH, se realizó mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) y una prueba para dos muestras (U-Mann-Whitney), empleándose para discriminar las diferencias entre los distintos trimestres una $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

Las concentraciones integradas de 24 horas de la hCG circulante fueron mayores en muestras obtenidas a las 10.2-13.0 semanas de la gestación que durante las semanas 21.2-24.5 y 33.7-36.5 ($p < 0.01$) (Tabla 1), en tanto que las concentraciones en suero (media \pm EEM) del E_2 y P en muestras obtenidas a las 08:00 h de cada día del estudio, fueron mayores al final de los trimestres segundo y tercero que del primero (E_2 en suero al final del primer trimestre = 9.5 ± 1.3 nmol/l, segundo trimestre = 28.7 ± 3.1 nmol/l, tercer trimestre = 77.4 ± 7.8 nmol/l, $p < 0.01$ primer trimestre vs segundo y tercero, y segundo vs tercero; P en suero al final del primer trimestre = 96.4 ± 7.9 nmol/l, segundo trimestre = 147.3 ± 13.0 nmol/l, tercer trimestre = 747.7 ± 62.0 nmol/l; $p < 0.05$, primero y segundo vs tercero, $p = NS$, primero vs segundo). Todas las mujeres presentaron un trabajo de parto normal a las 35.8-38.8 semanas de gestación, con nacimientos de 3 varones y 4 mujeres sanos.

A. DETECCIÓN DE PULSATILIDAD.

Los patrones de secreción pulsátil de hCG de 24 horas en cada voluntaria estudiada durante los tres trimestres están representados en las figuras 11 a 17. En la tabla 2 se resumen las características de los pulsos detectados en los diferentes trimestres. Se encontró que respecto a la frecuencia de picos en 24 horas, no hubo diferencias significativas al compararse los tres trimestres, ya que se encontraron 4.3 ± 0.7 , 4.0 ± 0.3 y 4.4 ± 0.6 picos/24 horas en el 1°, 2° y 3° trimestres respectivamente. La máxima altura de los picos fue significativamente mayor en el 1° trimestre ($p = 0.01$), siendo el promedio de 13.0 ± 3.6

TABLA 1

**CONCENTRACION INTEGRADA DE hCG ($\mu\text{g/ml}$) EN
LOS DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO**

SUJETO	PRIMER TRIMESTRE	SEGUNDO TRIMESTRE	TERCER TRIMESTRE
1	15.94 \pm 0.93	3.22 \pm 0.54	2.31 \pm 0.54
2	20.80 \pm 0.38	0.96 \pm 0.1	1.63 \pm 0.06
3	7.30 \pm 1.85	0.68 \pm 0.25	1.53 \pm 0.09
4	6.56 \pm 0.51	0.79 \pm 0.05	1.67 \pm 0.01
5	6.51 \pm 0.6	0.70 \pm 0.13	1.25 \pm 0.16
6	2.73 \pm 0.02	0.17 \pm 0.01	0.34 \pm 0.02
7	7.28 \pm 2.02	0.33 \pm 0.06	0.6 \pm 0.21
$\bar{X} \pm \text{DE}$	9.6 \pm 2.2*	1.0 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2

* $p < 0.01$ primer vs segundo y tercer trimestres (ANOVA)

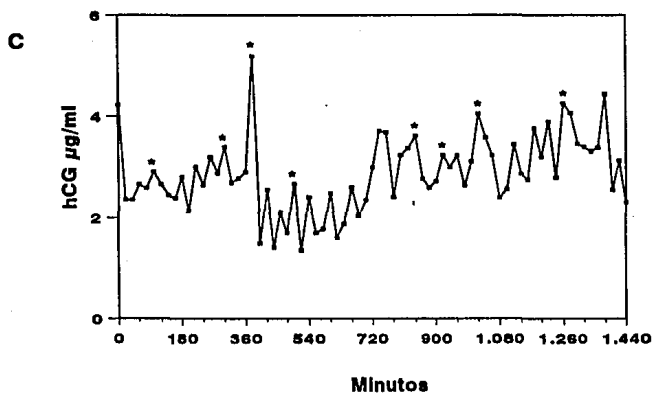
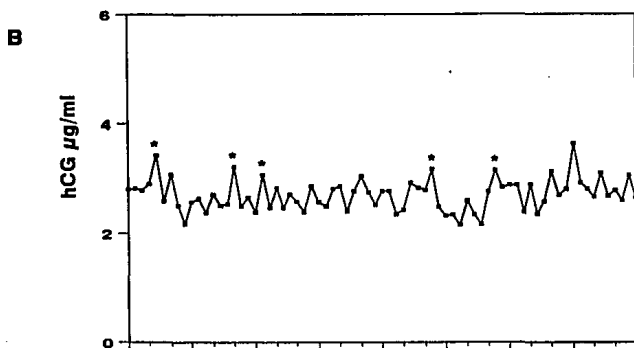
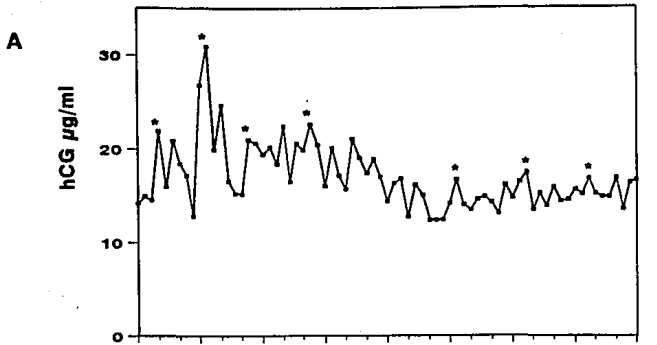


FIGURA 11. Patrón de secreción pulsátil de hCG durante 24 horas del SUJETO 1 durante (A) primer trimestre, (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. * Incrementos significativos.

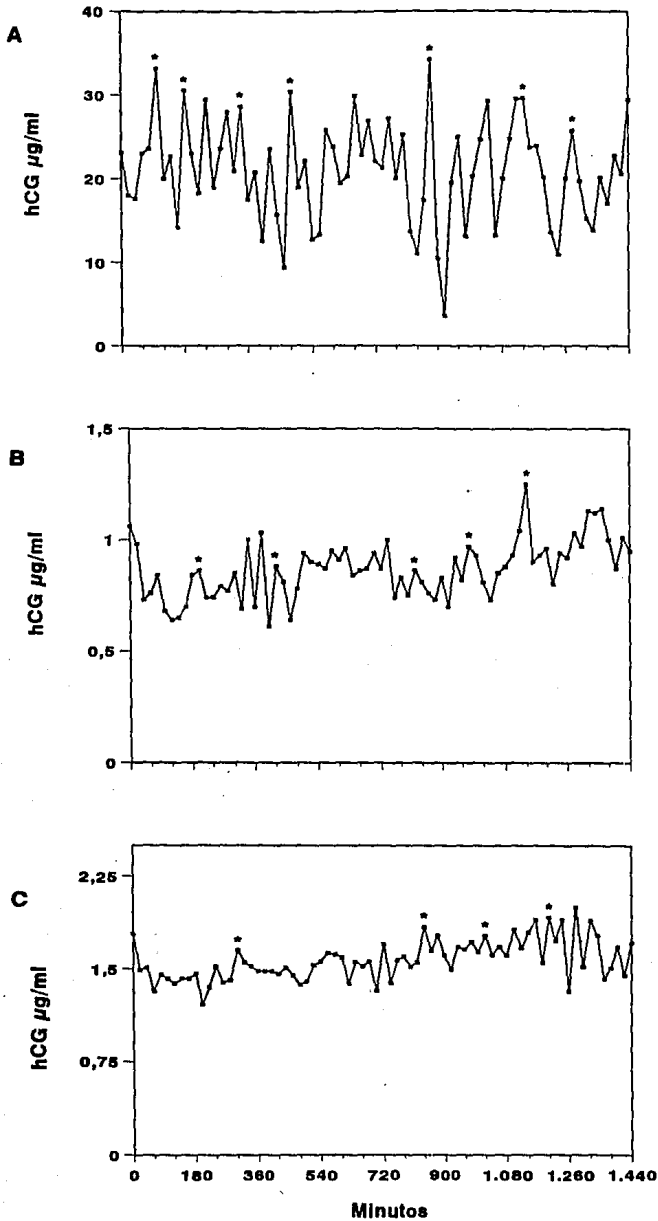


FIGURA 12. Patrón de secreción pulsátil de hCG durante 24 horas del SUJETO 2 durante (A) primer trimestre, (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. * Incrementos significativos.

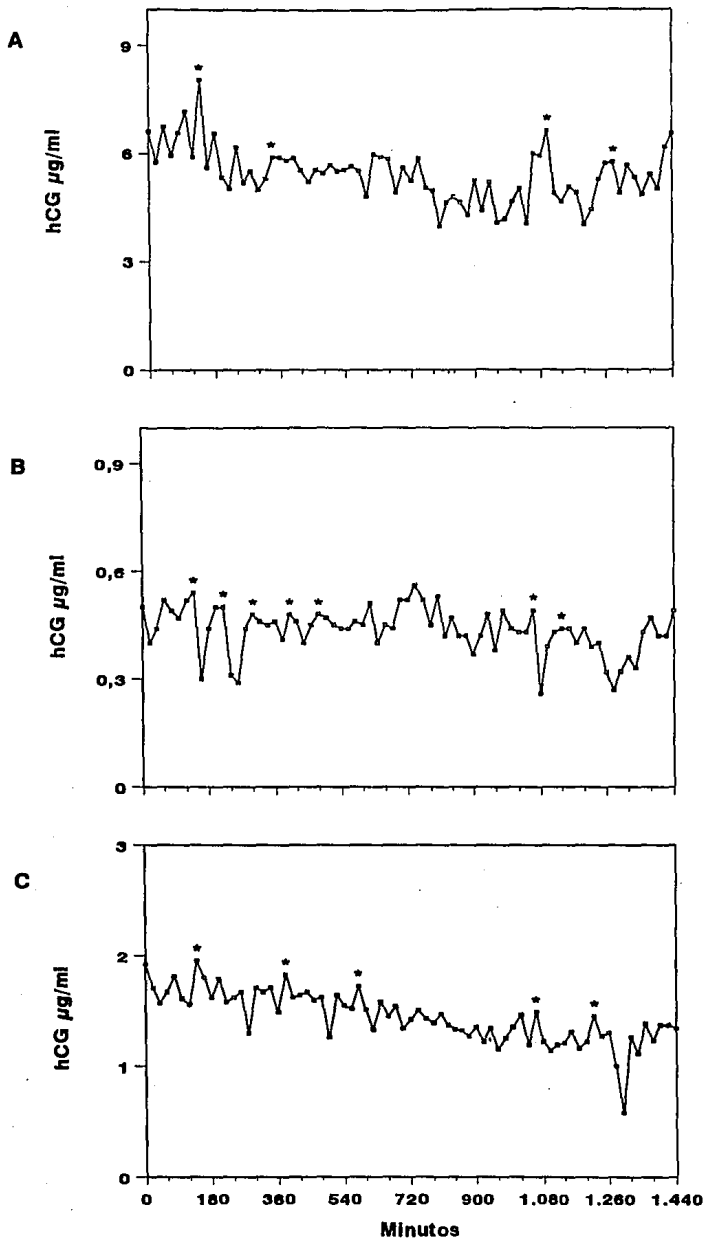


FIGURA 13. Patrón de secreción pulsátil de hCG durante 24 horas del SUJETO 3 durante (A) primer trimestre, (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. * Incrementos significativos.

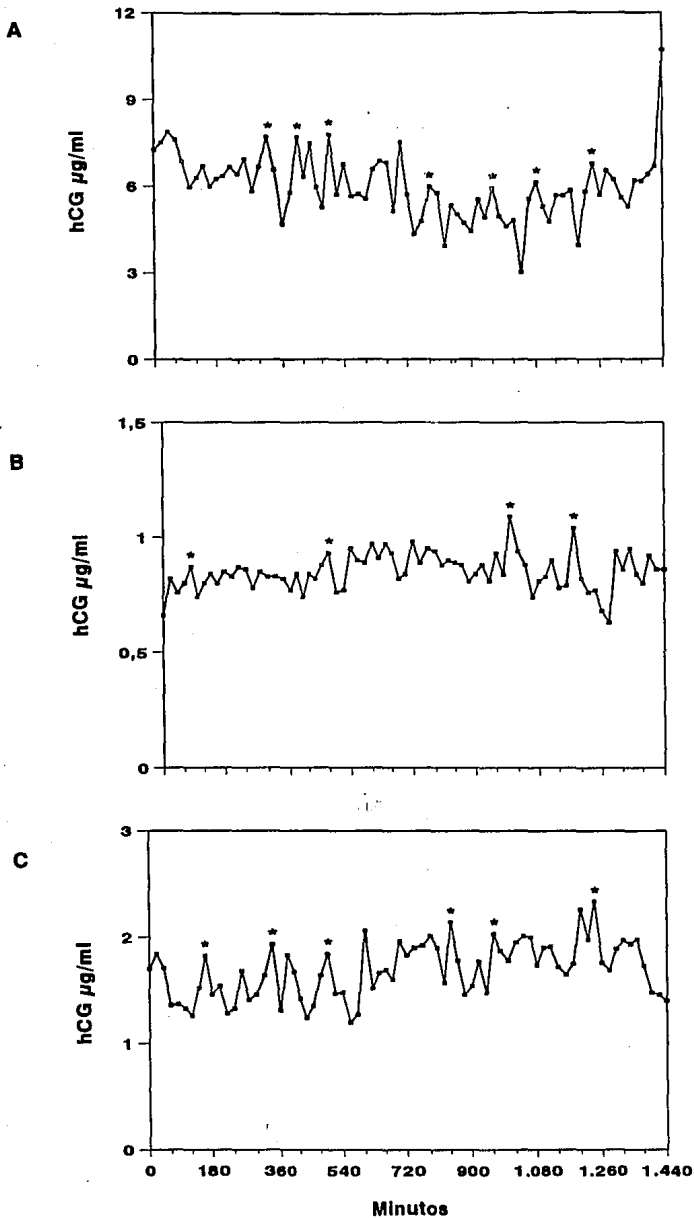


FIGURA 14. Patrón de secreción pulsátil de hCG durante 24 horas del SUJETO 4 durante (A) primer trimestre, (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. * incrementos significativos.

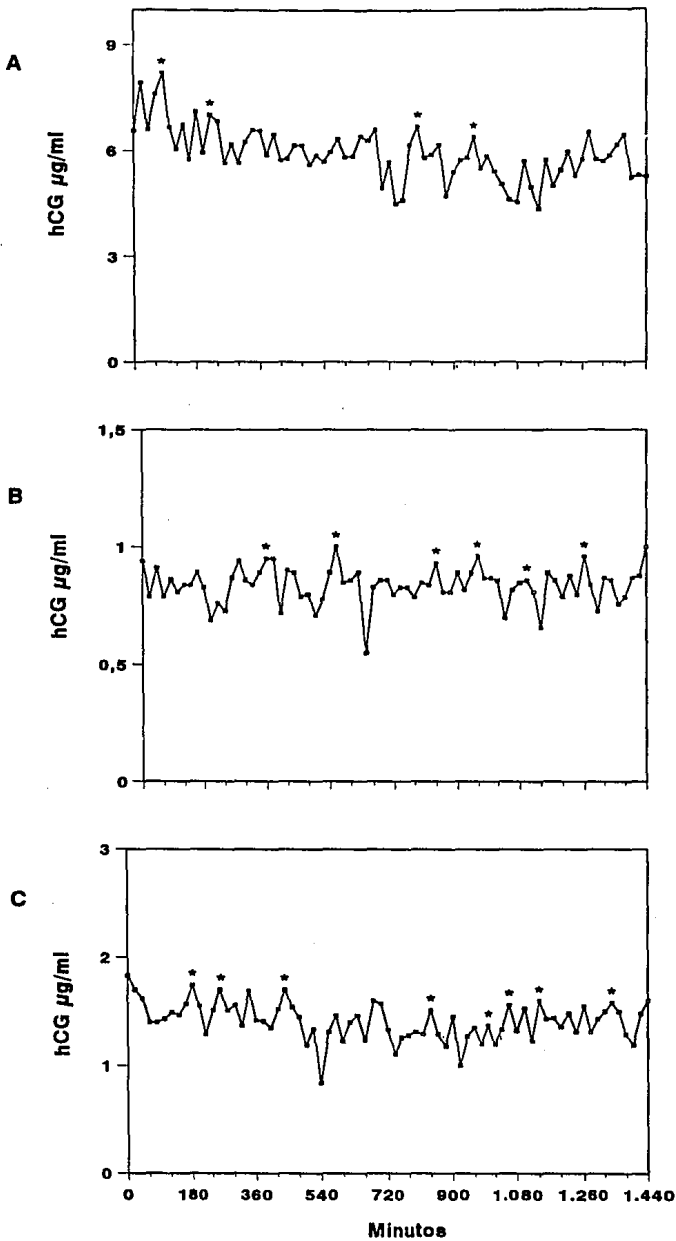


FIGURA 15. Patrón de secreción pulsátil de hCG durante 24 horas del SUJETO 5 durante (A) primer trimestre, (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. * Incrementos significativos.

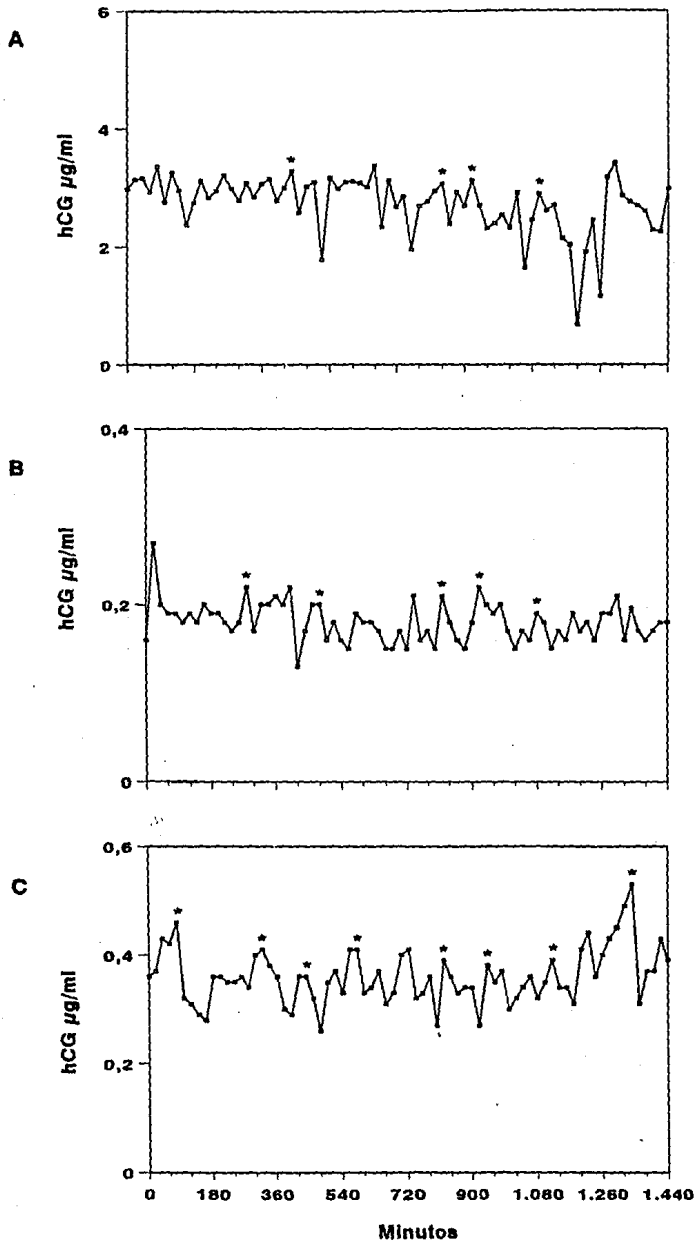


FIGURA 16. Patrón de secreción pulsátil de hCG durante 24 horas del SUJETO 6 durante (A) primer trimestre, (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. * incrementos significativos.

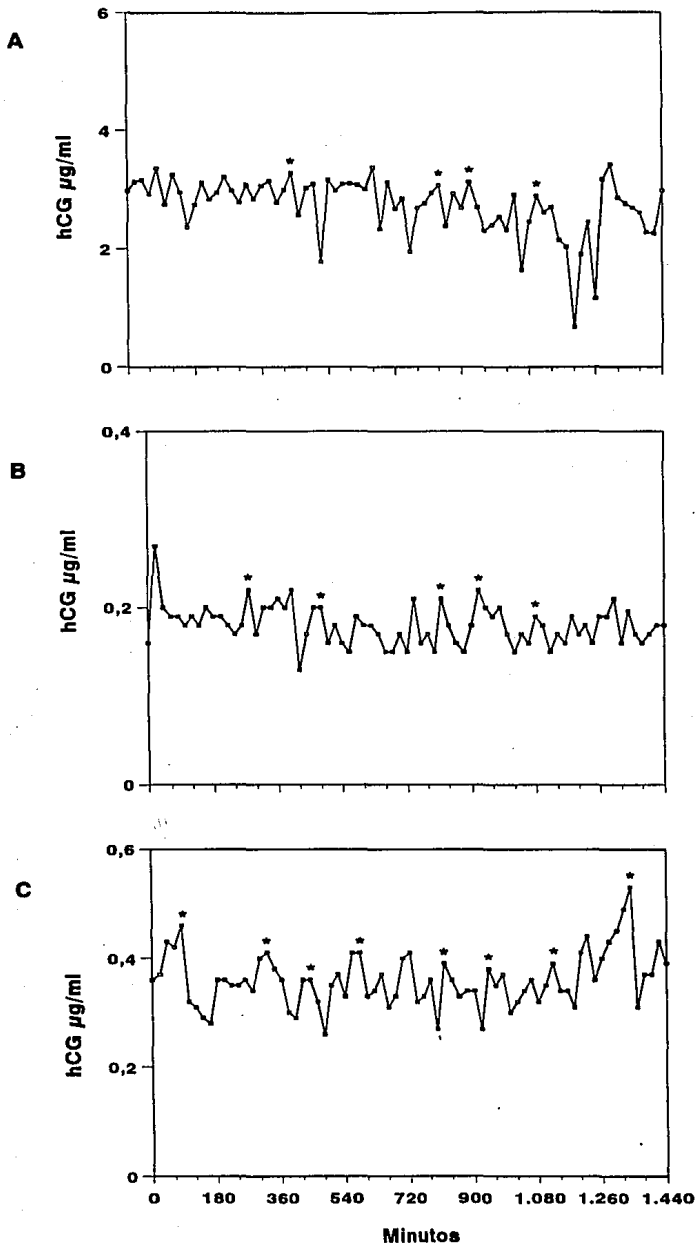


FIGURA 16. Patrón de secreción pulsátil de hCG durante 24 horas del SUJETO 6 durante (A) primer trimestre, (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. * Incrementos significativos.

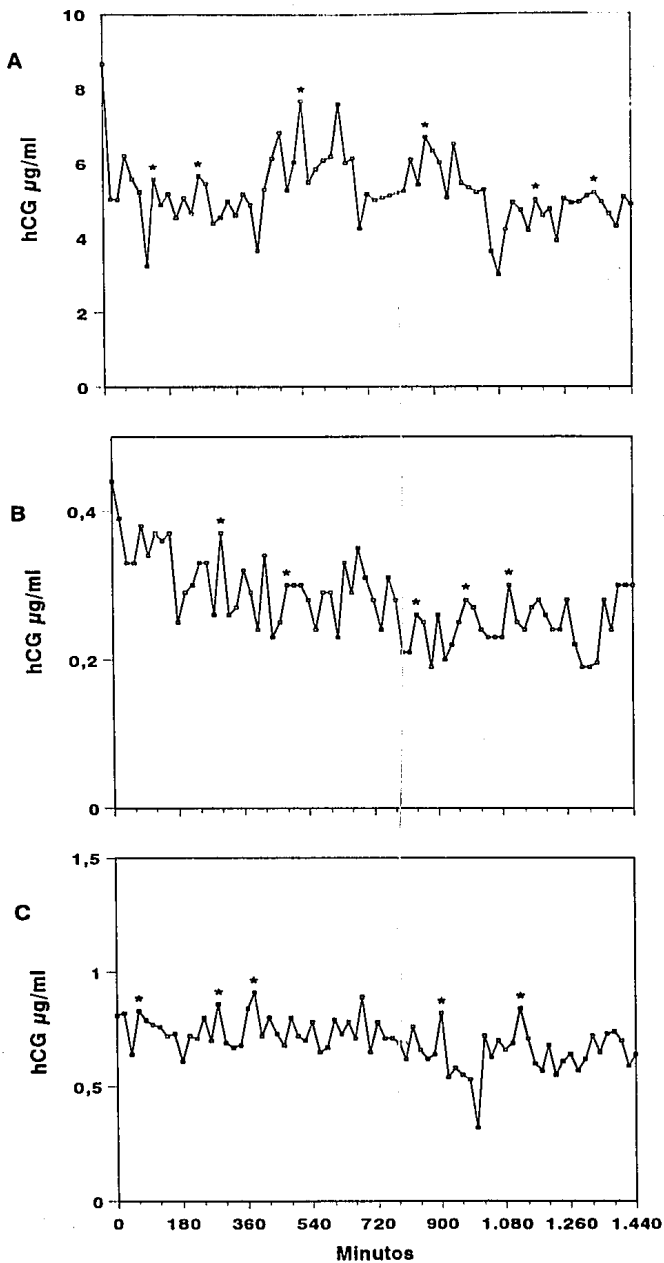


FIGURA 17. Patrón de secreción pulsátil de hCG durante 24 horas del SUJETO 7 durante (A) primer trimestre, (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre. * Incrementos significativos.

TABLA 2

**CARACTERISTICAS DE LOS PULSOS DE hCG EN LAS
DIFERENTES SEMANAS DE GESTACION**

CARACTERISTICAS	Semanas de gestación		
	10.2-13.0	21.2-24.5	33.7-36.5
Número de picos/24 h	4.3 ± 0.7	4.0 ± 0.3	4.4 ± 0.6
Altura máxima del pico (µg/ml)	13.0 ± 3.6*	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.3
Incremento de la amplitud (µg/ml)	4.8 ± 1.7*	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1
Area (µg/ml/minuto)	186.1 ± 42.3*	21.8 ± 10.5	25.0 ± 7.1
Número de valles/24 h	3.8 ± 1.1	2.1 ± 0.5	3.6 ± 0.9
Concentración en nadir (µg/ml)	7.4 ± 1.7*	0.8 ± 0.4	1.1 ± 0.2
Concentraciones integradas de hCG (µg/ml/24 h)	9.6 ± 2.2*	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.2

* p<0.01 10.2-13.0 semanas vs 21.2-24.5 y 33.7-36.5 semanas de gestación

$\mu\text{g/ml}$ para el 1^{er} trimestre, $1.3 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ para el 2^o y $1.6 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ en el 3^{er} trimestre. Respecto a la amplitud de los picos, se pudo observar que los picos del 1^{er} trimestre presentaron una amplitud ($4.8 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$) significativamente mayor ($p < 0.01$) que en el 2^o y 3^{er} trimestre, la cual fue de 0.4 ± 0.2 y $0.4 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. El área de los picos fue también mayor significativamente ($p < 0.01$) en el 1^{er} trimestre al compararse con el 2^o y 3^o, ($186.1 \pm 42.3 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$ en el 1^{er} trimestre, $21.8 \pm 10.5 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$ en el 2^o y $25.0 \pm 7.1 \mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$ en el 3^o).

Aún cuando, no hubo diferencias significativas entre los diferentes trimestres al compararse el número de valles en 24 horas, la máxima concentración de los nadires se observó en el 1^{er} trimestre, siendo de $7.4 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$ y en el 2^o y 3^{er} trimestre de $0.8 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ y $1.1 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Para determinar el posible efecto del aumento en volumen de distribución plasmática, secundario a ingesta de alimentos, en la aparición de los valles de la hCG, los resultados de las muestras correspondientes a los periodos postprandiales (2 horas para la comida y 3 horas para la merienda) de cada sujeto, fueron normalizadas al 100% en relación a la media de las concentraciones de los valores preprandiales (2 horas previas para la comida y 3 para la merienda) y las áreas bajo la curva obtenidas se compararon con aquellas que resultaron de los valores preprandiales correspondientes. Únicamente en las muestras obtenidas a las semanas 10.2-13.0 de la gestación se detectó una disminución postprandial significativa en las concentraciones de hCG; esta disminución se limitó exclusivamente al periodo postprandial correspondiente a la merienda (19:00-22:00 h) con reducciones del $11.8 \pm 3.8\%$, $14.8 \pm 5.12\%$, $15.5 \pm 7.0\%$ y $13.4 \pm 4.6\%$ en las concentraciones de hCG entre los 60 y 120 minutos después del inicio de dicha comida ($p < 0.01$). No obstante, únicamente en una mujer se detectó la presencia de un valle durante esta caída postprandial en las concentraciones de

hCG, representando el 3.7% del número total de valles registrados durante 24 horas en las 7 mujeres al final del primer trimestre.

B. BIOACTIVIDAD.

Debido a que la hCG de los tres trimestres del sujeto número 4 presentó una bioactividad extremadamente reducida (posiblemente por deterioro de la misma durante su manipulación y/o almacenamiento) no se incluyó en el estudio. De igual forma tampoco fue incluida la hCG del primer trimestre del sujeto número 6 ya que su curva dosis-respuesta no fue paralela con el estándar.

En las figuras 18 y 19 se presentan ejemplos de las curvas dosis-respuesta generadas por el estándar (CR-121) y la hCG de los tres trimestres en el bioensayo y el radioinmunoensayo. Se encontró que estas curvas dosis-respuesta no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de sus pendientes y por lo tanto fueron paralelas entre sí.

En los parámetros logísticos dosis efectiva al 50% (DE_{50}) y respuesta máxima, se observó una tendencia hacia el aumento de la DE_{50} conforme progresa el embarazo, sin cambios concomitantes en la capacidad de respuesta máxima (Tabla 3). En relación a la potencia biológica relativa de la hCG en muestras obtenidas durante los diferentes periodos gestacionales, se detectó una potencia significativamente mayor ($p < 0.05$) en el primer trimestre respecto al segundo y tercer trimestres, siendo el promedio de 1.144 ± 0.14 , 0.872 ± 0.22 y 0.796 ± 0.12 para el primero, segundo y tercer trimestres respectivamente (Tabla 4). No se encontraron diferencias significativas entre las potencias biológicas de la hCG en muestras correspondientes a picos y valles del primer trimestre (1.08 ± 0.29 vs 1.28 ± 0.33 ;

CURVAS DOSIS-RESPUESTA

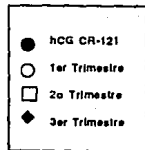
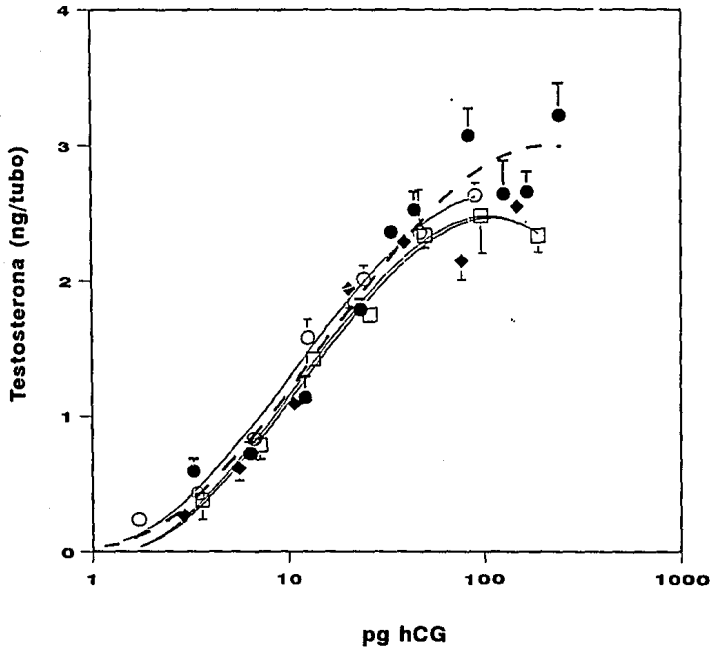


FIGURA 18.

Curvas dosis-respuesta representativas (sujeto 2) de la producción de testosterona durante la estimulación de células de Leydig de ratón con hCG de los diferentes trimestres y el estándar.

COMPARACION DE CURVAS
hCG CR-121 y diferentes trimestres

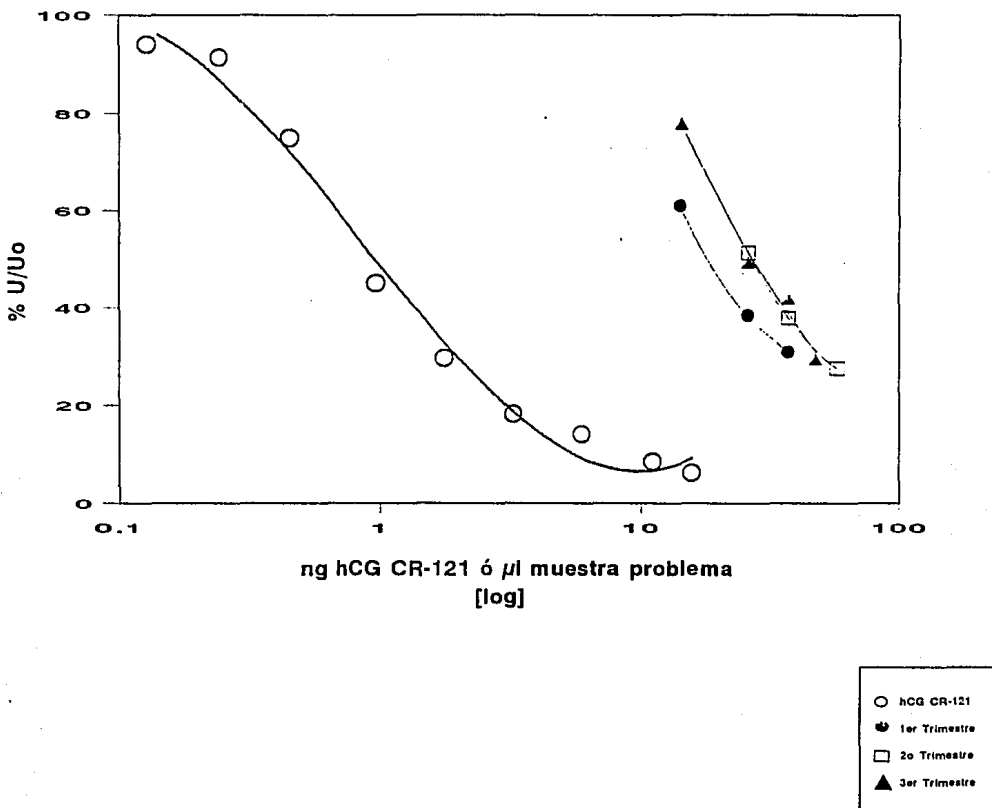


FIGURA 19.

Comparación entre la curva estándar (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 de los tres trimestres.

TABLA 3

VALORES DE DE₅₀ Y RESPUESTA BIOLÓGICA MÁXIMA DE hCG EN LOS DIFERENTES TRIMESTRES DE LA GESTACIÓN

TRIMESTRE	DE ₅₀ (ng hCG/tubo)			RESPUESTA MÁXIMA (ng T/tubo)		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
SUJETO						
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 al 50%
T = Testosterona

TABLA 4

**POTENCIAS RELATIVAS* DE hCG EN LOS
DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO**

SUJETO	PRIMER TRIMESTRE	SEGUNDO TRIMESTRE	TERCER TRIMESTRE
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 \pm 0.22	0.796 \pm 0.12

* Potencia relativa = $DE_{10} \text{ hCG CR-121} / DE_{10} \text{ muestra problema}$

** $p < 0.05$ primer trimestre vs segundo y tercero

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

p = N.S.)

C. CAMBIOS EN LA HETEROGENEIDAD POR CARGA DE LA hCG DURANTE EL EMBARAZO.

En las Figuras 20 a 27 se muestran los patrones de distribución por cromatoenfoco de la hCG presente en suero durante las diferentes semanas gestacionales estudiadas. Como puede observarse en las figuras se detectó inmunoreactividad de la hCG a lo largo de casi todo el gradiente de pH analizado así como en el pico de sal. En todas las muestras estudiadas fue posible detectar la presencia de diferentes isoformas de la hormona, con un claro predominio en abundancia relativa de aquellas detectadas en valores de $\text{pH} \leq 5.49$; de hecho, entre el 46% y el 81% del total de la hCG recuperada correspondió a la forma más ácida (pico de sal).

La tabla 5 muestra el porcentaje de hCG recuperado en cada región de pH. El porcentaje recuperado de la región I (pH de >7 a 6.5) no mostró diferencias significativas al compararse entre la 8.0-8.8, 10.2-13.0, 21.2-24.5 y 33.7-36.5 semanas de embarazo. La recuperación de hCG en la región II (pH de 6.49 a 5.5) así como de la región III (pH de 5.49 a 4.5) fue significativamente menor ($p < 0.05$) en la 8.0-8.8 semana respecto a la 10.2-13.0, 21.2-24.5 y 33.7-36.5 semanas. Por otro lado, la recuperación de hCG de la región III fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en la 33.7-36.5 semanas respecto a la 8.0-8.8, 10.3-13.0 y 21.2-24.5 semanas. No se encontraron diferencias significativas entre periodos gestacionales al compararse las recuperaciones de hCG en la región IV (pH de 4.49 a 3.5), en tanto que en la región V (pico de sal) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en la 8.0-8.0 semanas y menor en la 33.7-36.5 semanas (Figura 28).

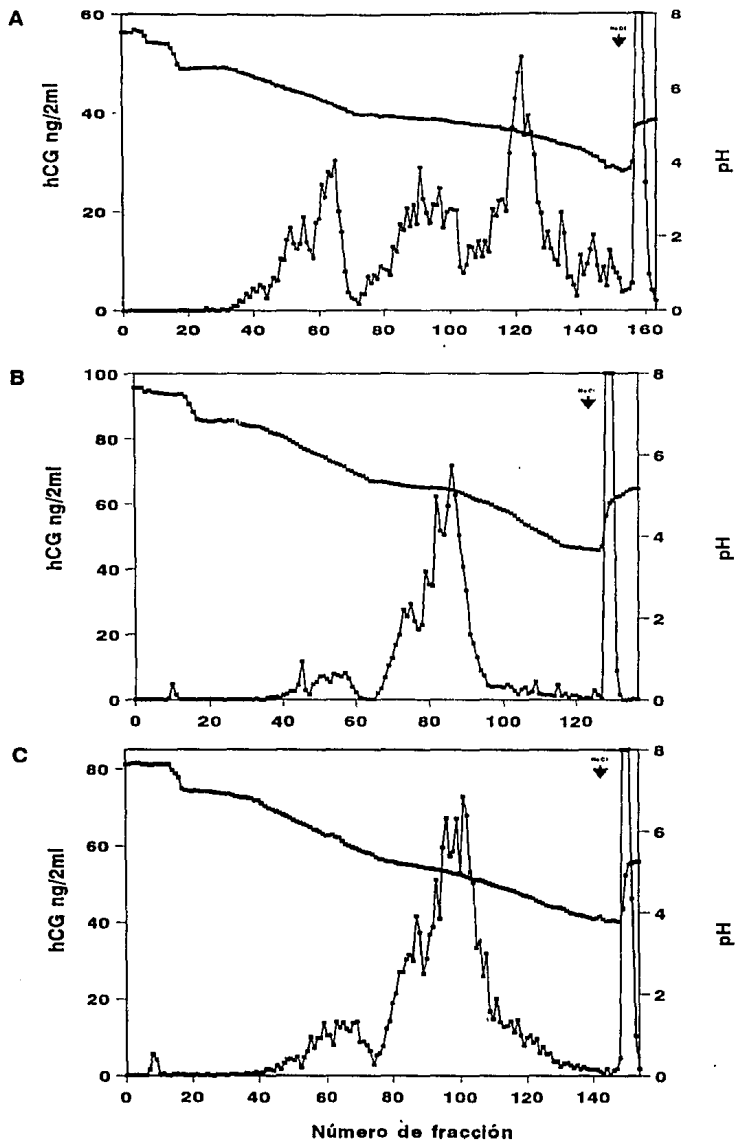


FIGURA 20. Patrón de elución de hCG después del cromatograma de las muestras del SUJETO 1 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre del embarazo.

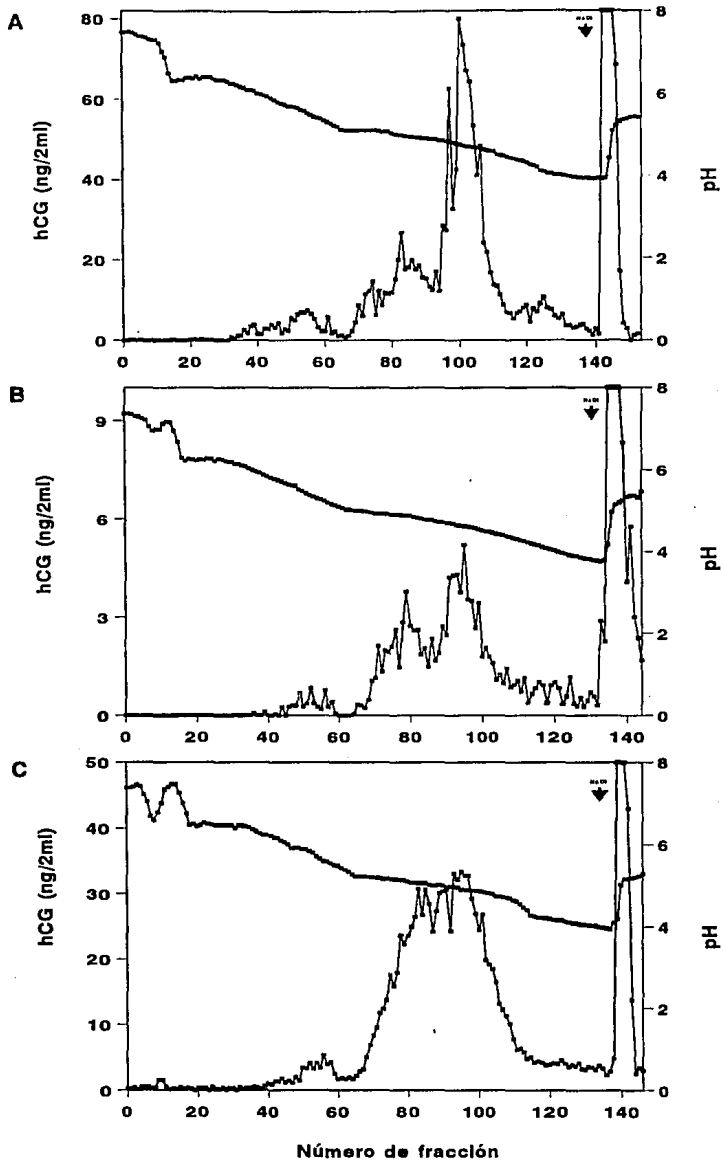


FIGURA 21. Patrón de elución de hCG después del cromatofoco de las muestras del SUJETO 2 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre del embarazo.

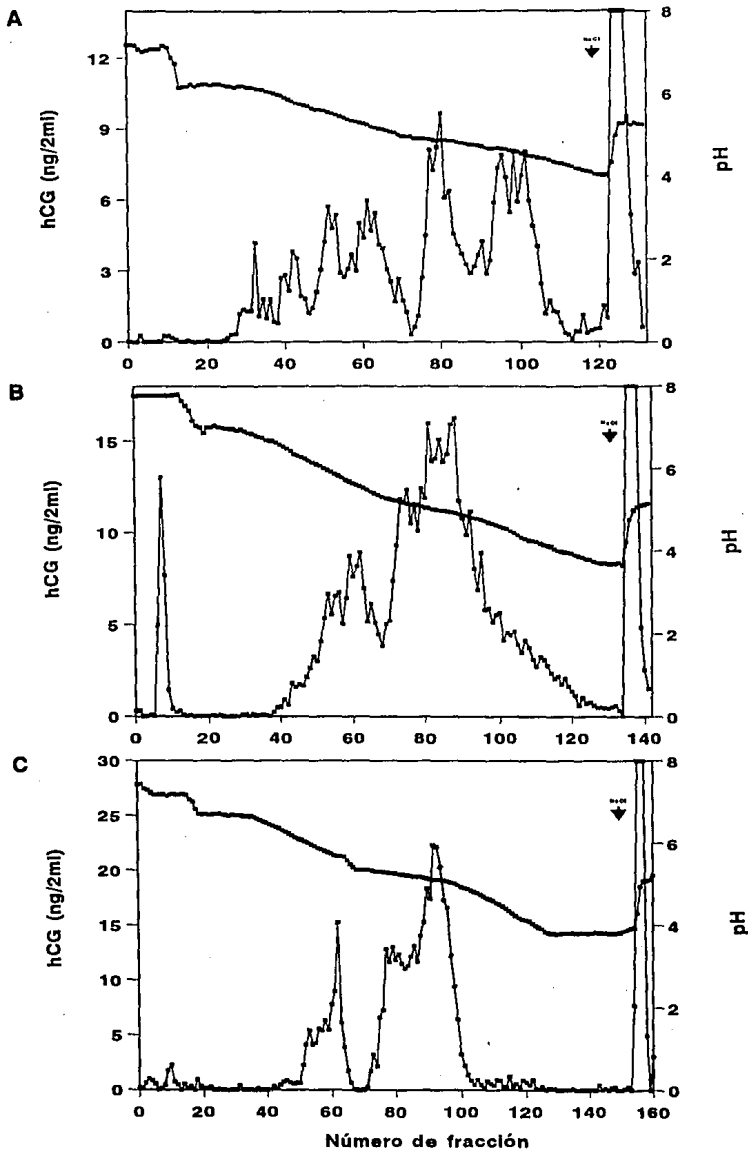


FIGURA 22. Patrón de elución de hCG después del cromatofluore de las muestras del SUJETO 3 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre del embarazo.

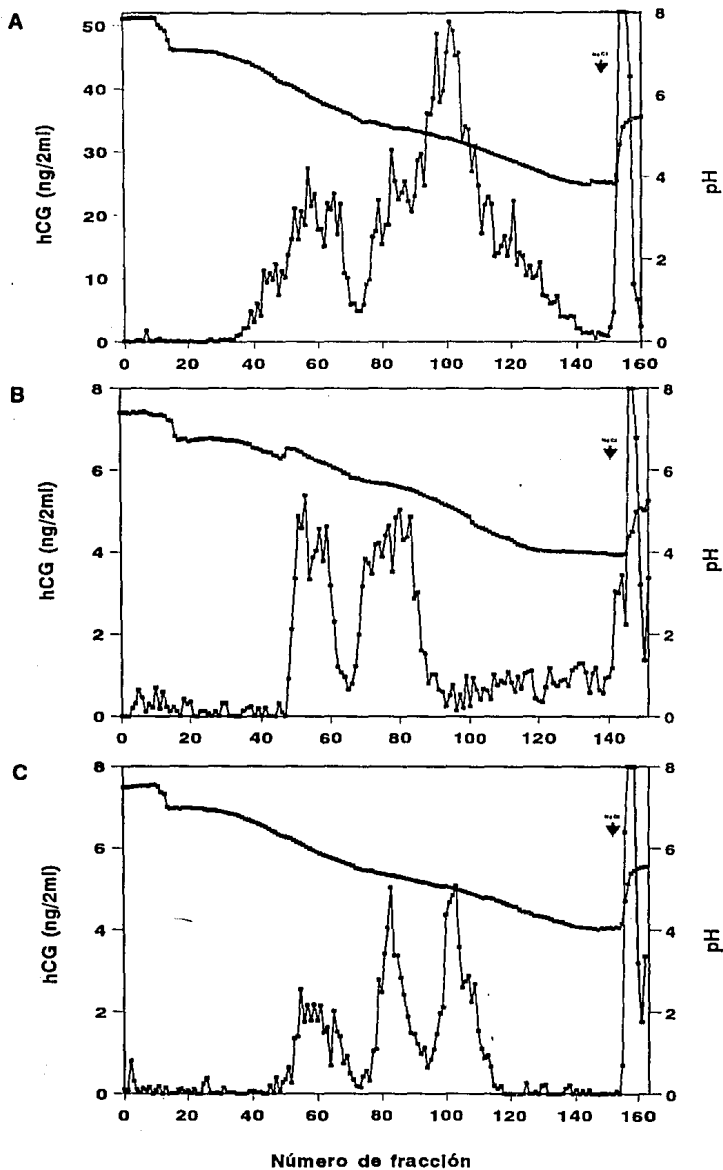


FIGURA 23. Patrón de elución de hCG después del cromatofoco de las muestras del SUJETO 4 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre del embarazo.

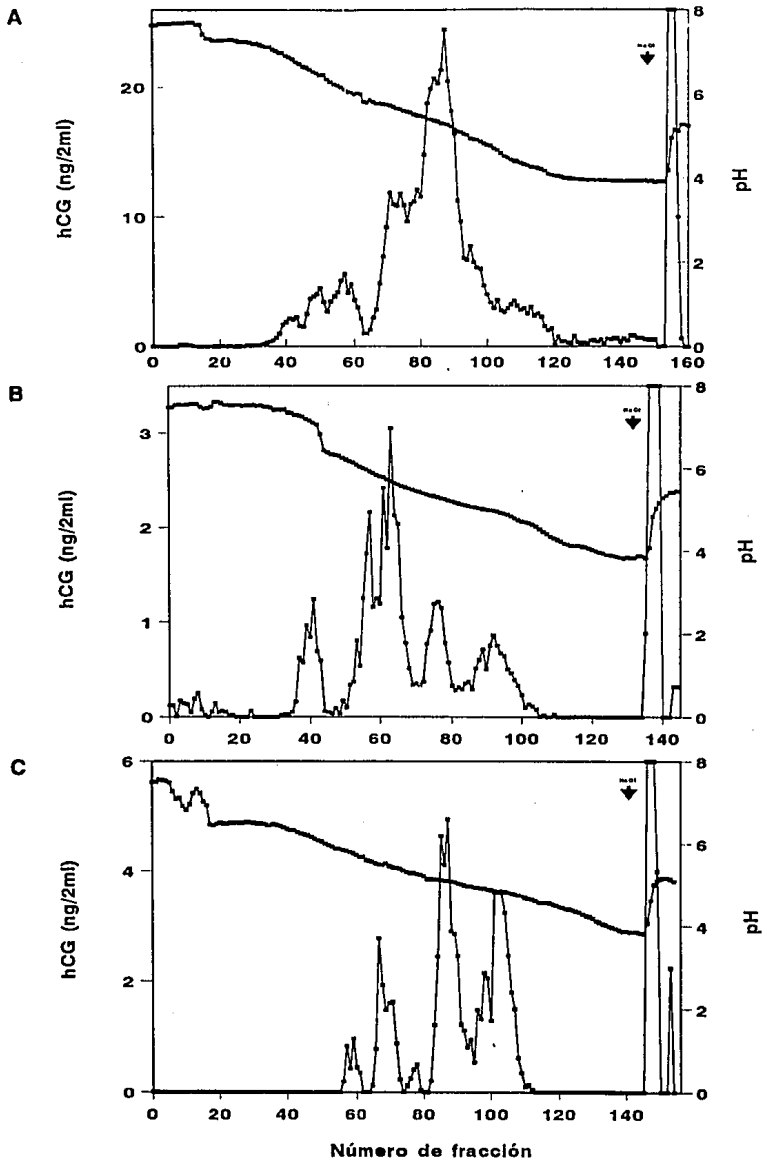


FIGURA 24. Patrón de elución de hCG después del cromatofoco de las muestras del SUJETO 5 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre del embarazo.

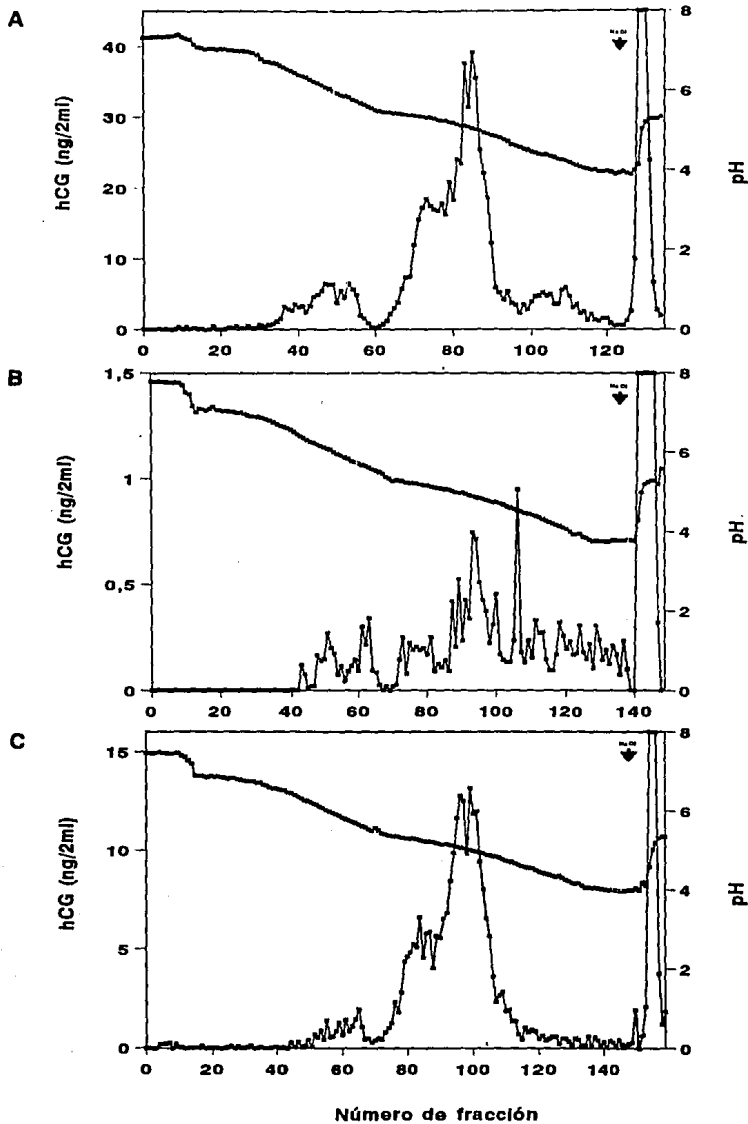


FIGURA 25. Patrón de elución de hCG después del cromatofoco de las muestras del SUJETO 6 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre del embarazo.

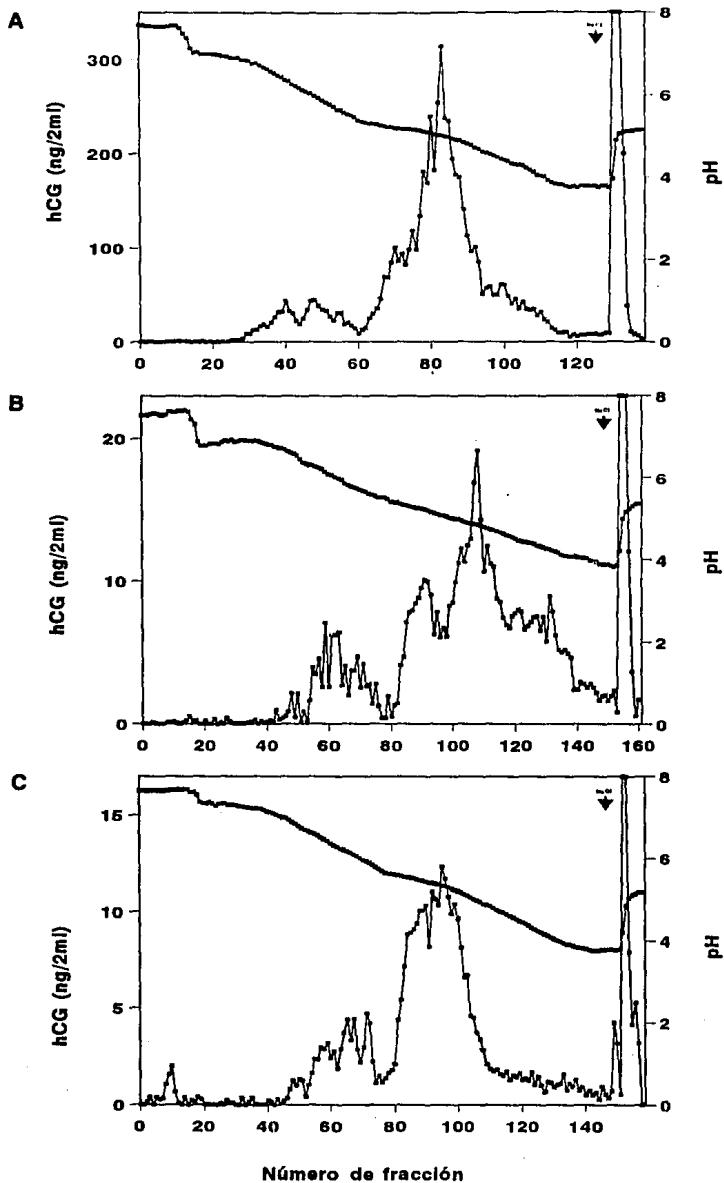


FIGURA 26. Patrón de elución de hCG después del cromatofoco de las muestras del SUJETO 7 durante (A) primer trimestre (B) segundo trimestre y (C) tercer trimestre del embarazo.

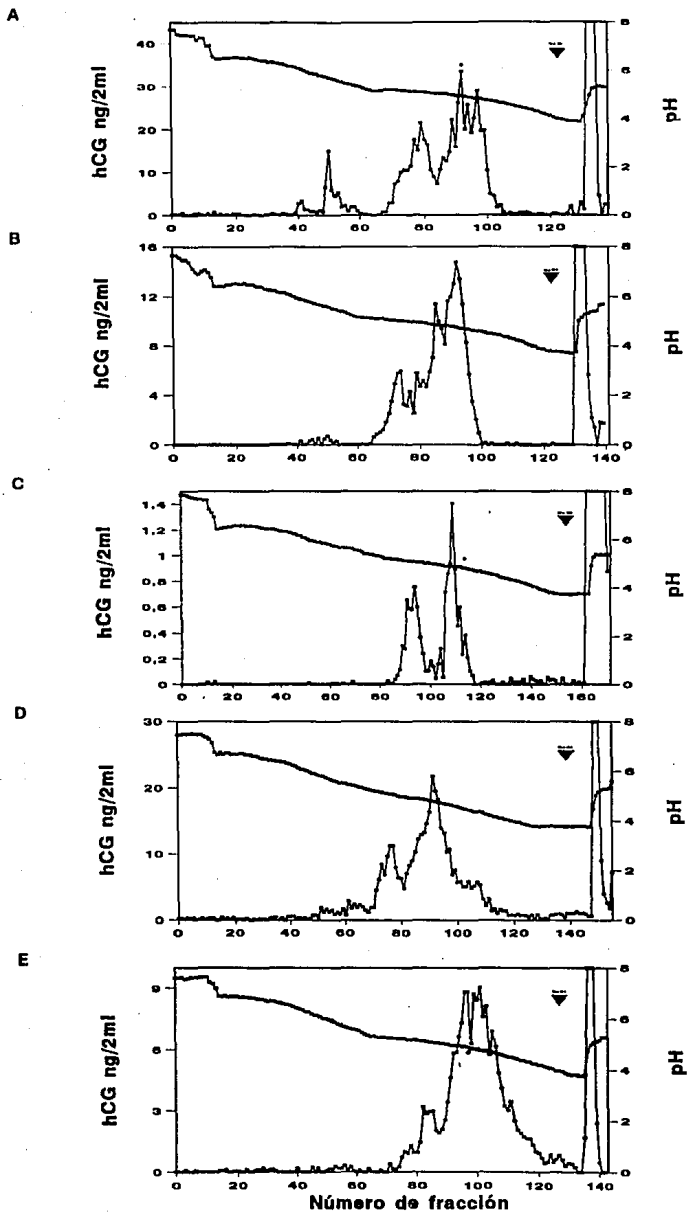


FIGURA 27. Patrones de elución de hCG después de los cromatofocos de las muestras de los sujetos 8 a 12 (figuras 27A a 27E) durante la octava semana del embarazo.

TABLA 5

PORCENTAJE DE hCG RECUPERADO EN CADA UNA DE LAS REGIONES DE pH DEL CROMATOENFOQUE ($\bar{X} \pm DE$)

AREA DE pH	Semanas de gestación			
	8,0-8,8	10,2-13,0	21,2-24,5	33,7-36,5
Región I (>7 - 6,5)	0.14 ± 0.10	1.07 ± 0.92	1.68 ± 1.52	1.34 ± 1.64
Región II (6,49 - 5,5)	0.83 ± 0.92*	7.05 ± 2.91	10.37 ± 11.34	8.87 ± 5.87
Región III (5,49 - 4,5)	16.28 ± 8.13*	29.86 ± 6.80	20.88 ± 11.11	39.28 ± 12.86**
Región IV (4,49 - 3,5)	1.64 ± 1.79	4.09 ± 1.69	6.83 ± 5.02	3.69 ± 2.56
Región V (Sal)	81.07 ± 9.91*	57.92 ± 2.71	60.19 ± 5.17	46.75 ± 6.01**

* p<0.05 8,0-8,8 semanas vs 10,2-13,0, 21,2-24,5 y 33,7-36,5 semanas
 ** p<0.05 33,7-36,5 semanas vs 8,0-8,8, 10,2-13,0 y 21,2-24,5 semanas

PORCENTAJE hCG RECUPERADO POR CROMATOENFOQUE

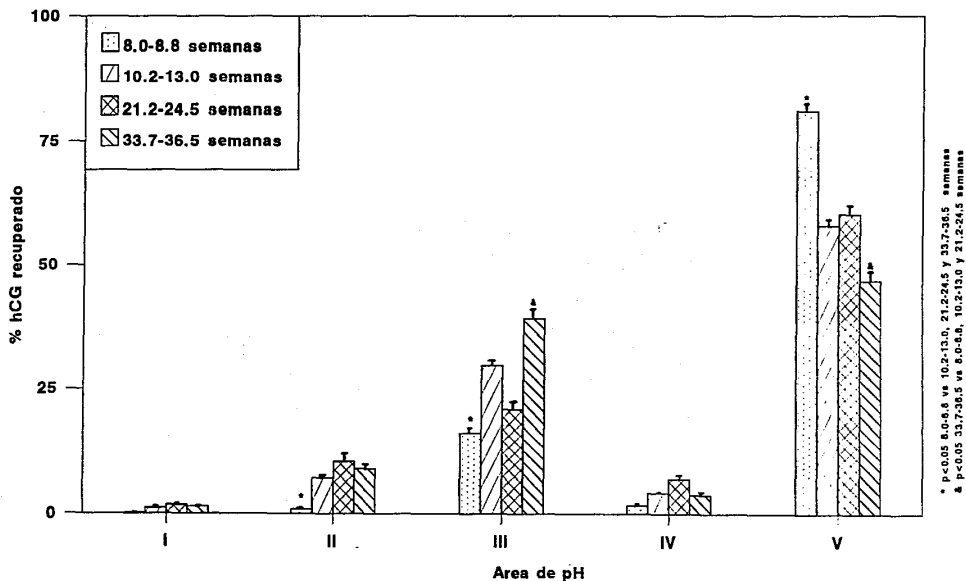


FIGURA 28.
Porcentajes de isoformas de hCG. Región I (pH>7-6.5), Región II (pH=6.49-5.5),
Región III (pH=5.49-4.5), Región IV (pH=4.49-3.5) y Región V (Sal)

VI. DISCUSION

Es bien conocido que el modo episódico de secreción de señales extracelulares hacia las células blanco, es más eficiente en términos de unión específica a la membrana y transmisión y procesamiento de la señal, que el modo continuo de liberación (69-71). La intensidad de la respuesta de la célula blanco y la activación diferencial de los distintos procesos celulares inducidos por un estímulo único, pueden ser modulados de una manera fina cambiando únicamente la frecuencia y/o amplitud del estímulo (72,73). En adición a este mecanismo regulatorio, la célula exportadora es también capaz de modular la vida media circulante y la intensidad del estímulo de la señal, introduciendo diferentes cambios en la estructura de su molécula (74,75).

En la presente tesis, se demostró que las concentraciones inmunoreactivas de la hCG presente al final del primero, segundo y tercer trimestres de la gestación, fluctúan durante un período de 24 horas y que tal variabilidad en estas concentraciones puede ser resuelta en patrones de pulsos, ampliando estudios previos realizados durante el embarazo temprano (55,76,77). Aunque esta variabilidad podría ser atribuida a cambios en la secreción episódica y/o volumen de distribución de la hormona, en este estudio se detectaron disminuciones significativas postprandiales en las concentraciones de hCG en suero únicamente en las muestras de las semanas 10.2-13.0 de gestación obtenidas inmediatamente después de la merienda. Así mismo, este descenso en las concentraciones de hCG al inicio de la noche no fue suficiente para inducir diferencias día-noche significativas en la frecuencia y características de los pulsos de hCG identificados durante estos períodos. Por lo tanto, ambos hallazgos sugieren que la variabilidad observada en los patrones de la hCG circulante durante 24 horas, fueron debidos a la presencia de un modo episódico de secreción placentaria de la hCG. El que

la hCG es secretada *in vivo* por la placenta en pulsos episódicos es apoyado por estudios *in vitro* que demostraron que explantes placentarios perfundidos y provenientes de embarazos tempranos y tardíos, secretaron hCG de una forma pulsátil (49,54). Adicionalmente, en estos últimos estudios se observó un efecto inhibitor de la P en la concentración total y amplitud de los pulsos de la hCG (54).

Los tres periodos gestacionales analizados mostraron una variabilidad significativa en las concentraciones de la hCG circulante. Aún cuando la frecuencia de los pulsos de la hCG circulante fue similar en estos 3 periodos gestacionales estudiados, la amplitud y área de sus picos se detectaron significativamente reducidos a las 21.2-24.5 y 33.7-36.5 semanas de la gestación en comparación con aquellos encontrados en semanas más tempranas, observación que correlacionó con la disminución encontrada en las concentraciones integradas de 24 horas de la hormona durante las gestaciones media y tardía. La reducción significativa en las concentraciones integradas de 24 horas de la hCG así como en la amplitud y área de sus pulsos al término del 2o. y 3er. trimestres, podrían ser secundarios a alteraciones en la síntesis y secreción total de la hCG, presencia de hendiduras en la molécula (78,79) (lo cual facilita su disociación rápida en subunidades α y β libres (48)), volumen intravascular aumentado (80) o a una combinación de todos estos factores. Las observaciones en condiciones *in vitro* e *in vivo* de que la producción total de hCG y de los ARN mensajeros de sus subunidades α y β , así como la secreción neta y amplitud de los pulsos de la hormona están marcadamente disminuídos en el tejido placentario del embarazo tardío (54,81-83), de que conforme el embarazo avanza el porcentaje de la hCG hendida se incrementa (48) y finalmente de que las concentraciones integradas de 24 horas y las características episódicas de la hCG circulante fueron similares al final del segundo y tercer trimestres de la gestación [períodos entre los cuales deben esperarse diferencias en volumen intravascular (80)]

(presente estudio), sugieren fuertemente que las disminuciones tan marcadas en las concentraciones integradas de 24 horas de la hCG en suero, así como en la amplitud y área de sus pulsos al final de los trimestres 2o. y 3o., fueron debidas principalmente a una combinación de producción y secreción reducidas de hCG e incremento rápido en la desactivación de la hormona [la hCG hendida es más susceptible de desactivación que su análogo intacto (48)].

Informes contradictorios han sugerido funciones opuestas de la progesterona en la regulación de la producción de la hCG *in vitro*. Mientras algunos estudios han encontrado efectos estimuladores de la P en la producción de hCG por explantes placentarios tempranos y tardíos (84), otros han informado una reducción significativa o supresión de la secreción de hCG y de sus concentraciones celulares de los RNA mensajeros para α - y β -hCG (38,54,85). En el presente estudio se detectaron relaciones inversas significativas entre las concentraciones en suero de P y E₂ y el área y amplitud de los picos de la hCG. Estas asociaciones, sin embargo, fueron únicamente aparentes y posiblemente están en relación con el fenómeno bien conocido de que las concentraciones de hCG en el suero materno disminuyen mientras aquéllas de P y E₂ se incrementan a lo largo del embarazo.

Además de las diferencias en características pulsátiles de la hCG circulante durante los diferentes trimestres, en este estudio fue posible detectar disminuciones significativas en la actividad biológica *in vitro* de la hormona circulante en la gestación media y tardía. Esta reducción en potencia biológica *in vitro* de la hCG podría estar reflejando la presencia de modificaciones estructurales en la cadena polipeptídica y/o en los carbohidratos de la glicoproteína. Varias evidencias apoyan esta posibilidad. El porcentaje de la hCG hendida aumenta después del 2o. mes de embarazo y posteriormente en forma continua hasta el término del mismo (48). Este porcentaje varía del 13% en las semanas 12 a 15 del embarazo

al 18% y 21% en las semanas 24 a 27 y 36 a 39 respectivamente (48) y la hCG hendida presenta el 9% de la actividad de unión y el 20% de la capacidad esteroidogénica *in vitro* de la molécula de hCG intacta (75). Por otro lado, el incremento en el porcentaje de hCG hendida durante la gestación media y tardía podría no ser el único factor responsable de la reducción en actividad biológica *in vitro* de la hormona. Es bien conocido que algunas modificaciones en la estructura de los carbohidratos de la molécula de hCG pueden también disminuir la capacidad biológica de la hormona en condiciones *in vitro* (86,87); la desialización de hCG reduce esta bioactividad al 25-46% de la actividad original (88,89). Si las diferencias entre los puntos isoeléctricos de la hCG circulante durante las diferentes edades gestacionales, particularmente entre las semanas 10.2-13.0 y 33.7-36.5 son debidas a la existencia de una pérdida parcial de residuos de ácido siálico en las moléculas de hCG de la gestación tardía (74), la reducción en el contenido de este residuo en la hCG presente durante este período podría ser también un factor adicional que estuviera contribuyendo en la atenuación observada de su potencia biológica.

El hallazgo de que los cambios en la distribución por carga de la hCG circulante se inician al final del primer trimestre del embarazo es compatible con los resultados de un estudio reciente informado por Wide y cols. (90) en el cual se detectó que los cambios en la movilidad electroforética y carga media de la molécula de la hCG circulante se inician alrededor de la decimotercera semana de embarazo. En ambos estudios las moléculas de hCG secretadas al término del primer trimestre estuvieron cargadas menos negativamente que aquellas correspondientes a períodos gestacionales más tempranos. Más aún, en el presente estudio se observó que la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas recuperadas en el área de pH de 5.49-4.5 fue mayor al final del 3er. trimestre que al término del segundo, lo cual indica que entre las semanas 21.2-24.5 y 33.7-36.5 de la gestación ocurren cambios

adicionales en la glicosilación (posiblemente una menor sialización) de la molécula de hCG. Estos cambios estructurales propios del 3er. trimestre no fueron encontrados en el estudio de Wide y cols. (90) posiblemente debido a la menor resolución del sistema empleado por estos autores para la separación de las isoformas.

La observación de que la actividad biológica *in vitro* de la hCG circulante fue similar en muestras provenientes de picos y nadires, está en oposición con algunas que han demostrado que la relación de la actividad biológica/actividad inmunológica de la hormona luteinizante (LH) se incrementa durante la secreción endógena de sus pulsos (91). Aunque este último fenómeno ha sido cuestionado recientemente (92), nuestros hallazgos sugieren que cualquiera que sea el factor generador de los pulsos de hCG, éste no modifica significativamente la distribución de sus isoformas durante el procesamiento de la señal por ser episódicamente secretada.

En conclusión, las concentraciones en suero de la hCG varían significativamente durante un período de 24 horas, lo cual probablemente refleja un modo pulsátil de secreción placentaria. Las características de esta secreción episódica se modifican significativamente durante la gestación y estos cambios se acompañan simultáneamente de alteraciones en la estructura molecular de la gonadotropina. La combinación de estos factores pudiera estar reflejando la existencia de diferentes mecanismos a través de los cuales el trofoblasto regula la cantidad, intensidad y duración del estímulo gonadotrópico.

VII. REFERENCIAS

1. Hertig AT: The placenta: some new knowledge about and lad organ. *Obstet Gynecol.* 20:859, 1962.
2. Ascheim S and Zondek B: Anterior pituitary hormone and ovarian hormone in the urine of pregnant women. *Klin Wochenschr.* 61:1322, 1927.
3. Pierce JG: The subunits of pituitary thyrotropin -their relationships to other glycoprotein hormones. *Endocrinology.* 89:1331, 1971.
4. Swaminathan N, Bahl OP: Dissociation and recombination of the subunits of hCG. *Biochem Biophys Res Commun.* 40:422, 1970.
5. Ross GT: Clinical relevance of research on the structure of hCG. *Am J Obstet Gynecol.* 129:795, 1977.
6. Husa RO: Biosynthesis of hCG. *Endocr Rev.* 1:268, 1980.
7. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A and Coutifaris C: Biosynthesis and secretion of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev.* 4:179, 1983.
8. Yen SSC and Jaffe R: *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management.* W:B: Saunders Co. 2nd ed. U.S.A. 1986.
9. Morgan FJ, Birken S, Canfield RE: The amino acid sequence of COOH-terminal fragments from the beta subunit of hCG. *J Biol Chem.* 252:5386, 1977.
10. Bahl OP, Carlsen RB, Bellisario R, Swaminathan N: hCG: amino acid sequence of the α and β subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 48:416, 1972.
11. Birken S, Canfield RE. Isolation and amino acid sequence of COOH-terminal fragments from the beta subunit of hCG. *J Biol Chem.* 252:5386, 1977.
12. Baenzinger JU, 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.

13. Stollo F, Harlin J, Hernández-Montes H, Robertson DM, Saidi AA and Diczfalusy E: Qualitative and quantitative differences in the isoelectrofocusing profile of biologically active lutropin in the blood of normally menstruating and postmenstruating women. *Acta Endocrinol.* 97:166, 1981.

14. Reader SCJ, Robertson WR and Diczfalusy E: Microheterogeneity of luteinizing hormone in pituitary glands from women of pre- and post-menopausal age. *Clinical Endocrinol.* 19:355, 1983.

15. Wide L: Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinol.* 109:181, 1985.

16. Snyder PJ, Hildegard M, Bashey M, Montecinos A, Odell WD and Spitalnik L: Secretion of multiple forms of human luteinizing hormone cultured fetal human pituitary cell. *J Clin Endocrinol Metab.* 68:1033, 1989.

17. Van Hall EV, Vaitukaitis JL and Ross GT: Immunological and biological activity of hCG following progressive desialylation. *Endocrinology.* 88:456, 1971.

18. Graesslin D, Leidenberg FA, Lichtenberg V et al: Existence of big and little forms of luteinizing hormone in human serum. *Acta Endocrinol.* 83:466, 1976.

19. Robertson DM, Van Damme MP, Diczfalusy R: Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone. I. Biological profile in pituitary and plasma samples after electrofocusing. *Mol Cell Endocrinol.* 9:45, 1977.

20. Nwokoro N, Chen H, Chrambach S: Physical, biological and immunological characterization of highly purified urinary human chorionic gonadotropin components separated by gel electrofocusing. *Endocrinology.* 108:291, 1981.

21. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P and Chappel SC: Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. Human Reproduction. 3:491, 1988.
22. Wide L: Male and female forms of human follicle stimulating hormone in serum. J Clin Endocrinol Metab. 55:682, 1982.
23. Ulloa-Aguirre A, Mejía JJ, Dominguez R, Guevara-Aguirre J, Díaz Sánchez V and Larrea F: Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in male rat: isoelectric focusing throughout sexual maturation. J Endocrinol. 110:539, 1986.
24. Smith PL, Bousfield GR, Kumar S, Fiets D and Baenzinger JU: Equine Lutropin and CG bear oligosaccharides terminating with SO₄-4-GalNAc and Sia₂,3Gal, respectively. J Biol Chem. 268:795, 1993.
25. Petraglia F, Volpe A, Genazzani AR, Rivier J, Sawchenko PE and Vale W: Neuroendocrinology of the human placenta. Frontiers in Neuroendocrinology. 11(1):6, 1990.
26. Licht P, Hartbarth P, Merz WE: Evidence for modulation of human chorionic gonadotropin (hCG) subunit messenger ribonucleic acid levels and hCG secretion by gamma aminobutyric acid (GABA) in human first trimester placenta in vitro. Endocrinology. 130:490-496, 1992.
27. 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.
28. Oberbauer AM, Linkhart TA, Mohan S, Longo LD: Fibroblast growth factor enhances human chorionic gonadotropin synthesis independent of mitogenic stimulation in JAR choriocarcinoma cells. Endocrinology. 123:2996-2700, 1988.
29. Morrish DW, Bhardwaj D, Paras MT: Transforming growth factor β -1 inhibits

placental differentiation and human chorionic gonadotropin and placental lactogen secretion. *Endocrinology*. 129:22-26, 1991.

30. Petraglia F, Vaughan J, Vale W: Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:5114-5117, 1989.

31. Steele GL, Currie D, Yuen BH, Jia X-C, Perlas E, Leung PCK: Acute stimulation of human chorionic gonadotropin secretion by recombinant human activin-A in first trimester human trophoblast. *Endocrinology*. 133:297-303, 1993.

32. Dodeur M, Mensier A, Alsat E, Bellet D, Bidart JM, Evain-Brion D: Effect of parathyroid hormone on cAMP production and endocrine function of trophoblast cells from first trimester placenta. *Reprod Nutr Dev*. 31:275-285, 1991.

33. Olike N, Iwashita M, Muraki T, Nomoto T, Takeda Y, Sakamoto S: Effect of adrenergic agonists on human chorionic gonadotropin release by human trophoblast cells obtained from first trimester placenta. *Horm Metab Res*. 22:188-191, 1990.

34. Saito S, Saito M, Motoyoshi K, Ichijo M: Enhancing effects of human macrophage colony-stimulating factor secretion of human chorionic gonadotropin by human chorionic villous cells and tPA30-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 178:1099-1104, 1991.

35. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, et al: Cachetin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 161:336, 1989.

36. Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Saji F and Tanizawa O: Trophoblast-derived Interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor human trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab*. 71:436, 1990.

37. Barnea ER, Ashkenazy R, Sarne Y: The effect of dynorphin on placental pulsatile

human chorionic gonadotropin secretion in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 73:1093-1098, 1991.

38. Maruo T, Matsuo H, Otani T, Hoshina M, Mochizuki M: Differential modulation of chorionic gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels and hCG secretion by progesterone in normal placental and choriocarcinoma cultured in vitro. *Endocrinology.* 119:855-864, 1986.

39. Ringler GE, Kallen CB, Strauss III JF: Regulation of trophoblast function by glucocorticoids: dexamethanose promotes increased secretion of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 124:1625-1631, 1989.

40. Kato Y, Braunstein GD: Retinoic acid stimulates placental hormone secretion by choriocarcinoma cells lines in vitro. *Endocrinology.* 128:401-407, 1991.

41. Yuen BH, Moon YS, Shin DH: Inhibition of human chorionic gonadotropin production by prolactin from term human trophoblast. *Am J Obstet Gynecol.* 154:336-340, 1986.

42. Deutsch PJ, Sun Y, Kroog GS: Vasoactive intestinal peptide increases intracellular cAMP and gonadotropin gene activity in Jeg-3 syncytial trophoblasts. *J Biol Chem.* 265:10274-10282, 1990.

43. Ren SG, Braunstein GD: Insulin stimulates synthesis and release of human chorionic gonadotropin by choriocarcinoma cell lines. *Endocrinology.* 128:1623-1629, 1991.

44. Palade G: Intracellular aspects of the process of protein syntesis. *Science.* 189:347, 1975.

45. Hoermann R, Spottl G, Moncayo R, and Mann K: Evidence for the presence of human corionic gonadotropin (hCG) and free β -subunit of hCG in the human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab.* 71:179, 1990.

46. Devlin MT: Textbook of biochemistry with clinical correlations. Tercera edición. 1993.
47. 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.
48. Cole AL, Kardana A, Park SY and Braunstein GD: The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Metab.* 76(3):704, 1993.
49. Barnea ER, Kaplan M: Spontaneous, gonadotropin releasing-hormone induced and progesterone-inhibit pulsatile secretion of human chorionic gonadotropin in the first trimester placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 69:215, 1989.
50. Licht P, Cao H, Lei ZM, Rao ChV and Merz WE: Novel Self-Regulation of Human Chorionic Gonadotropin Biosynthesis in Term Pregnancy Human Placenta. *Endocrinology.* 133:3014, 1993.
51. Migdley Jr AR, Jaffe RB: Regulation of hormone gonadotropins: X, episodic fluctuation of LH during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 44:520, 1977.
52. 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, 1983.
53. Santen RJ, Bardin CW: Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis clinical interpretation, physiological mechanisms. *J Clin Invest.* 52:2617, 1973.
54. 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 Endocrinol (Copenh).* 124:331, 1991.
55. Nakajima ST, McAuliffe T, Gibson M: The 24 hours pattern of levels of serum

progesterone and immunoreactive human chorionic gonadotropin in normal early pregnancy.

J Clin Endocrinol Metab. 71:345, 1990.

56. Urban RJ, Evans WS, Rogol AD, Kaiser DL, Jonhson ML and Veldhuis JD: Contemporary aspects of discrete peak-detection algorithms. I. The paradigm of the luteinizing hormone pulse signal in men. Endocrin Rev. 9:3, 1988.

57. Veldhuis JD, Jonhson ML: Cluster analysis: a simple versatil and robust algorithm for endocrine pulse detection. Am J Physiol. 250:E486, 1986.

58. Mendelson C, Dufau ML and 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.

59. Randola BJ, Graesslin D, Sluyterman LA and Wijdenes J: Cromatofocusing: isoelectric focusing on ion exchangers in the absence of an externally applied potential. Proc Int Symp Electrofocusing and Isotachophoresis. 463, 1977.

60. Sluyterman LA, Elgersma O: Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion exchange columns. I. General principles. J Chromatogr. 150:17, 1978.

61. Sluyterman LA, Wijdenes: Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion exchange columns. II. Experimental verification. J Chromatogr. 150:31, 1978.

62. Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL: World Health Organization Special Programme of Research, Development and Research of Training in Human Reproduction. Programme for the provition of matched reagents for radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology. Method Manual, Tenth Edition, WHO, Geneva Switzerland, 1986.

63. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of ¹³¹I-labeled human growth of high specific radioactivity. Biochem J. 89:114, 1963.

64. Van Damme MP, Robertson DM and Diczfalusy E: An improved in vitro bioassay

method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse leydig cell preparations. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 77:655, 1974.

65. Jones LR, Benker G, Salacinski PR, Lloyd TJ and Lowry PJ: Large-scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. *J Endocrinol*. 82:77, 1979.

66. Ulloa-Aguirre A, Damián-Matsumura P, Espinoza R, Dominguez R, Morales L and Flores A: Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol*. 26:323, 1990.

67. Veldhuis JD, Johnson ML: A novel general biophysical model for stimulating episodic endocrine gland signaling. *Am J Physiol*. 254:749, 1988.

68. 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.

69. Belchetz P, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E: Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin releasing hormone. *Science*. 202:631-633, 1978.

70. Isgaard J, Carlsson L, Isaksson OG, Jansson JO: Pulsatile intravenous growth hormone (GH) infusion to hypophysectomized rats increases insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in skeletal tissues more effectively than continuous GH infusion. *Endocrinology*. 123:2605-2610, 1988.

71. Naor Z: Signal transduction mechanisms of Ca^{2+} mobilizing hormones: the case of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrin Rev*. 11:326-353, 1990.

72. Knobil E: The neuroendocrine control of menstrual cycle. *Rec Prog Horm Res*. 36:53-88, 1980.

73. Schöfl C, Sánchez-Bueno A, Brabant G, Cobbold PH, Cuthbertson KSR: Frequency and amplitude enhancement of calcium transients by cyclic AMP in hepatocytes. *Biochem J.* 273:799-802, 1991.

74. Wide L, Hobson B: Some qualitative differences of hCG in serum from early and late pregnancies and trophoblastic diseases. *Acta Endocrinol (Copenh).* 116:465, 1987.

75. Cole LA, Kardana A, Andrade-Gordon P, Gawinowics MA, Morris JC, Bergert ER, O'Connor J, Birken S: The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). III> The occurrence and biological and immunological activities of nicked hCG. *Endocrinology.* 129:1559-1567, 1991.

76. Owens OM, Ryan KJ, Tuchinsky D: Episodic secretion of human chorionic gonadotropin in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 53:1307, 1981.

77. Ayala AR, Bustos H, Antunez O, González E: Episodic secretion of human chorionic gonadotropin. *Arch Invest Med. (Méx).* 15:147, 1984.

78. Puisieux A, Bellet D, Troalen F, Razafindratsita A, Lhomme C, Bohuon C, Bidart JM: Occurrence of fragmentation of free and combined forms of the β -subunit of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 126:687-694, 1990.

79. Sakakibara R, Miyasaki S, Ishiguro M: A nicked β -subunit of human chorionic gonadotropin purified from pregnancy urine. *J Biochem.* 107:858-862, 1990.

80. Chesley LC: Plasma and red cell volumes during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 112:440-450, 1972.

81. Reuter AM, Gaspard UJ, Deville JL, Vrindts-Gevaert Y, Franchimont P. Serum concentrations of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunit. I. During singleton and twin pregnancies. *Clin Endocrinol.* 13:305, 1980.

82. Mochizuki M: Biology of trophoblast and placenta protein hormones. En: Mochizuki

M, Husa R. Eds. Placenta protein hormones, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 3, 1988.

83. Boime I. Human placental hormone production is linked to the stage of trophoblast differentiation. *Trophobl Res.* 5:57, 1991.

84. Ahmed NA, Murphy BEP: The effects of various hormones on human chorionic gonadotropin production in early and late placental explants cultures. *Am J Obstet Gynecol.* 159:1220-1227, 1988.

85. Wilson EA, Jawad MJ, Powell DE: Effect of estradiol and progesterone on human chorionic gonadotropin secretion in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 149:143-148, 1984.

86. Moyle RW, Bahl OP and Mars L: Role of the carbohydrate of human chorionic gonadotropin in the mechanism of hormone action. *J Biol Chem.* 250:9163, 1975.

87. Channing CP, Sakai CN, Bahl OP: Role of the carbohydrate residues of human chorionic gonadotropin in binding and stimulating of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation by porcine granulosa cells. *Endocrinology.* 103:341, 1978.

88. Dufau ML, Catt KJ, Tsuruhara T: Retention of in vitro biological activities by desialylated human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun.* 44:1022, 1971.

89. Tsuruhara T, Dufau ML, Hickman J, Catt KJ: Biological properties of hCG after removal of terminal sialic acid and galactose residues. *Endocrinology.* 91:296, 1972.

90. Wide L, Lee JY, Rasmussen C: A change in the isoforms of human chorionic gonadotropin occurs around the 13th week of gestation. *J Clin Endoc Metab.* 78:1419-1423, 1994.

91. Veldhuis JD, Urban RJ, Beitinz IZ, Blizzard RM, Johnson ML, Dufau ML: Pathophysiological features of pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in

man. *J Steroid Biochem.* 33:739-749, 1989.

92. Huhtaniemi I, Ding YQ, Tähtelä R, Välimäki M: The bio/immuno ratio of plasma luteinizing hormone does not change during the endogenous secretion pulse: reanalysis of the concept using improved immunometric techniques. *J Clin Endoc Metab.* 75:1442-1445, 1991.