

11282
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

**CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LAS DIFERENTES FORMAS
MOLECULARES DE LA HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA
HUMANA (hCG) EN LOS DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO**

TESIS DE POSGRADO

Que para Obtener el Título de
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

Presenta:

M. en C. LAURA ELENA DIAZ CUETO

México, D.F.

Marzo de 1998.

259761

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES FORMAS
MOLECULARES DE LA HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA
HUMANA (hCG) EN LOS DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO.**

ALUMNA : M.C. Laura Elena Díaz Cueto

TUTOR : Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre

COTUTOR : Dr. Juan Pablo Méndez

TITULO DE LA TESIS :

CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LAS DIFERENTES FORMAS MOLECULARES DE LA HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (hCG) EN LOS DIFERENTES TRIMESTRES DEL EMBARAZO:

RESUMEN :

En la presente tesis nosotros analizamos y caracterizamos las diferentes isoformas de la Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) en suero durante el embarazo normal. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de 12 mujeres embarazadas a las 10-11, 12-15, 23-26 y 35-38 semanas de gestación. Las isoformas de hCG presentes en el suero fueron separadas en base a su carga por medio del cromatofoco. Una vez identificadas las isoformas, éstas fueron cuantificadas por radioinmunoanálisis. La actividad biológica in-vitro y la vida media plasmática de las diferentes isoformas de la hCG circulante fueron determinadas por métodos convencionales. Nuestros resultados demostraron que el patrón de distribución por carga de la hCG circulante cambia a través del embarazo. Durante las semanas 10-11 de gestación el porcentaje de recuperación en las isoformas más ácidas de la hCG ($\text{pH} < 3.7$) fue más del 80% del total recuperado después del cromatofoco, este porcentaje fue disminuyendo progresivamente y en forma significativa ($p < 0.05$) a 58, 60 y 47% durante las semanas 12-15, 23-26 y 35-38 de gestación respectivamente. Por otro lado, las proporciones relativas de las isoformas poco ácidas recuperadas dentro de un valor de pH de 6.49 a 4.50 fueron casi no detectables en las semanas 10-11, incrementándose al final del primer trimestre (12-15 semanas) en aproximadamente 10 y 5% respectivamente y permaneciendo sin cambios durante las semanas 23-26 y posteriormente se observó un incremento hacia el final del tercer trimestre. La actividad biológica in-vitro de las isoformas poco ácidas fue mayor que las isoformas más ácidas. En el primer trimestre del embarazo la vida media de las isoformas más ácidas ($\text{pH} < 3.7$) fue de 116.3 ± 23.0 min, mientras que la vida media plasmática de las isoformas intermedias ($\text{pH} = 4.25$ a 5.31) y menos ácidas ($\text{pH} = 5.74$ a 6.50) fue de 75.5 ± 20.6 y 41.2 ± 14.3 min respectivamente. Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.01$) al compararse las isoformas más ácidas vs intermedias y menos ácidas; así como intermedias vs menos ácidas. También se observó una relación inversa ($r = p < 0.001$) entre la media del valor de pH y la vida media plasmática de las isoformas de la hCG circulante. Estos resultados indican que la heterogeneidad de la hCG pudiera representar un adicional y fino mecanismo, a través del cual la placenta regula diferentes funciones en la madre y el feto durante el embarazo. Esto datos también sugieren que la disminución y mantenimiento de las bajas concentraciones de la hCG en suero durante el segundo y tercer trimestres de gestación pueden ser causadas por cambios en la estructura de carbohidratos de la molécula de hCG.

Alumna

M en C Laura Elena Díaz Cueto.

Tutor

Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre

THESIS TITLE :

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN (hCG) ISOFORMS DURING THE DIFFERENT TRIMESTERS OF GESTATION.

SUMMARY :

In the present thesis we analysed the dynamics of serum human chorionic gonadotrophin (hCG) charge isoform distribution throughout normal gestation and characterized some of the biological features of the several hCG glycoforms present in the circulation of pregnant women. Blood samples were obtained from normal pregnant women at 10-11, 12-15, 23-26 y 35-38 weeks of gestation. The sera were fractionated by preparative chromatofocusing and the separate hCG isoforms were identified and quantified by radioimmunoassay. The in-vitro biological activity and the plasma half-life of the several circulating hCG isoforms were determined by conventional methods. hCG isoforms became less acidic as pregnancy advanced. In samples taken at 10-11 weeks of gestation the most acidic hCG molecules (pH<3.7) comprised >80% of total hCG recovered after chromatofocusing; this proportion decreased to 58, 60 and 47% in samples taken from weeks 12.1 to 38.4 of gestation. Meanwhile, the relative proportion of less acidic isoforms recovered within pH values 6.49-4.50 increased at the end of the first trimester (12-15 weeks), remained constant until weeks 23-26 and then increased further by the end of the third trimester. Less acidic isoforms had higher in-vitro biological potency per immunological unit than the more acidic analogues. Regardless of the trimester of pregnancy, the plasma half-life of the highly acidic (elution pH 3.7) isoforms varied from 84.4 to 150 min (116.3 ± 23.0 ; mean \pm SD), whereas the corresponding half-life of mid-acidic (pH 4.25-5.31) and low-acidic (pH 5.74-6.50) hCG isoforms ranged from 31.0 to 115.3 (75.5 ± 20.6) and 15.3 to 58.3 (44.2 ± 14.3) min respectively ($p < 0.01$, highly acidic versus mid- and low-acidic analogues and mid-acidic versus least acidic isoforms). The overall data indicate that the human trophoblast is able to regulate the exact intensity, biochemical composition and duration of the gonadotrophic stimulus secreted during the course of normal gestation. They also suggest that the decrease and maintenance of low serum hCG concentrations during the second and third trimesters of gestation may be partially caused by changes in the carbohydrate structure of the hCG molecule.

Alumna

M en C Laura Elena Díaz Cueto.

Tutor

Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre

DEDICATORIA:

Esta tesis se la dedico especialmente a:

Mi Madre

Mis hermanos y familiares

Por todo su cariño, apoyo y comprensión que me han brindando durante toda mi vida.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES:

Quiero hacer patente mi agradecimiento especialmente al Dr. ALFREDO ULLOA AGUIRRE y al Dr. JUAN PABLO MENDEZ por su asesoría durante esta etapa dentro de mi carrera como investigador, al brindarme sus conocimientos su confianza y apoyo. Así mismo; agradezco al Dr. FERNANDO LARREA GALLO por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios de posgrado y por aceptarme como un miembro más en el Departamento de Biología de la Reproducción a su digno cargo.

También quiero expresar mi gratitud a la Bióloga JORGELINA BARRIOS-DE-TOMASI y al Bioquímico CARLOS TIMOSSI por su colaboración en la realización de este proyecto de investigación, así como a todo el personal médico y paramédico que labora en el Departamento por el apoyo y el afecto que siempre me han brindado.

De una manera especial quiero hacer también patente mi agradecimiento al Dr. JEROME STRAUSS por darme la oportunidad de realizar mi estancia posdoctoral en el Departamento de Ginecología y Obstetricia, División de Biología de Reproducción en la Universidad de Pennsylvania y al Dr. GEORGE GERTON por la asesoría y apoyo que me esta brindando durante este período de mi formación.

INDICE

PAGINA

I. INTRODUCCION.....	1
A.- GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (hCG)	
1.- Generalidades de la hCG	
2.- Síntesis de la hCG	
3.- Mecanismo de secreción de la hCG	
4.- Regulación de la secreción de la hCG	
5.- Concentraciones de la hCG	
6.- Funciones de la hCG	
7.- Metabolismo de la hCG a múltiples formas urinarias	
B.- RELACION - ESTRUCTURA FUNCION DE LA hCG	
1.- La formación de los puentes disulfuro y su importancia en la molécula de hCG	
2.- Regiones esenciales de la hCG para unión a su receptor y su actividad biológica	
3.- Glicosilación y heterogeneidad de la molécula de hCG	
II.- OBJETIVO.....	13
III.- HIPOTESIS.....	13
IV.- MATERIAL Y METODOS.....	14
A.- DISEÑO DEL ESTUDIO	
1.- Criterios de Inclusión	
2.- Criterios de Eliminación	
B.- SUJETOS DE ESTUDIO	
C.- PROTOCOLO DE ESTUDIO	
D.- METODOS	
1.- Extracción de albúmina del suero	
2.- Cromatoenfoco de concentrados séricos	
3.- Concentración de cada poza de hCG	
4.- Radioinmunoanálisis (RIA) de hCG	
5.- Bioensayo de hCG <i>in vitro</i>	
6.- Depuración de las formas moleculares de la hCG en la circulación de la rata	
7.- Valoración de la reproducibilidad de los datos obtenidos en los cromatoenfoques	
8.- Análisis estadístico	
V.- RESULTADOS.....	20
VI.- DISCUSION.....	23
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	27
IX.- APENDICE.....	40
1.- Aminoácidos y su código de una letra.	

INTRODUCCION.

A.- GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (hCG).

1.- Generalidades de la hCG.

La hCG es una proteína producida por el sincitiotrofoblasto placentario, la cual tiene un peso molecular de aproximadamente 36,000 Daltones y pertenece a un grupo de cuatro homologas proteínas glicosiladas comunmente conocidas como hormonas glicoproteicas. Estas glicoproteinas estan compuestas por 2 subunidades, la alfa (α) y la beta (β). Estas dos 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.^{1,2}

La subunidad α de la hCG es común a la de las otras glicoproteinas [hormona luteinizante (LH), hormona folículo-estimulante (FSH) y tirotropina (TSH)]. Dicha subunidad en todas las glicoproteinas consta de 89 a 92 aminoácidos en una misma secuencia, (Figura 1 A) sin embargo existen entre ellas diferencias en el tipo específico de oligosacáridos incorporados a las cadenas glicosídicas de dicho péptido.^{3,4}

Por lo que se refiere a la subunidad β , ésta es diferente en todas las glicoproteinas y es la que le confiere a cada una de ellas su especificidad tanto inmunologica como biológica.^{2,3} Sin embargo existen 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 unica de 30 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal.⁵⁻⁷ (Figura 1 B)

2.- Síntesis de la hCG

La síntesis de hCG inicia en estadios muy tempranos del embarazo. La expresión del RNA mensajero de la subunidad β de hCG ha sido detectado por estudios de hidridización *in situ* en el embrión de ocho células,⁸ para el día siete de gestación el blastocisto empieza a secretar la hCG⁹ y posteriormente grandes cantidades son producidas por la placenta una vez que ha ocurrido la implantación.¹⁰

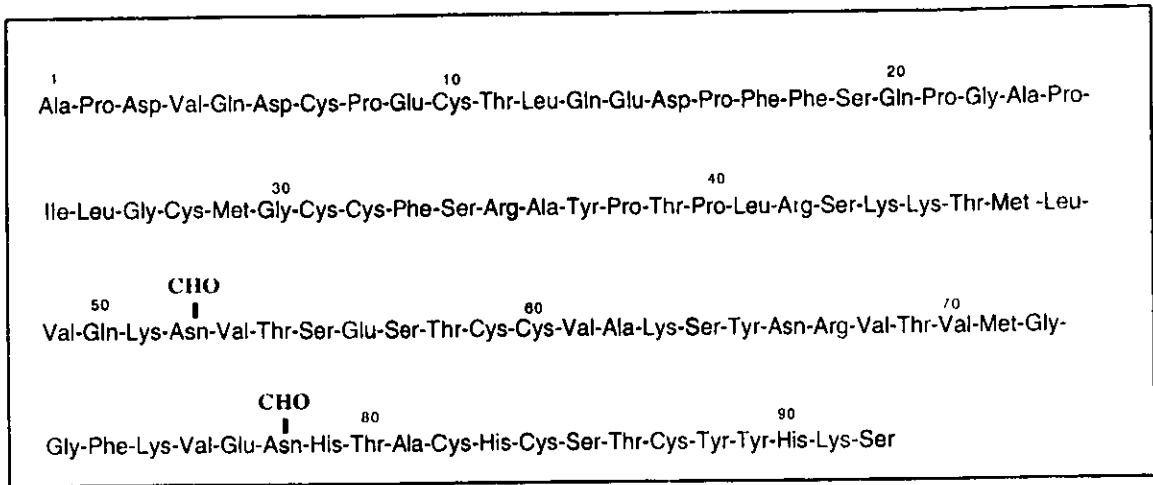
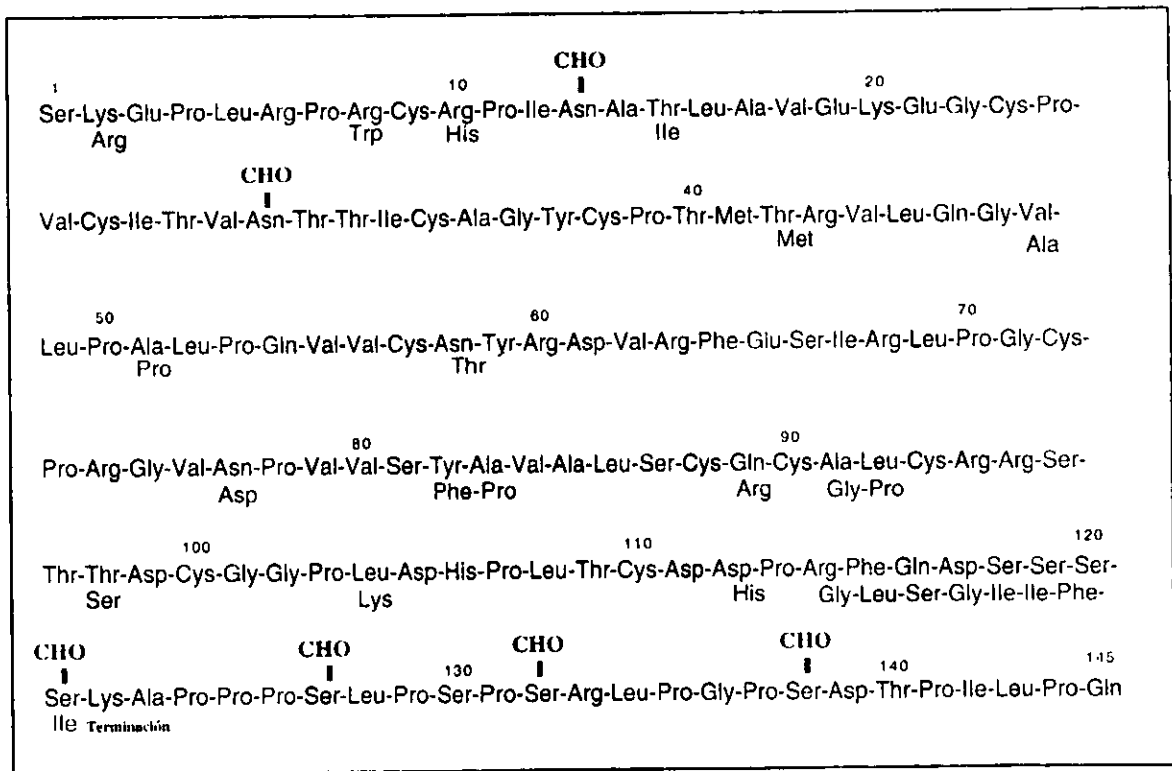
A**B**

Figura 1. Secuencia de aminoácidos en subunidad α (A) y subunidad β (B) de la hormona gonadotropina coriónica humana. En B, abajo de la secuencia se muestran los aminoácidos que cambian en la subunidad β 1.H y se señala su terminación. CHO indica las posiciones de glicosilación.

Las subunidades α y β que conforman la molécula de hCG son sintetizadas independientemente y su producción no está balanceada, este hecho pudiera deberse a que la síntesis de cada subunidad es controlada por varios genes localizados en diferentes cromosomas.^{5-7,11,12} La subunidad α la cual es común a todas las gonadotropinas es codificada por un solo gene localizado en el cromosoma 6 (6q21.1-23).^{13,14} Sin embargo, los genes que codifican para la subunidad β LH y β hCG son únicos y forman un conglomerado de 7 genes o pseudogenes en el brazo largo del cromosoma 19 (19q 13.3)^{15,16}

El gene de la subunidad α tiene un gene promotor clásico, característico de la regulación de los genes en eucariotes. Este gene promotor consta de varios elementos que regulan la transcripción basal tales como: caja TATA y caja CCAA, así como un elemento regulatorio de unión (JRE) y un elemento regulatorio río arriba (URE) que incrementan la actividad basal del promotor y expresan la especificidad de los tejidos.^{17,18} Varios factores específicos en la hipófisis y en la placenta regulan la expresión de este gene. En la hipófisis, el gene de la subunidad α es expresado en el gonadotropo y en el tirotropo. En el gonadotropo se ha identificado una proteína que se une al Elemento Específico del Gonadotropo (GSE) y se le conoce como GSEB,¹⁹ sin embargo, ésta proteína no es producida por el tejido placentario y en el tirotropo una proteína o Factor Embrionario del Tirotropo (TEF) parece tener ésta función.²⁰

La subunidad α es el marcador más conocido que es expresado más tempranamente durante el desarrollo de la hipófisis.^{21,22} Aunque aún se desconoce la relevancia fisiológica de este hecho, se sugiere que la subunidad α libre juega un papel importante en el desarrollo de la hipófisis, ya que en un estudio²³ se demostró que la diferenciación del lactotrofo en la hipófisis de la rata puede ser inhibido por la incorporación de un anticuerpo específico para la subunidad α y no para la subunidad β .

El gene promotor de la subunidad β de la hCG ha sido poco estudiado en comparación con el gene promotor de la subunidad α . Algunos estudios^{24,25} han mostrado que varias regiones contribuyen de una manera aditiva en la transcripción basal del promotor. Análisis por mutaciones sitio-dirigidas entre -187 y el sitio de iniciación de la transcripción han revelado que una secuencia AGA y un dinucleótido GC en posición -54 en el gene promotor son requeridos aunque no indispensables para la actividad del gene promotor β 5. Deleciones en la región entre -3700 y -1700 del gene también afectan la actividad basal del gene promotor de β 5.²⁶

La síntesis de hCG intacta requiere la concomitante activación de ambos genes (α y β). Hay una relación entre la producción de hCG intacta y la síntesis de la subunidad β ; esto está basado en la evidencia de que la subunidad α es producida en exceso por las células productoras de ésta, un estudio²⁷ ha demostrado que la rápida transcripción

del gene es en respuesta a la estimulación del AMPc.

Las concentraciones de los RNA mensajeros de las subunidades de hCG son reguladas individualmente. En placentas del primer trimestre la relación en las concentraciones de α RNA/ β RNA fue de 2:1, mientras que en placentas a término ésta relación fue de 12:1.²⁸ Esto correlaciona con las concentraciones séricas de las subunidades durante el embarazo, en donde se puede observar que las concentraciones séricas de la subunidad β libre aumentan en las primeras 3 o 4 semanas después de la implantación; posteriormente las concentraciones de hCG intacta incrementan y la subunidad β libre disminuye. La subunidad α libre aumenta considerablemente hacia el final de este.²⁹⁻³¹

La subunidad β libre de hCG también es producida por varias líneas celulares tumorales epiteliales y ésta expresión es independiente de la producción de la subunidad α .³²⁻³⁵ El análisis de la estructura del DNA genómico de diferentes coriocarcinomas han mostrado que no existen alteraciones en los genes de la subunidad β ni α , lo que demuestra que esta producción de subunidades libres no es debida a una mal expresión génica, pero sí, pudiera estar relacionada con una alteración en la regulación/expresión de estos genes.^{36,37}

Una vez sintetizadas las subunidades de la hCG se llevan a cabo los proceso de glicosilación, plegamiento de la proteína y la formación de los

puentes disulfuro. Estos procesos son llevados a cabo en el Retículo Endoplásmico (RE) y en el Aparato de Golgi de la célula.⁴ Los procesos que dan lugar al plegamiento de la proteína y la formación de los puentes disulfuro son muy complejos y requieren de la presencia de ciertas proteínas llamadas Chaperones, entre ellas se encuentran la BiP/grp78, Calnexin y Calreticulin.³⁸⁻⁴² Así, una proteína que no esta plegada completamente permanece retenida en el RE por una transitoria unión a las proteínas chaperones; posteriormente la proteína es replegada a expensas de la hidrólisis de ATP, permaneciendo unidas a las chaperones hasta tener una adecuada conformación. La proteína BiP/grp78 une a las regiones hidrofóbicas de la cadena polipeptídica⁴⁰ y las otras 2 proteínas Calnexin y Calreticulin son proteínas unidoras de calcio y unen específicamente los plegamientos intermedios de las glicoproteínas principalmente por vía de los residuos de carbohidratos.⁴¹⁻⁴⁴ Por lo tanto, la N-glicosilación (específicamente en la subunidad β) tiene un importante papel en el plegamiento de la proteína, formación de puentes disulfuro y secreción de la misma.^{45,46}

Algunos investigadores se han enfocado en el estudio del proceso de glicosilación.^{5-7,47} 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 78 en α HCG, 13 y 30 en β hCG) (Figura 1A) por uniones N-glicosídicas de oligosacáridos y de manosas pesadas. Además, en la fracción β hCG

existen otras 4 cadenas de oligosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos a residuos de serina (aminoácidos 121, 127, 132 y 138) (Figura 1 B). Algunos estudios han demostrado el importante papel que juegan estos carbohidratos en la biosíntesis de la hCG y en la función propiamente de ésta.⁴⁸⁻⁵⁰

3.- 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 la FSH, han demostrado que su secreción se lleva a cabo a través de un sistema de exocitosis.⁵¹ Por este mecanismo, las proteínas recién sintetizadas son secretadas al espacio cisternal del Retículo Endoplásmico Rugoso y almacenadas dentro de 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.⁵¹ Estudios de ultraestructura de la placenta humana no han demostrado la presencia de grandes gránulos; sin embargo, han identificado relativamente poco gránulos largos pleomórficos que no tienen la

aparición de gránulos secretorios; así como, pequeños gránulos redondos y elongados, con apariencia densa que pudieran contener hormonas proteicas.^{52,53} En un estudio más reciente se demostró que la hCG no está presente en estos gránulos; sin embargo, no se ha podido indicar con precisión la localización intracelular de esta hormona.⁵⁴

Estudios realizados *in vitro* en tejidos placentarios del primer trimestre, han demostrado que los procesos de glucosilación y secreción de la hCG, requieren de aproximadamente 2 horas para llevarse a cabo.⁵⁵ Estos hallazgos sugieren que para estimular la secreción de hCG, se requiere de la síntesis de RNAs y de proteínas, además de que la secreción de la hormona prealmacenada no se realiza en forma significativa.⁵⁶ Aunque hasta el momento se desconoce el mecanismo de secreción de hCG, se piensa que la membrana celular está implicada en los procesos de síntesis y secreción de la hormona, dada la función que presenta dentro de la célula de determinar que elementos ingresan o se exteriorizan del citoplasma.^{56,57}

La hCG es secretada en forma pulsátil y esto obedece a la necesidad de la célula blanco de ser estimulada intermitentemente y no de forma continua, para evitar la desensibilización o regulación decreciente de sus receptores membranales.^{58,59} Varios estudios, entre ellos un estudio *in vitro*, en el cual utilizaron explantes placentarios del primer y tercer trimestre sugirió ésta

forma pulsátil de secreción.⁶⁰ Estudios *in vivo* en hombres y mujeres (no embarazadas) sin patología asociada; así como en mujeres en el primer trimestre del embarazo han demostrado que la secreción de hCG se presenta de manera pulsátil.⁶¹⁻⁶⁴ En un estudio nuestro⁶⁵ realizado *in vivo* en mujeres embarazadas, demostramos que la secreción de hCG se presenta de manera pulsátil en los tres trimestres del embarazo, al ser cuantificada cada 20 minutos por 24 horas, no encontrando diferencias en el número de pulsos de secreción de la hCG a lo largo del embarazo, pero en términos de la amplitud y el área de los pulsos resueltos por el análisis de conglomerados, reveló que ambos parámetros fueron significativamente mayores en el primer trimestre del embarazo que en el segundo y tercero.⁶⁵

4.- Regulación de la secreción de 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 (Factor liberador de gonadotropinas) en condiciones *in vitro*.⁶⁶ Dicho factor ha sido identificado en tejidos placentarios por medio de técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) y por inmunofluorescencia, estableciéndose que su síntesis es placentaria y conociéndose con el nombre de factor semejante a GnRH (GnRH-like).⁶⁷ El efecto

estimulador de GnRH sobre la secreción de hCG ha sido valorada *in vitro* en tejidos placentarios, demostrándose que la GnRH sintética puede estimular la liberación α y β de una forma dosis-dependiente,⁶⁸ además de estimular la producción de AMPc.⁶⁶

Se ha mencionado que el AMPc pudiera ser otro probable agente regulador de la secreción de hCG al actuar como un segundo mensajero.⁴ Este fenómeno fue valorado en cultivos de trofoblasto procedentes de placentas a término a los cuales se les adicionó AMPc o un análogo de AMPc, observándose un aumento de la síntesis y secreción de la hCG total y de sus subunidades libres,⁶⁹⁻⁷² se observó además que la acción de AMPc estimuló la síntesis de RNAm y de proteínas específicas, regulando de manera directa la síntesis de hCG.

Algunos investigadores se han enfocado en el estudio de los efectos de los factores de crecimiento sobre el trofoblasto. El trofoblasto 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 tiene la capacidad de inducir la secreción de hCG en cultivos *in vitro*, al parecer por activación de diferentes señales de transducción intracelular.⁷³ El trofoblasto también posee receptores para el Factor de Crecimiento Epidermal,⁷⁴ el cual es un polipéptido que tiene propiedades mitogénicas, así como de fosforilación

de proteínas de membrana entre otras. Algunos estudios^{75,76} que han valorado este factor, han demostrado que posee la capacidad de inducir la mayor liberación de hCG tanto en tejidos de coriocarcinoma⁷⁵ como en tejidos placentarios humanos de embarazos a término o de abortos terapéuticos.⁷⁶ El Factor de Necrosis Tumoral Alfa (FNT α), es otra citosina que esta implicada en la mediación del sistema inmunológico, este factor ha sido detectado también en el trofoblasto, el cual posee receptores para este factor.⁷⁷ Se ha demostrado que este FNT α tiene un efecto regulador inhibitorio en los sistemas endócrinos,^{78,79} y un estudio *in vitro*⁸⁰ en tejido trofoblástico de embarazos tempranos mostró que el FNT α inhibe la secreción de hCG y al parecer el efecto no es debido a su citotoxicidad.

Por otra parte, se ha demostrado que la misma hCG puede regular su propia secreción en la placenta humana a término, probablemente por la regulación de sus receptores a nivel placentario.⁸¹

5.- Concentraciones de la hCG

Durante las pasadas 2 décadas, algunos estudios^{61,82-85} han reportado la presencia de hCG en hombres y mujeres sin patología asociada, detectadas con el empleo de análisis altamente sensible, sugiriéndose que esta producción es de origen hipofisario. En un estudio reciente⁸⁶ esto

fue demostrado al ser aislada y caracterizada la hCG de extractos hipofisarios.

En el embarazo la hCG es detectada 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.⁸⁷ Sus concentraciones varían ampliamente a lo largo del embarazo, aumentando aproximadamente cada dos días en forma exponencial.⁸⁸ 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 vigésima 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.⁸⁹ En la actualidad se desconocen los mecanismos exactos que regulan la forma de secreción de dicha hormona a lo largo del embarazo.

6.- Funciones de la hCG

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.⁹⁰ 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 los procesos metabólicos, entre ellos la esteroidogénesis placentaria. Aún cuando se desconocen en la actualidad los mecanismos exactos de la regulación de la esteroidogénesis placentaria, la hCG parece desempeñar un papel importante, ya que la inmunización pasiva de monas rhesus embarazadas con anti- β -hCG sérica resulta en abortos espontáneos.⁹¹ Este conocimiento ha llevado al desarrollo de experimentales vacunas anticonceptivas, usando péptidos análogos a la específica secuencia de la región carboxi-terminal de hCG.^{92,93}

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.⁹⁴ La hCG parece tener también implicaciones en el proceso de esteroidogénesis de la corteza suprarrenal fetal en las primeras etapas del embarazo.⁹¹

Por otro lado se ha informado que la hCG tiene importantes propiedades inmunosupresivas,⁹⁵ sugiriéndose que probablemente tiene efectos paracrinis o autocrinis en la producción de las prostaglandinas placentarias implicadas en los procesos de implantación y prevención del rechazo embrionario.

Recientes estudios⁹⁶⁻⁹⁹ han demostrado que la hCG tiene un importante papel como factor de crecimiento. La hCG estimuló el crecimiento *in*

vitro de varias líneas celulares, entre ellas, de cáncer de vejiga⁹⁶ y células de tumor murino.⁹⁷ Además, el crecimiento de células tumorales de pulmón humano fue inhibido por la adición al medio de cultivo de un anticuerpo dirigido contra la subunidad α de hCG,⁹⁸ así como por la adición un RNA antisentido específico para la subunidad α de la hCG.⁹⁹ Sin embargo, estudios¹⁰⁰ en células epiteliales normales y tumorales provenientes de glándula mamaria humana, la hCG mostró un efecto antiproliferativo, que posiblemente pudiera estar mediado por la secreción de inhibina.^{101,102} Estos resultados implican que la glándula mamaria presenta receptores para LH/hCG y esto ha sido recientemente demostrado.¹⁰³

7.- Metabolismo de la hCG a múltiples formas urinarias

El 9% del peso de la molécula de hCG corresponde al contenido de ácido siálico, el cual parece tener dos funciones importantes, la primera como regulador del mecanismo de acción de la 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.¹⁰⁴

Las diferencias entre la hCG circulante y los metabolitos urinarios de la hCG, radica en la microheterogeneidad de los carbohidratos, al menos para las formas placentarias de hCG.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ La forma hipofisiaria de hCG ha sido recientemente descrita⁸⁶ y hasta ahora no se conocen metabolitos urinarios de ésta. La diferencia de esta forma hipofisiaria de hCG con respecto a las formas placentarias es la presencia de grupos sulfatos en la porción terminal de los oligosacáridos en lugar de ácido siálico.⁸⁶

La mayoría de los metabolitos urinarios de la hCG han sido bien descritos, uno de ellos es el fragmento β core de la hCG (β hCGfc), éste fragmento está compuesto de los residuos β 6-40 y β 55-92 unidos por puentes disulfuro, cuenta con moléculas de azúcares que en la mayoría de los casos aparecen truncadas [Figura 2 (C)]. La estructura de este fragmento fue reportada hace varios años y existen ensayos muy sensitivos para su determinación.¹⁰⁸⁻

¹¹⁰ El β hCGfc está presente en la orina de mujeres embarazadas a concentraciones molares 2 a 10 veces más que la concentración del heterodímero de hCG.¹¹¹⁻¹¹³ Algunos estudios sugieren que este fragmento es producido por proteólisis de la molécula de hCG o de la subunidad β de hCG en el riñón, sin embargo, el β hCGfc también ha sido

detectado en sangre en muy poca concentración,^{112,114} lo que sugiere que puede tener un sistema dual de secreción y puede ser producido directamente por la placenta.¹¹⁵

Otros interesantes metabolitos de hCG son las formas hendidas de la molécula completa de hCG o hCG "hendida". Estas formas de hCG son péptidos que presentan cortes a nivel de la subunidad β y específicamente entre los residuos β 44-45 y β 47-48.¹¹⁶⁻¹²⁰ [Figura 2 (B)]. Estas dos rupturas ocurren en una asa formada por 2 cisteínas anfipáticas en posición 38 y 57 de la subunidad β , modificando la estructura terciaria de la molécula, lo cual disminuye su actividad biológica¹¹⁶⁻¹¹⁹ e interfiere con el reconocimiento de la misma por ciertos anticuerpos.¹²⁰ Por otro lado, se ha valorado el probable efecto que pudieran tener estas rupturas en cuanto a la función de la hCG durante el embarazo, demostrando que las rupturas (hCG hendida) y la disociación de las subunidades α y β provocan una desactivación de la hormona. Este proceso de cortes en la molécula de hCG se lleva a cabo en el trofoblasto y se inicia a partir de los 2 primeros meses del embarazo y aumenta conforme progresa el mismo.¹²¹

B.- RELACION ESTRUCTURA - FUNCION DE LA hCG

Por estudios de cristalografía,¹²² la estructura

tridimensional de la hCG ha demostrado que sus dos

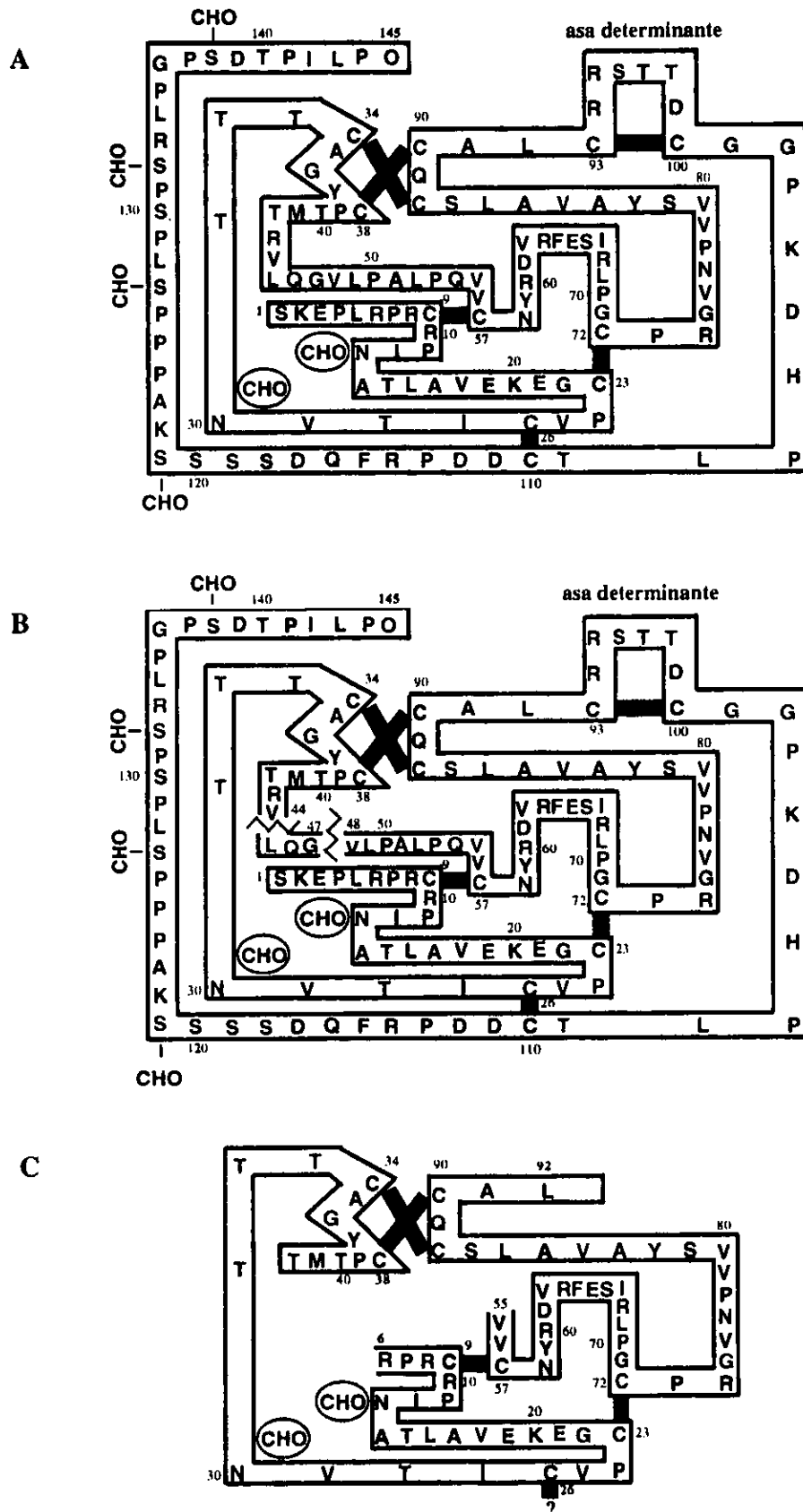


Figura 2.- Secuencia de aminoácidos de la subunidad β de hCG (A) y de sus derivados. (B) Estructura de la forma hendida de hCG presentando 2 cortes en una asa formada por 2 cisteínas anfipáticas en posiciones 38 y 57 de la subunidad β , específicamente entre los residuos β 44-45 y β 47-48. (C) Fragmento β -core de la hCG (β hCGf) compuesto de los residuos β 6-40 y β 55-92. Las franjas negras representan los puentes disulfuro. [Lapthorn JJ. y Cols. Nature. 369:455,1994. (122)]. Ver apéndice para el código de los aminoácidos.

subunidades tienen una similar topografía, con puentes disulfuro formando asas de cisteínas. Esta misma característica de plegamiento ha sido observada en la estructura de varios factores de crecimiento, lo que pudiera estar en relación a la actividad proliferativa que experimenta la hCG en ciertas líneas tumorales como se mencionó anteriormente.¹²³

1.- La formación de los puentes disulfuro y su importancia en la molécula de hCG.

La subunidad α hCG contiene 92 aminoácidos, de los cuales 10 son cisteínas que están unidas por 5 puentes disulfuro, en las posiciones 7-31, 10-60, 28-82, 32-84 y 59-87. Algunos estudios^{124,125} han valorado la importancia de estas cisteínas y sus puentes disulfuro en el plegamiento de la subunidad α y la unión con la subunidad β hCG. Uno de ellos demostró que las uniones disulfuro asociadas con cisteínas en posición α 7, α 31, α 59, α 87 y α 32 no son esenciales para el plegamiento de la subunidad α ni para su ensamblaje con la subunidad β hCG y producen una proteína biológicamente activa.¹²⁴ El estudio más reciente¹²⁵ en el cual se construyeron subunidades α mutadas en sus residuos de cisteínas por alaninas, eliminando los puentes disulfuro 7-31 y 59-87, demostró que estos cambios en la subunidad α , no afectaron la unión con la subunidad β hCG ni β FSH; sin embargo, sí afectaron significativamente la unión de la subunidad β LH, lo que sugiere que la región de la subunidad α que es reconocida por la

subunidad β es diferente para las distintas gonadotropinas.¹²⁵

La subunidad β hCG está formada por 145 aminoácidos y 12 de ellos son cisteínas las cuales forman 6 uniones disulfuro, en las posiciones 9-57, 23-72, 26-110, 34-88, 38-90 y 93-100 [Figura 2 (A)]. En contraste con los resultados observados en la subunidad α , en cuanto a la importancia de las uniones disulfuro, la subunidad β hCG requiere de todas ellas para un adecuado plegamiento y perfecto ensamblaje a la subunidad α .¹²⁶

2.- Regiones esenciales de la hCG para unión al receptor y actividad biológica.

Varios residuos de aminoácidos han sido considerados importantes para la actividad biológica de la hCG y su unión al receptor. Estas regiones han sido identificadas a través del empleo de modificaciones químicas, el uso de péptidos sintéticos en estudios de inhibición por competencia y por mutagénesis sitio-dirigidas.^{127,128}

En la subunidad β , dos secuencias de aminoácidos han sido consideradas esenciales para bioactividad de la molécula y su unión al receptor. Una de ellas es la región β 93-100, conocida también como "secuencia determinante"¹²⁶⁻¹²⁹ [Figura 2 (A)]. Los residuos de aminoácidos específicos de esta región, que están implicados en la unión al receptor son: Arg94, Arg95, Ser96, y Asp99, ya que en la estructura

tridimensional de la proteína, estos quedan expuestos de la superficie del dímero. La importancia del aminoácido Thr97 ha sido considerada por su relación y su estrecho contacto con los carbohidratos del residuo α 52Asn.¹³⁰

La otra región importante es la secuencia β 38-57, ya que algunos estudios donde realizaron mutagénesis de Arg43 a Leu en hCG o remplazo de las cisteínas en posición 38 y 57 por Ala y Asp mostraron disminución o pérdida de la unión al receptor.^{131,132}

Los aminoácidos en posición 47-53 son predominantemente hidrofóbicos y forman una estructura poco común semejante a una protusión en forma de cuña, considerándose también esencial para unión al receptor.

De la subunidad α en su extremo carboxilo-terminal la secuencia de aminoácidos 88-92 pudiera tener implicaciones en la unión al receptor, pues en la estructura tridimensional de la hCG esta secuencia está en relación estrecha con la región β 93-100.¹³³

También, por su estrecha relación con esta región, los residuos de aminoácidos α 40-50 se consideran que están implicados en la unión al receptor, además de que presentan una estructura tipo helicoidal.¹³⁴

3.- Glicosilación y heterogeneidad de la molécula de hCG

Previamente se mencionó que 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 . Cada una de estas cadenas terminan en dos residuos de ácido siálico (Acido-N-Acetilneuramínico). Además la subunidad β hCG en su extremo carboxilo-terminal posee 4 cadenas de oligosacáridos que se encuentran unidos por enlaces glicosídicos (tipo O) a residuos de serina (Ser) en las posiciones 121,127,132 y 138.⁵⁻⁷ (Figura 1 y 3).

Investigaciones realizadas^{104,135-138} acerca del papel que desempeñan los carbohidratos ligados a la molécula de hCG, han demostrado que estos tienen una influencia importante en el efecto biológico de la misma y 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.¹³⁵ 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* e *in vitro*, y su vida media se reduce a minutos.^{104,135-138}

Estudios de mutagénesis sitio-dirigidas han demostrado que los oligosacáridos unidos a residuos de Asn por enlaces tipo N en posiciones α 52 y β 13 son requeridos para producir una completa respuesta esteroideogénica, sin embargo, los oligosacáridos en posiciones α 78 y β 30 parecen no tener ningún efecto en la actividad biológica de la hCG, al igual

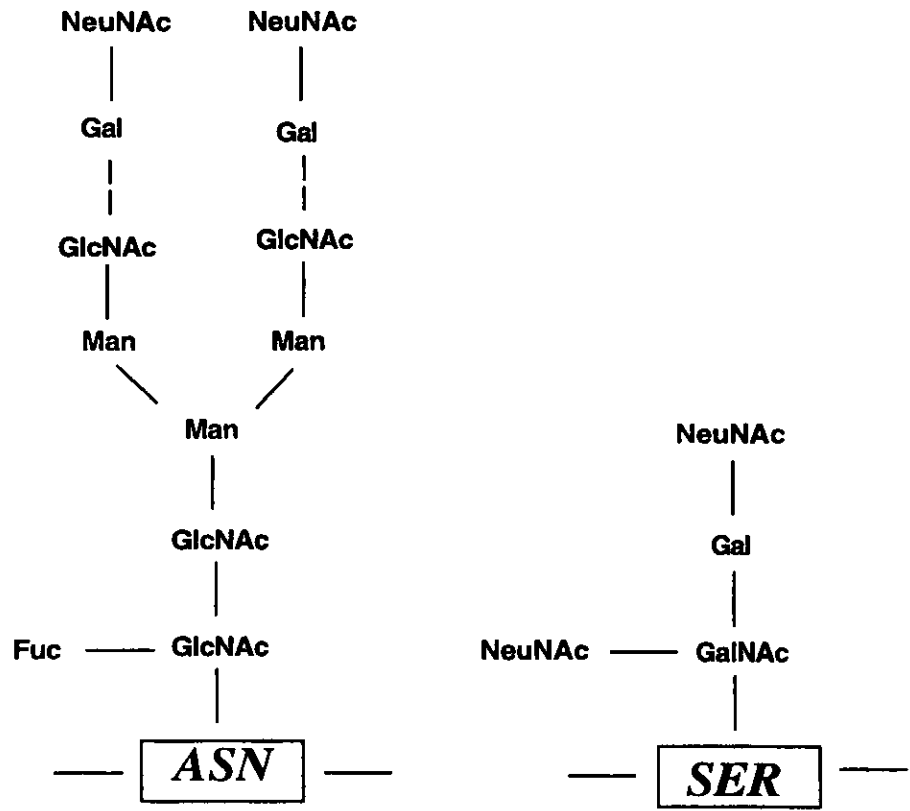


Figura 3.- Composición y distribución de los diferentes oligosacáridos y ácido siálico unidos a los residuos de N- (ASN) y O- (SER) de la molécula de la Hormona Gonadotropina Coriónica Humana..

que las 4 cadenas de oligosacáridos que se encuentran unidos a los residuos de serina en la subunidad β .¹³⁹ La extensión carboxi-terminal de la fracción β de hCG, parece estar relacionada con una prolongada vida media de la hormona, debido a que cuenta con los 4 oligosacáridos cargados negativamente (mayor contenido de ácido siálico) unidos a residuos de serina, cuya presencia disminuye el metabolismo renal de la hormona, prolongando su vida media y su bioactividad.¹⁴⁰

La presencia de los oligosacáridos en ambas cadenas α y β de molécula de hCG, los cuales presentan diferentes grados de sialización,¹⁴¹ constituyen la base bioquímica de la presencia de las isoformas (heterogeneidad) de la molécula de hCG, que al igual que las gonadotropinas hipofisarias [hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH)] existe en múltiples formas moleculares (isoformas).¹⁴¹⁻¹⁴⁵

La heterogeneidad molecular ha podido ser demostrada mediante el empleo de diversas técnicas de separación tales como filtración en gel, cromatografía por afinidad, electroforesis en suspensión de agarosa, enfoque isoeléctrico y cromatoenfoco.^{142,143,146-151} Cuando se emplean como técnicas de separación la electroforesis en suspensión de agarosa, el isoelectroenfoco o cromatoenfoco, el polimorfismo detectado es esencialmente el resultado de variaciones en el contenido de ácido siálico (heterogeneidad por carga).¹⁴⁹ Se ha demostrado^{149,150} que hay relación

entre las características fisicoquímicas (punto isoeléctrico, pI) de las isoformas con la actividad biológica *in vitro*, unión al receptor y vida media plasmática. En general, de acuerdo con los estudios realizados en gonadotropinas LH y FSH se ha demostrado que las isoformas más ácidas tienen una mayor vida media *in vivo*, una menor bioactividad y unión al receptor *in vitro*, al ser comparada con las isoformas más básicas.¹⁵¹⁻¹⁵⁶ Por otra parte el tipo y la cantidad relativa de las diferentes isoformas por carga cambia en diversas condiciones endócrinas. Varios estudios han demostrado que la proporción de isoformas ácidas aumentan conforme aumenta la edad y después de castración.^{143,155-158} Durante el ciclo menstrual un aumento relativo en las isoformas básicas se presenta en la fase preovulatoria en comparación con la fase folicular y lútea donde predominan las isoformas ácidas.¹⁵⁹

Algunos estudios^{160,161} han demostrado que el polimorfismo de la hCG en extractos placentarios, orina y suero de mujeres con 12 semanas de gestación, utilizando como técnica de separación el isoelectroenfoco. En los extractos placentarios se han identificado 12 isoformas de esta hormona, cuyos pI oscilaron entre 9.6 a 3.9. En las muestras de orina predominaron las formas más ácidas, aquellas cuyos pI se encontraron entre 5.2 a 3.9.¹⁶¹ En las muestras séricas, de las mujeres con 12 semanas de gestación predominaron las formas más ácidas, estando presentes las formas básicas aunque en menor proporción.¹⁶¹ Cada una de las isoformas de hCG aisladas difirieron una de la otra no solo en

su pl, sino en su concentración, su potencia biológica *in vitro* y en su vida media plasmática.^{148,160,161}

Estudios previos han demostrado que la razón o cociente bioactividad/inmunoactividad de la hCG se modifica conforme progresa el embarazo y que estas modificaciones varían dependiendo del tejido particular que sintetiza a la molécula (placenta hormonal, mola hidatidiforme o tumores trofoblásticos benignos o malignos).¹⁶²⁻¹⁶⁵ Es posible que estos cambios en la actividad biológica sean secundarios a variaciones en la estructura proteica y/o de carbohidratos de la molécula ya que su movilidad electroforética se modifica en forma paralela.¹⁶⁶

En un estudio *in vivo* realizado en mujeres durante el embarazo temprano (1^{er} trimestre) y tardío (3^{er} trimestre) y en hombres y mujeres con enfermedades trofoblásticas, se encontró que existían diferencias en cuanto a la relación bioactividad/inmunoactividad de hCG, así como a la carga neta de la misma; la carga eléctrica media de la hCG circulante durante el tercer trimestre fue más básica que la del primer trimestre del embarazo, disminuyendo paralelamente su actividad biológica *in vivo*.¹⁶⁶

En un estudio nuestro⁶⁵ en el cual valoramos la bioactividad de la hCG en los diferentes trimestres del embarazo, mostramos que la hCG del primer trimestre fue más bioactiva al compararse con aquellas del segundo y tercer trimestres. Además la

carga media de la molécula se modificó conforme progresó el embarazo; en el primer trimestre la hCG estuvo cargada más negativamente ($p < 0.05$) que la hCG del segundo y tercer trimestres. Un estudio de Wide y cols.¹⁶⁷ ha demostrado que los cambios en la movilidad electroforética y carga media de la molécula de la hCG circulante inician alrededor de la decimotercera semana de embarazo.

Estudios de Ulloa-Aguirre y cols.⁷² empleando el citotrofoblasto humano aislado de placenta a término y cultivado durante 96 horas, demostraron que durante la maduración morfológica y funcional del trofoblasto, la hCG fue secretada en diferentes formas moleculares y en abundancias relativas que dependieron del tiempo de incubación en presencia de AMP cíclico, indicando que las formas circulantes de hCG son producto de la síntesis y secreción placentaria y no el resultado de la degradación periférica.⁷²

Aún cuando en la actualidad se desconocen con precisión los cambios en el polimorfismo de la hCG circulante a lo largo de todo el embarazo, así como su importancia fisiológica, es probable que esta heterogeneidad sea un reflejo de la capacidad del tejido placentario para regular la intensidad exacta de la señal gonadotrópica de acuerdo al estadio específico de la gestación y/o del desarrollo embrionario.

II. OBJETIVO

Con el fin de conocer la heterogeneidad biológica de la hCG en los diferentes trimestres del embarazo, se tratará de identificar cada una de las isoformas en suero por medio de la técnica del cromatoenfoco; asimismo se valorará la actividad biológica (AB) en sistemas *in vitro* y la vida media plasmática de cada una de estas isoformas.

III HIPOTESIS

La hCG es secretada en diferentes formas moleculares durante el embarazo. La abundancia relativa de cada una de las isoformas varía en los diferentes trimestres del embarazo. Existe un predominio de las isoformas más ácidas durante el primer trimestre y las isoformas menos ácidas incrementan conforme progresa el embarazo. La actividad biológica *in vitro* es menor y la vida media plasmática mayor en las isoformas más ácidas que en las menos ácidas

II. OBJETIVO

Con el fin de conocer la heterogeneidad biológica de la hCG en los diferentes trimestres del embarazo, se tratará de identificar cada una de las isoformas en suero por medio de la técnica del cromatoenfoco; asimismo se valorará la actividad biológica (AB) en sistemas *in vitro* y la vida media plasmática de cada una de estas isoformas.

III HIPOTESIS

La hCG es secretada en diferentes formas moleculares durante el embarazo. La abundancia relativa de cada una de las isoformas varía en los diferentes trimestres del embarazo. Existe un predominio de las isoformas más ácidas durante el primer trimestre y las isoformas menos ácidas incrementan conforme progresa el embarazo. La actividad biológica *in vitro* es menor y la vida media plasmática mayor en las isoformas más ácidas que en las menos ácidas

IV. MATERIAL Y METODOS

A.- DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se trata de un estudio descriptivo, longitudinal y prolectivo, en cual se analizaron especímenes (sueros) procedentes de mujeres embarazadas quienes con anterioridad asistían a la consulta de Endocrinología Reproductiva e Infertilidad del INNSZ. En todos estos casos se cumplieron con los siguientes criterios.

1.- CRITERIOS DE INCLUSION

- 1.- Presencia de embarazo, diagnosticado por ausencia de menstruación (8 semanas), positividad en la determinación de hCG urinaria y confirmación mediante ultrasonido pélvico.
- 2.- Edad entre 20 y 32 años.
- 3.- Ausencia de enfermedades crónicas debilitantes.
- 4.- Inexistencia de patologías concomitantes después de una evaluación clínica detallada.
- 5.- Valores de glucosa, urea, creatinina o pruebas de función hepática dentro de los límites de referencia.
- 6.- Presentar 3 días antes del estudio valores de hemoglobina superior a 12g/dl, hematocrito mayor de 36% y niveles 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.

2.- 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 de alguno de los parámetros de laboratorio detallados en 1 (5 y 6), de ser así se dió tratamiento necesario para corregir dicha alteración.
- 3.- Decisión de no continuar con el estudio
- 4.- Si durante el momento del estudio se presentara alteración en tensión arterial, frecuencia cardiaca o temperatura que indicara la posibilidad de alguna alteración física.
- 5.- Si durante el parto se determinara alguna alteración estructural de la placenta.

B.- SUJETOS DE ESTUDIO

En total fueron doce mujeres las que se incluyeron en el estudio, siete de ellas fueron estudiadas prospectivamente durante el 1º, 2º y 3º trimestres del embarazo [(12.1-14.8), (23.1-26.4) y (35.5-38.4) semanas de embarazo respectivamente], y en quienes previamente se valoró la forma de secreción y la bioactividad de la hCG en los diferentes trimestres del embarazo.⁶⁵ Las cinco mujeres restantes se estudiaron solamente a las 10.0-10.8 semanas de embarazo, dada la importancia de la hCG en las primeras semanas de gestación.

La edad de las pacientes osciló entre 22 y 32 años (Tabla 1). Tres de estas pacientes consultaban en el Departamento de Biología de la Reproducción del 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 nueve, fueron mujeres sanas 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

TABLA 1. Características Clínicas de los 12 sujetos incluidos en el estudio.

SUJETO No	EDAD (años)	TALLA (cm)	DIAGNOSTICO PREVIO	PESO (Kg) 12-10 SEMANAS GESTACION	TIPO DE CONCEPCION
1	32	160	Sana	54.250	Espontánea
2	32	156	SOP	58.000	Inducida**
3	27	157	Historia de AN	46.090	Espontánea
4	30	164	Sana	63.000	Espontánea
5	30	166	Infertilidad*	81.890	Espontánea
6	22	156	Sana	50.100	Espontánea
7	27	160	Sana	61.300	Espontánea
8	30	155	Sana	54.000	Espontánea
9	22	160	Sana	60.200	Espontánea
10	25	165	Sana	62.500	Espontánea
11	22	158	Sana	51.500	Espontánea
12	25	159	Sana	54.000	Espontánea

SOP = Síndrome de Ovarios Poliquísticos

AN = Anorexia Nervosa

* = Factor Tubario

** = Citrato de Clomifén (Inductor de Ovulación)

los resultados de los estudios de laboratorio (BH, hierro, folato, vitamina B₁₂, glucosa, urea, creatinina y PFH) se encontraron dentro de los límites de referencia.

C.- PROTOCOLO DE ESTUDIO.

Las mujeres estudiadas a las 12.1-14.8, 23.1-26.4 y 35.5-38.4 semanas de embarazo, fueron internadas en la Unidad Metabólica del INNSZ un día antes de llevar a cabo el protocolo de estudio, con el fin de que se habituaran al lugar físico donde se les practicaría la prueba. El estudio dió inicio al día siguiente a las 08:00 horas. Las pacientes se mantuvieron en posición de decúbito durante las 24 horas en que se tomaron las muestras sanguíneas, ingirieron sus alimentos y durmieron en su horario habitual. Media hora antes de iniciar el estudio se les colocó un catéter corto en una vena antecubital. Se muestreo a las pacientes cada 20 minutos durante las próximas 24 horas (ya que previamente se determinó pulsatilidad hormonal) obteniéndose 2 mls de sangre en cada toma (144 mls totales). El extraer hasta 450 mls de sangre a mujeres embarazadas no produce alteración alguna ni en la madre ni en el feto como ya ha sido descrito previamente.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ A lo largo del estudio se tomaron signos vitales cada 30 minutos y en el último trimestre se valoró el foco fetal. A las mujeres con 10.0-10.8 semanas de embarazo se les tomó un sola muestra sanguínea (20 mls) en ayunas.

D.- METODOS.

La sangre obtenida se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 3000 RPM y se separó el suero congelándose este a -20°C hasta el momento en que se realizó su procesamiento.

1.- EXTRACCION DE ALBUMINA DEL SUERO

Con el fin de separar proteínas tales como la albúmina, los extractos previamente obtenidos, se pusieron en contacto con un gel de afinidad (Affi-gel blue, Bio-Rad) que consiste de pequeñas cuentas de agarosa entrecruzadas que se encuentran covalentemente adheridas a un colorante azul de cibacrón que tiene una capacidad de unión a la albúmina de >11 mg/ml. El método se encuentra resumido en la figura 4.

2.- CROMATOENFOQUE DE CONCENTRADOS SERICOS.

Las isoformas de hCG presente en cada concentrado sérico fueron separadas en base a su carga por medio del

PREPARACION DE LAS MUESTRAS SERICAS
(EXTRACCION DE ALBUMINA)

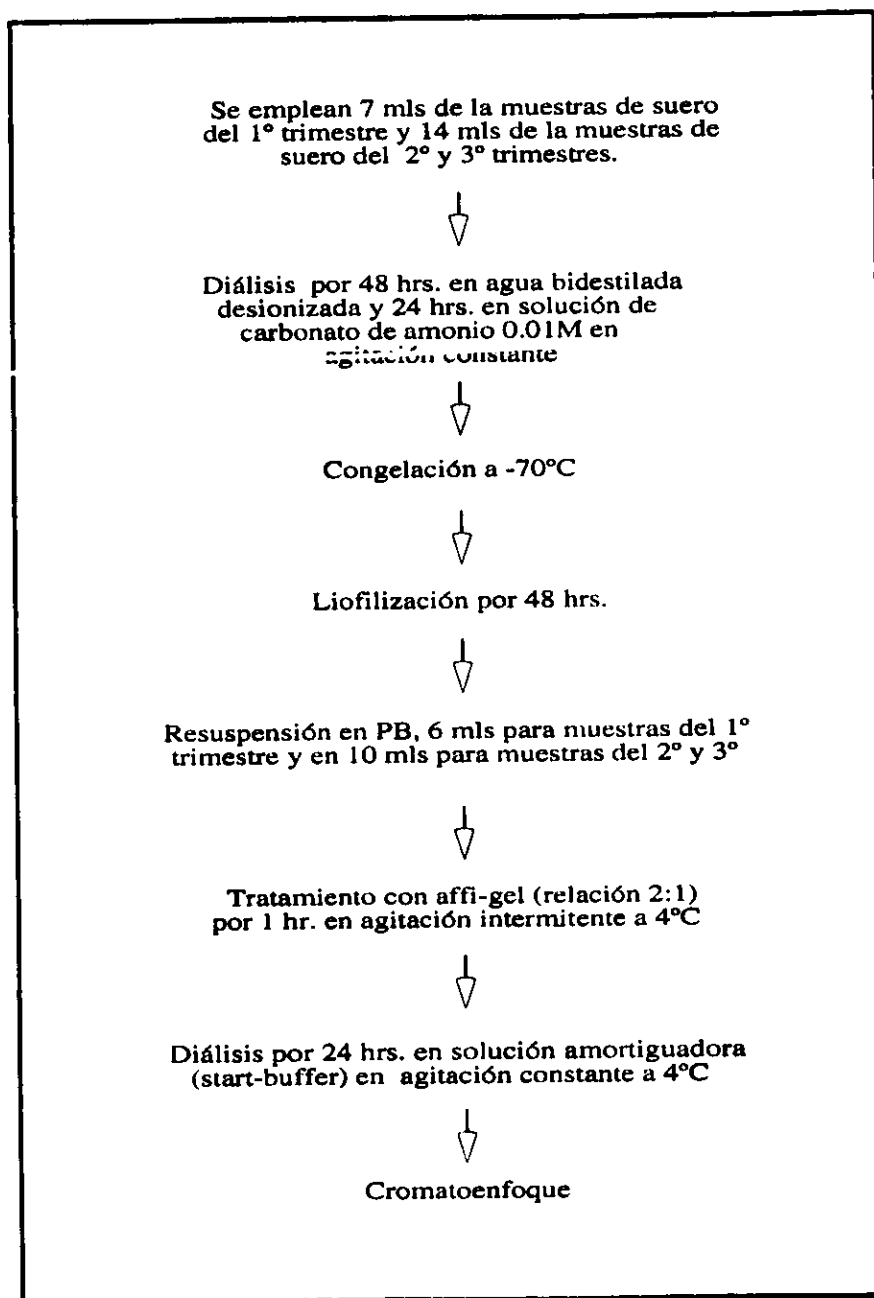


Figura 4

cromatofoco, en cual se realizó de acuerdo al método descrito previamente por Ulloa-Aguirre y cols.¹⁷¹ el cual se encuentra resumido en la figura 5. Se construyeron columnas de cromatofoco con dimensiones de 30.0 x 1.0 cm, empleando la resina de intercambio PBE-94 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA). Previamente al cromatofoco, la columna se equilibró con 15 volúmenes de amortiguador de imidazole-HCl (0.025M, pH 7.4). Los concentrados séricos se cromatografiaron en estas columnas empleando como amortiguador de elución el poliamortiguador -74 (Pharmacia Fine Chemicals) a una dilución de 1:8 en agua desionizada. Las fracciones (de 2 ml cada una) se colectaron a un flujo de 1 ml/4 min a 4°C. Se determinó el pH de cada fracción y cuando el eluyente de la columna mostró un valor de 4.0 se cambió el amortiguador eluyente a una solución IM de NaCl con la finalidad de obtener el material que no logró eluir dentro de un rango de pH de 8.0-4.0 (pico de sal). Cada fracción obtenida se mantuvo a -20°C hasta el día del radioinmunoanálisis (RIA) de hCG. La recuperación de la hCG por este método fue mayor del 70% del total depositado a la columna.

Después de la cuantificación del contenido de hCG en cada muestra de elución de la columna, las fracciones correspondientes a valores de pH 7.0 - 6.5 (area I), 6.49 - 5.50 (area II), 5.49 - 4.50 (area III), 4.49 - 3.70 (area IV) y <3 (area V; pico de sal) fueron mezcladas y concentradas (una poza / area de pH en cada periodo de gestación).

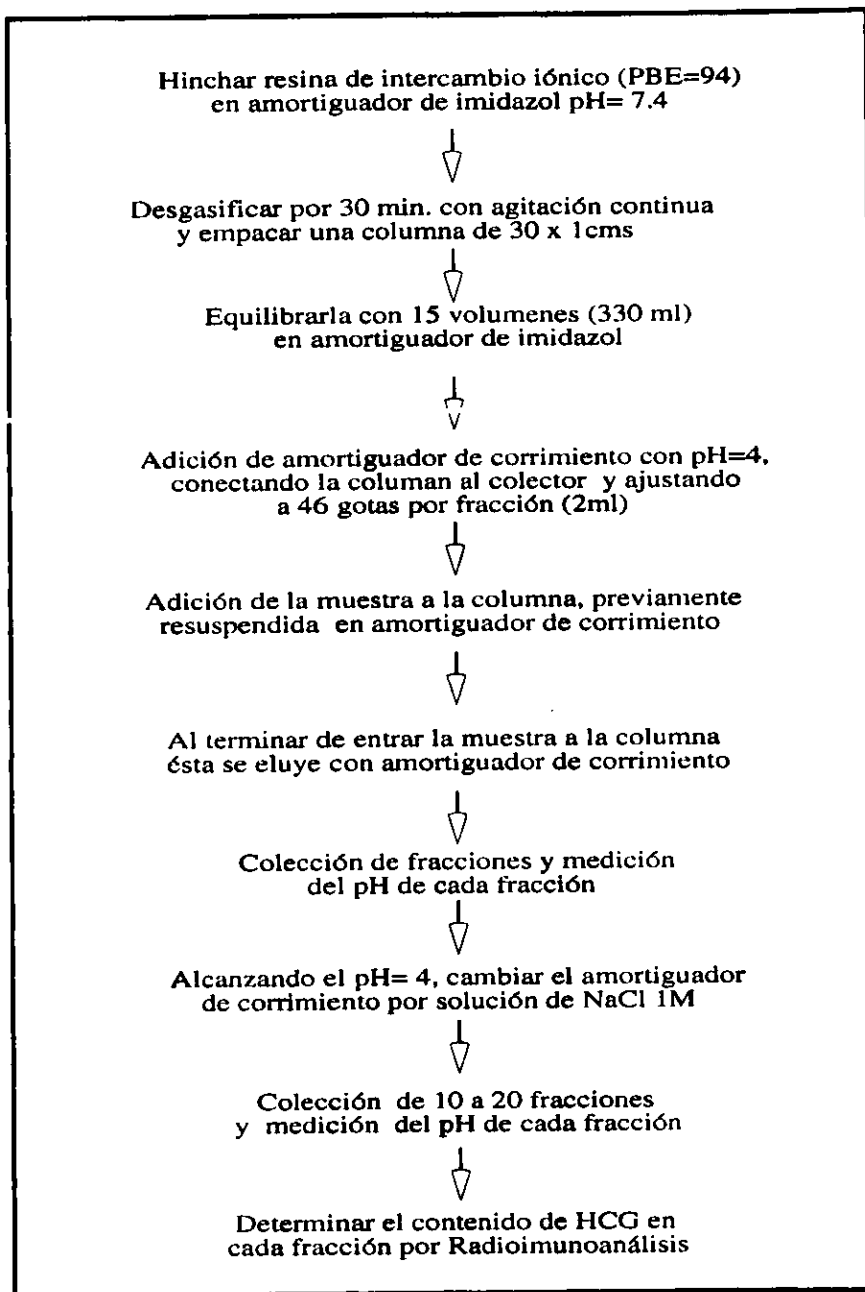
3.- CONCENTRACION DE CADA POZA DE hCG.

Cada una de las pozas de hCG fueron transferidas en forma individual a tubos de diálisis (límite permisivo, 12,000 Spectrum Medical Industries, Los Angeles CA, EUA) y dializadas a 4°C durante 24 horas contra agua desionizada y posteriormente contra carbonato de amonio 0.01M (pH 7.5); después de la diálisis, las muestras se concentraron mediante liofilización. A cada liofilizado obtenido se le cuantificó su contenido de hCG por medio de RIA. Una vez cuantificado el contenido de hCG, cada concentrado se separó en pequeñas alícuotas que fueron utilizadas para valorar actividad biológica y vida media.

4.- RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA) DE hCG.

La cuantificación de la hCG de cada uno de los concentrados obtenidos en los cromatofocos se realizó por RIA siguiendo la metodología descrita por Sufi y cols,¹⁷² la cual se encuentra resumida en la figura 6. Como estándar

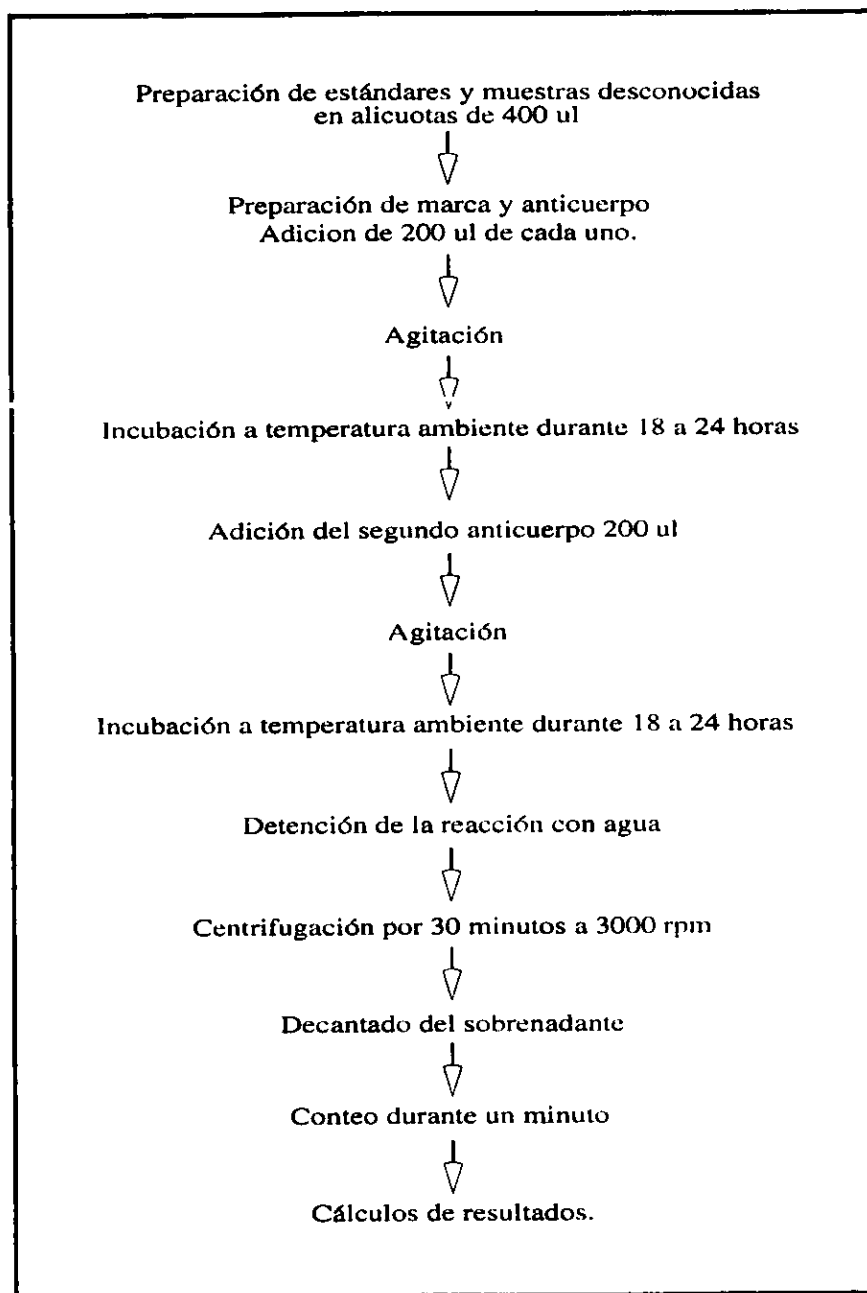
CROMATOENFOQUE DE hCG



Ulloa-Aguirre y Cols., 1990 (171)

Figura 5

RIA DE hCG



Sufi y Cols., 1986 (172)

Figura 6

se utilizó un preparación altamente purificada (hCG CR 121) proporcionada por los Institutos Nacionales de Salud, EUA, Bethesda, MD; esta misma se utilizó como trazador al ser marcada con I^{125} siguiendo el método de la Cloramina T,¹⁷³ el cual se encuentra resumido en la figura 7. El anticuerpo (anti-hCG-H180, batch#2, Institutos Nacionales de Salud, EUA) se utilizó a una dilución final de 1:100,000. La reacción cruzada de este anticuerpo contra subunidad α y β fue de 1.2% y 3.2% respectivamente. Este anticuerpo no reconoce la porción hendida de la molécula de hCG. Para evitar variaciones interensayo las muestras provenientes de una columna de cromatoenfoco o de un período del embarazo fueron analizadas en un mismo ensayo. Los resultados fueron expresados como ng del estándar hCG-CR121. La sensibilidad del RIA fue de 0.125 ng/tubo (1.0 UI/L). El coeficiente de variación intraensayo fue <7.5%.

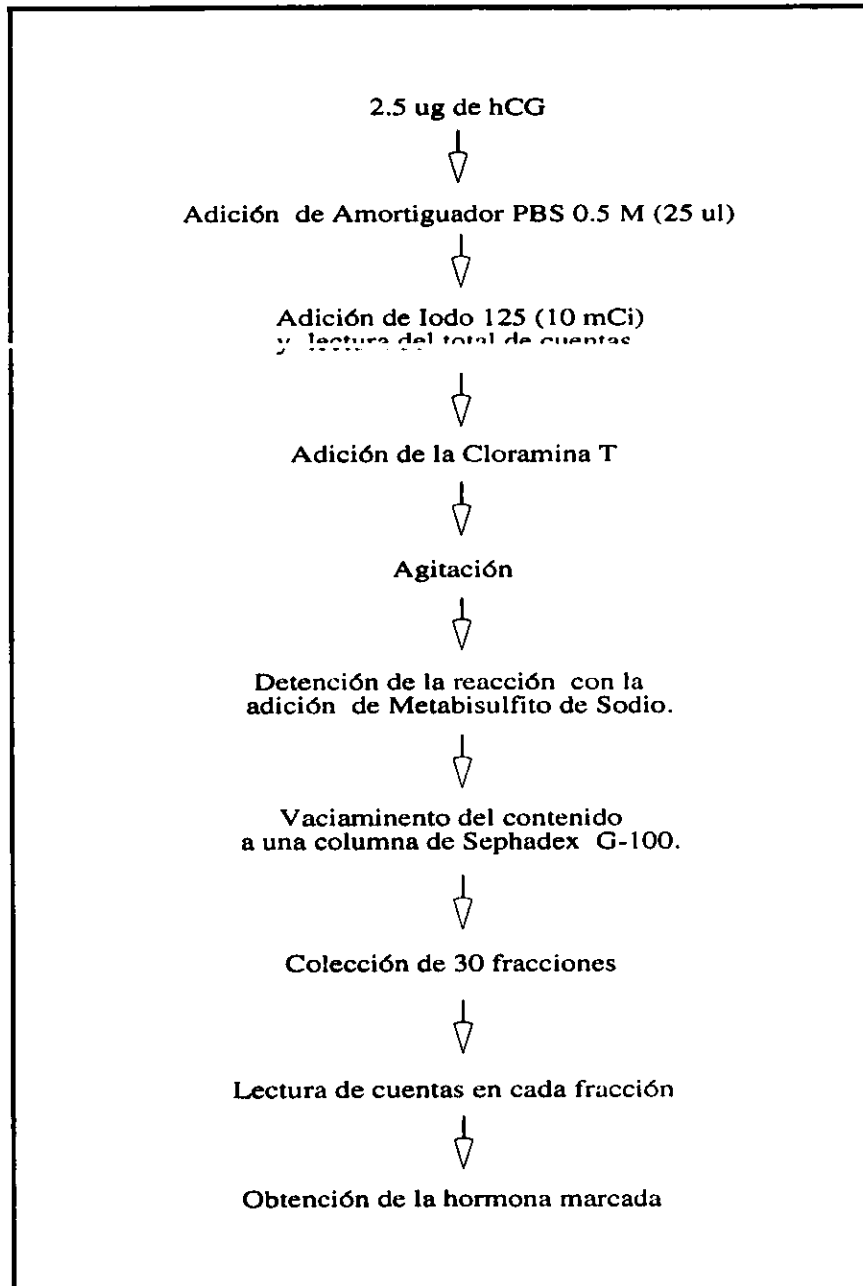
5.- BIOENSAYO *in vitro* DE hCG.

La actividad biológica *in vitro* de cada forma molecular de hCG separada mediante cromatoenfoco, se determinó empleando un bioensayo en células intericiales de testículo de ratón adulto, tal y como ha sido descrito por Van Damme¹⁷⁴ y modificado por Díaz-Cueto y cols⁶⁵ y que se resume en las figuras 8a y 8b. Se utilizó como estándar la preparación altamente purificada hCG-CR 121. En las muestras séricas de las mujeres de 10-11 semanas de gestación, la actividad biológica *in vitro* de la hCG solo se valoró en una sola muestra sérica, mientras que en las mujeres estudiadas al final del primer, segundo y tercer trimestres, la actividad fue determinada en polas de suero hechas de la serie de muestras tomadas durante 24 hrs, como es descrito en el protocolo de estudio. Para evitar variaciones interensayo todas las muestras de una paciente o concentrados de isoformas de hCG (áreas de pH I a V) de un solo período gestacional fueron analizados en un mismo ensayo en 8 a 10 concentraciones diferentes y en incubaciones por triplicado; el coeficiente de variación intraensayo fue <10%. La cantidad de testosterona producida *in vitro* por la células intericiales se determinó por RIA, descrito previamente por Ulloa-Aguirre y cols,¹⁷⁵ y se resume brevemente en la figura 9. Todas las muestras de un solo bioensayo fueron analizadas en una misma corrida. El coeficiente de variación intraensayo fue <5%. La actividad biológica aparente se expresó como la relación bioactividad/inmunoactividad (B/I), esto es, la actividad de la forma molecular determinada por el bioensayo en relación con la actividad inmunológica dada por el RIA.

6.- DEPURACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA hCG EN LA CIRCULACION DE LA RATA.

Las diferentes isoformas de hCG identificadas después del cromtoenfoco y provenientes de un sujeto en las 10.1

**RADIOMARCAJE DE hCG
POR EL METODO DE LA CLORAMINA T**

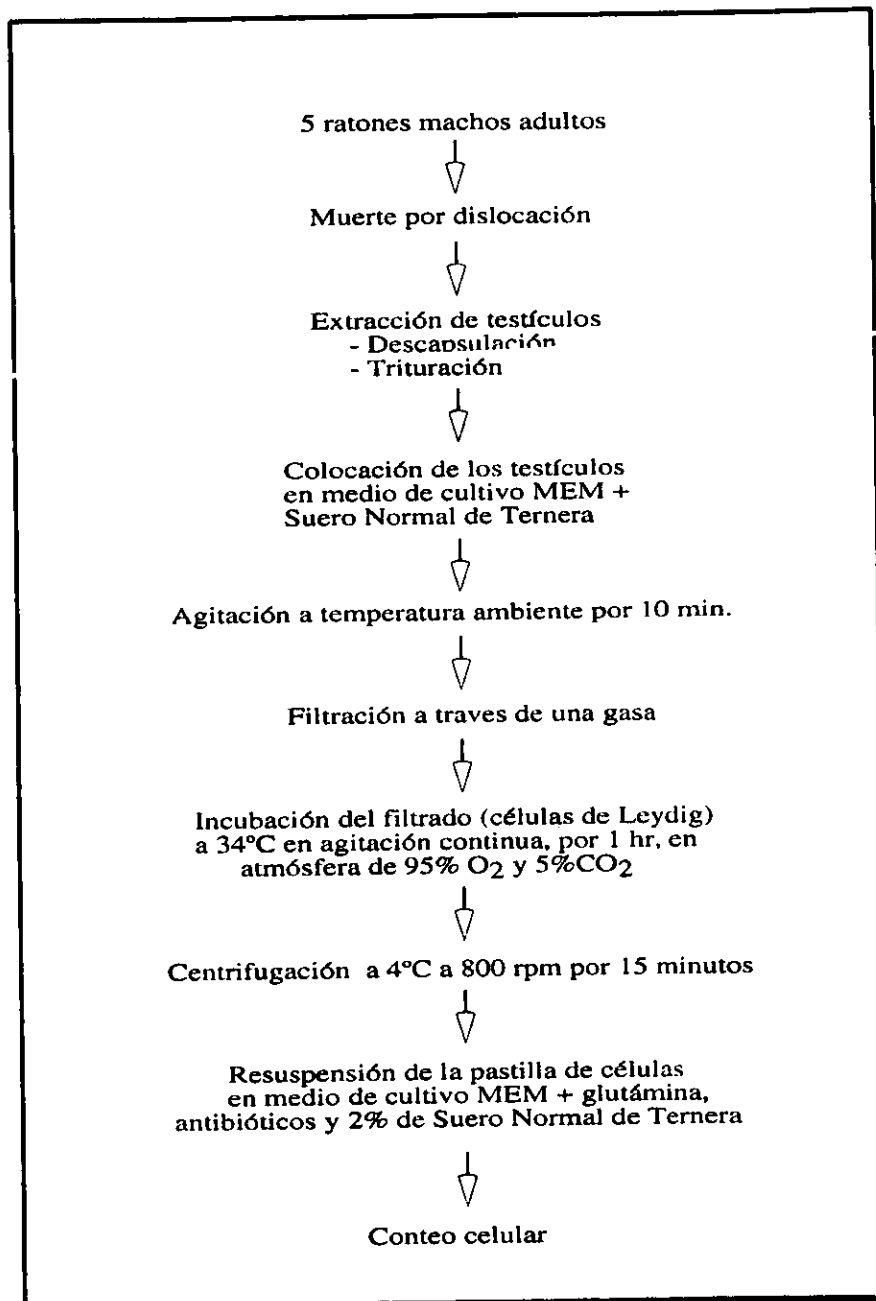


Greenwood FC y Cols., 1968 (173)

Figura 7

BIOENSAYO *in vitro* DE hCG

A) OBTENCION DE CELULAS



Vann Damme MP y Cols., 1974 (174)

Figura 8a

BIOENSAYO *in vitro* DE hCG

B) ESTIMULACION DE CELULAS

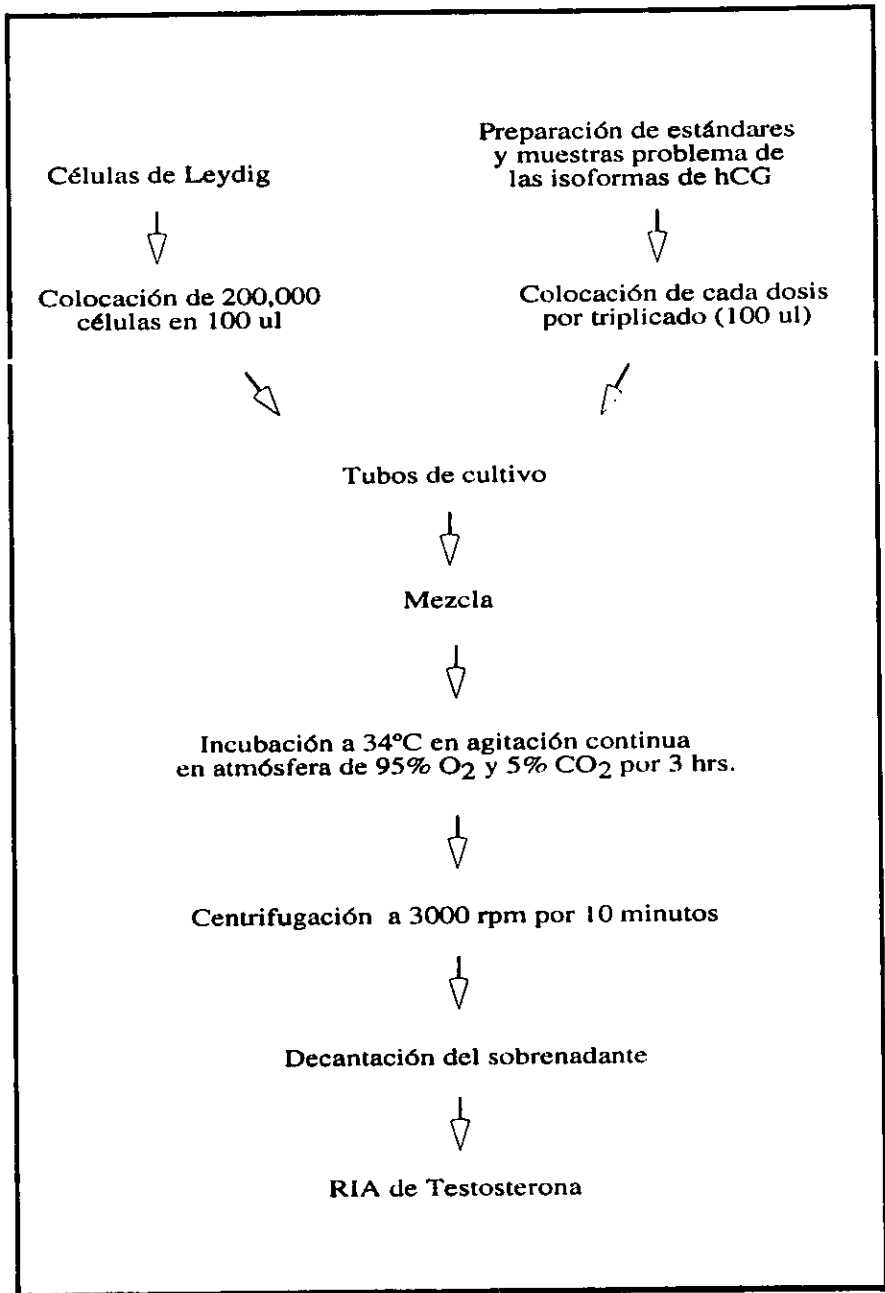
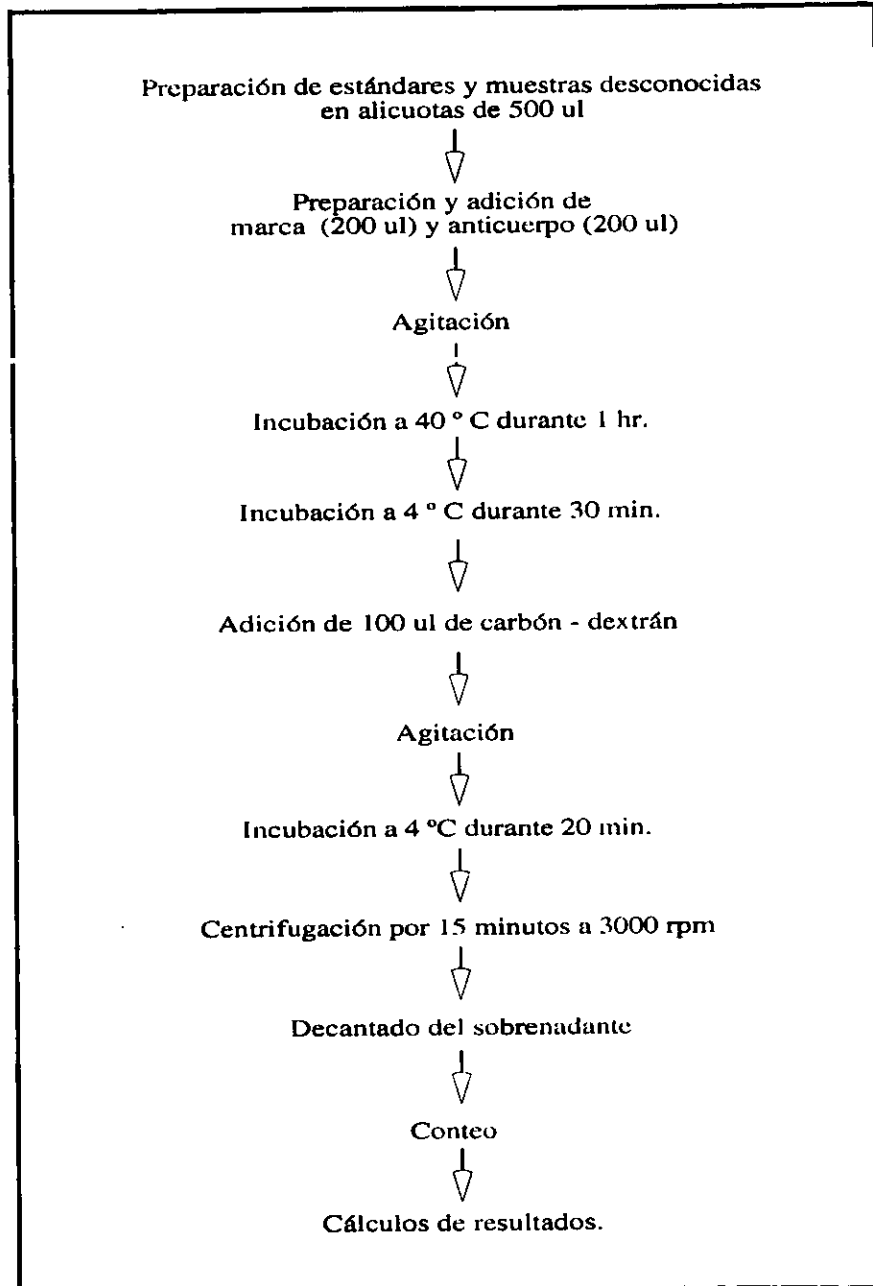


Figura 8b

RIA DE TESTOSTERONA



Ulloa-Aguirre y Cols., 1986 (175)

Figura 9

semanas y de dos mujeres en las 12.2, 23.1-24.2 y 36.2 semanas de gestación fueron utilizadas para valorar su vida media plasmática, su tasa de depuración y su tiempo de residencia en la circulación. Para este propósito se utilizaron ratas machos adultos de la cepa Long Evans con peso de 380 a 400 grs. Bajo anestesia con ether a los animales se les instaló una cánula en la vena Yugular y posteriormente se les inyectó 50 ng de hCG inmunoreactiva por esta vía. Las muestras sanguíneas (150 μ l) fueron tomadas a los 5 y 10 minutos después de la inyección y posteriormente a intervalos de tiempo regulares de 10 a 60 minutos durante las siguientes 7 a 8 horas. Después de la toma de cada muestra sanguínea el volumen circulante fue sustituido con solución salina al 0.9%. Las muestras tomadas fueron mantenidas a 4°C durante 30 minutos y posteriormente fueron centrifugadas a 100 x g por 10 minutos, separándose el suero el cual fue congelado a -20°C hasta el día de la realización del RIA de hCG.

7.- VALORACION DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS CROMATOENFOQUES DE hCG.

Con la finalidad de valorar la reproducibilidad de los resultados encontrados por las cromatografías, la muestra de suero de una mujer a las 12.4 semanas de gestación fueron sometidas a un segundo cromatoenfoco después de un período de tiempo de veinte meses de haber realizado el primero, siguiendo la misma metodología descrita en el inciso D (1-5).

8.- ANALISIS ESTADISTICO

Como estadística descriptiva se utilizó promedio \pm desviación estándar ($X \pm DE$). Un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía fue utilizado para determinar diferencias entre los grupos. Cuando existieron diferencias una prueba de t de student fue usada para determinar cual promedio fue diferente. Una Análisis de Regresión Linear fue realizado para determinar el grado y la significancia de la asociación entre los valores de pH de la isoformas de hCG y sus correspondientes vidas medias plasmáticas. Probabilidades <0.05 se consideraron como estadísticamente significativas. La presencia de paralelismo entre las diversas curvas generadas en el bioensayo *in vitro*, así como la determinación de las dosis efectivas al 50% (DE_{50}) y potencias relativas de cada forma molecular fueron analizadas siguiendo el método de DeLean y cols.¹⁷⁶ Para determinar los parámetros cinéticos de las diferentes formas moleculares de hCG inyectadas a las ratas, se utilizó un programa de computadora interactivo para el análisis estadístico y farmacocinético de los datos (PKCALC).¹⁷⁷

V.- RESULTADOS

1.- CONCENTRACIONES EN SUERO DE hCG DURANTE EL EMBARAZO.

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 estudiadas. El promedio de la concentración de hCG en el primer trimestre fue de $9.86 \pm 5.23 \mu\text{g/ml}$ (incluyendo a las 5 pacientes que se solo se estudiaron a las 10-11 semanas de gestación). El promedio \pm desviación estándar en el segundo trimestre fue de $0.87 \pm 0.78 \mu\text{g/ml}$. En el tercer trimestre el promedio fue de $1.38 \pm 0.78 \mu\text{g/ml}$. La concentración de hCG significativamente más altas se presentó en el primer trimestre ($p < 0.01$) Tabla 2.

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

En la figura 10 se muestran los patrones representativos de la distribución de la hCG presente en los concentrados de suero obtenidos durante las diferentes periodos gestacionales estudiados, identificándose en cada una de las gráficas las diferentes isoformas de acuerdo a su pH de elución. Como puede observarse en las gráficas, se detectó inmunoreactividad de la hCG a lo largo de casi todo el pH analizado (7.4-4.0), así como en el pico de sal (región eluida con una solución de NaCl con la finalidad de obtener el material que no logró eluir dentro del intervalo de pH de 7.4-4.0). En cada una de las muestras estudiadas fue posible detectar la presencia de diferentes isoformas (5 a 8) de la hormona, con un claro predominio en la abundancia relativa de aquellas detectadas en valores de $\text{pH} < 5.49$; de hecho, entre el 46% y el 81% del total de la hCG recuperada correspondió a la forma más ácida (pico de sal). (Figura 10)

El porcentaje de hCG recuperado en cada región de pH del cromatoenfoco se muestra en la tabla 3 y figura 11. Se puede apreciar que las isoformas de hCG fueron menos ácidas conforme progresó el embarazo. Durante las semanas 10-11 de gestación el porcentaje de recuperación en las isoformas más ácidas de la hCG (área V, $\text{pH} < 3.7$) fue más del 80% del total de hCG recuperado después del cromatoenfoco; este porcentaje fue disminuyendo progresivamente y en forma significativa ($p < 0.05$) a 57.92%, 60.19% y 46.75% durante la semanas 12-15, 23-26 y 35-38 respectivamente (Tabla 3 y Figura 11). Por otro lado, las proporciones relativas de las isoformas

TABLA 2. Concentraciones promedio de hCG ($\mu\text{g/ml}$) en los diferentes trimestres del embarazo.

SUJETO No	1er TRIMESTRE	2º TRIMESTRE	3º TRIMESTRE
1	16.87	2.68	2.85
2	21.19	0.86	1.57
3	5.45	0.43	1.44
4	6.05	0.84	1.68
5	5.91	0.84	1.41
6	2.75	0.18	0.36
7	5.26	0.27	0.39
8	11.25	-	-
9	10.02	-	-
10	9.93	-	-
11	8.66	-	-
12	15.05	-	-
X \pm DE	9.86 \pm 5.23 *	0.87 \pm 0.78	1.38 \pm 0.78

* ANOVA $p < 0.01$
 $t = p < 0.01$ (1º vs 2º) (1º vs 3º)

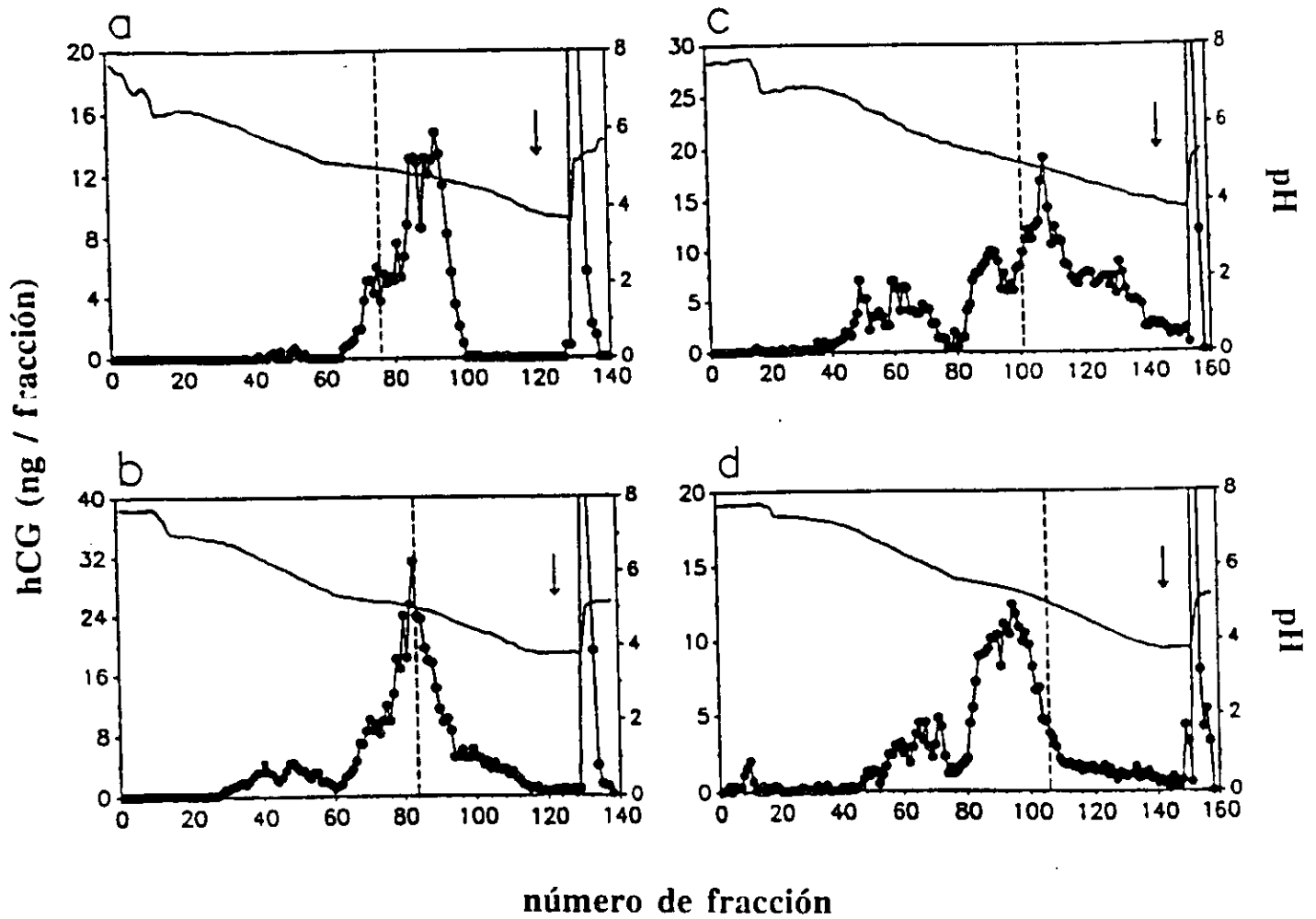


Figura 10.- Distribución de las isoformas de hCG después del cromatoenfoco de las muestras séricas provenientes de una mujer estudiada a las 10.8 semanas (a) y de otra mujer estudiada a las 12.2 (b), 24.8 (c) y 38.5 (d) semanas de gestación. Las flechas indican la adición de 1M de NaCl a las columnas de cromatoenfoco. Las líneas punteadas separan las isoformas con valores de pH <5 y >5.

TABLA 3. Porcentaje de hCG recuperado en cada una de las regiones de pH identificadas en los cromatogramas ($\bar{X} \pm DE$) de las muestras séricas de los sujetos estudiados en los diferentes trimestres del embarazo.

Area de pH	SEMANAS DE EMBARAZO				
	10.0-10.8 n=5	12.1-14.8 n=7	23.1-26.4 n=7	35.5-38.4 n=7	
Región I (>7.0-6.50)	0.14 ± 0.10	1.07 ± 0.92	1.63 ± 1.52	1.34 ± 1.64	
Región II (6.49-5.50)	0.83 ± 0.92 *	7.05 ± 2.91	10.37 ± 11.34	8.87 ± 5.87	
Región III (5.49-4.50)	16.28 ± 8.13*	29.86 ± 6.80	20.81 ± 11.11	39.28 ± 12.86 **	
Región IV (4.49-3.70)	1.64 ± 1.79	4.09 ± 1.69	6.83 ± 5.02	3.69 ± 2.56	
Región V (Pico de sal)	81.07 ± 9.91*	57.92 ± 2.71	60.17 ± 5.17	46.75 ± 6.01 **	

* p<0.05 10.0-10.8 semanas vs 12.1-14.8, 23.1-26.4 y 35.5-38.4

** p<0.05 35.5-38.4 semanas vs 10.0-10.8, 12.1-14.8 y 23.1-26.4

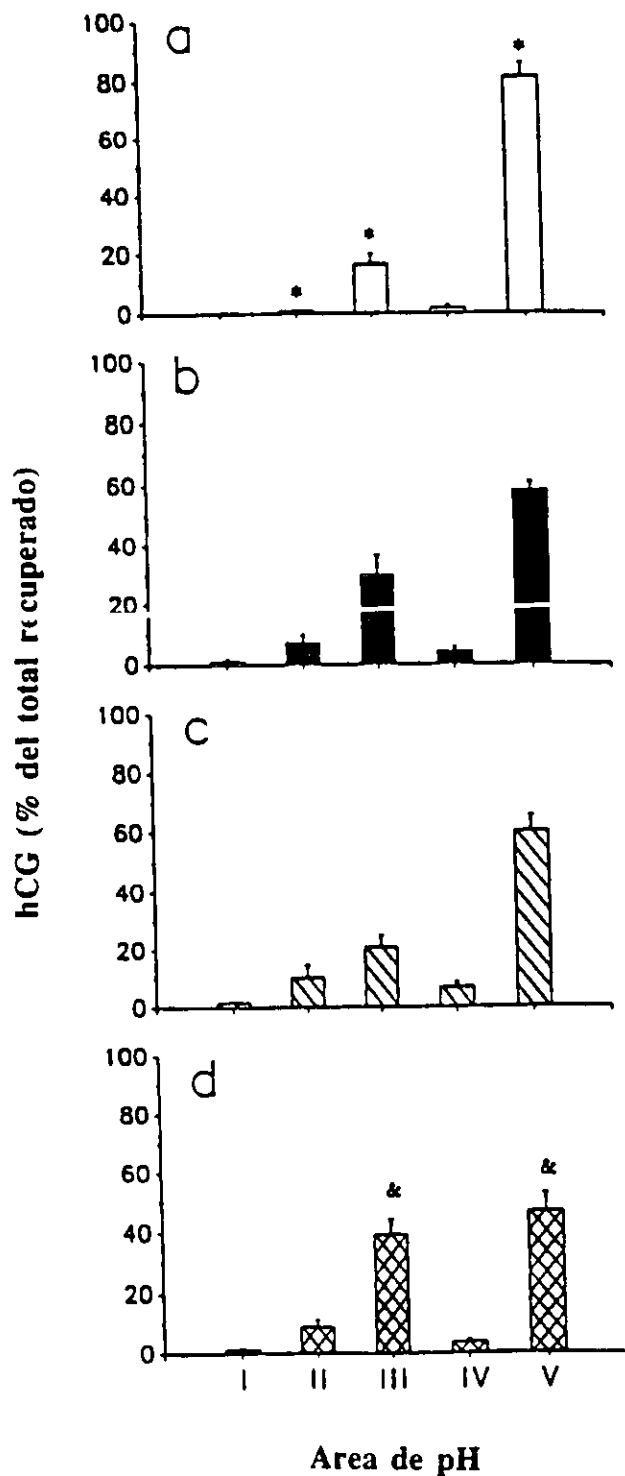


Figura 11.- Porcentaje de hCG inmunoreactiva identificada dentro de cinco áreas de pH (I=pH>7.0-6.50, II=pH 6.49-5.50, III=pH 5.49-4.50, IV=pH 4.49-3.70 y V=pH <3.7) después del cromatoenfoco de muestras séricas provenientes de mujeres en las 10-11 (a), 12-15 (b), 23-26 (c) y 35-38 (d) semanas de gestación. Los valores representan la $\bar{X} \pm DE$. * $p < 0.05$ 10-11 vs 12-15, 23-26 y 35-38 semanas en la misma área de pH. & $p < 0.05$ 35-38 vs 10-11, 12-15 y 23-26 semanas de gestación.

poco ácidas recuperadas en las áreas de pH II y III (pH 6.49 a 4.50) fueron casi no detectables en las semanas 10-11, incrementándose al final del primer trimestre (12-15 semanas) en aproximadamente 10 y 5% respectivamente y permaneciendo sin cambios durante las semanas 23-26; posteriormente se observó un incremento en forma significativa ($p < 0.05$) en la proporción relativa de la isoforma de hCG en la área III al final del tercer trimestre del embarazo. La proporción relativa de hCG recuperada en las áreas de pH I y IV incrementaron ligeramente a través del embarazo, pero estos cambios no fueron estadísticamente significativos. (Tabla 3 y Figura 11).

En la figura 12 A-F se muestran los resultados del recromatofoco de concentrados obtenidos de cada una de los picos de hCG identificados después del cromatofoco (figura 12 parte superior) de una muestra de suero de una mujer en las 12.2 semanas de gestación. Las seis isoformas recromatofocadas con pH de 6.68-6.01, 6.22-5.53, 5.42-5.07, 5.13-4.63, 4.30-3.99 y < 3.9 (pico de sal) eluyeron en el mismo pH que en el cromatofoco original.

3.- BIOACTIVIDAD *in vitro* DE LAS DIFERENTES FORMAS MOLECULARES DE LA hCG DURANTE EL EMBARAZO.

Las concentraciones de hCG de los concentrados correspondientes a las áreas I y II a las 10-11 semanas y de la área I a las 36-39 semanas de gestación fueron insuficientes para valorar la actividad biológica *in vitro*. 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 cada una de las isoformas de la hCG obtenidas en el cromatofoco como se muestra en la figura 13. Las concentraciones de hCG de los concentrados utilizados para valorar la actividad biológica *in vitro* fueron determinadas por RIA.

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 sí (Figura 13). Como puede observarse en las gráficas, las curvas dosis-respuestas de las isoformas más ácidas correspondientes a las fracciones de pH < 4.49 (áreas IV y V) se mantuvieron a la derecha de las curvas dosis-respuesta de las isoformas con valores de pH > 4.50 (áreas I a III). Por lo tanto, las isoformas poco ácidas tuvieron mayor bioactividad *in vitro* que las isoformas más ácidas.

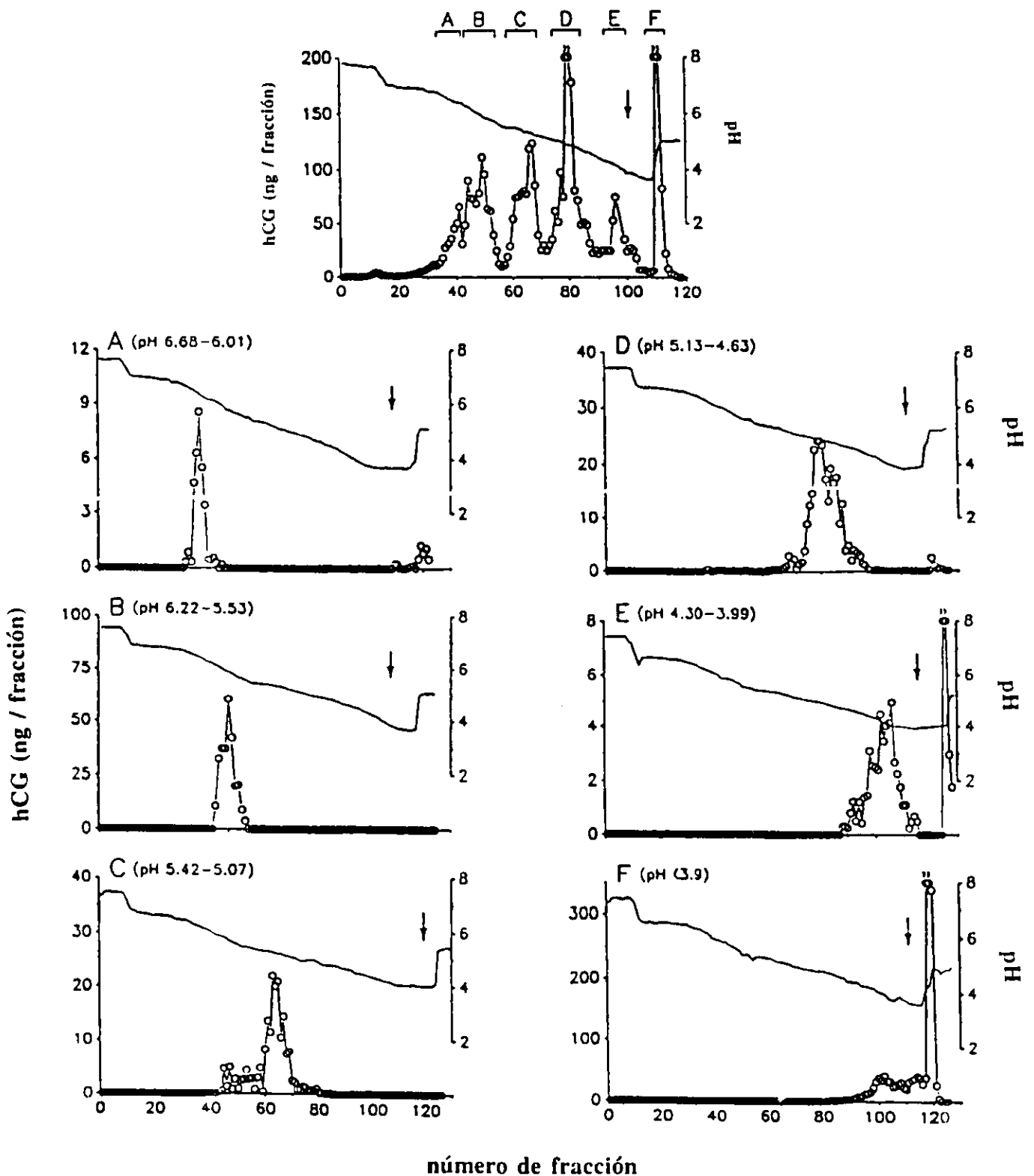


Figura 12.- Recromatoenfoco de las diferentes isoformas de hCG con valores de pH de 6.68-6.01 (A), 6.22-5.53 (B), 5.42-5.07 (C), 5.13-4.63 (D), 4.30-3.99 (E) y <3.9 (pico de sal) (F). Los diferentes picos de hCG inmunoreactiva (A-F figura superior), identificados después del cromatoenfoco de una muestra sérica obtenida de una mujer a las 12.2 semanas de gestación, fueron dializadas, congeladas, resuspendidas en start buffer y posteriormente re-cromatoenfocadas en columnas individuales (figuras A-F). Las flechas indican la adición de 1M de NaCl a las columnas de cromatoenfoco.

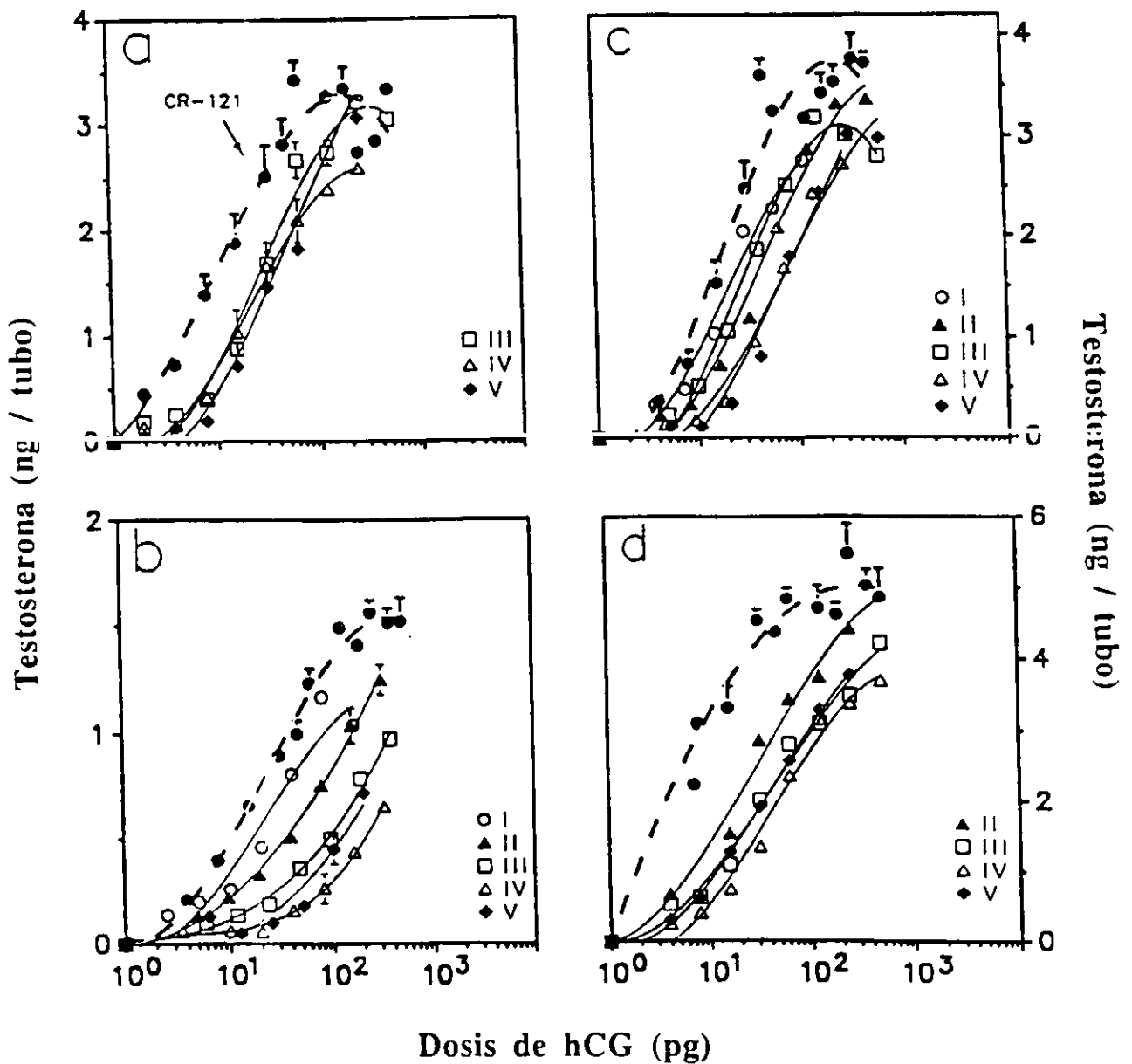
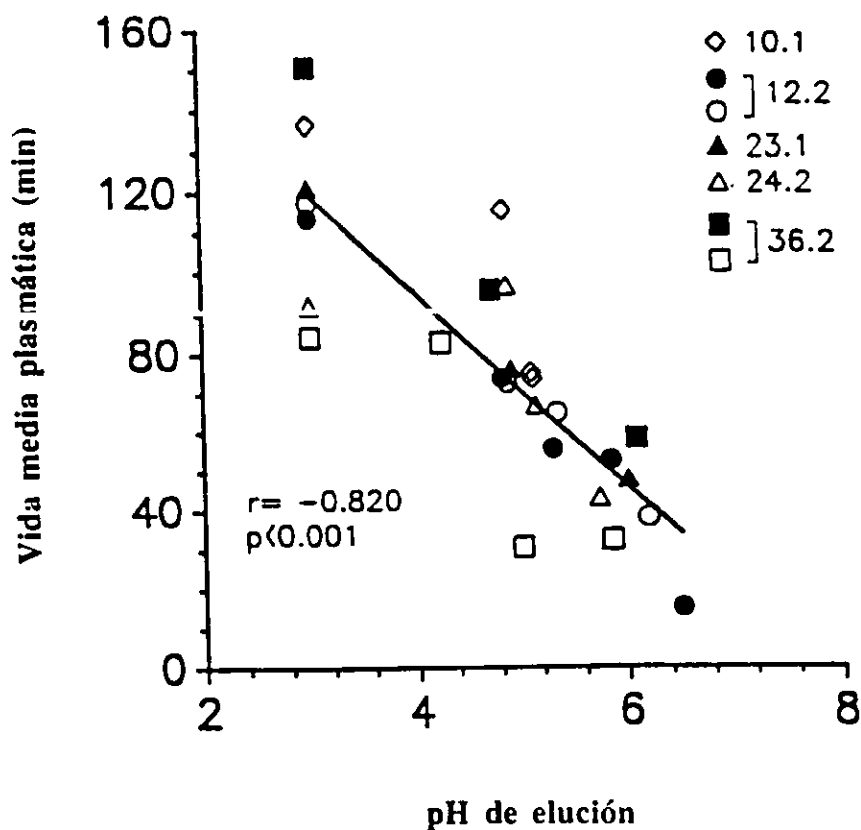


Figura 13.- Curvas dosis - respuesta representativas de la producción de testosterona durante la estimulación de las células de leydig de ratón con la hCG inmunoreactiva identificada dentro de las 5 áreas de pH (I= $pH > 7.0-6.50$, II= $6.49-5.50$, III= $5.49-4.50$, IV= $4.49-3.70$ y V= <3.7) después del cromatoenfoco de las muestras séricas provenientes de mujeres en las 10-11 (a), 12-15 (b), 23-26 (c) y 35-38 (d) semanas de gestación. La dosis es expresada en términos del estándar de hCG-CR121 cuantificada por RIA.

4.- DEPURACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA hCG EN LA CIRCULACION DE LA RATA.

Después de inyectar las diferentes isoformas de hCG en las ratas machos, los resultados de la depuración de ésta mostraron que la vida media plasmática de la hCG circulante fue aumentando conforme disminuyó el valor de pH de cada una de las isoformas. En el primer trimestre del embarazo, el promedio y la desviación estándar de la vida media plasmática de las isoformas más ácidas (pH=<3.7) fue de 116.3 ± 23.0 min, mientras que la vida media plasmática de las isoformas intermedias (pH= 4.25 a 5.31) y menos ácidas (pH= 5.74 a 6.50) fue de 75.5 ± 20.6 y 41.2 ± 14.3 min respectivamente. Estas diferencias fueron significativas ($p<0.01$) al compararse las isoformas más ácidas vs intermedias y menos ácidas; así como intermedias vs menos ácidas. En la figura 14 podemos observar la significativa relación inversa ($r=p<0.001$) que existió entre la media del valor de pH y la vida media plasmática de las isoformas de la hCG circulante.



VI. DISCUSION.

Estudios previos de Ulloa-Aguirre y cols⁷² han demostrado que el trofoblasto humano secreta diferentes formas de hCG durante su diferenciación morfológica y funcional en tejidos. Empleando este sistema de cultivos *in vitro*, en el cual se pueden reproducir los eventos citoplasmáticos y funcionales que ocurren durante la gestación temprana,¹⁷⁸ ellos demostraron que las moléculas de hCG más ácidas y sializadas aumentan en forma progresiva conforme la diferenciación morfofuncional del trofoblasto va progresando. Estas observaciones indican que algunas de las isoformas de hCG identificadas en suero y orina de mujeres¹⁶¹ pueden ser directamente producidas por la placenta y entonces ser liberadas a la periferia.

En el presente estudio, nosotros hemos demostrado que el patrón de distribución por carga de la hCG circulante cambia a través del embarazo. Los cambios iniciales detectados en los especímenes de suero analizados fue una disminución en forma significativa de la proporción relativa de las isoformas más ácidas ($\text{pH} < 3.7$) con un concomitante aumento en las isoformas con valores de pH de 6.49 a 4.50. Estos cambios iniciales en la secreción de las isoformas poco ácidas ocurrió entre las 11 y 15 semanas de gestación, hallazgo que

concuera con un estudio previo en el cual emplearon una técnica diferente de separación en base a la carga eléctrica de la molécula.¹⁶⁷ Además con el cromatoenfoco, que fue la técnica utilizada por nosotros para identificar las diferentes isoformas, pudimos detectar la presencia de un segundo mayor pico de producción de isoformas de hCG poco silizadas durante el tercer trimestre del embarazo. Estas observaciones indican que además de las alteraciones en su cadena peptídica [presencia de cortes en la fracción βhCG (hCG - hendida)],^{116-118,121} las modificaciones estructurales de la hCG secretada durante los dos últimos trimestres del embarazo también involucra cambios en el grado de sialización y estructura de carbohidratos. Por lo tanto, las bajas concentraciones de hCG durante este periodo del embarazo, pueden ser debidas a los cambios en la cadena peptídica y estructura de los carbohidratos.

Todas las isoformas de hCG circulantes identificadas en este estudio mostraron una actividad biológica *in-vitro* menor que el estándar de hCG urinario altamente purificado que se utilizó como referencia. Esto sugiere, que durante el procesamiento de las muestras para obtener las diferentes isoformas, éstas perdieron algo de su actividad biológica pero no su

actividad inmunológica. Sin embargo, también observamos que las isoformas menos ácidas mostraron una mayor bioactividad en relación con su inmunoactividad que las formas más ácidas. Estos resultados concuerdan con los observados por Ulloa-Aguirre y cols.⁷² con las diferentes isoformas de hCG secretadas *in-vitro* por el citotrofoblasto humano y por Yoshimura y cols.¹⁷⁹ con las diferentes isoformas de hCG aisladas de molas hidatidiformes. Estas diferencias en la bioactividad entre las isoformas menos y más ácidas pueden ser debidas a la presencia de los carbohidratos cargados más negativamente (por la presencia del ácido siálico) en las isoformas más ácidas,^{72,179} los cuales pueden disminuir la interacción entre la hormona y su receptor.¹⁸⁰ Además ha sido demostrado que las isoformas de hCG poco sializadas y glicosiladas pueden ser más potentes que la hCG intacta en estimular la producción de AMPc en células de ovario de hamster chino que expresan un receptor funcional para Hormona Estimulante del Tiroides (TSH).¹⁸¹ Por otro lado, es poco probable que la potencia biológica reducida que presentan las isoformas más ácidas pudiera estar relacionada a la presencia de los cortes en la cadena peptídica de la subunidad β .¹²¹

Hasta el momento no existen evidencias de que isoformas altamente ácidas sean más susceptibles a desactivación por la presencia de los cortes en su cadena peptídica que las isoformas menos ácidas. Si esto fuera cierto, la presencia de una alta proporción de isoformas más ácidas (isoformas detectadas

predominantemente en todos los trimestres del embarazo) con cortes en su cadena peptídica explicarían, el porqué de la producción y liberación de isoformas poco ácidas y más altamente biológicas, así como la disminución en la relación bio/inmuno *in-vitro* de la mezcla de las isoformas circulantes de hCG conforme progresa el embarazo.^{65 y presente estudio.}

Varios estudios¹⁸²⁻¹⁸⁵ han demostrado la existencia de una estrecha relación entre el contenido de ácido siálico, la carga y la vida media plasmática de las gondotropinas. Las diferencias observadas en cuanto a la carga media y punto isoeléctrico de las isoformas de la hCG circulante son debidas probablemente a sus diferencias en el contenido de ácido siálico, como ha sido demostrado para isoformas de hCG urinarias y provenientes de molas hidatidiformes.^{148,179} Por otro lado, la hCG sérica proveniente de etapas tardías del embarazo, tiene una menor carga negativa y es depurada rápidamente de la circulación al compararse con la hCG de etapas tempranas del embarazo.¹⁶⁶

De acuerdo con esto datos, nosotros encontramos que la vida media plasmática de las diferentes isoformas de la hCG presentes a lo largo de todo el embarazo correlaciona altamente con su pH de elución. Independientemente de las semanas de gestación en las cuales fueron obtenidas las muestras séricas, las isoformas poco ácidas desaparecieron más rápidamente de la circulación de la rata que las isoformas más ácidas. A pesar de que

los estudios farmacocinéticos^{160,166} de las diferentes isoformas de hCG han sido realizados en roedores, la evidencia de que la abundancia relativa de las isoformas séricas poco ácidas de la hCG es reducida comparada con la abundancia relativa de las isoformas más ácidas en extractos placentarios, sugiere que un comportamiento similar pudiera estar ocurriendo en el plasma humano y que después de ser secretadas estas isoformas poco ácidas son rápidamente eliminadas de la circulación que las isoformas más ácidas (más sializadas).

En el presente estudio, encontramos una clara relación entre el tipo de isoforma (altamente ácida, medio ácida y poco ácida), la semana de gestación y vida media plasmática de la hCG. Sin embargo, aunque no fue posible examinar la presencia de cortes de la cadena peptídica en las diferentes isoformas de hCG estudiadas, los datos sugieren que variaciones en el contenido de ácido siálico pudieran ser importantes para determinar la extensión y la participación de estos cortes en la vida media de la hormona en la circulación.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos que están involucrados en la regulación de la producción de la hCG. Algunos cambios en la producción y secreción de esteroides sexuales y de otros factores no esteroidales tales como el factor liberador de gonadotropinas (GnRH) e inhibina, han sido asociados con las modificaciones en las moléculas de LH y FSH.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Por lo tanto, modificaciones en la glicosilación y sialización de la

hCG a través del embarazo pudieran ser debidas a cambios en las concentraciones séricas de estradiol y progesterona, pero hasta el momento no existen evidencias que demuestren esta relación causal. Por otro lado, se sabe que ciertos factores no esteroidales de origen placentario y no placentario están involucrados en la producción y secreción de la hCG *in vitro*^{73,80, 189-191} y AMPc ha mostrado tener un efecto regulador en la producción de isoformas ácidas en cultivos de citotrofoblasto humano.⁷² Futuros estudios deberán ser realizados para determinar si estos factores tienen alguna participación en la regulación de la síntesis y secreción de las diferentes isoformas de la hCG *in vivo*.

Aún cuando, la heterogeneidad de la molécula de hCG está bien establecida, en la actualidad se desconoce cuál es el papel funcional de la hormona durante el segundo y tercer trimestre del embarazo; así como, cuál es el significado biológico de esta variedad de isoformas. Es bien sabido, que la hCG tiene un papel importante en el mantenimiento del cuerpo lúteo en las primeras etapas de la gestación, al igual que otros factores endocrinos, paracrinos y autocrinos provenientes de la madre y el feto.^{81,90,192-195}

De manera especulativa, las diferentes isoformas de hCG pudieran estar participando en el control de una gran variedad de respuestas de diferentes células blancas y durante períodos específicos de gestación en los cuales se requiere un control preciso de la duración e intensidad del estímulo de la hCG. Tal

como en el embarazo, donde algunas isoformas de la hCG para inducir actividad tiroidea,¹⁷⁹ pudieran estar actuando sobre otra célula blanco al unirse a los distintos receptores de hCG.¹⁹⁶

Es probable que la heterogeneidad de la hCG pudiera representar un adicional y fino mecanismo, através del cual la placenta regula diferentes funciones en la madre y el feto durante el embarazo.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pierce JG: The subunit of pituitary thyrotropin - their relationships to other glycoprotein hormones. *Endocrinology*. 89:1331, 1971.
- 2.- Swaminathan N, Bahl OP: Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun*. 40:422, 1970.
- 3.- Ross GT: Clinical relevance of research on the structure of human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol*. 129:795, 1977.
- 4.- Husa RO: Biosynthesis of human chorionic gonadotropin. *Endocrin Rev*. 1:268, 1980.
- 5.- Morgan FJ, Birken S, Canfield RE: The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The α subunits and β subunits. *J Biol Chem*. 250:5247, 1975.
- 6.- 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.
- 7.- Birken S and Canfield RE: Isolation and amino acid sequence of COOH-terminal fragments from the beta subunits of human choriogonadotropin. *J Biol Chem*. 252:5386, 1977.
- 8.- Bonduelle MI, Dodd R, Liebaers I, Van-Steirteghem A, Williamson R, Akhurst R: Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod*. 3:909, 1988.
- 9.- Hay DI, Lopata A: Chorionic gonadotropin secretion by human embryos in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 67:1322, 1988.
- 10.- Burner JA: Distribution of human chorionic gonadotropin in mother and fetus at various stages of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 11:360, 1951.
- 11.- 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.
- 12.- 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.
- 13.- Burnside J, Buckland PR and Chin WW: Isolation and characterization of the gene encoding the α -subunit of the rat pituitary glycoprotein hormone. *Gene*. 70:67, 1988.
- 14.- Naylos SL, Chin WW, Goodman HM, Lalley PA, Grzeschik KH and Sakaguchi AY: Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic Cell Genetics*. 9:757, 1983.
- 15.- Boorstein WR, Vamvakopoulos NS and Fiddes JC: Human chorionic gonadotrophin β -subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem and inverted pairs. *Nature*. 300:419, 1982.
- 16.- Graham MY, Otani T, Boime I, Oslén MV, Carle GF and Chaplin DD: Cosmid mapping of the human gonadotrophin β subunits genes by field- inversion gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. 15:4437, 1987.

- 17.- Anderson B, Kennedy GC, Nilson JH: A cis-acting element located between the cAMP response elements and CCAAT box augments cell-specific expression of the glycoprotein hormone alpha subunit gene. *J Biol Chem.* 265:, 21874, 1990.
- 18.- Pittman RH, Clay CM, Farmerie TA, Nilson JH: Functional analysis of the placenta-specific enhancer of the human glycoprotein hormone alpha subunit gene. Emergence of a new element. *J Biol Chem.* 269:19360, 1994.
- 19.- Horn F, Windle JJ, Barnhart KM, Mellon PL: Tissue-specific gene expression in the pituitary: The glycoprotein hormone alpha-subunit gene is regulated by a gonadotrope-specific protein. *Mol Cell Biol.* 12:2143, 1992.
- 20.- Drolet D, Scully KM, Simmons DM, Wegner M, Chu KT, Swanson LW: TEF, a Transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 5: 1739, 1991.
- 21.- Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG: Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* 4:695, 1990.
- 22.- Mulchahey JJ, Diblasio AM, Martin MC, Blumenfeld Z, Jaffe RB: Hormone production and peptide regulation of human fetal pituitary gland. *Endocr Rev.* 8:406, 1987.
- 23.- Begeot M, Hemming FJ, Dubbois PM, Combarous Y, Dubbois MP, Aubert ML: Induction of pituitary lactotrope differentiation by luteinizing hormone alpha subunit. *Science.* 226:566, 1984.
- 24.- Hollenberg AN, Pestell RG, Albanese C, Boers ME, Jameson JL: Multiple promoter elements in the beta subunit genes distinguish their expression from the luteinizing hormone beta gene. *Mol Cell Endocrinol.* 106:111, 1994.
- 25.- Jameson JL, Lindell CM, Habener JF: Evolution of different transcriptional start sites in the human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin beta-subunit genes. *DNA.* 5:227, 1986.
- 26.- Jameson JL, Lindell CM: Isolation and characterization of the human chorionic gonadotropin beta subunit (CG beta) gene cluster: regulation of transcriptionally active CG beta gene by cyclic AMP. *Mol Cell Biol.* 8:5100, 1988.
- 27.- Milstread A, Cox RP and Nilson HJ: Cyclic AMP regulates transcription of the genes encoding chorionic gonadotrophin with different kinetics. *DNA.* 6:213, 1987.
- 28.- Boothby M, KukowskaJ, Boime I: Imbalanced synthesis of human choriogonadotropin alpha and beta subunits reflects the steady state levels of the corresponding mRNAs. *J Biol Chem.* 258:9250, 1989.
- 29.- Norman RJ, Poulton T, Gard T and Chard T: Monoclonal antibodies to human chorionic gonadotrophin; implications for antigenic mapping immunoradiometric assay and clinical applications. *J Clin Endocrinol Metab.* 61:1031, 1985.
- 30.- Ayala AR, Bustos H, Aguilar RM: Daily rhythm of serum human chorionic gonadotropin and human chorionic somatomammotropin in normal pregnancy. *Inter J Gynecol Obst.* 22:173, 1984.
- 31.- Cole LA, Restrepo-Candelo H, Lavy G and Decherney A: hCG free β -subunit an early marker of outcome of *in vitro* fertilisation clinical pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 64:1328, 1987.

- 32.- Braunstein GD, Vaitukaitis JL, Crabone PP and Ross GT: Ectopic production of human chorionic gonadotrophin by neoplasma. *Ann Intern Med.*78:39, 1973.
- 33.- Cole La, Wang Y, Elliot M, Latiff M, Chambers JT, Chambers SK and Schwartz PE: Urinary human chorionic gonadotrophin free β -subunit and β -core fragment a new marker of ginecological cancers. *Cancer Research.* 48:1356, 1988.
- 34.- Iles RK, Purkis PE, Whitehead PC, Oliver RTD, Leigh I and Chard T: Expression of beta human chorionic gonadotrophin by non-trophoblastic non-endocrine 'normal' and malignant epithelial cells. *Br J Cancer.* 61:663, 1990.
- 35.- Iles RK and Chard T: Immunochemical analysis of the human chorionic gonadotrophin - like material secreted by 'normal' and neoplastic urothelial cells. *J Mol Endocrinol.* 2:107, 1989.
- 36.- Whitfield GK and Kourides IA: Expression of chorionic gonadotrophin α and β genes in normal neoplastic tissues; relationship to deoxyribonucleic acid structure. *Endocrinology.* 117:231, 1985.
- 37.- Iles Rk, Czepulkowski BH, Young BD and Chart T: Amplification or rearrangement of the β -human chorionic gonadotropiin (β -hCG)-numan LH gene cluster in not responsible for the ectopic production of β -hCG by bladder tumour cells. *J Mol Endocrinol.* 2:113, 1989.
- 38.- Hartl FU, Martin J, Neupert W: Protein folding in the cell: the rol of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 21:293, 1992.
- 39.- Georgopoulos C. The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem Sci.* 17:295, 1992.
- 40.- Knittler MR, Dirks , Haas IG: Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:1764, 1995.
- 41.- Ahluwalia N, Bergeron JJ, Wada I, Degen E, Williams DB: The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membrane protein. calnexin. *J Biol Chem.* 67:10914, 1992.
- 42.- Burns K, Michalak M: Interactions of calreticulin with proteins of the endoplasmic and sarcoplasmic reticulum membranes. *FEBS Lett.* 318:181, 1993.
- 43.- Ware FE, Vassilakos A, Peterson PA, Jackson MR, Lehrman MA, Williams DB: The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as a initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem.* 270:4697, 1995.
- 44.- Hebert DN, Foellmer B, Helenius A: Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 81:425, 1995.
- 45.- Fiedler K, Simons K: The role of N-Glycans in the secretory pathway. *Cell.* 81:309, 1995.
- 46.- Feng W, Matzuk MM, Mountjoy K, Bedows E, Ruddon RW, Boime I: The asparagine-linked oligosaccharides of the human chorionic gonadotropin beta subunit facilitate correct disulfide bond pairing. *J Biol Chem.* 270:11851, 1995.
- 47.- 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.

- 48.- Matzuk MM, Boime I: The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the alpha subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotropin. *J Cell Biol.* 106:1049, 1988.
- 49.- Matzuk MM, Boime I: Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the asparagine-linked oligosaccharides of chorionic gonadotropin beta subunit. *J Biol Chem.* 263:17106, 1988.
- 50.- Matzuk MM, Boime I: Mutagenesis and gene transfer define site-specific roles of the gonadotropin oligosaccharides. *Biol Reprod.* 40:48, 1989.
- 51.- Palade G: Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* 189:347, 1975.
- 52.- Wynn RM: Cytotrophoblastic specializations: and Ultrastructural study of the human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 114:339, 1972.
- 53.- Thliveris JA and Speroff L: Ultrastructure of the placental villi, chorion laeve, and decidua perietalis in normal and hipertensive pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 129: 492, 1977.
- 54.- Handwerger S, Wilson SP, Tyrey L and Conn PM: Biochemical evidence that human placental lactogen and human chorionic gonadotropin are not stored in cytoplasmic secretion granules. *Biol Rep.* 37:28, 1987.
- 55.- Folman R, Ilan J, Shiklosh J, De Groot N, Segral S, Hochberg AA: The synthesis and secretion of human chorionic gonadotropin by tissue slices from first trimester placentas. *Mol Biol Rep.* 5:175, 1979.
- 56.- 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 malignan cells. *J Biol Chem.* 255:1000, 1980.
- 57.- Hussa RO: Studies on human chorionic gonadotropin secretion: effects of EGTA, lanthanum and the ionophore A 23187. *J Clin Endocrinol Metab.* 44:520, 1977.
- 58.- Baxter JD, Funder JW: Hormone receptors. *N Eng J Med.* 301:1149, 1979.
- 59.- Catt KJ, Harwood JP, Aguilera G, Dufau ML: Hormonal regulation of peptide receptor and target cell response. *Nature.* 280:109, 1975.
- 60.- Barnea ER, Kaplan M: Spontaneous, gonadotropin-releasing-hormone induced and progesterone-inhibited pulsatil secretion of human chorionic gonadotropin in the first trimester placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 69:215, 1987.
- 61.- Odell WD, Griffin J: Pulsatil secretion of human chorionic gonadotropin in normal adults. *N Engl J Med.* 317:1688, 1987.
- 62.- 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.
- 63.- Ayala AR, Bustos H, Antunez O, Gonzalez E: Secrecion pulsatil de la gonadotropina coriónica humana. *Arch Invest Med (Mex).* 15:147, 1984.
- 64.- 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.

- 65.- Diaz-Cueto L, Méndez JP, Barrios de Tomasi J, Lee JY, Wide L, Veldhuis JD and Ulloa-Aguirre A: Amplitude regulation of episodic release, biological to immunological ration and median charge of human chorionic gonadotropin in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 78:890, 1994.
- 66.- Khodr GS, Siler-Khodr TM: Content of Luteinizing hormone-releasing factor and its synthesis. *Science.* 207:315, 1980.
- 67.- Siler-Khodr TM: Khodr GS: Content of luteinizing hormone-releasing factor in the human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 130:216, 1978.
- 68.- Khodr GS, Siler-Khodr TM: The effects of luteinizing hormone-releasing factor on human chorionic gonadotropin secretion. *Fertil Steril.* 30:301, 1978.
- 69.- Handwerger SJ, Barrett J, Tyrey L, Schomberg D: Differential effect of cyclic adenosine monophosphate an the secretion of human placental lactogen and human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 36:1268, 1973.
- 70.- Hussa RO, Patillo RA, Ruckert ACF, Schevermann KW: Effects of butyrate and dibutyrylcyclic AMP on HCG-secreting trophoblastic and non trophoblastic cell. *J Clin Endocrinol Metab.* 46:69, 1978.
- 71.- Feinman MA, Kliman HJ, Caltbiano S and Strauss III EF: 8-bromo-3', 5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblast in culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 63:1211, 1986.
- 72.- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Cravioto A, Grotjan E, Damian P, Espinoza R: Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotropin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Hum Reprod.* 5:661, 1990.
- 73.- 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 trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab.* 71:436, 1990.
- 74.- 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.
- 75.- Benveniste R, Speeg Jr KV, Carpenter G, Cohen S, lindner J, Rabinowitz D: Epidermal growth factor stimulate secretion of human chorionic gonadotropin by cultured human choriocarcinoma cell. *J Clin Endocrinol Metab.* 46:169, 1978.
- 76.- 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.
- 77.- Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Ayarzun E, Hobbins JC, Cerami A: Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 161:336, 1989.
- 78.- Walton PE, Cronin MJ: Tumor necrosis factor- α inhibits growth hormone secretion from cultured anterior pituitary cell. *Endocrinology.* 125:925, 1990.
- 79.- Walton PE, Cronin MJ: Tumor necrosis factor-alpha and interferon- gamma reduce prolactin release in vitro. *Am J Physiol.* 259:672, 1990.
- 80.- Ohashi K, Saji F, Kato M, Walkimoto A, Tanizawz O: Tumor necrosis factor- α inhibits human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 72:594, 1992.

- 81.- Licht P, Cao H, Lei ZM, Rao ChV and Merz E: Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology*. 133:3014, 1993.
- 82.- Chen HC, Hodgen GD, Matsuura S, Lin LJ, Gross E, Reichert Jr LE, Birken S, Canfield RE, Ross GT: Evidence for a gonadotropin from nonpregnant subjects that has physical, immunological, and biological similarities to human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73:285, 1976.
- 83.- Armstrong EG, Ehrlich PH, Birken S, Schlatterer JP, Siris E, Hembree WC, Canfield RE: Use of highly sensitive and specific immunoradiometric assay for detection of human chorionic gonadotropin in urine of normal, non-pregnant and pregnant individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 59:867, 1984.
- 84.- Ayala AR, Nisula BC, Chen HC, Hodgen GD, Ross GT: Highly sensitive radioimmunoassay for human chorionic gonadotropin in human urine. *J Endocrinol*. 125:477, 1990.
- 85.- 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.
- 86.- Birken S, Maydelman Y, Cawinowicz MA, Pound A, Liu Youping and Hartree A: isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 137:1402, 1996.
- 87.- Yen SSC and Jaffe RB(eds). *Protein hormones of the placenta decidua and fetal membranes*. Reproductive Endocrinology. 2nd. edition. Philadelphia, Saunders, 1985, 758-769.
- 88.- 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.
- 89.- Pittaway DE, Wentz AC: Evaluation of early pregnancy by serial chorionic gonadotropin determinations: A comparison of methods by receiver operating characteristics curve analysis. *Fertil Steril*. 43:529, 1985.
- 90.- Csapo AI, Pulkkinen MO, Wiest WG: Effects of luteectomy and progesterone replacement in early pregnant patients. *Am J Obstet Gynecol*. 115:759, 1973.
- 91.- 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.
- 92.- Mitchison NA: Gonadotrophin vaccines. *Current opinion Immunology*. 2:725, 1989.
- 93.- Stevens VC: Use of synthetic peptides as immunogens for developing a vaccine against human chorionic gonadotropin. In *Synthetic Peptides as Antigens*, pp 200-225, Chichester: John Wiley and Sons, 1986.
- 94.- 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.
- 95.- 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.
- 96.- Gillott DJ, Iles RK and Chard T: The effects of β -human chorionic gonadotropin on the in vitro growth of bladder cancer cell lines. *Br J Cancer*. 7:323, 1996.
- 97.- Muckherjee K and Das S: A placental glycoprotein, human chorionic gonadotropin, as a growth factor stimulant of murine tumor cell. *IRCS Med Sci*. 12:1101, 1984.

- 98.- Kumar S, Talwar GP and Biswas DK; Necrosis and inhibition of growth of human lung tumor by anti- α human chorionic gonadotropin antibody. *J Natl Cancer Inst.* 84:42, 1992.
- 99.- Rivera RT, Pasion SG and Wong DT: Loss of tumorigenic potential by human lung tumor cell in the presence of antisense RNA specific to the ectopically synthesized alpha subunit of human chorionic gonadotropin. *J Cell Biol.* 108:2423, 1989.
- 100.- Alvarado MV, Russo J, Alvarado NE and Russo IH: Human chorionic gonadotropin inhibits proliferation and induces expression of inhibin in breast epithelial cells *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol.* 30A:4, 1994.
- 101.- Alvarado MV, Russo J and Russo IH: Immunolocalization of inhibin in the mammary gland of rats treated with hCG. *J Histochem. Cytochem.* 41:29, 1993.
- 102.- Alvarado MV, Ho TY, Russo J and Russo IH: Human chorionic gonadotropin regulates the synthesis of inhibin in the ovary and mammary gland of rat. *Endocrine.* 2:1107, 1994.
- 103.- Menduri G, Charnaux N, Loosfelt H, Jolivet A, Spyrtos F, Brailly S and Milgrom E: Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in breast cancer. *Cancer Res.* 57: 857, 1997
- 104.- Tsuruhara TE, Dufau ML, Hickman J and Catt KL: Biological properties of hCG after removal of terminal sialic acid and galactose residues. *Endocrinology.* 91:296, 1972.
- 105.- Nishimura R, Kitajima T, Hasegawa K, Takeuchi K and Mochizuki M: Molecular forms of human chorionic gonadotropin in choriocarcinoma serum and urine. *Jpn J Cancer Res.* 80:968, 1989.
- 106.- Nishimura R, Utsunomiya T, Ide k, Kitajima T, Chen HC, Strobel JL, Hussa RO and Mochizuki M: Characterization of human chorionic gonadotropin in urine of patients with trophoblastic diseases by Western blotting using specific antibodies. *Jpn J Cancer Res.* 78:833, 1987.
- 107.- Bliethe DL, Akar AH, Wehmann RE and Nisula BC: Purification of β core fragment from pregnancy urine and demonstration that its carbohydrate moieties differ from those of native human chorionic gonadotropin- β *Endocrinology.* 122:173, 1988.
- 108.- Birken S, Amstrong EG, Kolks MA, Cole LA, Agosto GM, Krichevsky A, Vaitukaitis JI, and Canfield RE: Structure of the human chorionic gonadotropin β -subunit fragment from pregnancy urine. *Endocrinology.* 123:572, 1988.
- 109.- Bliethe DL, Wehmann RE and Nisula BC: Carbohydrate composition of β -core. *Endocrinology* 125:2267, 1989.
- 110.- Krichevsky A, Armstrong EG, Schlatterer J, Birken S, O'Connor J, Bikel K, Silverberg S, Lustbader JW and Canfield RE: Preparation and characterization of antibodies to the urinary fragment of the human chorionic gonadotropin β -subunit. *Endocrinology.* 123:564, 1988.
- 111.- de Medeiros SF, Amato F, Matthews CD and Norman RJ: Urinary concentration of β core fragment of hCG throughout pregnancy. *Obstet Gynecol.* 80, 223, 1992.
- 112.- Wehmann RE, Bliethe DL, Flack MR and Nisula BC: Disparity between β -core levels in pregnancy urine and serum: implications for the origin of urinary β -core. *J Clin Endocrinol Metab.* 70:371, 1990.
- 113.- Wehmann RE, Bliethe DL, Flack MR and Nisula BC: Metabolic clearance rate and urinary clearance of purified β -core. *J Clin Endocrinol Metab.* 69:510, 1989.

- 114.- de Medeiros SF, Amato F, Bacich D, Wang L, Matthews CD and Norman RJ: Distribution of the β -core human chorionic gonadotrophin fragment in the human body fluids. *J Endocrinol.* 135:175, 1992.
- 115.- Cole LA and Birken S: Origin and occurrence of human chorionic gonadotropin β -subunit core fragment. *Mol Endocrinol.* 2:825, 1988.
- 116.- Kardana A, Elliott MM, Gawinowicz MA, Birken S and Cole LA: The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). I Characterization of peptide heterogeneity in 13 individuals preparations of hCG. *Endocrinology.* 129:1541, 1991.
- 117.- Birken S, Gawinowicz MA, Kardana A and Cole LA: The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). II. Characteristics and origins of nicks in hCG reference standards. *Endocrinology.* 129:1551, 1991.
- 118.- Cole LA, Kardana A, Andrade-Gordon P, Gawinowicz MA, Morris JC, Bergert ER, O'Connor J and Birken S: The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked hCG. *Endocrinology.* 129:1559, 1991.
- 119.- Puisieux A, Bellet D, Troalen F, Razafindratsita A, Lhomme C, Bohuon C and Bidart JM. Occurrence of fragmentation of free and combined forms of the β subunit of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 126: 687, 1990.
- 120.- Kardana A and Cole LA: Polypeptide nicks cause erroneous results in assays of human chorionic gonadotropin free β -subunit. *Clin Chem.* 38:26, 1992.
- 121.- Cole LA, Kardana A, Park SY and Braunstein GD: The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Metab.* 76:704, 1993.
- 122.- Laphorn JJ, Harria DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield JE, Machin KJ, Morgan FJ and Isaacs NW: Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature.* 369:455, 1994.
- 123.- Sun PD, Davies DR: The Cystine-Knot growth-factor superfamily. *Annu RevBiophys Struct.* 24:269-1995.
- 124.- Furuhashi M, Ando H, Bielinska M, Pixley MR, Shikone T, Hsueh AJW and Boime I: Mutagenesis of cysteine residues in the human gonadotropin α subunit. *J Biol Chem.* 269:25543, 1994.
- 125.- Furuhashi M, Suzuki Shoji and Sukanuma N: Disulfide bonds 7-31 and 59-87 of the α -subunit play a different role in assembly of human chorionic gonadotropin and lutropin. *Endocrinology.* 139:4196, 1996.
- 126.- Sukanuman N, Matzuk M and Boime I: Elimination of disulfide bonds affects assembly and secretion of the human chorionic gonadotropin beta subunit. *J Biol Chem.* 264:19302, 1989.
- 127.- Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO, Vutyavanich T: Structure-function relationships of gonadotropins. *Rec Progres Horm Res.* 43:383, 1987.
- 128.- Keutmann HT: Receptor-binding regions in human glycoprotein hormones. *Molec Cell Endocr.* 86:C1-C6, 1992.
- 129.- Keutmann HT, Mason KA, Kitzmann K and Ryan RJ: Role of the beta 93-100 determinant loop-sequence in receptor binding and biological activity of human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Molec Endocr.* 3:526, 1989.
- 130.- Huang J, Ujihara M, Xia H, Chen F, Yoshida H and Puett D: Mutagenesis of the "determinant loop" region of human choriogonadotropin beta. *Molec Cell Endocr.* 90:211, 1993.

- 131.- Chen F and Puett D: Contribution of Arginines-43 and-94 of human choriogonadotropin β to receptor binding and activation as determined by oligonucleotide-based mutagenesis. *Biochemistry*. 30:10171, 1991.
- 132.- Keutmann HT, Charles worth MC, Kitzmann K, Mason KA, Johnson L and Ryan RJ: Primary and secondary structural determinants in the receptor binding sequence β (38-57) from human luteinizing hormone. 27:8939, 1988.
- 133.- Chen F, Wang Yi and Puett D: The carboxy terminal region of glycoprotein hormone α -subunit contributions to receptor binding and signaling in human chorionic gonadotropin. *Molec Endocr*. 6:914, 1992.
- 134.- Xia H, Chen F and Puett D: A region in the human glycoprotein hormone α -subunit important in holoprotein formation and receptor binding. *Endocrinology*. 134:1768, 1994.
- 135.- 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.
- 136.- Sairman MR: Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *Faseb J*. 3:1915, 1989.
- 137.- Van Hall EV, Vaitukaitis JL, Ross GT, Hickman JW and Ashwell G: Effects of progressive desialylation on the rate of disappearance immunoreactive hCG from plasm in rats. *Endocrinology*. 89:11, 1971.
- 138.- Manjunath P and Sairam MR: Biochemical, biological, and immunological properties of chemically deglycosylated human choriogonadotropin. *J Biol Chem*. 257:7109, 1982.
- 139.- Matzuk MM, Keene JL, Boime I: Site Specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J Biol Chem*. 264:2409, 1989.
- 140.- Matzuk MM, Hsueh AJ, Lapolt P, Tsafirri A, Keene JL and Boime I: The biological role of the carboxyl-terminal extension of human chorionic gonadotropin β subunit. *Endocrinology*. 126:376, 1990.
- 141.- Van Hall EV, Vaitukaitis JL and Ross GT: Immunological and biological activity of hCG following progressive desialylation. *Endocrinology*. 88:456, 1971.
- 142.- Strollo F, Harlin J, Hernandez-Montes H, Robertson D, Saidi AA and Diczfalusy E: Qualitative and quantitative differences in the isoelectrofocusing profile of biologically active lutropin in the blood of normally menstruating and posmenstruating women. *Acta Endocrinol*. 97:166, 1981.
- 143.- Reader SCJ, Robertson WR and Diczfakusy E: Microheterogeneity of luteinizing hormone in pituitary glands from women of pre - and post-menopausal age. *Clinical Endocrinol*. 53:355, 1983.
- 144.- 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.
- 145.- Snyder PJ, Hildegard M, Bashey M, Montecinos A, Odell WD and Spitalnik L: Secretion of multiple forms of human luteinizing hormone by cultured fetal human pituitary cell. *J Clin Endocrinol Metab*. 68:1033. 1989.
- 146.- Graesslin D, Leidenberg FA, Lichtenberg V, Glismann D, Hess N: Existence of big and little forms of luteinizing hormone in human serum. *Acta Endocrinol*. 83:466, 1976.

- 147.- Robertson DM, Van Damme MP, Diczfalussy 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 .
- 148.- Nwokoro N, Chen H, Chrambach S: Physical, biological and immunological characterization of highly purified urinary human chorionic gonadotrophin components-separated by gel electrofocusing. *Endocrinology.* 108:291, 1981.
- 149.- Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P and Chappel SC: Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Human Reproduction.* 3:491, 1988.
- 150.- Wide L: Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:682, 1982.
- 151.- Ulloa-Aguirre A, Mejia JJ, Dominguez R, Guevara-Aguirre J, Diaz Sanchez V and Larrea F: Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in male rat: isoelectric focusing throughout sexual maturation. *J Endocrinol.* 110:539, 1986.
- 152.- Lichtenberg V, Weise HC, Graesslin D and Bettendorf G: Polymorphism of human pituitary luteinizing hormone (LH). Effect of the seven isohormones on mouse Leydig cell functions. *FEBS Letters.* 169:21, 1984.
- 153.- Chappel SC, Bethea CL and Spies HG: Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of cynomolgus monkeys. *Endocrinology.* 115:452, 1984.
- 154.- Blum W, Gupta D: Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing studies on serum FSH, hormone released in vitro and metabolic clearance rates of its various forms. *J Endocrinol.* 105:29, 1985.
- 155.- Wide L and Hobson BM: Qualitative difference in follicle-stimulating hormone activity in pituitaries of young women compared to that of men and elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 56:371, 1983.
- 156.- Ulloa-Aguirre A, Midgley R Jr, Beitins IZ and Padmanabhan V: Follicle-Stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. *Endocr Rev.* 16:765, 1995
- 157.- Wide L: Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. II. Relationship to sex and age. *Acta Endocrinol.* 109:190, 1985.
- 158.- Peckham WD, Knobil E: The effects of ovariectomy, estrogen replacement and neuraminidase treatment on the properties of the adenohipophysial glycoprotein hormones of the rhesus monkey. *Endocrinology.* 98:1054, 1976.
- 159.- Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Diaz-Cueto L, Veldhuis JD and Ulloa-Aguirre A: Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 80:1647, 1995.
- 160.- Graesslin D, Lichtenberg V, Holtje F, Schedlinski G and Rinne G: The role of sialic acid for survival of gonadotrophins and the different hCG isohormones in placenta, serum and urine. *Acta Endocrinol.* 105 (Suppl.262): A81, 1984.
- 161.- Lichtenberg V, Holthe F, Graesslin D and Bettendorf G: Different degree of polymorphism of hCG in placenta, serum and urine. *Acta Endocrinol.* 111 (Suppl. 274): A153, 1986.
- 162.- Wide L: An immunological method for the assay of human chorionic gonadotrophin. *Acta Endocrinol (Copenh).* Suppl 70:1, 1962.

- 163.- Wide L and Hobson B: New method for diagnosis of hydatidiform mole. *Lancet*. 2:699, 1964.
- 164.- Wide L and Hobson B: Immunological and biological activity of human chorionic gonadotropin in urine and serum of pregnant women and women with a hydatidiform mole. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 58:473, 1968.
- 165.- Hobson B and Wide L: Human gonadotropin excretion by men and women with invasive trophoblast assayed by an immunological and biological method. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 58:473, 1968.
- 166.- Wide and Hobson B: Some qualitative differences of hCG in serum from early and late pregnancies and trophoblastic diseases. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 116:465, 1987.
- 167.- Wide L, Lee JY and Rasmussen C: A Change in the isoform of human chorionic gonadotropin occurs around the 13th week of gestation. *J Clin Endocrinol Metab*. 78:1419, 1994.
- 168.- Sandlaer SG, Beyth Y, Laufer N, Levence C: Autologous blood transfusions and pregnancy. *Obstet Gynecol*. 53:625, 1979.
- 169.- Kruskal MS, Leonard S, Klapiroiz H. Autologous blood donation during pregnancy: analysis of safety and blood use. *Obstet Gynecol*. 70:938, 1987.
- 170.- Herbert WNP, Owen HG, Collins ML: Autologous blood storage in obstetrics. *Obstet Gynecol*. 72:166, 1988.
- 171.- Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura O, 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*. 126:323, 1990.
- 172.- Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL: World Health Organization Special Programme of Research Development and Research training in Human Reproduction. Programme for the prevention of matched reagents for radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology. *Method Manual*, Tenth Edition, WHO, Geneva, Switzerland. 1986.
- 173.- Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of ¹³¹I-labeled-human growth of high specific radioactivity. *Biochem J*. 89:114, 1963.
- 174.- 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*. 77:655, 1974.
- 175.- Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Diaz-Sanchez V, Altamirano A and Perez Palacios G: Self-priming effects of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab*. 61:926, 1985
- 176.- 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.
- 177.- Shumaker CR: PKCALC: A basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metab Rev*. 17:331, 1986.
- 178.- Kliman HJ, Feinman M and Strauss JF: Differentiation of human cytotrophoblast into syncytiotrophoblast in culture. *Trophoblast Res*. 2:407, 1987.

- 179.- Yoshimura M, Pekary AE, Pang XP, Berg L, Goodwin TM, Hershman JM: Thyrotropic activity of basic isoelectric forms of human chorionic gonadotrophin extracted from hydatidiform mole tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 78:862, 1994.
- 180.- Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L and Chappel S: Production of all follicle-stimulating isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod.* 30:382, 1984.
- 181.- Yoshimura M, Hershman JM, Pang XP, Berg L, Perkary AE: Activation of the thyrotropin (TSH) receptor by human chorionic gonadotrophin and luteinizing hormone in Chinese hamster ovary cell expressing functional human TSH receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 77:1009, 1993.
- 182.- Rosa C, Amr S, Birken S, Wehmann R, Nisula B: Effects of desialylation of human chorionic gonadotropin on its metabolic clearance rate in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 59:1215, 1984.
- 183.- Wide L: The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 112:336, 1986.
- 184.- Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Díaz Sanchez V: Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod.* 7:23, 1992.
- 185.- Chappel SC: Heterogeneity of follicle-stimulating hormone: control and physiological function. *Hum Reprod. Update.* 5:479, 1995.
- 186.- Galle PC, Ulloa-Aguirre A and Chappel SC: Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J Endocrinol.* 99:31, 1983.
- 187.- Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitnis IZ: Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 67:465, 1988.
- 188.- Phillips DJ and Wide: Serum gonadotropin isoform become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab.* 79:814, 1994.
- 189.- Belisle S, Guevin J-F, Bellabarba D and Lehoux J-G: Luteinizing hormone-releasing hormone binds to enriched human placental membranes and stimulates *in vitro* the synthesis of bioactive human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 59:119, 1984.
- 190.- Petraglia F, Vaughn J and Vale W: Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured placental cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:5224, 1989.
- 191.- Barnea ER, Neubraun D and Shurtzvirski R: Effects of insulin on human chorionic gonadotropin secretion by placental explants. *Hum Reprod.* 8:858, 1993.
- 192.- Huhtaniemi IT, Korenbrot CC and Jaffe RB: hCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 44:963, 1977.
- 193.- Braunstein GD: Physiologic function of human chorionic gonadotropin during pregnancy. In Mochizuki M and Husa R. (eds). *Placental Protein Hormones.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp.33-41, 1988.

- 194.- Lei ZM and Rao ChV: Gonadotropin receptors in human fetoplacental unit: implications for hCG as an intracrine, paracrine and endocrine regulator of human fetoplacental function. *Trophoblast Res.* 6:213, 1992.
- 195.- Eta E, Ambrus G and ChV: Direct regulation of human myometrial contractions by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 79:1582, 1994.
- 196.- McIlroy PJ: Differences in the characteristics and distribution of rat luteal receptors for native and deglycosylated human choriongonadotropin. *Biol Reprod.* 47:97, 1992.

IX.- APENDICE

AMINOACIDO

CODIGOS

Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ac. Asnártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Ac. Glutámico	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

Amplitude Regulation of Episodic Release, *in Vitro* Biological to Immunological Ratio, and Median Charge of Human Chorionic Gonadotropin in Pregnancy*

LAURA DÍAZ-CUETO†, JUAN P. MÉNDEZ, JORGELINA BARRIOS-DE-TOMASI,
JIA-YING LEE, LEIF WIDE, JOHANNES D. VELDHUIS‡,
AND ALFREDO ULLOA-AGUIRRE

Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (L.D.-C., J.P.M., J.B.-D.-T., A.U.-A.), Mexico City, Mexico; the Department of Clinical Chemistry, University Hospital (J.-Y.L., L.W.), Uppsala, Sweden; and the Department of Internal Medicine, University of Virginia Health Sciences Center (J.D.V.), Charlottesville, Virginia 22908

ABSTRACT

In the present study, we examined the regulation of 24-h serum immunoreactive levels, *in vitro* biological to immunological (B/I) ratio, and median charge of circulating CG at the end of the first, second, and third trimesters of human gestation. Seven pregnant women were prospectively studied at 12–15, 23–26, and 35–38 weeks of gestation. Blood was sampled every 20 min over a 24-h period, and serum CG concentrations were determined by RIA. Pulse detection and analysis of the 24-h rhythm of serum immunoreactive CG concentrations were carried out by the program Cluster and cosine curve fitting, respectively. The *in vitro* biological activity of circulating CG was determined by the mouse Leydig cell-testosterone production bioassay, and the median charge of its isoforms was determined by zone electrophoresis in agarose suspension. The immunoreactive levels of CG present at the end of each trimester of gestation fluctuated over a 24-h period; such variability exceeded that of the within-assay coefficient of variation of the CG RIA and could be resolved into a series of CG peaks and valleys. Although no trend in the number of peaks or valleys was systematically found in relation to gestational age, comparisons between the amplitude and area of the CG peaks revealed that these pulse parameters were significantly higher at 12–15 weeks than at 23–26 and 35–38 weeks of gestation. Cosine fits for 24-h rhythms revealed the existence of significant nyctohemeral profiles of serum CG levels in all women studied at

12–15 weeks, in four subjects at 23–26 weeks, and in six women at 35–38 weeks gestation. The time of acrophase was highly homogeneous only between 12–15 weeks of gestation, occurring between 1057–1452 h in six of the women. The *in vitro* B/I ratio of CG contained in serum pools from 12–15 weeks was significantly ($P < 0.05$) higher than that exhibited by CG during later gestational periods (B/I ratio at the end of first trimester, 1.14 ± 0.14 ; second trimester, 0.87 ± 0.22 ; third trimester, 0.79 ± 0.12). hCG isoforms at 12–15 weeks were more negatively charged than those circulating at 23–26 and 35–38 weeks of gestation. There were no significant differences between the B/I ratio and the median charge of CG molecules from the second and third trimesters.

We conclude that serial serum concentrations of CG throughout pregnancy show significant amplitude-modulated pulsatile release and nyctohemeral variations. The amplitude-regulated pulsatile mode of release is probably endowed by the placenta. These changes in episodic CG release throughout gestation are concomitantly accompanied by alterations in the molecular structure of the gonadotropin, thus indicating the existence of a variety of distinct mechanisms through which the placenta regulates the intensity, biochemical composition, and/or clearance of the CG signal. (*J Clin Endocrinol Metab* 78: 890–897, 1994)

HCG is a glycoprotein hormone produced by the syncytiotrophoblasts of the placenta (1, 2). Its circulating levels vary profoundly throughout pregnancy; from an early rise, its production peaks at approximately 8–12 weeks of gestation, thereafter declines, and then remain constant until term (3–6). Although it is well known that this gonadotropin plays a luteotropic role in early pregnancy, its functional

roles after this period remain unknown. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that during early pregnancy, hCG is secreted episodically from the placenta, and this variability in the levels of hCG may be resolved into a short term pattern of pulses similar to that demonstrated by the pituitary members of the gonadotropin family (7–11). In addition to differences in plasma hCG concentrations between early and late pregnancy, the type of hCG molecule circulating during the first trimester and the episodic manner of *in vitro* hCG secretion differ from those in late pregnancy (11–14); this suggests the existence of a variety of distinct mechanisms through which the placenta can regulate the potency, biochemical composition, and/or clearance of the hCG signal.

In the present study, we have explored some of these issues with the following goals: 1) to characterize the regulation of episodic and nyctohemeral release of serum immunoreactive hCG throughout normal gestation, and 2) to define qualitative differences among the hCG molecules circulating during the different trimesters in terms of median

Received September 7, 1993. Accepted January 11, 1994.

Address all correspondence and requests for reprints to: Alfredo Ulloa-Aguirre, M.D., Ph.D., Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición SZ, Vasco de Quiroga no. 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico.

* This work was supported by grants from the WHO (Geneva, Switzerland) and the Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH, Mexico City; to A.U.-A.).

† Postgraduate student supported by the Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), Universidad Nacional Autónoma de México, and the Ministry of Health (SS), Mexico City.

‡ Supported in part by a NIH Research Career Development Award (1K04-HD-00634) from the NICHD (Bethesda, MD).

CG RELEASE IN PREGNANCY

charge and ability to induce a biological response at the target cell level.

Subjects and Methods

Seven pregnant women, aged 22–32 yr, agreed to participate in the study. Approval from the ethical committee of the institute and informed written consent from the volunteers were obtained. All subjects were in good general health and had conceived spontaneously, with the exception of a woman with polycystic ovarian disease, who received clomiphene citrate for ovulation induction. The length of gestation for each pregnancy was determined in accordance with the date of the last menstrual period. All women were studied at the end of the first (12.1–12.7 weeks; one subject at 14.8 weeks), second (23.1–26.4 weeks), and third (35.5–38.4 weeks) trimesters of pregnancy. Each subject was admitted to the metabolic unit the night before the study day. Venous blood samples were obtained from an indwelling heparinized iv catheter every 20 min for 24 h, starting at 0800 h. Subjects were recumbent in bed during the study, consumed a regular diet (lunch at 1300 h, dinner at 1900 h), and were instructed to try to sleep at 2200 h. Blood samples (a total of 73/subject-day of study) were allowed to clot at room temperature for 30 min and centrifuged at $1000 \times g$, and the sera were stored at -20°C until the day of the assays. All subjects delivered normal healthy infants (3 males and 4 females) at 37.7–40.7 weeks of gestation.

Hormonal assays

RIA of hCG. Each set of samples from a subject (73 samples/subject-trimester) was analyzed for hCG content by RIA, using the hCG RIA kit provided by the NIDDK (Bethesda, MD) (15). Briefly, hCG-CR121 was iodinated by the chloramine-T method, and this same preparation was employed to construct the standard curve. Anti-hCG-H80 (batch 2), at a final dilution of 1:100,000, was used as antiserum; this antiserum exhibits 1.2% and 3.2% cross-reactivities with free hCG α - and β -subunits, respectively, and is insensitive to nicking of the hCG molecule (16). Samples from each set were diluted with 0.05 mol/L phosphate buffer such that all of the dose levels tested fell on the linear portion of the standard curve (Fig. 1). Each sample was assayed in triplicate incubations. To avoid interassay variations, all samples from a single study day were analyzed in the same batch. The sensitivity of the assay was 1.0 IU/L. The intraassay coefficient of variation was determined using multiple replicates ($n = 9$) of three serum pools, with dose levels ranging from 6,000–110,000 IU/L, which displaced the ^{125}I hCG from the antibody at 21–27%, 45–59%, and 73–80% total binding after being diluted for each assay as the unknown samples; this coefficient ranged from 2.3–8.9%. Each set of samples was diluted and assayed in two independent RIAs to assess hCG pulse reproducibility and concordance. Results were expressed as international units per L according to the WHO Third International Standard of hCG for immunoassay (coded 75/537).

In vitro bioassay. The *in vitro* bioactivity of hCG contained in serum pools made from aliquots of each individual series of samples (one pool per subject/trimester) was assessed employing the mouse Leydig cell testosterone (T) production assay described by Van Damme *et al.* (17). The standard curve was constructed using the hCG-CR121 preparation as standard. To avoid interassay variations, all sets of diluted pools from a single subject were tested in the same assay at seven different concentrations in triplicate incubations; the mean intraassay coefficient of variation was 7.6%. The quantity of T produced *in vitro* was determined by RIA, as previously described (18). All samples from a single bioassay were analyzed for T content in the same batch; the mean intraassay coefficient of variation was less than 5%. Tests for parallelism among the slopes generated by the different hCG samples (standard and unknowns) assayed by the *in vitro* bioassay and estimation of maximal T responses were performed following the method of De Lean *et al.* (19). The apparent *in vitro* biological activity of hCG was expressed in terms of the biological to immunological (B/I) activity ratio.

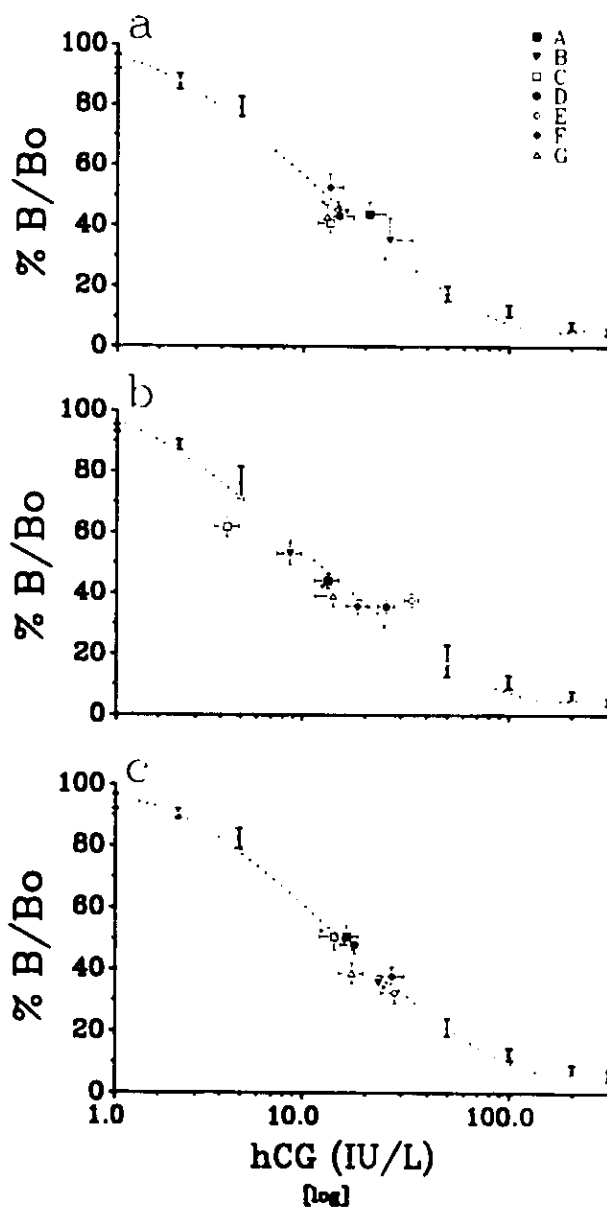


FIG. 1. The standard curves of the hCG RIA system employed in the present study (---), and the positions of the unknown samples assayed (symbols) with respect to the corresponding curve. In each panel (a, RIAs of samples from 12–15 weeks; b, samples from 23–26 weeks; c, samples from 35–38 weeks of gestation), doses throughout the dotted curve are the mean \pm SD of 14 observations, and each symbol represents the mean \pm SD of the dose and percent binding observed for each set of unknown samples from subjects A–G (73 samples/subject). B/Bo, Bound/Bound at zero dose.

Zone electrophoresis in agarose suspension

The zone electrophoresis of the serum samples was performed as previously described (12, 20) with few modifications. The median charge of the hCG isoforms in serum was determined by electrophoresis of 0.5 mL serum in 1.3×67 -cm columns with 0.10% agarose (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) suspension in 0.075 mol/L sodium veronal buffer (pH 8.6) for 20 h at a current of 50 mamp. The electrophoretic mobility of hCG was expressed in relation to that of human serum albumin as albumin mobility units. The technique provides a nonsieving separation

with migration velocities similar to those in free solution, and the mobility of human serum albumin was estimated to be 12 cm²/s·V toward the anode. The mean (\pm SD) recovery of hCG activity after electrophoresis was 102 \pm 4.9% (n = 21). hCG in fractions eluted after electrophoresis was measured with a noncompetitive time-resolved sandwich fluorimmunoassay (21, 22) (Delfia hCG, Wallac OY, Turku, Finland). Cross-reactivities with hCG α , hCG β , and human LH were less than 2.0%, less than 2.5%, and less than 0.5%, respectively.

Statistical analysis

The serial fluctuating concentrations of serum hCG over 24 h were resolved into pulsatile patterns employing the statistically based peak detection algorithm described by Veldhuis and Johnson (Cluster analysis) (23), using a conservative peak detection cluster configuration of three points in the test nadir and two points in the test peak, with a *t* statistic of 2.84 for up- and down-strokes (1% apparent false positive rates). The parameters estimated on each set of samples included the number of detected peaks (where peaks were defined as the number of significant serum hCG increases followed by significant decreases detected during the 24-h sampling period), peak amplitude [expressed as the absolute value (international units per L) of the maximal hCG concentration attained within the peak (maximal peak height)], incremental peak amplitude [incremental increase in the largest value expressed as an increment (algebraic difference) between the largest value and the preceding nadir], peak area [the product of the mean peak amplitude that is above the diagonal connecting the two flanking nadirs times the time interval (peak duration)], number of valleys, and nadir hormone concentrations. Each set of data was analyzed for differences between trimesters using one-way analysis of variance, followed by the Bonferroni protected Student's paired two-tailed *t* test. Investigation of nyctohemeral periodicities was carried out by nonlinear least squares cosinor analysis (cosine curve fitting of each 24-h pattern of immunoreactive hCG levels) (24); between-group differences in amplitude (defined as 50% difference between zenith and nadir), phase (time of maximal value of the 24-h rhythm), and mesor (mean value about which the 24-h rhythm oscillates) were analyzed by nonparametric techniques (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests). Between-group differences in *in vitro* maximal T responses, hCG B/I ratio, and electrophoretic mobility were analyzed by analysis of variance, as described above.

Results

24-h profiles of serum hCG concentrations

The mean coefficients of variation for each hCG data series were 18 \pm 1.9%, 12 \pm 1.3% and 15 \pm 1.8% for samples from 12–15, 23–26, and 35–38 weeks of gestation, respectively. All of these coefficients were greater than the intraassay coefficient of variation for the hCG RIA (absolute range, 2.3–8.9%). Resolution of the two series of concentration values obtained from the RIAs of each 24-h set of samples into

series of hCG peaks and valleys revealed an overall rate of reproducibility in the number and position of these parameters of 70 \pm 1.3% (68 \pm 7.6%, 70 \pm 4.2%, and 73 \pm 5.2% for 12–15, 23–26, and 35–38 weeks of gestation, respectively). There were no significant differences between the attributes of these coincident peaks and valleys (peak height, peak amplitude and area, and nadir concentrations) derived from the two sets of data analyzed (not shown). To analyze differences between trimesters, only the data derived from pulses reproduced in both independent RIAs and Cluster analysis were considered. Table 1 summarizes the quantitative characteristics of the episodic concentrations of serum hCG throughout gestation. Integrated concentrations of serum hCG were higher in samples obtained at 12–15 weeks of gestation than in those from 23–26 and 35–38 weeks (*P* < 0.01). Comparisons between the amplitude (in terms of both maximal peak height and incremental peak amplitude) and area of the hCG peaks resolved by Cluster analysis revealed that these parameters were significantly higher at 12–15 weeks than at 23–26 and 35–38 weeks of gestation. These changes were specific, because no trend in the number of peaks or valleys was found in relation to gestational age. There were no significant differences in the pulsatile characteristics of serum hCG levels when the data from the time intervals 0800–2000 and 2000–0800 h were analyzed separately and compared. Figure 2 illustrates the 24-h profiles of serum hCG levels in a women sampled at 12.2, 24.2, and 36.2 weeks of gestation.

To determine whether there was a meal effect on the appearance of hCG valleys, areas under the serum hCG curves corresponding to postprandial periods (2 h after lunch and 3 h after dinner) in every subject's hCG data series were normalized to a percentage of the mean of the immediate 2 h (for lunch) or 3 h (for dinner) preprandial values. A postprandial fall in serum hCG levels was detected exclusively in samples obtained between 12–15 weeks of gestation. In these samples, a significant decline in mean serum hCG levels was observed only after dinner (1900–2200 h), with reductions of 12 \pm 3.8%, 15 \pm 5.12%, 16 \pm 7.0%, and 13 \pm 4.6% occurring 60–120 min after initiation of the corresponding meal (*P* < 0.01). Nevertheless, only one of the women showed the presence of a valley during this postprandial fall in hCG levels, representing 3.7% of the total valleys registered during 24 h in all seven subjects sampled

TABLE 1. Pulsatile characteristics of immunoreactive hCG from seven pregnant women sampled every 20 min for 24 h at the end of the first, second, and third trimesters of gestation

Characteristic	Weeks gestation		
	12-15	23-26	35-38
No. of peaks/24 h	4.3 \pm 0.7	4.0 \pm 0.3	4.4 \pm 0.6
Maximal peak ht (IU/L \times 10 ³)	104 \pm 29*	10 \pm 4.0	13 \pm 2.4
Incremental peak amplitude (IU/L \times 10 ³)	38 \pm 14*	3.2 \pm 1.6	3.2 \pm 0.8
Area (IU/L \times 10 ³ · min)	1520 \pm 336*	176 \pm 84	200 \pm 57
No. of valleys/24 h	3.8 \pm 1.1	2.1 \pm 0.5	3.6 \pm 0.9
Nadir concentrations (IU/L \times 10 ³)	59 \pm 14*	6.4 \pm 3.2	8.8 \pm 1.6
Integrated hCG conc. (IU/L \times 10 ³ · 24 h)	77 \pm 18*	8.0 \pm 2.4	10 \pm 1.6

Values represent the mean \pm SEM of the data derived from pulses detected by Cluster analysis and reproduced in two independent RIAs.
* *P* < 0.01, 12–15 weeks vs. 23–26 and 35–38 weeks of gestation.

CG RELEASE IN PREGNANCY

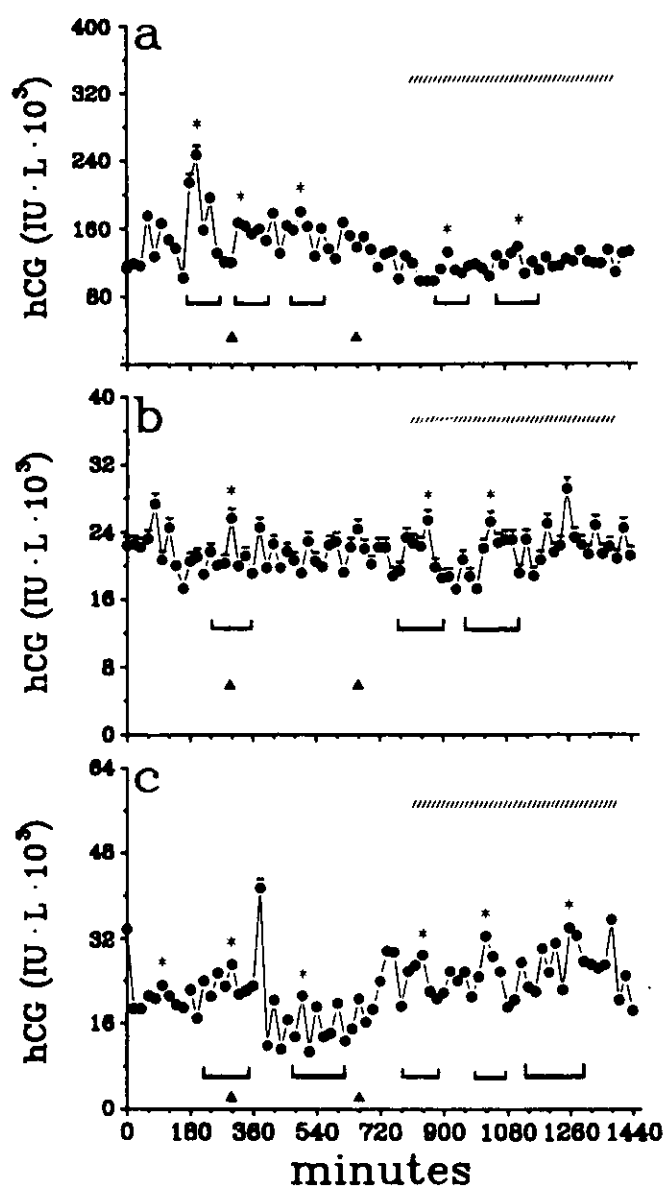


FIG. 2. The 24-h profiles of serum immunoreactive hCG levels in a pregnant women sampled at 12.2 (a), 24.2 (b), and 36.2 (c) weeks of gestation. The onsets and offsets of the peaks reproduced in two independent RIAs and detected by Cluster analysis are denoted by the brackets opening upward. Asterisks denote the maximal peak value. ▲, Ingestion of lunch and dinner. Upper horizontal bars denote the sleep periods.

at the end of the first trimester.

Cosine curve fitting of the 24-h profiles of serum immunoreactive hCG concentrations revealed the existence of significant basal 24-h rhythms in all seven women from 12–15 weeks, in four from 23–26 weeks, and in six from 35–38 weeks of gestation (Table 2). The mean amplitude and mean value (mesor) of this 24-h rhythm were higher ($P < 0.05$) at 12–15 weeks than at later gestational ages. At the end of the first trimester, the acrophase occurred between 1057–1452 h in six women (Fig. 3); at the end of the third trimester, it

TABLE 2. Cosine fits of 24-h rhythms of serum hCG concentrations in seven pregnant women studied at the end of the first (1st; weeks 12–15), second (2nd; weeks 23–26), and third (3rd; weeks 35–38) trimesters of gestation

Subject	Cosine fits								
	Amplitude ^a (IU/L × 10 ³)			Time of acrophase ^b (clocktime, h)			Mesor ^c (IU/L × 10 ³)		
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
A	21.6	NS	1.5	1400	NS	0734	136	NS	24.8
B	39.2	0.53	1.0	1057	1236	1430	136	6.8	12.0
C	4.9	0.29	2.1	1201	1745	1524	42.4	3.4	11.2
D	7.0	0.41	1.7	1130	2001	0145	47.2	6.6	12.8
E	4.5	NS	2.0	1230	NS	1439	46.4	NS	10.4
F	2.6	NS	NS	1452	NS	NS	21.6	NS	NS
G	3.4	0.28	0.62	1907	1245	1400	41.6	2.2	5.5
Mean (median)	11.8 ^d	0.37 ^e	1.5	(1230)	(1457)	(1415)	67.3 ^d	4.7 ^e	12.8
SEM	5.2	0.06	0.24				18.0	1.1	2.6

Only the 24-h fits that are statistically significant at $P < 0.05$ are shown. NS, Not significant.

^a Defined as 50% of the difference between zenith and nadir.

^b Times of occurrence of maxima of the best curve fit.

^c Mean value about which the 24-h rhythm oscillates.

^d $P < 0.01$ vs. 2nd and 3rd trimesters.

^e $P < 0.01$ vs. 3rd trimester.

occurred within this same time period in four subjects and later (0145 and 0734 h) in two. During weeks 23–26, the time of the acrophase was not so homogeneous, and only in two hCG patterns with statistically significant 24-h fits did the acrophase occur early in the afternoon (Table 2).

In vitro B/I ratio of hCG

All serum pools from each set of samples were able to induce significant and parallel curves for dose-dependent T production when analyzed in the mouse Leydig cell bioassay (Fig. 4a). Although in no dose-response curves were significant within-subject differences between the maximal T responses induced by samples from different gestational ages (maximal response in samples from 12–15 weeks, 49.3 ± 2.3 nmol/L; 23–26 weeks, 52.0 ± 2.7 nmol/L; 35–38 weeks, 51.3 ± 2.4 nmol/L; $P = NS$), the corresponding B/I ratios were significantly higher at 12–15 weeks of gestation than at 23–26 and 35–38 weeks (mean B/I ratio at the end of first trimester, 1.14 ± 0.14 ; second trimester, 0.87 ± 0.22 ; third trimester, 0.79 ± 0.12 ; $n = 6$ samples/trimester; $P < 0.05$, first vs. second and third trimesters; $P = NS$, second vs. third trimester). Serum samples from individual hCG peaks and nadirs identified after Cluster analysis of the concentration values at 12–15 weeks of gestation were also tested for *in vitro* hCG bioactivity. There were no significant differences between the B/I ratio of hCG in peaks and corresponding nadirs (mean B/I ratio of peak samples, 1.08 ± 0.29 ; nadir samples, 1.28 ± 0.33 ; Fig. 4b).

Median charge of hCG

The results obtained from the electrophoretic analysis of individual serum specimens are shown in Table 3. In six of the seven pregnant women, hCG obtained between 12–15

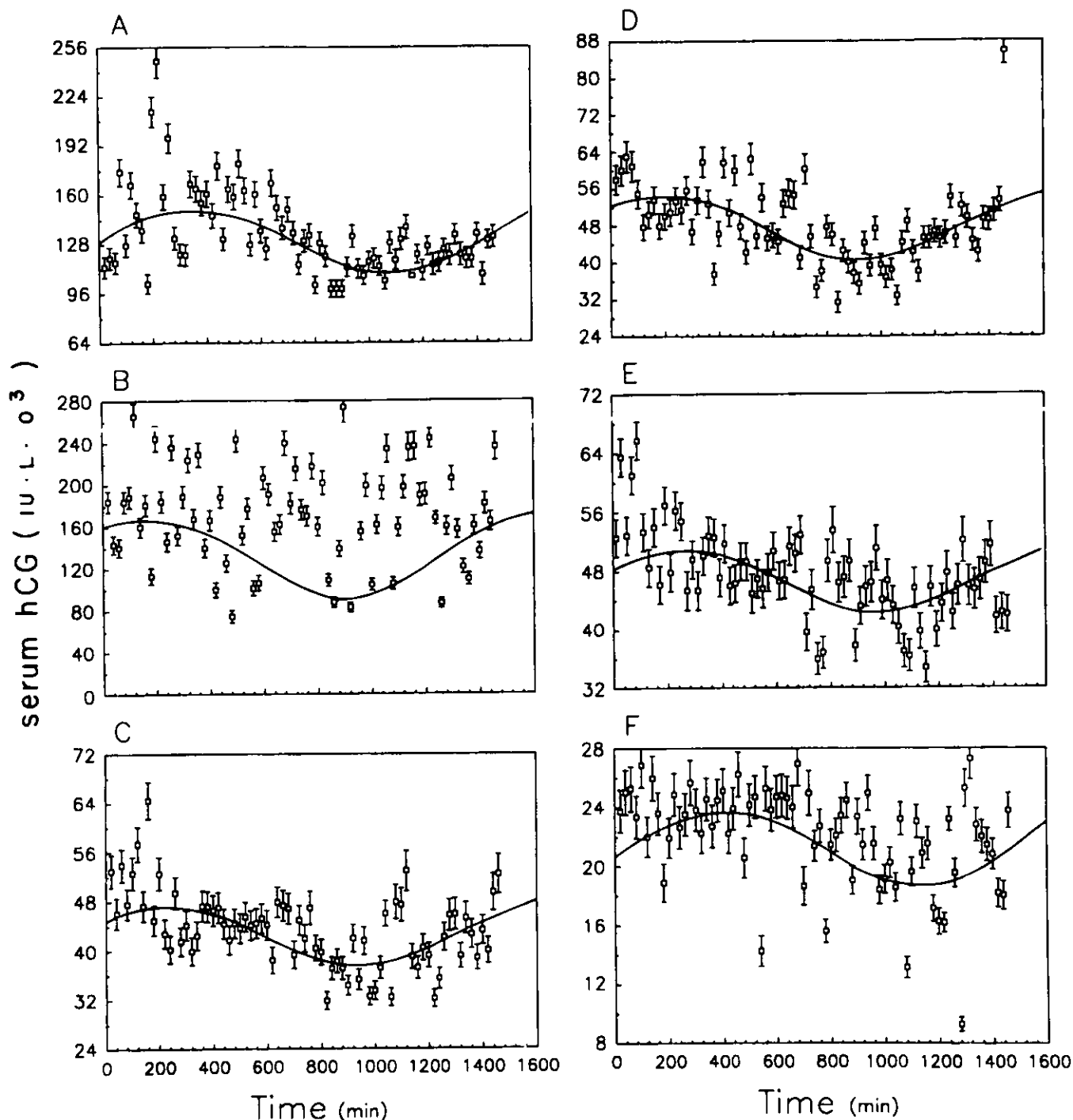


FIG. 3. Cosinor analysis of 24-h rhythms of serum immunoreactive hCG concentrations in six pregnant women (subjects A-F) studied at 12-15 weeks of pregnancy.

weeks gestation was more negatively charged than that circulating at 23-26 and 35-38 weeks; differences between the mean values of the median charge were statistically significant ($P < 0.05$). The mean median charge of hCG was similar in samples collected at the end of the second and

third trimesters of gestation (Table 3). The electrophoretic mobilities of hCG contained in peaks and nadirs detected in samples from each trimester were also similar [mean electrophoretic mobility (albumin mobility units $\times 10^2$) of hCG in peak samples, 37.7 ± 1.03 ; in nadir samples, 37.9 ± 1.04].

CG RELEASE IN PREGNANCY

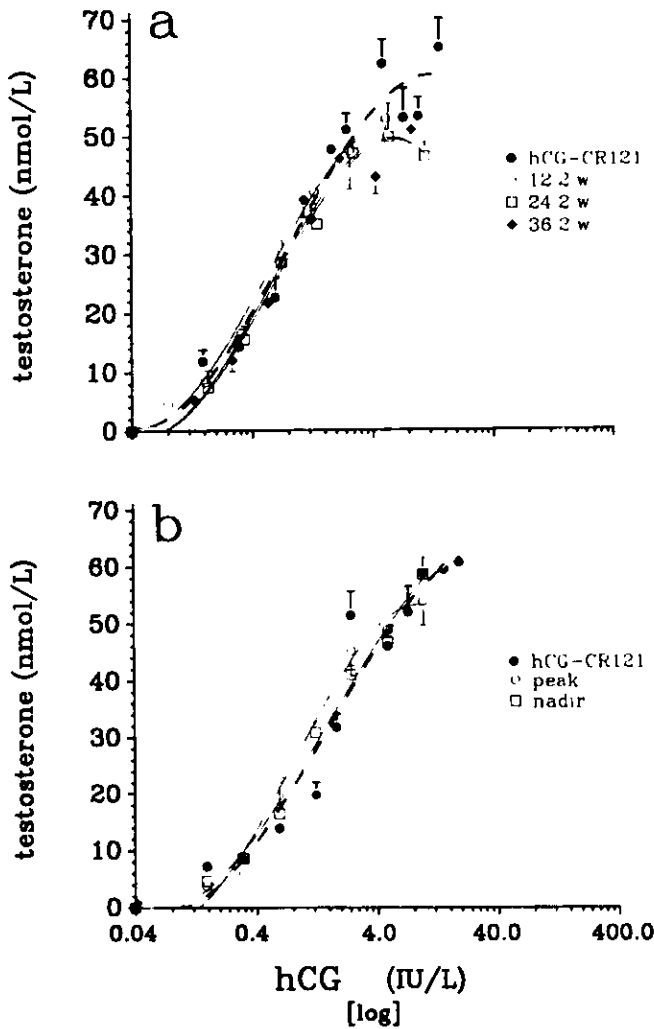


FIG. 4. The ability of increasing doses of hCG to induce T production by mouse interstitial cells. a, Serum samples obtained from a pregnant women studied at 12.2, 23.1, and 36.2 weeks of gestation. b, Samples from a peak and nadir identified by Cluster analysis of a set of samples obtained at 10.4 weeks of gestation. Each dose represents the mean \pm SD of triplicate incubations.

Discussion

In the present study, we have shown that the serial concentrations of hCG at the end of the first, second, and third trimesters of gestation fluctuate over a 24-h period and that such time-dependent variability in serum hCG concentrations may be resolved into episodic pulses, thus extending similar studies of hCG in early pregnancy (7, 8, 10). Although this short term variability might be attributed to changes in episodic secretion, the distribution volume of the hormone, or a combination of both, our study subjects remained supine in order to obviate acute postural effects on the distribution volume, and we were able to detect significant decreases in serum hCG levels only in samples obtained between 12–15 weeks immediately after the evening meal. Furthermore, this

TABLE 3. The electrophoretic mobility of hCG in serum specimens from seven pregnant women sampled at the end of the first, second, and third trimesters of gestation

Subject	Electrophoretic mobility (AMU $\times 10^4$)		
	12–15 weeks	23–26 weeks	35–38 weeks
A	39.6	36.5	36.9
B	40.1	38.1	35.8
C	43.1	33.3	34.6
D	39.0	34.1	33.1
E	35.9	34.7	35.3
F	36.4	34.5	33.8
G	32.6	32.7	33.7
Mean	38.1*	34.8	34.7
SEM	1.3	0.7	0.5

The electrophoretic mobility is expressed in relation to that of serum albumin in albumin mobility units (AMU).

* $P < 0.01$ vs. 23–26 and 35–38 weeks of gestation.

evening meal-related fall in hCG levels was not sufficient to induce significant day to night differences in the frequency and characteristics of the hCG pulses. Assuming that rapid variations in the metabolic clearance ratio of hCG do not occur, these findings strongly suggest that the variability observed in the 24-h profile of serum immunoreactive hCG concentrations is mainly due to an episodic mode of release of hCG from the placenta. Although the number of peaks detected during the gestational periods analyzed differs from that previously reported by Nakajima *et al.* (10), who noted an average of 1.7 peaks/24 h, it should be considered that the majority (~80%) of women studied by those researchers were of earlier gestational ages, and the frequency of sampling was lower than that employed in the present study. The possibility that the pulse frequency of hCG changes with increasing maturity of the placenta during the first trimester remains to be investigated.

A significant variability in serum hCG levels was detected during the three gestational ages studied. The frequency of the hCG pulses was similar throughout all three gestational periods analyzed, whereas the amplitude and area of the peaks were significantly reduced at 23–26 and 35–38 weeks of gestation than in earlier weeks. The significant reductions in integrated 24-h hCG concentration and hCG pulse amplitude and area at the end of the second and third trimesters of gestation may be secondary to alterations in the total synthesis and secretion of hCG, nicking of the molecule (25–27) [which, in turn, facilitates its rapid dissociation into free α - and β -subunits (14)], increased intravascular volume (28), or a combination of all of these factors. The *in vitro* and *in vivo* observations that the total production of hCG and its hCG α and hCG β mRNA as well as the net secretion and pulse amplitude of the hormone are markedly decreased in ageing placental tissue (4, 11, 29, 30), that as pregnancy advances hCG becomes more nicked (14), and that the 24-h integrated hCG concentrations and episodic characteristics of circulating hCG were similar at the end of the second and third trimesters of gestation [when differences in intravascular volume should be expected (Ref. 28 and the present study)] collectively suggest a combined effect of reduced production and secretion and increased deactivation of the

hormone as the cause of these changes.

Although significant nyctohemeral periodicities in circulating hCG levels were detected during all gestational periods studied, the presence and uniformity of these nyctohemeral variations were particularly remarkable at the end of the first and third trimesters. The mechanism(s) subserving this 24-h rhythmicity in circulating hCG concentrations during pregnancy is unclear. Various extraplacental and placental factors, such as alterations in the MCR, volume of distribution of the hormone, and level of activity of local intraplacental regulatory factors, may all be involved. In fact, under *in vitro* conditions, both the production and secretion of hCG are putatively regulated by an interplay between several stimulatory and inhibitory factors (31–33), some of which, such as glucocorticoids, opioid peptides and insulin, exhibit marked circadian and ultradian periodicities or meal-related variations in their serum concentrations (34–36). The ultimate role of these and other factors produced in the maternal and fetal compartments in regulating the synthesis, secretion, and circadian and episodic release of hCG *in vivo* remains to be elucidated.

In addition to amplitude control of the pulsatile release of hCG, a slight but significant decrease in the B/I ratio of the hormone was detected in samples from the end of the second and third trimesters of gestation. This decrease in the B/I ratio of circulating hCG may reflect modifications in both the protein core and carbohydrate structure of the glycoprotein, which, in turn, may reduce its biological activity without significantly affecting its immunological activity. Several lines of evidence support this possibility. The extent of nicking of the hCG molecule increases beginning after 2 months of pregnancy and continues to rise until term (14). The extent of hCG nicking varies from 13% between weeks 12–15 to 18% and 21% between weeks 24–27 and 36–39 of pregnancy (14). Nicked hCG has 9% of the receptor binding and 20% of the *in vitro* steroidogenic activity of intact hCG (25). Increased hCG nicking during mid- and late gestation might not account solely for the reduction in its *in vitro* B/I ratio. Indeed, modifications in the carbohydrate structure of hCG may also reduce its *in vitro* biopotency (37, 38); for example, desialylation of hCG reduces its *in vitro* bioactivity to 25–46% of its original activity (39, 40) without altering its immunoreactivity (41). The differences observed between the median charge of the hCG isoforms circulating during the different gestational ages may be due to partial loss of sialic acid residues in the hCG molecules of mid- and late gestation (12), which may be an additional factor contributing to the observed reduction in their B/I ratio. In fact, an interesting parallelism between the median charge and the B/I ratio of hCG was found in the present study. In serum specimens corresponding to the end of the second and third trimesters, hCG was less negatively charged and exhibited lower B/I ratios than its counterpart from earlier gestational ages. The detection of changes in the median charge and *in vitro* B/I ratio of the hCG molecule throughout gestation is in agreement with previous studies showing that the *in vivo* B/I ratio and the circulatory half-life of hCG are higher in the first trimester than at later gestational periods (12, 42).

Our observation that the B/I ratio of circulating hCG was similar in samples from peaks and nadirs contrasts with some (43), but not all, previous reports concerning LH showing that the biological to immunological activity ratio of the hormone increases during the endogenous secretory pulse (44–46). The present data on hCG suggest that whatever the nature of the hCG pulse generator, episodic hCG release does not exhibit significant short term variations in the charge of its isoforms and/or intrinsic biological activities.

In conclusion, serial serum concentrations of hCG throughout pregnancy show significant amplitude-modulated pulsatile release and nyctohemeral variations. The amplitude-regulated pulsatile mode of release is probably endowed by the placenta. Decreased amplitude of episodic hCG release in later gestation is accompanied by alterations in the molecular structure of the gonadotropin. These factors allow for distinctly different mechanisms through which the trophoblast may regulate the amount, intensity, and duration of the gonadotropic stimulus.

Acknowledgments

The authors are indebted to the NIADDK for the hCG RIA reagents, and to Dr. Deborah Alemán-Hoey for her critical review of the manuscript.

References

1. Simpson ER, MacDonald PL. 1981 Endocrine physiology of the placenta. *Annu Rev Physiol*. 43:163–188.
2. Hoshina M, Boothby M, Boime I. 1982 Cytological localization of chorionic gonadotropin alpha and placental lactogen mRNAs during development of the human placenta. *J Cell Biol*. 93:190–198.
3. Misheil DR, Wide L, Gemzell CA. 1963 Immunological determination of human chorionic gonadotropin in serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 23:125–131.
4. Reuter AM, Gaspard UJ, Deville J-L, Vrindts-Gevaert Y, Franchimont P. 1980 Serum concentrations of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. I. During singleton and twin pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 13:305–318.
5. Cole LA, Kroll TG, Ruddon RW, Hussa RO. 1984 Differential occurrence of free beta and free alpha subunits of human chorionic gonadotropin (hCG) in pregnancy sera. *J Clin Endocrinol Metab*. 58:1200–1202.
6. Hay DL. 1985 Discordant and variable production of human chorionic gonadotropin and its free α - and β -subunits in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 61:1195–1200.
7. Owens OM, Ryan KJ, Tuchinsky D. 1981 Episodic secretion of human chorionic gonadotropin in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 53:1307–1309.
8. Ayala AR, Bustos H, Antunez O, Gonzalez E. 1984 Episodic secretion of human chorionic gonadotropin. *Arch Invest Med (Mex)*. 15:147–153.
9. Barnea ER, Kaplan M. 1989 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*. 69:215–217.
10. Nakajima ST, McAuliffe T, Gibson M. 1990 The 24-hour pattern of the levels of serum progesterone and immunoreactive human chorionic gonadotropin in normal early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 71:345–353.
11. Kaplan M, Barnea ER, Bersinger NA. 1991 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)* 124:331–337.

CG RELEASE IN PREGNANCY

12. **Wide L, Hobson B.** 1987 Some qualitative differences of hCG in serum from early and late pregnancies and trophoblastic diseases. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 116:465-472.
13. **Skarulis MC, Wehmann RE, Nisula BC, Blithe DL.** 1992 Glycosylation changes in human chorionic gonadotropin and free alpha subunit as gestation progresses. *J Clin Endocrinol Metab*. 75:91-96.
14. **Cole LA, Kardana A, Park S, Braunstein GD.** 1993 The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Metab*. 76:704-710.
15. **Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Cravioto A, Grotjan E, Damián-Matsumura P, Espinoza R.** 1990 Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotropin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Hum Reprod*. 5:661-669.
16. **Cole LA, Kardana A.** 1992 Discordant results in human chorionic gonadotropin assays. *Clin Chem*. 38:263-270.
17. **Van Damme MP, Robertson DM, Diczfalussy E.** 1974 An improved *in vitro* bioassay method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse Leydig cell preparations. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 77:655-671.
18. **Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Díaz-Sánchez V, Altamirano A, Pérez-Palacios G.** 1985 Self-priming effect of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I Serum testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab*. 61:926-932.
19. **De Lean AP, Munson PJ, Rodbard D.** 1978 Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am J Physiol*. 235:E97-E102.
20. **Wide L.** 1985 Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH, and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 109:181-189.
21. **Lovgren T, Hemmiliä I, Pettersson K, Eskola JU, Bertoff E.** 1984 Determination of hormones by time-resolved fluorimmunoassay. *Talanta*. 31:909-916.
22. **Soini E, Lövgren T.** 1987 Time-resolved fluorescence of lanthanide probes and applications in biotechnology. *Crit Rev Anal Chem*. 18:105-154.
23. **Veldhuis JD, Johnson ML.** 1986 Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol*. 250:E486-E493.
24. **Veldhuis JD, Iranmanesh A, Lizarralde G, Johnson ML.** 1989 Amplitude modulation of a burst-like mode of cortisol secretion subserves the nyctohemeral glucocorticoid rhythm in man. *Am J Physiol*. 257:E6-E14.
25. **Cole LA, Kardana A, Andrade-Gordon P, et al.** 1991 The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked hCG. *Endocrinology*. 129:1559-1567.
26. **Puisieux A, Bellet D, Troalen F, et al.** 1990 Occurrence of fragmentation of free and combined forms of the β -subunit of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 126:687-694.
27. **Sakakibara R, Miyazaki S, Ishiguro M.** 1990 A nicked β -subunit of human chorionic gonadotropin purified from pregnancy urine. *J Biochem*. 107:858-862.
28. **Cheesley LC.** 1972 Plasma and red cell volumes during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 112:440-450.
29. **Mochizuki M.** 1988 Biology of trophoblast and placental protein hormones. In: Mochizuki M, Hussa R eds. *Placental protein hormones*. Amsterdam: Elsevier; 3-15.
30. **Boime I.** 1991 Human placental hormone production is linked to the stage of trophoblast differentiation. *Trophoblast Res*. 5:57-60.
31. **Ringer GE, Strauss III JF.** 1990 *In vitro* systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr Rev*. 11:105-123.
32. **Barnea ER, Ashkenazy R, Sarne Y.** 1991 The effect of dynorphin on placental pulsatile human chorionic gonadotropin secretion *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*. 73:1093-1098.
33. **Barnea ER, Neubrun D, Shurtzswirski R.** 1993 Effect of insulin on human chorionic gonadotropin secretion by placental explants. *Hum Reprod*. 8:858-862.
34. **Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellman L.** 1971 Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 33:14-22.
35. **Phelps RL, Metzger RL, Freinkel N.** 1981 Carbohydrate metabolism in pregnancy. XVII. Diurnal profiles of plasma glucose, insulin, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, and individual amino acids in late normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 140:730-736.
36. **Iranmanesh A, Lizarralde G, Johnson ML, Veldhuis JD.** 1989 Circadian, ultradian, and episodic release of β -endorphin in men, and its temporal coupling with cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*. 68:1019-1026.
37. **Moyle WR, Bahl OP, März L.** 1975 Role of the carbohydrate of human chorionic gonadotropin in the mechanism of hormone action. *J Biol Chem*. 250:9163-9169.
38. **Channing CP, Sakai CN, Bahl OP.** 1978 Role of the carbohydrate residues of human chorionic gonadotropin in binding and stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation by porcine granulosa cells. *Endocrinology*. 103:341-348.
39. **Dufau ML, Catt KJ, Tsuruhara T.** 1971 Retention of *in vitro* biological activities by desialylated human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun*. 44:1022-1029.
40. **Tsuruhara T, Dufau ML, Hickman J, Catt KJ.** 1972 Biological properties of hCG after removal of terminal sialic acid and galactose residues. *Endocrinology*. 91:296-301.
41. **Van Hall EV, Vaitukaitis JL, Ross GT, Hickman JW, Ashwell G.** 1971 Immunological and biological activity of HCG following progressive desialylation. *Endocrinology*. 88:456-464.
42. **Wide L.** 1962 An immunological method for the assay of human chorionic gonadotropin. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 70(Suppl):1-111.
43. **Huhtaniemi I, Ding Y-Q, Tähtelä R, Valimäki M.** 1991 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 Endocrinol Metab*. 75:1442-1445.
44. **Veldhuis JD, Urban RJ, Beitinz IZ, Blizzard RM, Johnson ML, Dufau ML.** 1989 Pathophysiological features of the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Steroid Biochem*. 33:739-749.
45. **Tsatsoulis A, Shalet SM, Richardson P, Robertson WR.** 1990 Testosterone reduces the bioactivity of luteinizing hormone (LH) in man. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 32:73-82.
46. **Valenti S, Dahl KD.** Qualitative changes in LH secretion in response to various stimuli. *Proc of the 26th Annual Meet of the Soc for the Study of Reprod* 1993;281.

More in-vitro bioactive, shorter-lived human chorionic gonadotrophin charge isoforms increase at the end of the first and during the third trimesters of gestation

L.Díaz-Cueto^{1,3}, J.Barrios-de-Tomasi¹, C.Timossi², J.P.Méndez^{1,4} and A.Ulloa-Aguirre^{1,5}

¹Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, and ²Department of Pharmacology, Universidad Nacional Autónoma de México, School of Medicine, México D.F., Mexico

³Present address: Department of Obstetrics and Gynecology, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia PA, USA

⁴Present address: Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F.

⁵To whom correspondence should be addressed at: Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición SZ, Vasco de Quiroga #15, Tlalpan 14000, México D.F.

In the present study we analysed the dynamics of serum human chorionic gonadotrophin (HCG) charge isoform distribution throughout normal gestation and characterized some of the biological features of the several HCG glycoforms present in the circulation of pregnant women. Blood samples were obtained from normal pregnant women at 10–11, 12–15, 23–26 and 35–38 weeks of gestation. The sera were fractionated by preparative chromatofocusing and the separated HCG isoforms were identified and quantified by radioimmunoassay. The in-vitro biological activity and the plasma half-life of the several circulating HCG isoforms were determined by conventional methods. HCG isoforms became less acidic as pregnancy advanced. In samples taken at 10–11 weeks of gestation, the most acidic HCG molecules (pH <3.7) comprised >80% of total HCG recovered after chromatofocusing; this proportion decreased to 58, 60 and 47% in samples taken from weeks 12.1 to 38.4 of gestation. Meanwhile, the relative proportion of less acidic isoforms recovered within pH values 6.49–4.50 increased at the end of the first trimester (12–15 weeks), remained constant until weeks 23–26 and then increased further by the end of the third trimester. Less acidic isoforms had higher in-vitro biological potency per immunological unit than the more acidic analogues. Regardless of the trimester of pregnancy, the plasma half-life of the highly acidic (elution pH <3.7) isoforms varied from 84.4 to 150 min (116.3 ± 23.0 ; mean \pm SD), whereas the corresponding half-life of mid-acidic (pH 4.25–5.31) and low-acidic (pH 5.74–6.50) HCG isoforms ranged from 31.0 to 115.3 (75.5 ± 20.6) and 15.3 to 58.3 (41.2 ± 14.3) min respectively ($P < 0.01$, highly acidic versus mid- and low-acidic analogues and mid-acidic versus least acidic isoforms). The overall data indicate that the human trophoblast is able to regulate the exact intensity, biochemical composition and duration of the gonadotrophic stimulus secreted during the course of normal gestation. They also suggest that the decrease and maintenance of low serum HCG concentrations during the second and third trimesters of gestation may be partially caused by changes in the carbohydrate structure of the HCG molecule.

Key words: charge isoforms/human chorionic gonadotrophin/pregnancy

Introduction

Human chorionic gonadotrophin (HCG) is a sialic acid-enriched glycoprotein hormone synthesized and secreted by the placental syncytiotrophoblast (Simpson and MacDonald, 1981; Hoshina *et al.*, 1982). The circulating concentrations of this hormone vary profoundly during pregnancy; in the first trimester, the concentration in the blood rapidly increases reaching a peak at ~8–12 weeks of gestation, thereafter declines, and then remains constant until term (Mishell *et al.*, 1963; Reuter *et al.*, 1980; Cole *et al.*, 1984; Hay, 1985). Serum HCG concentrations also show significant amplitude-modulated pulsatile release throughout pregnancy; both the amplitude and the area of the HCG pulses are significantly higher during the first trimester than during mid- and late gestation (Díaz-Cueto *et al.*, 1994). In addition to these

quantitative variations, several studies have shown that the type of HCG molecules produced and secreted in early and late pregnancy are both structurally and functionally different (Fein *et al.*, 1980; Wide and Hobson, 1987; Skarulis *et al.*, 1992; Cole *et al.*, 1993; Díaz-Cueto *et al.*, 1994). HCG from women in late pregnancy bears a higher proportion of intrachain nicks (at positions β 44–49) (Cole *et al.*, 1993), is differently charged (Wide and Hobson, 1987; Sawitzke *et al.*, 1994; Wide *et al.*, 1994), exhibits reduced plasma half-life and in-vivo biological potency (Wide and Hobson, 1987) and shows lower biological to immunological relationships than HCG in early pregnancy (Díaz-Cueto *et al.*, 1994).

In the present study, we further explored some of the mechanisms by which the placenta modulates the intensity and duration of the HCG signal released during the course of

normal pregnancy. Our specific goals were: (i) to analyse the direction of the changes in charge isoform distribution of serum HCG throughout gestation; and (ii) to study and compare the relative *in-vitro* biological activity as well as the circulatory survival of the various charge HCG isoforms present in the circulation of women in different stages of pregnancy.

Materials and methods

Subjects and sample preparation

Serum samples were obtained from seven pregnant women, aged 22–32 years, at 20 min intervals for 24 h at the end of the first (12.1–14.8 weeks), second (23.1–26.4 weeks) and third (35.5–38.4 weeks) trimesters of pregnancy; details of the sampling conditions and procedures employed in the study of this subset of women have been reported elsewhere (Díaz-Cueto *et al.*, 1994). The set of samples from each subject (73 samples/subject per trimester) were separately pooled, mixed at 8°C for 2 h, concentrated by dialysis at 4°C for 24 h against deionized water and thereafter against 0.01 M ammonium carbonate (pH 7.5) and freeze-dried. After lyophilization, each sample was stored frozen at –70°C until further analysis by chromatofocusing separation. Additional sera (20 ml each) from five pregnant women (aged 22–30 years) from whom a single blood sample was obtained at 10.0–10.8 weeks of gestation were also included in the study; samples from these women were also processed as described above. All the women were in good health and had conceived spontaneously with the exception of one woman who had received clomiphene citrate for ovulation induction. The length of gestation for each pregnancy was determined in accordance with the date of the last menstrual period. Approval from the ethical committee of the Institute and informed written consent from the volunteers were obtained.

Chromatofocusing of serum specimens

The isoforms of HCG present in each serum specimen were separated on the basis of charge by a previously described chromatofocusing procedure (Zambrano *et al.*, 1995). Briefly, each lyophilized sample was re-dissolved in phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) to a volume equivalent to 1/10 (4/10 for samples from women in 10.0–10.8 weeks of pregnancy) of the original and the resultant concentrates were subjected to albumin removal by Affi-gel blue (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) extraction. Each albumin-free sample (6 ml each) was transferred to a dialysis membrane tubing (molecular weight cut-off, 6000–8000; Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA), dialysed at 4°C for 24 h against starting buffer (0.025 M imidazole-HCl, pH 7.4) and then applied to the top of a 30 × 1 cm chromatofocusing column of polybuffer exchange resin (PBE-94; Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA) which had been previously equilibrated with 15 volumes of starting buffer. Chromatofocusing was performed at 4°C and the column fractions (2 ml each) were collected at a flow rate of 1 ml/4 min. The pH of each fraction was measured, and when the column eluent reached pH 4.0, the eluent buffer [1:8 dilution of Polybuffer-74 (Pharmacia)] was changed to a solution of 1.0 M NaCl to displace those proteins bound at the lower limiting pH (salt peak). Each fraction was measured for HCG content by radioimmunoassay and then stored frozen at –20°C. After measuring the HCG content in each column eluate, fractions corresponding to pH values >7.0–6.50 (area I), 6.49–5.50 (area II), 5.49–4.50 (area III), 4.49–3.70 (area IV) and <3.7 (area V; salt peak) were separately pooled (one pool/pH area, per period of gestation) and concentrated as described above; the HCG content of each HCG pool was then measured by both radioimmunoassay and an *in-vitro* bioassay.

Hormonal assays

Radioimmunoassay of HCG

The radioimmunoassay for HCG was performed using reagents provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK, Bethesda, MD, USA) as previously described (Díaz-Cueto *et al.*, 1994). The HCG-CR121 standard (~10% nicked; Birken *et al.*, 1991) was radiolabelled by the chloramine T method, and this same preparation was employed to construct the standard curve. Upon fractionation by chromatofocusing, this HCG standard exhibits a predominantly acidic pH distribution profile with two peaks identified at pH values 4.80–4.10 and 4.0–3.20 as well as an additional component bound at the lower limiting pH (pH < 3.2); this is very similar to that of its analogue HCG-CR127 whose extent of nicking is ~20% (Birken *et al.*, 1991). Anti-HCG-H80 (batch 2) at a final dilution of 1:100 000 was used as antiserum. Cross-reactivities of this antiserum with HCG α - and β -subunits are 1.2 and 3.2% respectively, and the antiserum recognizes intact and nicked molecules equivalently (Cole and Kardana, 1992). To avoid interassay variations, samples from a single chromatofocusing column or period of pregnancy were analysed in the same assay run. Results are expressed as ng of the HCG-CR121 standard or as IU/l according to the WHO Third International Standard of HCG for immunoassay (coded 75/537) (1 mg of HCG-CR121 = 8000 IU) as appropriate. The sensitivity of the assay was 0.125 ng (1.0 IU/l) HCG-CR121/tube and the intra-assay coefficient of variation was <7.5%.

In-vitro bioassay of HCG

The *in-vitro* bioactivity of HCG was assessed employing the mouse Leydig cell testosterone production assay described by Van Damme *et al.* (1974) and Díaz-Cueto *et al.* (1994). The standard curve was constructed using the HCG-CR121 preparation. In samples from women at 10–11 weeks of gestation, the *in-vitro* biological activity of HCG was measured in a single serum sample, whereas in those women studied at the end of the first, second and third trimesters, the activity was determined in serum pools made from aliquots of each individual series of samples (one pool per subject/trimester) as described previously (Díaz-Cueto *et al.*, 1994). To avoid interassay variations, all samples from a single subject or HCG isoform concentrates (pH areas I–V) from a single gestational period were tested in the same assay at 8–10 different concentrations in triplicate incubations; the mean intra-assay coefficient of variation was <10%. The quantity of testosterone produced *in vitro* was determined by radioimmunoassay, as previously described (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1985). All samples from a single bioassay were analysed for testosterone content in the same batch; the mean intra-assay coefficient of variation was <5%. Tests for parallelism among the slopes generated by the different HCG specimens (standard and unknowns) assayed by the *in-vitro* bioassay were performed following the method of De Lean *et al.* (1978).

Disappearance of HCG from rat circulation

HCG isoforms identified after chromatofocusing of samples from one subject at 10.1 weeks and two women at 12.2, 23.1–24.2 and 36.2 weeks of gestation were concentrated as described above and used to assess the half-life of the HCG isoforms in circulation. For this purpose, a jugular vein from adult Long Evans male rats weighing 380–400 g was prepared and cannulated under ether anaesthesia. The animals were slowly injected *i.v.* with ~50 ng of immunoreactive HCG. Blood samples (150 μ l) were taken at 5 and 10 min after the injection and subsequently at regular time-intervals (10–60 min) during the ensuing 7–8 h. After each bleeding, the circulating volume was maintained with 0.9% NaCl. Samples were left to clot at 4°C and then centrifuged at 1000 g for 10 min. Serum was removed and stored frozen at –20°C until the HCG radioimmunoassay. Each HCG

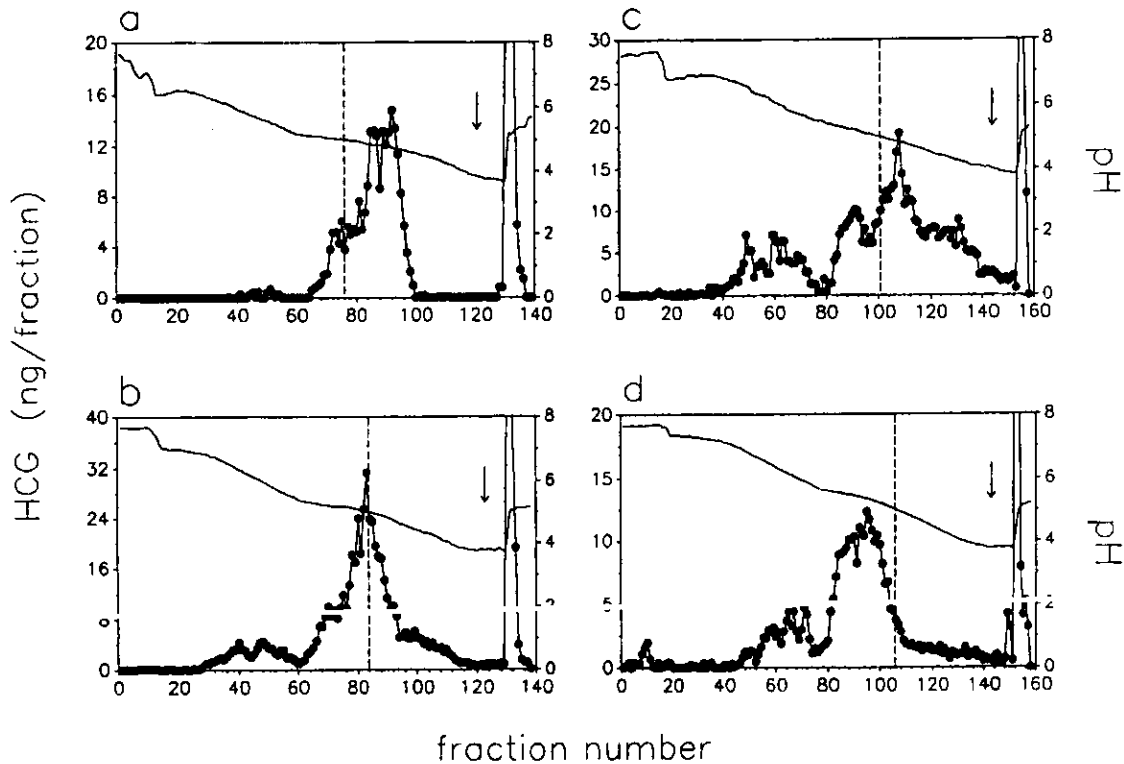


Figure 1. Distribution of human chorionic gonadotrophin (HCG) isoforms after chromatofocusing of serum specimens collected from a woman sampled at (a) 10.8 weeks and from a subject studied at (b) 12.2, (c) 24.8 and (d) 38.5 weeks of gestation. Arrows indicate the addition of 1 M NaCl to the chromatofocusing columns. Vertical broken lines separate isoforms with pH values >5.0 and <5.0 .

isoform was assayed in a single animal. To determine the plasma half-life of each injected HCG specimen, an interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data (PKCALC) (Shumaker, 1986) was used as described elsewhere (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992).

Statistical analysis

One-way analysis of variance was employed to determine differences between groups. When differences existed, *t*-tests were used to determine which means were significantly different. Linear regression analysis was performed to determine the degree and significance of the association between the median elution pH value of the HCG isoforms and their corresponding plasma half-life. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Serum HCG concentrations at 10–11 and 12–15 weeks of gestation were significantly higher than those at 23–26 and 35–38 weeks (mean \pm SEM: 10–11 weeks, 88 ± 9 IU/l $\cdot 10^3$; 12–15 weeks, 77 ± 18 ; 23–26 weeks, 8 ± 2 and 35–38 weeks, 10 ± 2 IU/l $\cdot 10^3$). $P < 0.05$ 10–11 and 12–15 versus 23–26 and 35–38 weeks; not significant 10–11 versus 12–15 weeks and 23–26 versus 35–38 weeks. The in-vitro biological activity/immunoactivity (B/I) HCG ratio also decreased as the gestational age progressed (mean B/I ratio at 10–11 weeks, 1.5 ± 0.12 ; 12–15 weeks, 1.14 ± 0.14 ; 23–26 weeks, 0.87 ± 0.22 and 35–38 weeks, 0.79 ± 0.12). $P < 0.05$ 10–11 versus 12–15, 23–26 and 35–38 weeks, and 12–15 versus 23–26 and 35–38 weeks; not significant 23–26 versus 35–38 weeks.

Separation by chromatofocusing of serum concentrates

obtained during different gestational ages disclosed the presence of multiple (5–8) immunoreactive charge HCG isoforms (Figure 1). Re-focusing of concentrates prepared from each HCG peak identified after chromatofocusing of a serum specimen from a woman at 12.2 weeks of gestation yielded single peaks of HCG activity for components with elution pH values 6.68–4.63 (Figure 2). Re-chromatofocusing of a minor component recovered at pH 4.30–3.99 resulted in the identification of significant quantities of HCG activity in both the original elution pH value and the salt peak; conversely, refocusing of HCG present in the latter component disclosed the presence of some HCG immunoreactivity in fractions corresponding to pH 4.30–3.99.

HCG isoforms became less acidic as pregnancy advanced. At 10–11 weeks of gestation, the most acidic HCG molecules (present in area V, pH <3.7) comprised $>80\%$ of total HCG recovered after chromatofocusing; this proportion progressively decreased to 58, 60 and 47% throughout weeks 12.1–38.4 of gestation (Figure 3). Meanwhile, the relative proportion of less acidic isoforms recovered in pH areas II and III (pH 6.49–4.50) increased at the end of the first trimester (12–15 weeks), remained constant until weeks 23–26 and then increased further by the end of the third trimester. The relative proportions of HCG recovered in pH areas I and IV slightly increased as pregnancy advanced; these changes, however, were not statistically significant.

The in-vitro biological activity of HCG recovered within the different pH segments of chromatofocusing separations from each gestational is shown in Figure 4. The amount

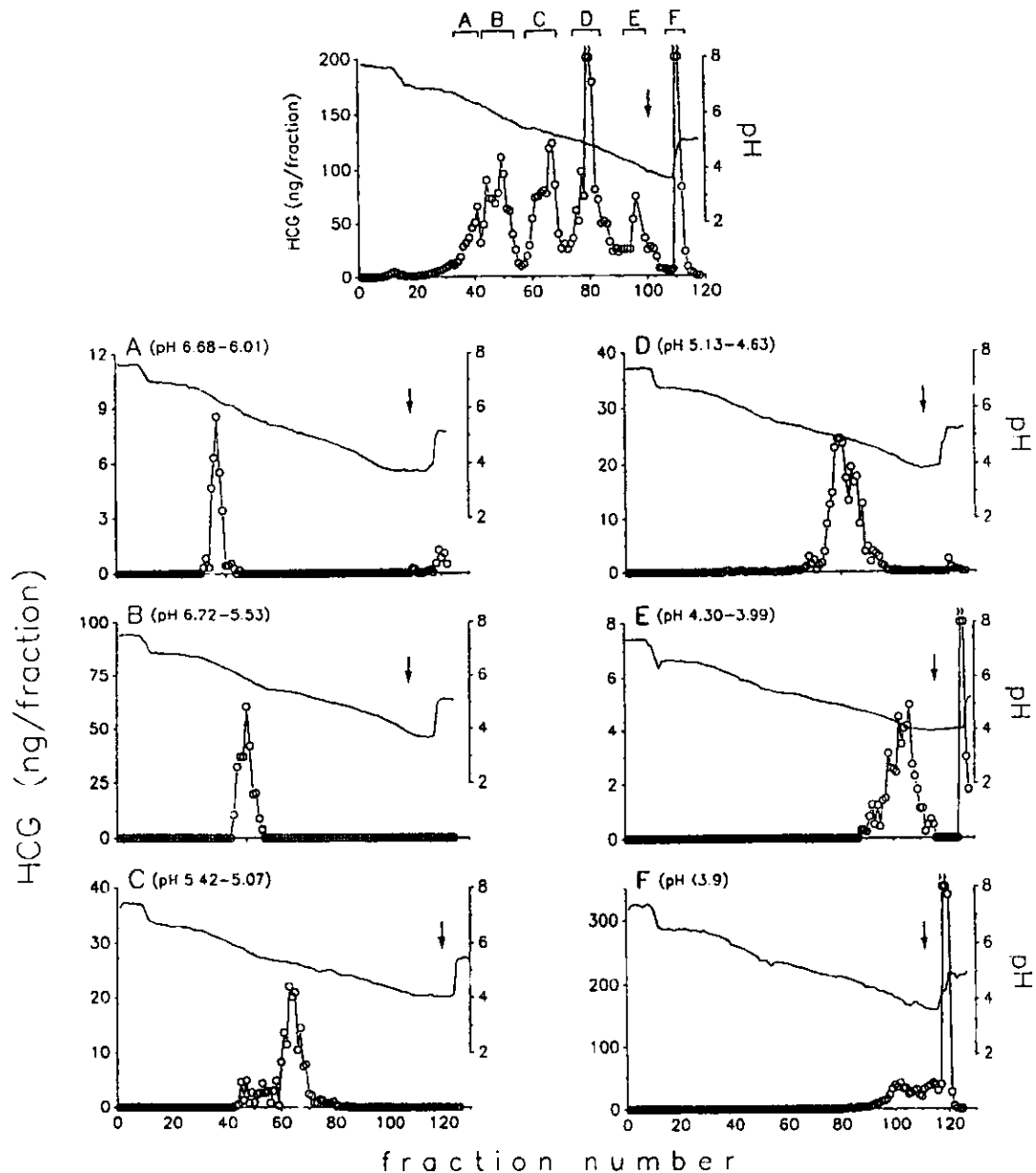


Figure 2. Refocusing of serum human chorionic gonadotrophin (HCG) isoforms with pH values 6.68–6.01 (A), 6.22–5.53 (B), 5.42–5.07 (C), 5.13–4.63 (D), 4.30–3.99 (E) and <3.9 (salt peak) (F). Column eluents corresponding to each immunoreactive HCG peak (A to F in top figure) identified after chromatofocusing of a sample obtained from a woman at 12.2 weeks of gestation, were dialysed, freeze dried, resuspended in starting buffer and then re-chromatofocused in individual columns (A–F). Arrows indicate the addition of 1 M NaCl to the chromatofocusing columns.

of HCG tested for in-vitro bioactivity was determined by radioimmunoassay of each HCG specimen at several dose levels: all concentrates displaced [125 I]-labelled HCG from the antibody in a parallel fashion (not shown). HCG material present in concentrates I and II from 10–11 weeks and in area I from 36–39 weeks was insufficient to assess the bioactivity of their corresponding HCG isoforms. As shown in Figure 4, all HCG concentrates induced significant and parallel dose-dependent testosterone production curves when analysed in the mouse Leydig cell bioassay. The dose-response curves of the most acidic HCG isoforms identified in fractions with pH values <4.49 (areas IV and V) were consistently shifted to the right of the dose-response curves for the isoforms with pH

values ≥ 4.50 (pH areas I to III). Thus, the less acidic isoforms had higher in-vitro biological potency per immunological unit (as assessed by radioimmunoassay) than the more acidic analogues.

Injection of individual HCG isoforms into male rats revealed that the plasma half-life of circulating HCG increased as the pH value of the corresponding isoforms declined. Regardless of the trimester of pregnancy, the plasma half-life of the highly acidic (elution pH <3.7) isoforms varied from 8.4 to 150 min (mean \pm SD: 116.3 ± 23.0), whereas the corresponding half-life of mid-acidic (pH 4.25–5.31) and low-acidic (pH 5.74–6.50) HCG isoforms ranged from 31.0 to 115.3 (75.5–20.6) and 15.3 to 58.3 (41.2 ± 14.3) min respectively ($P < 0.01$).

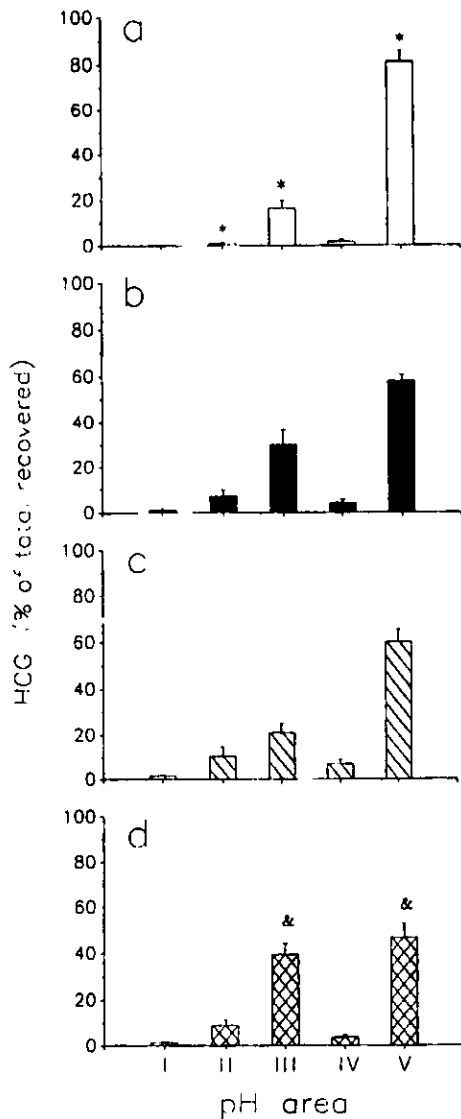


Figure 3. Relative content (as percentage of total recovered) of immunoreactive human chorionic gonadotrophin (HCG) identified within five pH segments (I = pH >7.0–6.50; II = pH 6.49–5.50; III = pH 5.49–4.50; IV = pH 4.49–3.70 and V = pH <3.7) after chromatofocusing of serum specimens collected at (a) 10–11, (b) 12–15, (c) 23–26 and (d) 35–38 weeks of gestation. Values represent the Mean \pm SD. * P < 0.05 10–11 versus 12–15, 23–26 and 35–38 weeks in the same pH area; & P < 0.05 35–38 versus 12–15 and 23–26 weeks of gestation.

highly acidic versus mid- and low-acidic analogues and mid-acidic versus least acidic isoforms). In fact, there was a highly statistically significant inverse relationship between the median pH value and plasma half-life of the circulating HCG isoforms (Figure 5).

Discussion

We have previously demonstrated that the human cytotrophoblast secretes different molecular forms of HCG during its morphological and functional differentiation in culture (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1990). Employing this system, which reproduces *in vitro* the spectrum of cytoplasmic and functional events

normally occurring during early gestation (Klaman *et al.*, 1987), we found that the secretion of the most acidic/sialylated HCG molecules progressively increased as the morphofunctional differentiation of the cytotrophoblasts into syncytiotrophoblasts progressed. These observations indicated that some of the isoforms of HCG previously identified in serum and urine (Lichtenberg *et al.*, 1986) may be actually produced by the placenta and then released to the periphery.

In the present study, we have shown that the pattern of pH distribution of circulating HCG changes throughout pregnancy. The earliest change detected in the specimens analysed was a significant decrease in the relative proportion of the most acidic isoforms (pH <3.7) with a concomitant increase in isoforms with pH values 6.49–4.50. This initial shift towards secretion of less acidic isoforms occurred between 11–15 weeks of gestation, a finding which corroborates a previous study employing a different charge-based separation technique (Wide *et al.*, 1994). Using chromatofocusing to fractionate the different HCG glycoforms, we were able to detect the occurrence of a second major shift towards the production of less acidic/sialylated HCG isoforms during the third trimester. This observation indicates that in addition to alterations in its peptide backbone (i.e. nicking and cleavage) (Cole *et al.*, 1993), the structural modifications of HCG secreted during the later stages of gestation also involve changes in the degree of sialylation of its oligosaccharide structures. Thus, the decrease and maintenance of low serum HCG concentrations during the second and third trimester of gestation may be partially caused by these changes in both the peptide and carbohydrate structures of the HCG molecule.

All serum HCG isoforms exhibited lower *in-vitro* bioactivity than the highly purified urinary HCG standard, suggesting that the isoform-containing specimens lost some biological activity, but not immunoactivity, during the various experimental procedures employed in their isolation. Nonetheless, as previously observed with the HCG isoforms released *in vitro* (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1990), less acidic serum isoforms exhibited higher bioactivity per immunological unit than the more acidic variants. This finding is also in agreement with a recent study demonstrating that less acidic and basic isoelectric forms of molar HCG show higher thyroid-stimulating activity *in vitro* than their more acidic counterparts (Yoshimura *et al.*, 1994). The difference in bioactivity between the less and more acidic isoforms of HCG may be due to the presence of more negatively charged carbohydrate residues (i.e. sialic acid) in the acidic analogues (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1990; Yoshimura *et al.*, 1994), which in turn may decrease the interaction between the hormone and its receptor at the target cell (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1984). In fact, it has been demonstrated that some less sialylated/glycosylated HCG species may be more potent than intact HCG in stimulating cAMP production in Chinese hamster ovary cells expressing functional human thyroid stimulating hormone (TSH) receptors (Yoshimura *et al.*, 1993). Less likely, the reduced relative potency of the more acidic isoforms may be due to more extensive or selective intrachain nicking of their corresponding β -subunit (Cole *et al.*, 1991). There is no evidence, however, that the highly acidic HCG isoforms are more prone to deactivation by nicking than

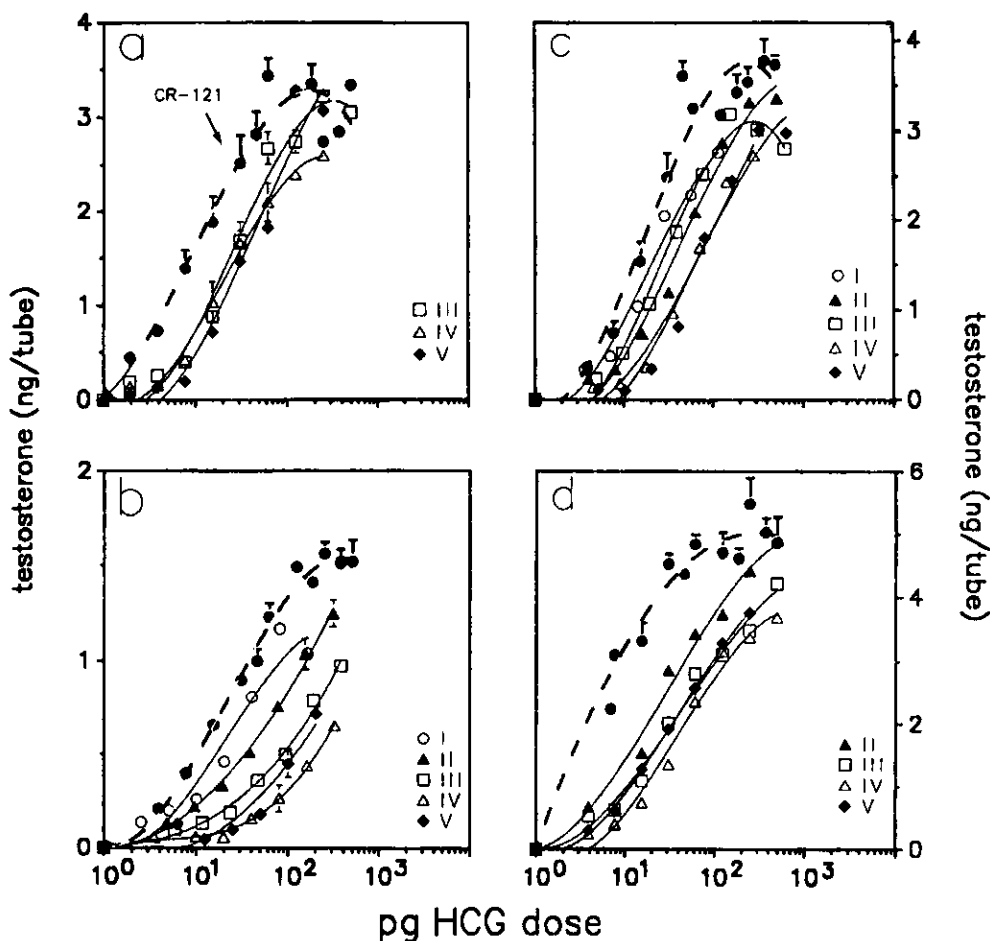


Figure 4. The ability of increasing doses of human chorionic gonadotrophin (HCG) present in five different pH segments (I-V, see Figure 3 legend) from chromatofocusing separations of serum samples obtained at (a) 10–11, (b) 12–15, (c) 23–26 and (d) 35–38 weeks of gestation to induce testosterone production by mouse interstitial cells. The dose is expressed in terms of HCG-CR121 as measured by radioimmunoassay

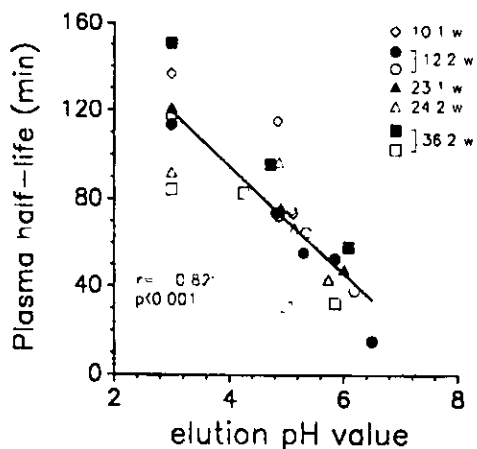


Figure 5. The relationship between the charge, expressed as the median elution pH value, and the plasma half-life of individual human chorionic gonadotrophin (HCG) isoforms obtained after chromatofocusing of serum specimens from a subject sampled at 10.1 weeks of pregnancy (\diamond) and from two women studied at 12.2, 23.1 and 24.2, and 36.2 weeks of gestation (open and filled symbols respectively). A median elution pH value of 3.0 was arbitrarily assigned to the salt peak (pH < 3.7).

the less acidic variants. If this was the case, then the presence of a higher proportion of intrachain nicks in the more acidic isoforms (which were the predominant forms detected in the circulation during all trimesters of gestation) may explain why, despite the shift towards the production and release of less acidic/highly bioactive isoforms, the in-vitro B/I ratio in the mix of circulating HCG isoforms decreases as pregnancy advances (Díaz-Cueto *et al.*, 1994; present study).

Previous studies have demonstrated the existence of a close relationship between the sialic acid content, the charge and the circulatory survival of gonadotrophins (Rosa *et al.*, 1984; Wide, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992; Chappel, 1995). The differences observed in median charge and isoelectric point of circulating HCG isoforms are most probably due to differences in their sialic acid content as has been shown for the different isoforms of both urinary and molar HCG (Nwokoro *et al.*, 1981; Yoshimura *et al.*, 1994). Serum HCG from late pregnancy is less negatively charged and is cleared faster from the circulation of mice than circulating HCG from early pregnancy (Wide and Hobson, 1987). In agreement with these data, we found that the plasma half-life of the various isoforms of serum HCG present throughout pregnancy correlated highly with their elution pH value. Regardless of the week of gestation

in which the serum specimens were obtained, less acidic HCG isoforms disappeared faster from the circulation of rats than their more acidic counterparts. Although previous studies aimed to determine the pharmacokinetics of the various HCG isoforms have been performed exclusively on rodents (Graesslin *et al.*, 1984; Wide and Hobson, 1987), the observation that the relative abundance of the less acidic serum HCG isoforms is considerably reduced as compared to that present in placental extracts (Lichtenberg *et al.*, 1986), strongly suggests that a similar plasma behaviour may also occur in the human and that, after being secreted, these less acidic variants are cleared faster from the circulation than the more acidic/sialylated isoforms. Interestingly, we were unable to find within each particular group of charge isoforms (highly acidic, mid-acidic and low acidic) a clear relationship between the specific week of pregnancy and the plasma half-life of HCG. Although the extent of nicking was not analysed in the isoforms tested, the data suggest that variations in sialic acid content may be more critical than the relative extent of intrachain nicks in determining the circulatory survival of the hormone. Nevertheless, additional studies including a larger number of the different charge isoforms need to be performed in order to corroborate this hypothesis.

The factors involved in the regulation of HCG isoform production are unknown. Changes in the production and secretion of sex steroids and other non-steroidal factors such as gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and inhibin, have been associated with structural modifications in follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) molecules (Galle *et al.*, 1983; Padmanabhan *et al.*, 1988; Phillips and Wide, 1994). Although modifications in glycosylation and sialylation of HCG throughout gestation could be subserved by changes in serum concentrations of oestradiol and progesterone, there is no firm evidence supporting such a causal relationship. On the other hand, it has been shown that several non-steroidal factors from placental and extraplacental origin are involved in HCG production and secretion *in vitro* (Belisle *et al.*, 1984; Petraglia *et al.*, 1989; Nishino *et al.*, 1990; Ohashi *et al.*, 1992; Barnea *et al.*, 1993), and cAMP has proved to exert a regulatory role in the production of acidic isoforms in cultured human cytotrophoblasts (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1990). Whether these factors are involved in the control of the synthesis and secretion of the different HCG glycoforms *in vivo* remains to be determined.

Although the molecular heterogeneity of HCG is well established, both the functional role of the hormone during the second and third trimesters of pregnancy and the physiological significance of such a variety of isoforms for a single hormone still remain to be more clearly defined. Aside from its critical role in regulating corpus luteum function during early pregnancy, several other endocrine, paracrine and autocrine regulatory effects at both the maternal and fetal level have been proposed (Huhtaniemi *et al.*, 1977; Braunstein, 1988; Hoermann *et al.*, 1991; Lei and Rao, 1992; Licht *et al.*, 1993; Eta *et al.*, 1994). Although speculative, the various isoforms may selectively participate in the control of a variety of responses at different target cells and during particular periods of gestation requiring a more precise control of the intensity

and/or duration of the HCG stimulus. In addition to inducing thyroid activity (Yoshimura *et al.*, 1994), some HCG isoforms may preferentially act on other target cells through distinct HCG receptors (McIlroy, 1992). From this perspective, HCG heterogeneity may represent an additional, fine-tuning mechanism through which the placenta regulates different maternal and fetal functions throughout gestation.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH, México City) and The National University of Mexico (DGAPA-UNAM, México). The authors are indebted to the NIADDK for the HCG RIA reagents and to Dr Deborah Alemán-Hoey for her review of the manuscript. Dr Laura Díaz-Cueto was a postgraduate student supported by the Ministry of Health (SS) and the CON-AcYt, México.

References

- Daroca, E.R., Neubrun, D. and Snurtzowski, R. (1993) Effect of insulin on human chorionic gonadotrophin secretion by placental explants. *Hum. Reprod.*, **8**, 858-862.
- Belisle, S., Guevin, J.-F., Bellabarba, D. and Lehoux, J.-G. (1984) Luteinizing hormone-releasing hormone binds to enriched human placental membranes and stimulates *in vitro* the synthesis of bioactive human chorionic gonadotrophin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **59**, 119-126.
- Birken, S., Gawinowicz, M.A., Kardana, A. and Cole, L.A. (1991) The heterogeneity of human chorionic gonadotrophin (hCG). II. Characteristics and origins of nicks in hCG reference standards. *Endocrinology*, **129**, 1551-1558.
- Braunstein, G.D. (1988) Physiologic function of human chorionic gonadotrophin during pregnancy. In Mochizuki, M. and Hussa, R. (eds), *Placental Protein Hormones*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 33-41.
- Chappel, S.C. (1995) Heterogeneity of follicle-stimulating hormone: control and physiological function. *Hum. Reprod. Update*, **5**, 479-487.
- Cole, L.A. and Kardana, A. (1992) Discordant results in human chorionic gonadotrophin assays. *Clin. Chem.*, **38**, 263-270.
- Cole, L.A., Kroll, T.G., Ruddon, R.W. and Hussa, R.O. (1984) Differential occurrence of free beta and free alpha subunits of human chorionic gonadotrophin (hCG) in pregnancy sera. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58**, 1200-1202.
- Cole, L.A., Kardana, A., Andrade-Gordon, P. *et al.* (1991) The heterogeneity of human chorionic gonadotrophin (hCG). III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked HCG. *Endocrinology*, **129**, 1559-1567.
- Cole, L.A., Kardana, A., Park, S. and Braunstein, G.D. (1993) The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 704-710.
- De Lean, A.P., Munson, P.J. and Rodbard, D. (1978) Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.*, **235**, E97-E102.
- Díaz-Cueto, L., Méndez, J.P., Barrios-de-Tomás, J. *et al.* (1994) Amplitude regulation of episodic release, *in vitro* biological to immunological ratio, and median charge of human chorionic gonadotrophin in pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 890-897.
- Eta, E., Ambrus, G. and Rao, Ch.V. (1994) Direct regulation of human myometrial contractions by human chorionic gonadotrophin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 1582-1587.
- Fein, H.F., Rosen, S.W. and Weintraub, B.D. (1980) Increased glycosylation of serum human chorionic gonadotrophin and subunits from eutopic and ectopic sources: comparison with placental and urinary forms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **50**, 1111-1129.
- Galle, P.C., Ulloa-Aguirre, A. and Chappel, S.C. (1983) Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J. Endocrinol.*, **99**, 31-39.
- Graesslin, D., Lichtenberg, V., Holtje, F. *et al.* (1984) The role of sialic acid for survival of gonadotrophins and the different isohormones in placenta, serum and urine. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **105** (Suppl. 262), A81.

- Hay, D.L. (1985) Discordant and variable production of human chorionic gonadotropin and its free I- and β -subunits in early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **61**, 1195-1200.
- Hoermann, R., Schumm-Draeger, P.-M., Rehbach, K. and Mann, K. (1991) Asialoagalacto-human chorionic gonadotropin, a carbohydrate-modified variant of human chorionic gonadotropin, antagonizes the stimulatory actions of bovine thyroid-stimulating hormone on thyroid function and HLA-DR expression in human thyroid *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **88**, 1947-1954.
- Hoshina, M., Boothby, M., and Boime, I. 1982. Cytological localization of chorionic gonadotropin alpha and placental lactogen mRNAs during development of the human placenta. *J. Cell. Biol.*, **93**, 190-8.
- Huhtaniemi, I.T., Korenbrot, C.C. and Jaffe, R.B. (1977) hCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **44**, 963-967.
- Kliman, H.J., Feinman, M. and Strauss J.F. (1987) Differentiation of human cytotrophoblast into syncytiotrophoblast in culture. *Trophoblast Res.*, **2**, 407-421.
- Lei, Z.M. and Rao, Ch.V. (1992) Gonadotropin receptors in human fetoplacental unit: implications for hCG as an intracrine, paracrine and endocrine regulator of human fetoplacental function. *Trophoblast Res.*, **6**, 213-224.
- Licht, P., Cao, H., Lei, Z.M. *et al.* (1993) Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology*, **133**, 3014-3025.
- Lichtenberg, V., Holthe, F., Graesslin, D. and Bettendorf, G. (1986) Different degree of polymorphism of HCG in placenta, serum and urine. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **111** (Suppl. 274), 153-154.
- McIlroy, P.J. (1992) Differences in the characteristics and distribution of rat luteal receptors for native and deglycosylated human chorionic gonadotropin. *Biol. Reprod.*, **47**, 97-104.
- Mishell, D.R., Wide, L. and Gemzell, C.A. (1963) Immunological determination of human chorionic gonadotropin in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **23**, 125-131.
- Nishino, E., Matsuzaki, N., Masuhiro, K. *et al.* (1990) Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**, 436-441.
- Nwokoro, N., Chen, H. and Chrambach, A. (1981) Physical, biological and immunological characterization of highly purified urinary human chorionic gonadotropin components separated by gel electrofocusing. *Endocrinology*, **108**, 291-299.
- Ohashi, K., Saji, F., Kato, M. *et al.* (1992) Tumor necrosis factor- α inhibits human chorionic gonadotropin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **74**, 130-134.
- Padmanabhan, V., Lang, L.L., Sonstern, J. *et al.* (1988) Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoforms distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67**, 465-473.
- Petraglia, F., Vaughn, J. and Vale, W. (1989) Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured placental cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5114-20.
- Phillips, D.J. and Wide, L. (1994) Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 814-819.
- Reuter, A.M., Gaspard, U.J., Deville, J.-L. *et al.* (1980) Serum concentrations of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunits. I. During singleton and twin pregnancies. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, **13**, 305-318.
- Rosa, S., Amr, S., Birken, S. *et al.* (1984) Effect of desialylation of human chorionic gonadotropin on its metabolic clearance rate in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **59**, 1215-1219.
- Sawitzke, A.L., Griffin, J. and Odell, W.D. (1994) Human pituitary chorionic gonadotropin is produced, circulated, and excreted in multiple isoforms. In Lustbader, J.W., Puett, D. and Ruddon, R.W. (eds), *Glycoprotein Hormones*. Springer-Verlag, New York, pp. 321-342.
- Shumaker, C.R. (1986) PKCALC: a basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metab. Rev.*, **17**, 331-348.
- Simpson, E.R. and MacDonald, P.L. (1981) Endocrine physiology of the placenta. *Ann. Rev. Physiol.*, **43**, 163-188.
- Skarulis, M.C., Wehmann, R.E., Nisula, B.C. and Blithe, D.L. (1992) Glycosylation changes in human chorionic gonadotropin and free alpha subunit as gestation progresses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **75**, 91-96.
- Ulloa-Aguirre, A., Miller, C., Hyland, L. and Chappel, S. (1984) Production of all follicle-stimulating isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol. Reprod.*, **30**, 382-387.
- Ulloa-Aguirre, A., Méndez, J.P., Díaz-Sánchez, V. *et al.* (1985) Self-priming effect of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **61**, 926-932.
- Ulloa-Aguirre, A., Méndez, J.P., Cravioto, A. *et al.* (1990) Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotropin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Hum. Reprod.*, **5**, 661-669.
- Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P. *et al.* (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum. Reprod.*, **7**, 23-30.
- Van Damme, M.P., Robertson, D.M. and Diczfalusy, E. (1974) An improved *in vitro* bioassay method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse Leydig cell preparations. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **77**, 655-671.
- Wide, L. (1986) The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **112**, 336-344.
- Wide, L. and Hobson, B. (1987) Some qualitative differences of hCG in serum from early and late pregnancies and trophoblastic diseases. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **116**, 465-472.
- Wide, O., Lee, J.-Y. and Rasmussen, C. (1994) A change in the isoforms of human chorionic gonadotropin occurs around the 13th week of gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 1419-1423.
- Yoshimura, M., Hershman, J.M., Pang, X.P. *et al.* (1993) Activation of the thyrotropin (TSH) receptor by human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone in Chinese hamster ovary cells expressing functional human TSH receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**, 1009-1013.
- Yoshimura, M., Pekary, A.F., Pang, X.-P. *et al.* (1994) Thyrotropic activity of basic isoelectric forms of human chorionic gonadotropin extracted from hydatidiform mole tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 862-866.
- Zambrano, E., Olivares, A., Méndez, J.P. *et al.* (1995) Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**, 1647-1656.

Received on April 22, 1996; accepted on July 12, 1996