



11261
le
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina

Modificaciones en las Concentraciones de 20 Alfa
Dihidroprogesterona y Progesterona, en Sangre
Materna, con Relación a la Iniciación del
Trabajo de Parto en el Humano.

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

(BIOLOGIA MOLECULAR)

Presenta el Médico Cirujano:

Héctor Rafael Sánchez Nuncio

FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1984



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	página
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	8
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	18
DISCUSION	30
BIBLIOGRAFIA	34

INTRODUCCION

A pesar de que la comprensión del funcionamiento del organismo humano reviste un alto grado de dificultad para el científico, se han podido ir uniendo una serie de conocimientos, que finalmente provocarán la elucidación de su funcionamiento en forma global.

En lo que respecta a esta investigación "CATABOLISMO PLACENTARIO DE PROGESTERONA E INICIACION DEL TRABAJO DE PARTO", se conocen ciertas hormonas, enzimas y metabolitos, así como posibles relaciones y mecanismos de acción, que permiten tratar de comprender, el hasta ahora, complicado fenómeno de la iniciación del trabajo de parto en el ser humano.

Existen comunicaciones que hablan sobre la evolución histórica de la atención del parto y su mecanismo (1), del posible papel que la fibrinólisis pudiera tener en él (2); otras plantean hipótesis plausibles sobre el papel de la oxitocina, las adrenales fetales (cortisol; Malpas 1933), los estrógenos (E) y la progesterona (P4): así como las prostaglandinas (Lukainen y Csapo) y su relación con la regulación de la concentración de Ca^{++} en el útero (3).

Algunas más observan cambios en la sensibilidad del útero a oxitocina, como causa principal, y refutan las hipótesis de la participación fetal, como productor de metabolitos que desencadenen el trabajo de parto (4 y 5).

Csapo, elaboró una teoría (see-saw theory) que implica un papel clave de las prostaglandinas sobre la acción de la P4. (6).

Los datos mencionados en otras publicaciones sobre concentraciones hormonales durante el ciclo menstrual, abren un camino hacia el estudio y comprensión -- del tema (7 y 8).

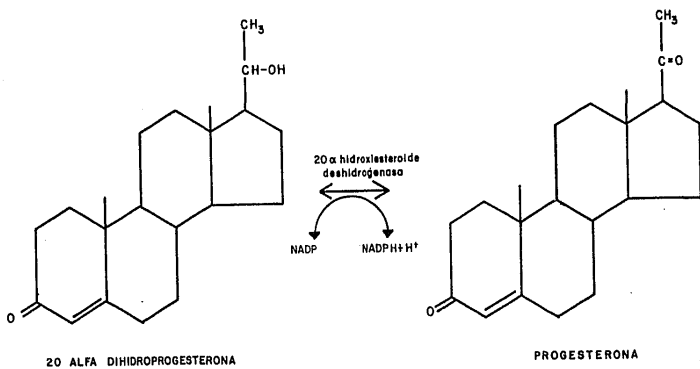
Se piensa que la relación entre concentraciones hormonales y el mecanismo de iniciación de trabajo de parto, en el ser humano, es uno de los principales - factores y que su comprensión permitirá entenderlo más.

Las hormonas esteroides actúan por medio de receptores en el citosol, a nivel transcripcional (9). Se conocen los mecanismos de estimulación e inhibición - de la contracción uterina a nivel neuronal (alfa y beta receptores) y se han investigado los metabolitos que actúan sobre dichos receptores (pregnenolona, etanol, dextrosa, oxitocina) (10), así como la estructura muscular a nivel -- microscópico (enzima:miosina), sobre la que finalmente ejercerán su acción -- las prostaglandinas y la oxitocina, siendo reguladas a su vez por P4 y E, así como el importante papel del monofosfato de adenosina cíclico (AMP_c) (11).

Se ha investigado también el papel fisiológico de los principales actores en el desencadenamiento del trabajo de parto desde el punto de vista de la síntesis de P4, porque se piensa, que esta hormona es el principal metabolito regulador del inicio del trabajo de parto, en el humano y en los mamíferos en - general, conociéndose que el feto metaboliza acetato a colesterol y la placenta colesterol a P4: a la vez que es capaz de metabolizar pregnenolona hasta a E. (12 y 18).

Las comunicaciones relacionadas con el tema de aumentos y disminuciones en la concentración de metabolitos que pudieran desencadenar el trabajo de parto, - mencionan que existen algunos prostanoides que aumentan durante el trabajo de parto, pero que no se ha comprobado que lo desencadenen (prostaciclina) (13),

REACCION CATALIZADA POR 20 α HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA.



Esquema I

así como aumentan otros esteroides durante este tiempo (estriol) (14).

Un trabajo más nos habla de la necesidad de la P4 y estradiol (E2) para la implantación y desarrollo del feto en la rata (15) y finalmente nos encontramos con las publicaciones que apoyan la investigación aquí presentada.

Investigaciones previas han medido las concentraciones de las principales hormonas (P4, 20 alfa dihidroprogesterona (20 DHP), E2) al inicio (16 y 17), durante, y en el último trimestre de la gestación (19, 20 y 21) y observan que las hormonas que interesan a este estudio, P4 y 20 DHP, se incrementan conforme avanza la edad gestacional, (P4 60 ng/ml a la semana 26, y 160 ng/ml a la semana 38, y 20 DHP 12 ng/ml a la semana 26 y 30 ng/ml a la semana 38 de gestación (gráfica 1) y que la relación P4/20 DHP cambia notablemente durante la gestación: 3.5:1 en la semana 4, 15.6:1 en la semana 24, 7.9:1 en la semana 25, 3.2:1 en el embarazo a término. Los tejidos fetales (cerebro, adrenales y sangre) son principalmente los que transforman la P4 en 20 DHP.

La hipótesis de la disminución de la concentración de P4 para disparar el mecanismo de trabajo de parto, en mamíferos, (conejo, rata, oveja, cabra y perro, ha sido comprobada; en ellos la gestación temprana es mantenida por la producción de P4 ovárica (23 y 24); pero en el ser humano, a nivel periférico sólo se ha observado una disminución de la P4 en 5 semanas anteriores al trabajo de parto (25 y 26) pensando que una alteración en la relación P4/E sería la causa del inicio del trabajo de parto (27 y 31). Se conoce que el feto depura el 50% de P4 y el 48% de E2 pero éstos no cambian su concentración al inicio del trabajo de parto (28 y 35).

Varios artículos desmienten la hipótesis de una caída en la concentración de P4 a nivel periférico como desencadenante del trabajo de parto (29, 30, 31, 33 y 44).

Sin embargo en las mediciones hechas en placenta humana antes y después del trabajo de parto, esta caída si se observa (antes del trabajo de parto 1.63 ug/g y después del trabajo de parto 0.69 ug/g) (32).

A la vez se han hecho cuantificaciones hormonales postparto, pero los cambios observados no proporcionan mayor información al respecto (34 y 35).

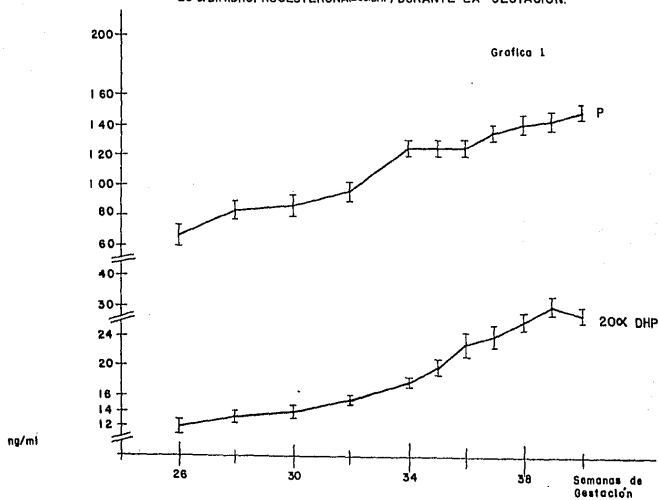
Las prostaglandinas, por su efecto estimulador sobre la contracción uterina, han sido muy estudiadas, y se ha analizado el aumento de su concentración durante el trabajo de parto, pero no parecen tener un papel en el inicio del mismo, (36, 37, 38, 39 y 40), sin embargo inhiben la síntesis de P4, in vitro y al parecer estabilizan el mecanismo de trabajo de parto en vivo (41).

Otra diferencia entre los mamíferos estudiados y el ser humano es que las placentas de los primeros sintetizan P4 a partir de pregnenolona, pero la metabolizan rápidamente por delta 4 reductasa, 3 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, 20 alfa y 20 beta hidroxisteroide deshidrogenasas. Existen en la placenta de primates enzimas que convertirán andrógenos a estrógenos que no existen en el humano (42 y 43).

Dentro del metabolismo de P4 en la mujer y en la etapa de trabajo de parto -- parece jugar un papel muy importante la enzima 20 alfa-hidroxisteroide deshidrogenasa, cuyo metabolito, la 20 alfa dihidroprogesterona, (descubierto por Butenandt y Schmidt en 1934), se encontró en casi todos los tejidos de la madre y el feto, pero en mayor cantidad en la placenta y en el micometrio, así como en las membranas fetales. Se observa un aumento de la actividad de esta enzima en estos tejidos conforme avanza la gestación (44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y 55), así como se ha descubierto un papel biológico a este metabolito la 20 DHP (inhibición de la transformación de pregnenolona a P4) (52, 53 y 59).

CONCENTRACIONES EN SANGRE PERIFERICA MATERNA, DE PROGESTERONA(P) Y
20 α DIHIDROPROGESTERONA(20 α DHP) DURANTE LA GESTACION.

Grafico 1



También se han estudiado otras enzimas que metabolizan P4, pero estas no parecen jugar un papel importante en el desencadenamiento del trabajo de parto, porque sus actividades no tienen variaciones en el inicio o transcurso del mismo. (3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa, delta 5 isomerasa) así como sus precursores (lipoproteínas de baja densidad, acetato, etc) (54, 56, 57 y 58), finalmente otros estudios apoyan las teorías de uniones intercelulares y la conducción eléctrica como causas de desencadenamiento del trabajo de parto (60, 61 y 62) y otros más se han abocado a la tarea de estudiar a los receptores de P4 como posibles causantes de la disminución virtual de la concentración de P4 in situ, siendo esta perspectiva de mucho interés (63, 64, 65, 66, 67, 68 y 69).

HIPOTESIS

Se ha observado que aunque no se logran detectar disminuciones de la concentración de P4 en el humano, a nivel de la circulación plasmática, antes del desencadenamiento del trabajo de parto (disminución que sí ha sido observada en otros mamíferos); a nivel placentario el catabolismo de P4 parece estar acelerado (32).

Dentro de los estudios previos del metabolismo de P4, se ha logrado el aislamiento de la enzima delta 5,3 beta hidroxisteroide oxidoreductasa (deshidrogenasa), productora de P4 a partir de pregnenolona. Se ha aislado de la fracción mitocondrial de placenta humana, pudiendo estudiarse a fondo su actividad que al parecer no se altera con el trabajo de parto (80). También se han estudiado dentro de su catabolismo algunos de los metabolitos, siendo el principal la 20 DHP, - producida en la reacción catalizada por la enzima 20 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa (42, 43, 44, 45, 46 y 47).

Esto permite observaciones a nivel placentario de cambios entre la P4 y los demás metabolitos; así concomitantemente con la disminución de ésta haya una elevación en la concentración de 20 DHP y de prostaglandinas. Pudiéndose elaborar una hipótesis sobre el papel de la 20 DHP para el desencadenamiento del trabajo de parto.

Por lo tanto nuestra hipótesis sugiere que es de esperarse que el pico máximo de concentración de 20 DHP en sangre materna se alcance en la fase activa del

trabajo de parto, en vista de que el catabolismo placentario de P4 a 20 DHP, está aumentado durante el mismo.

Es por lo tanto de esperarse que en el postparto inmediato debe existir una caída en las concentraciones de 20 DHP.

La relación P4/20 DHP debe llegar a su valor mínimo durante el trabajo de parto y aumentar quizá, en el postparto inmediato.

El antecedente que se tiene es que la concentración de 20 DHP en la sangre materna periférica, aumenta a medida que aumenta la edad gestacional, ocurriendo algo semejante con otros esteroides como la P4, 16 alfa hidroxiprogesterona y 17 alfa hidroxiprogesterona (20).

Los valores de 20 alfa DHP aumentan de 835.5 ± 103 pmoles generados por mg de proteína por hora antes del parto, a $1,160.4 \pm 101$ pmoles/mg/h después de éste, en placenta, debido al aumento de actividad del enzima 20 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa. (55)

Las concentraciones de P4 en la sangre materna periférica van de 70 ng/ml a 140 ng/ml y para 20 DHP de 12 ng/ml a 28 ng/ml en la semana 26 y a término, respectivamente (20).

Resultando estos cambios en una modificación en la relación P4/20 DHP en tejido placentario, que decreció desde 2/1, antes del parto, a 1/1 después del mismo, pudiendo ser este fenómeno de importancia en el mecanismo de iniciación y continuación del trabajo de parto.

MATERIAL Y METODOS

Individuos sujetos a estudio:

El estudio analítico comparativo se realizó con un total de 76 mujeres las cuales fueron asignadas en 4 grupos.

- 1) Mujeres a término (38-40 semanas de gestación) y sin trabajo de parto (24 - mujeres)
- 2) Mujeres a término durante la fase activa del trabajo de parto (26 mujeres)
- 3) Mujeres con 24 hrs de postparto (13 mujeres) y
- 4) Mujeres con 48 hrs de postparto (13 mujeres).

En todos los casos fue obtenida la aprobación verbal de cada individuo para su participación en el estudio.

Recolección de muestras plasmáticas.

La obtención de las muestras se realizó en la Unidad de Gineco-Obstetricia del Hospital General S. S. A. por venopunción, entre las 8 y 10 hrs para las mujeres a término y sin trabajo de parto y para las mujeres con un postparto de 24 y 48 hrs. En el caso de las mujeres con trabajo de parto efectivo (3 contracciones en 10') se tuvo que realizar por las noches entre las 0 y 6 hrs por ser este horario el de mayor concentración de este tipo de mujeres.

Una vez obtenida la muestra sanguínea fue centrifugada a 3000 g por 10' y el plasma fue almacenado a -70° C hasta utilizarlo.

La edad de las mujeres osciló entre 16 y 35 años, con un promedio de 25.5

años. Las mujeres en general procedían de un medio socioeconómico bajo y la mayoría fueron multíparas. Se realizaron "pooles" (muestras de concentración conocida) de control de calidad en base a 1) mujeres embarazadas a término, 2) mujeres postparto, 3) suero de hombre y 4) suero libre de esteroides.

Material químico:

4-pregnen-3,20-diona ($1,2 \text{ }^3\text{H}$ (N)) (act. esp. 57.5 Ci/mmol) e hidroxipregnen-4-3-ona-20-alfa ($1,2 \text{ }^3\text{H}$ (N)) (act. esp. 55 Ci/mmol) obtenidos de New England Nuclear, Boston Massachusetts. Anticuerpos específicos para P4 y 20 DHP obtenidos de Radioassay System Lab, Inc. y el Instituto Pasteur, París, Francia, respectivamente.

4-pregnen-3,20-diona e hidroxipregnen-4,3-ona-20 alfa obtenidos de Sigma. Etanol, acetona, éter dietílico, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , azida de sodio, NaCl, - carbón activado, tolueno y metanol obtenidos de Merck (México).

Sephadex LH-20, PPO, dimetil POPOP, Dextrán, Gelatina obtenidos de Sigma. BBS (bio-solv) obtenido de Packard. Tubos de poliestireno 12 X 75 mm obtenidos de Alba Nuclear (México), viales de 20 ml obtenidos de Fisher, contador de espectrometría de centelleo líquido marca Packard, modelo 3255. Centrífuga Sorvall RT-6000. Tubos de vidrio, vortex y Dubnoff (baño metabólico con agitación).

Radioinmunoanálisis (RIA).-

Se utilizó este método por estar reportado en la literatura como el más exacto, preciso, reproducible y específico en la medición de hormonas esteroides en muestras donde se encuentran a bajas concentraciones.

La precisión en un RIA se define como el grado de variación en la cuantificación repetida de una misma muestra, alrededor de la media; la reproducibilidad implica que el resultado obtenido, en una muestra dada, se reproduce en cuantificaciones repetidas en diversos análisis. Estando las 2 íntimamente ligadas entre sí y siendo la imagen inversa de los errores cometidos en el transcurso de los análisis.

La exactitud de un análisis es el grado de acercamiento entre el valor obtenido a través del RIA y la concentración real en la muestra. La especificidad de un RIA puede definirse como el reconocimiento selectivo de la estructura esteroide (hormona) que desea cuantificarse, sin interferencia de estructuras esteroideas análogas u otras sustancias presentes en la muestra; como se ha podido observar en ciertas investigaciones, en las cuales se tienen compuestos parecidos a las hormonas pero con ciertos grupos sustituidos en forma diferente, produciéndose una diferente estereoquímica (isómeros), donde los estereoisómeros pueden llegar a producir anticuerpos que reaccionarían con las hormonas objeto del estudio (70).

Para cada hormona medida se formó una curva estándar (dosis-respuesta) para la valoración de las muestras problema, en base a concentraciones conocidas de la misma y su reacción al anticuerpo, representa la relación entre el grado de unión de la hormona marcada con el anticuerpo y la concentración de la hormona (estándar).

Existen varias alternativas para la expresión gráfica de la dosis-respuesta, y la que se utilizó por lo regular fue:

Transformación logit (logit de porcentaje de radiactividad unida al anticuerpo, la radiactividad unida al anticuerpo en ausencia de estándar vs logaritmo

decimal del estándar.

La transformación logit-log introducida por Rodbard (70) es muy recomendable porque suprime la posibilidad de errores personales en el trazo de la curva dosis-respuesta y en el cálculo de las muestras desconocidas.

La transformación logit(Y) es:

$$Y = \frac{100(U-UNE)}{U_0-UNE}$$

U= porcentaje de radiactividad unida al anticuerpo

U₀= radiactividad unida al anticuerpo en ausencia de estándar

UNE= Unión no específica (hormona marcada en ausencia de anticuerpos y estándar)

$$\text{logit } Y = \ln \left(\frac{Y}{100-Y} \right)$$

Al utilizar la transformación logit-log de la curva dosis respuesta y obtener una línea recta se facilita la interpretación del análisis. En primer término se calculan los coeficientes de regresión de la recta, que permiten obtener el valor de la pendiente que se designa como b y el valor del intercepto al origen que se designa como a. En la práctica el valor de b=-2.303 es una aproximación y se deben aceptar valores de b entre -2.147 a -2.459, es decir, -2.303 ± 0.156 . La reproducibilidad del valor de b en una serie de análisis es un parámetro en el control de calidad.

Otro parámetro de la curva dosis-respuesta es el coeficiente de correlación entre los puntos de la misma que debe ser cercano a 1, y estos dos parámetros se emplearon metodológicamente para la valoración de las curvas, y en algunos análisis se aplicaron otros valores de precisión como la sensibilidad de la curva dosis-respuesta y perfil de precisión de la curva dosis-respuesta li-

nearizada.

Otros parámetros medidos en este sistema fueron la variación intra-análisis y la variación inter-análisis.

Los errores sistemáticos y las fallas personales al graficar la curva dosis-respuesta pueden alterar en forma importante la exactitud. Como ejemplo de los primeros, se podrían mencionar el uso de pipetas mal calibradas, la no sustracción de la masa presente en el estándar interno (cantidad de hormona tritiada agregada a la muestra para la corrección de pérdidas durante el proceso de extracción y separación cromatográfica), valores blancos inadecuados, la falta de equilibrio entre el estándar interno y el plasma previo a la extracción, etc.. Por otro lado si las muestras desconocidas son calculadas sobre la curva estándar, graficada manualmente (particularmente cuando se realiza sin conversión lineal), se corre el riesgo de una estimación inexacta (72, 73, 75, 76 y 79).

Purificaciones:

Las hormonas radiactivas fueron purificadas por columna de Sephadex LH-20 empleando como eluyentes tolueno, metanol (85:15 v/v). (75)

En P4 y 20 DHP no tritiadas se comprobó su pureza por cromatografía en placa fina.

Para la producción de anticuerpos contra hormonas esteroides se conoce que es necesario al inyectarlos en el conejo para producir la respuesta inmune (IgG) además de hacerlo con el adyuvante de Freund, hacerlo con el esteroide unido a carbodiimida, anhídrido succínico o clorocarbonato. (74 y 79).

Las extracciones de esteroides de suero o líquidos biológicos se pueden realizar directa o indirectamente, nosotros elegimos el método directo del éter

etílico (75).

El líquido de centelleo debe poseer; 1) solvente (tolueno) 2) solubilizador (BBS) 3) fluor primario y secundario (PPO y dimetil POPOP) 4) la muestra radiactiva P y 20 DHP ^3H). El fenómeno de apagamiento es reportado como posible causa de alteración en los resultados y se debe a cualquier cosa que interfiera con la visualización por los tubos multiplicadores de la luz emitida por la muestra reduciendo la eficiencia del centelleo líquido.

Existiendo dentro de algunos aparatos métodos para su corrección (78).

Radioinmunoanálisis de 20 alfa dihidroprogesterona:

Extracción.-

- 1) En tubos de vidrio se agregan 100 ul de 20 DHP ^3H (2000 cpm).
- 2) Agregar 200 ul de suero problema
- 3) Agitar 3 pulsos de 2 a 3 segundos en Vortex
- 4) Dejar equilibrar durante 15 minutos a temperatura ambiente
- 5) Agregar 3 ml de éter etílico . Agitar en el Vortex 1 minuto y dejar separar las fases.
- 6) Congelar el suero a - 70° C utilizando hielo seco/acetona, decantar la fase etérea a otro tubo de vidrio, evaporar el éter a sequedad a 37° C.
- 7) Resuspensión del extracto etéreo adicionando 800 ul de buffer de fosfato pH 7.2-7.4
- 8) Agitar en vortex por un minuto. Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Incubar a 60° C 10 minutos, con agitación constante
- 10) Volver a agitar 1 minuto

11) Tomar las alícuotas correspondientes en viales de 20 ml (200 ul para calcular el porcentaje de recuperación) y en tubos de poliestireno 12X75 mm (100 ul para RIA).

(Buffer de fosfatos 1 M con NaCl 0.154 M, 0.1% gelatina 0.1% azida de sodio). Una vez obtenido el resultado de porcentaje de extracción, siendo éste entre $95 \pm 10 \%$ se procede al RIA. (71)

En los tubos para RIA (poliestireno 12X75 mm) que ya poseen la muestra extraída, se añaden 100 ul de solución de esteroide marcado (10,000 cpm) previamente purificado en columna de Sephadex LH-20 y 100 ul de anticuerpo específico para el esteroide a medir. Introduciendo en el mismo ensayo tubos que contengan el mismo volumen de muestra, en este caso de buffer de fosfatos, con la hormona marcada y el anticuerpo, y otros con solo la hormona marcada, igualando el volumen con el mismo buffer.

También se introducen los tubos con los "pooles" de control de calidad y los que servirán para formar la curva dosis-respuesta (tubos con concentraciones conocidas de la hormona no marcada).

Los tubos se incuban por 18-20 hrs a 4° C, posteriormene se añade una suspensión de carbón-dextrán (carbón 0.625%, dextrán 0.0625% en buffer de fosfatos) a razón de 200 ul por tubo en un tiempo máximo de 3 minutos entre el 1er. y el último tubo. Nueva incubación por 10', decantando los tubos en viales de 20 ml. Para el conteo de radiactividad, a los viales se les añade líquido de centelleo a razón de 10 ml por vial. El líquido de centelleo contiene: tolueno 2 l, BBS 25 ml, etanol 42 ml, PPO 10 g y Dimetil POPOP 1 g.

Se realiza el conteo por 4' para disminuir el error y se realizan los cálculos de los resultados obtenidos.

Radioinmunoanálisis de Progesterona:

La extracción posee los mismo pasos que la anterior solo que se añaden 100 ul de suero y se reconstituyen en 4 ml de buffer.

Tomando alícuotas para recuperación y ensayo de 500 ul.

Siendo el volumen final de ensayo para P4 de 700 ul y para 20 DHP de 400 ul.

El análisis estadístico utilizado en este estudio para valorar diferencias - significativas fue el de análisis de varianza.

RESULTADOS

a) Del Método:

Extracción: el porcentaje de extracción promedio fue de 93.2% para 20 DHP y 90% para P4.

Los resultados de la purificación de las marcas en columna de Sephadex LH-20 pueden apreciarse en las gráficas 2 y 3.

La reactividad cruzada para el antisuero de 20 DHP fue de 6.1% para el isómero beta y menor que 0.01% para otros esteroides (delta 5 pregnenolona, 17 alfa - hidroxiprogesterona, corticosterona, cortisol, estradiol 17 beta) y 0.07% para P4.

La unión no específica en el RIA de 20 DHP fue menor del 3%, y la sensibilidad de la curva dosis-respuesta fue de 80 pg/tubo con una unión máxima de 51%. La curva dosis-respuesta permitió el ensayo de muestras entre 30 y 1000 pg/tubo. (tabla I)

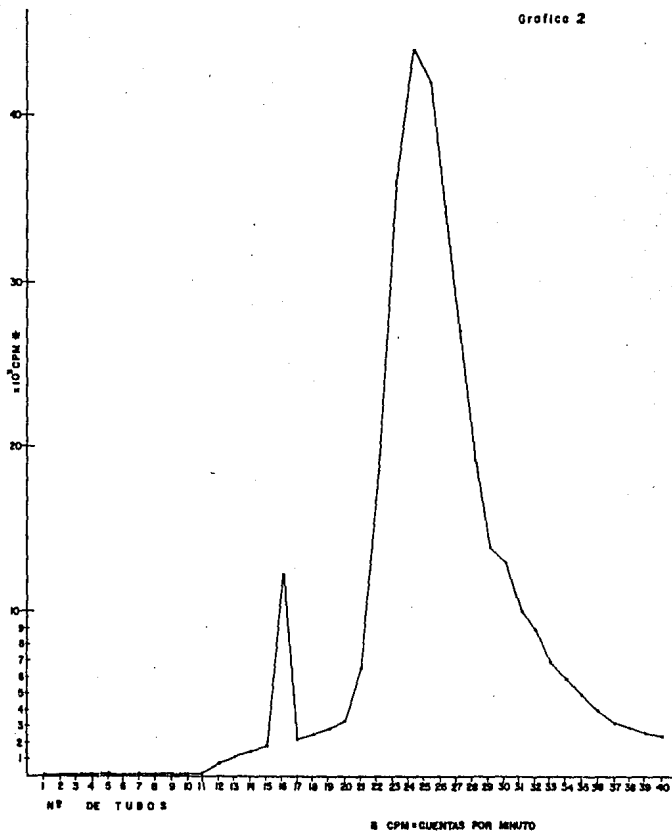
La reactividad cruzada para el antisuero de P4 fue 1.5% para desoxicorticosterona, 0.85% para pregnenolona, 0.3% para 20 DHP.

La unión no específica en el RIA de P4 fue menor del 4%, la sensibilidad de la curva dosis-respuesta fue de 80 pg/tubo con una unión máxima de 50%. La curva dosis-respuesta permitió el análisis de muestras entre 625 y 2000 pg/tubo. (Tabla I).

El coeficiente de regresión para 10 curvas dosis-respuesta de 20 DHP fue de -

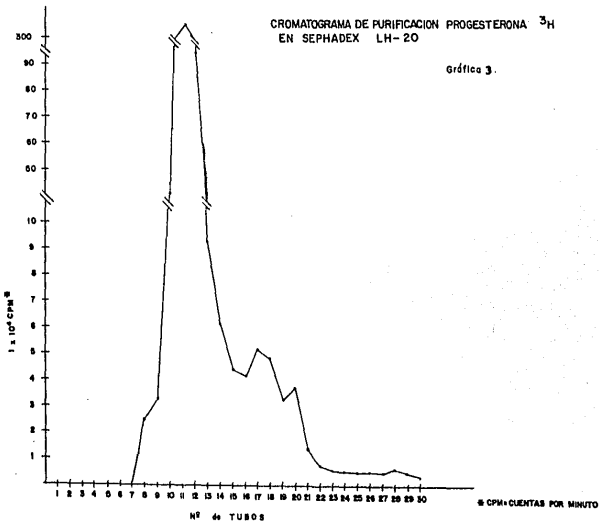
CROMATOGRAMA DE PURIFICACION DE $20\alpha\text{-DHP}^3\text{H}$
EN SEPHADEX LH-20

Grafico 2



CROMATOGRAMA DE PURIFICACION PROGESTERONA ³H
EN SEPHADEX LH-20

Gráfico 3.



0.9951, siendo de 0.9987 para 10 curvas de P4; y la pendiente de las curvas - linearizadas fue de : -2.8881 ± 0.082 para 20 DHP y -2.2790 ± 0.052 para P4, validando según los criterios de control de calidad y valoración, las concentraciones obtenidas.

La variación intra-ensayo fue menor del 6% para 20 DHP y menor del 10% para P4, y la variación inter-ensayo fue menor del 10% en los dos casos para las concentraciones media y alta. Comprobando todavía más la exactitud y precisión de las mediciones.

Los resultados en cpm (cuentas por minuto) de la radiactividad de las muestras en los RIA's fueron procesados por programas realizados para calculadoras HP-33C y HP-97 (82).

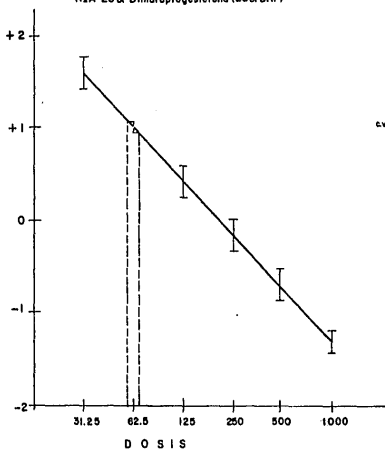
Otros parámetros de control fueron la sensibilidad de la curva dosis-respuesta y perfil de precisión (gráficas 4 y 5).

b) Del estudio:

Los resultados observados en la Tabla II nos demuestran que existió un pico - significativo en la concentración de 20 DHP en sangre materna periférica, durante el parto efectivo, con concentraciones que se fueron incrementando hasta 2 veces después de la iniciación del parto. Posteriormente se observó un decremento en concentración hasta concentraciones casi normales de mujeres no embarazadas, a las 48 hrs postparto (7 y 8) (gráficas 6 y 8).

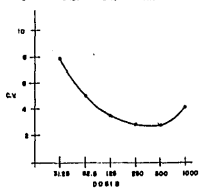
En cambio, y en acuerdo con los artículos anteriormente citados (29, 30, 31 - 33 y 44) no se observaron cambios significativos en la concentración de P4 en el trabajo de parto efectivo, decayendo en los niveles hasta la concentración normal de P4 en mujeres no embarazadas. a las 48 hrs postparto (gráficas 7 y 8)

Sensibilidad curva dosis respuesta
RIA 20 α Dihidropogesterona (20 α DHP)



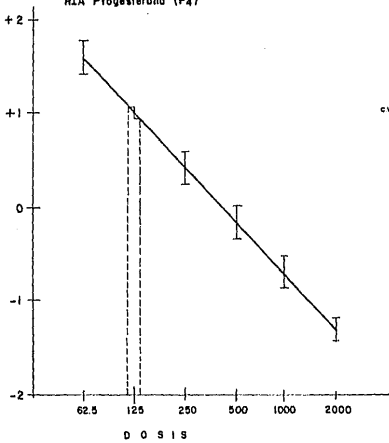
PERFIL DE PRECISION CURVA DOSIS RESPUESTA RIA 20 α DHP

Estadíst.	Dosis pg/100g	CV	CV
1	1000	37.1	3.71
2	500	18.5	3.7
3	250	7.06	3.65
4	125	6.25	3.61
5	62.5	2.81	3.57
6	31.25	2.42	3.53



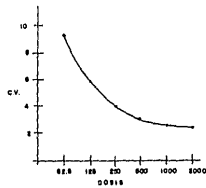
Gráfica 4

Sensibilidad curva dosis respuesta
RIA Progesterona (P₄)



PERFIL DE PRECISION CURVA DO SIS RESPUESTA RIA (P₄)

Estadíst.	Dosis	1σ	C.V.
1	2000	-1.8008	0.10
2	1000	-0.9858	0.23
3	500	-0.1959	0.76
4	250	0.4979	1.21
5	125	1.1225	0.81
6	62.5	1.8722	0.54



Gráfica B.

La oscilación de la relación P4/20 DHP resultó ser la esperada, como fue mencionado anteriormente (20).

TABLA I

VALIDACION DEL RADIOINMUNOANALISIS

	20 IHP 3-100	P4 625-2000
Intervalo de la curva dosis - respuesta (pg/tubo)		
Variación intraensayo	6%	10%
Variación interensayo	10%	10%
Unión no específica (UNE)	3%	4%
Valor promedio de 10 curvas diferentes:		
Coefficiente de regresión	0.9951	0.9987
Pendiente	-2.2881± 0.082	-2.2790±0.052
Cada análisis incluyó los controles siguientes: (pg/tubo)		
Muestra concentración alta	427	1224
Muestra concentración media	253	440
Muestra concentración baja	30.20	80
Suero libre de esteroides	12.07	24

TABLA II

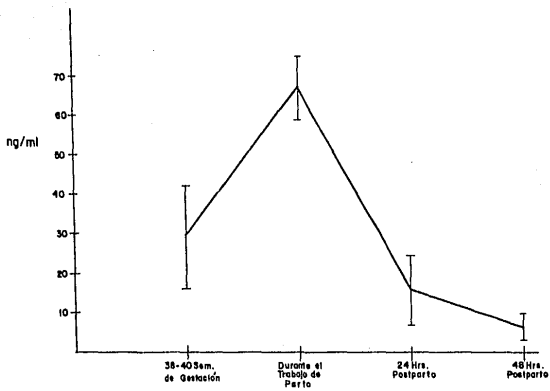
Concentraciones de Progesterona y 20 alfa dihidroprogesterona en sangre materna periférica

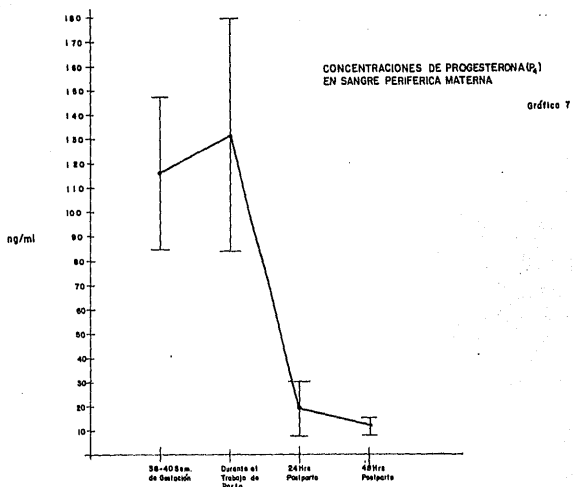
Pacientes	n	P4 (ng/ml±SD)	20 RHP [*] (ng/ml±SD)	P4/20RHP Relación
A término sin trabajo de parto	24	126.12±19.32	30.24±13.94	4.1
A término con trabajo de parto efectivo	26	144.44±27.57	66.70±8.02*	2.1
24 h postparto	13	19.02±6.19*	16.45±9.12*	1.1
48 h postparto	13	12.34±2.03*	6.71±3.06*	1.8

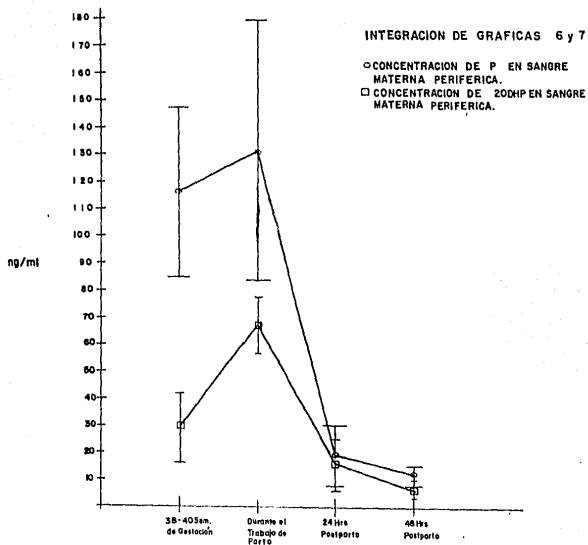
* p<0.005 (análisis de varianza).

CONCENTRACIONES DE DIHIDROPROGESTERONA
(20α DHP) EN SANGRE PERIFERICA MATERNA

Grafica 6







Gráfica 8

DISCUSION

Los niveles de P4 encontrados en sangre materna periférica durante el trabajo de parto efectivo, no parecen estar reflejando, lo que hipotéticamente debe suceder in situ: disminución de la concentración de P4 en membranas fetales, miometrio y placenta, para el desencadenamiento del trabajo de parto en el humano; esto es por demás interesante y se ha comprobado en el conejo y en el humano (32 y 83). El decremento en la P4 al final de la fase lútea del ciclo ovárico en mujeres no preñadas está asociado con la instalación de ciertos eventos metabólicos en el endometrio que posee muchas analogías bioquímicas con el parto humano (7, 8 y 47).

Por otro lado, se ha comprobado que el horario en la toma de muestras, por efectos de ciclo circadiano en liberación de hormonas esteroides, pueden afectar la desviación estándar, de un mismo grupo como sucedió en el estudio (84). Sin embargo, está comprobado que la técnica utilizada en este trabajo, supera a otras más en cuanto a precisión y seguridad en la medición de las concentraciones de hormonas esteroides (85).

Lo que se ha estudiado hasta el momento de la iniciación del trabajo de parto en el humano y su relación con P4 y sus metabolitos, nos indica que en los partos prematuros se ha encontrado un abatimiento de la P4 (27) y que esto cambiaría la relación P4/E, dando a los E un papel antagónico al de la P4, -- por ejemplo: se piensa que en la oveja el parto empieza porque un aumento del cortisol fetal estimula la liberación de E no conjugados desde la placenta y

causa una caída en la secreción de P4.

Los E estimulan la producción de prostaglandina F alfa 2, que a su vez producirá cambios en las contracciones uterinas (31).

Este antagonismo entre P4 y E, es comprobado por la regulación que la P4 ejerce sobre los receptores a estrógenos, disminuyéndolos, misma acción ejercida sobre sus propios receptores, al contrario de los E que favorecen la producción de receptores a P4 (86).

También se piensa que la P4 puede metabolizarse a E por la 17 alfa hidroxilasa, por efecto de corticoides sobre el metabolismo placentario, desencadenando el trabajo de parto (87).

Otra hipótesis sugiere que el desencadenamiento del trabajo de parto en el humano se lleva a cabo por las membranas fetales, las cuales poseen gran concentración de fosfolipasa A2 en los lisosomas de sus células, enzima inhibida por efecto de la P4; pero se ha observado que el metabolismo de P4 en este tejido decae en la 2a. mitad del embarazo, pensándose en un posible secuestro subcelular de P4 que a la larga significaría el desencadenamiento del trabajo de parto por acción de la fosfolipasa A2 sobre el ácido araquidónico (también en gran concentración en este tejido), formación de prostaglandinas e inhibición del retículo sarcoplásmico para secuestrar calcio (90).

Este último es analizado sobre el efecto de P4 sobre la unión de calcio a la fracción microsomal del útero humano gestante y no gestante, incrementándola. Actividad también probada en útero de conejo, teniendo como antagonistas a oxitocina y prostaglandinas.

Se menciona que hay un aumento de la enzima 20 alfa hidroxisteroide oxidoreductasa ovárica (que cataboliza P4 a 20 DHP y reversa) cerca del inicio del

trabajo de parto y en la lactación en la rata (91). En este mismo modelo biológico, se conoce que esta enzima es inhibida por prolactina y estimulada por LH; el aumento de su actividad (por lactación acelerada) produce reabsorción de fetos en edades gestacionales tempranas, efecto inhibido por P4 y LH. (92) La inducción de 20 alfa hidroxisteroide oxidoreductasa (deshidrogenasa), hacia el final del embarazo en la rata, parece ocurrir en el endometrio y no se ve reflejada, al mismo tiempo, en disminución de P4 periférica. Pero se desconocen qué factores la controlan (93).

Las prostaglandinas E1, F alfa 1, F alfa 2 y E2 inhiben esta enzima en la reacción 20 DHP a P4 y se piensa que esto pueda influir para el decaimiento de P4 y el inicio del trabajo de parto (94).

A la 20 DHP se le han estudiado papeles fisiológicos, en rata, encontrando que: es 1/10 activa comparativamente con P4 pero no puede sostener un embarazo, en ratas, ratones o conejos; no sinergiza con E induciendo comportamiento sexual en las ratas; no modifica los niveles de gonadotrofinas no altera los ciclos ováricos; no tiene actividad de anti-progestina; sinergiza los efectos de P4 en la deciduización(95) y la transformación de pregnenolona a P4 es inhibida in vitro por 20 DHP. (52).

Por nuestros resultados podemos concluir que el pico observado en la 20 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa y el incremento observado al inicio y durante el trabajo de parto de 20 DHP, respectivamente, que la actividad de la enzima está aumentada y puede existir un decaimiento in situ de concentración de P4 a nivel de miometrio, placenta y membranas fetales; disminución no observada en sangre periférica.

Sin embargo estudios sobre concentración miometrial de P4 han mostrado dismi-

nuciones estadísticas en concentraciones tisulares de P4 relacionadas con el inicio del trabajo de parto.

Nuestros estudios serán ahora dirigidos para encontrar la evidencia de competitividad entre P4 y 20 DHP a nivel de receptores miometriales, porque éste pudiera también ser un mecanismo para disminuir la concentración de P4 miometrial sin aparente cambio en la concentración sanguínea.

También parecen abrirse nuevos horizontes en cuanto al estudio de la regulación de la actividad enzimática de la 20 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, ya que esta enzima fue reportada en 1960 como posible enzima bifuncional, actuando a la vez sobre E, como 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa y sobre P4 en catalizaciones reversibles (96); siendo mayor su afinidad por los E en una relación de 100:1. Encontrándose dicha enzima en el citosol de la placenta y en las mitocondrias del miometrio, su actividad podría ser regulada por las concentraciones variables de dichos esteroides durante la gestación y el inicio del trabajo de parto (97).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Smyth CN Biomechanics and Human Parturition. Proc Roy Soc Med 67:189-194 March 1974.
- 2.- Konopka P. Essai d'explication du Mécanisme du travail. Rev Franc Gynec 68(1):7-12.
- 3.- MacDonald Paul C. Initiation of Parturition in the Human Female. Seminars in Perinatology 2(3):273-286 July 1978.
- 4.- Editorial: The Initiation of Labour. The Lancet 124-125 January 26 1974.
- 5.- Pearson Berley E. Does the human fetal adrenal play a role in parturition? Am J Obstet Gynecol 115(4):521-525 Feb 15, 1973.
- 6.- Csapo A. I. The "seesaw" theory of the regulatory mechanism of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 121(4):578-581 Feb 15, 1975.
- 7.- Aedo A. R. Studies on the pattern of circulating steroids in the normal menstrual cycle. Acta Endocrinologica 82:600-616, 1976.
- 8.- Florensa E. Plasma 20 alfa dihydroprogesterone, progesterone and 17-hydroxyprogesterone:daily and four-hourly variations during the menstrual cycle. Journal of Steroid Biochemistry, 7:769-777, 1976.
- 9.- Chan Lawrence. Mechanism of action of the sex steroid hormones. The New England Journal of Medicine 294(25):1372-1381 June 17, 1976.
- 10.- Bieniarz Joseph. Inhibition of uterine contractility in labor. Am J Obst Gynecol 111(7):874-885 Dec 1, 1971.
- 11.- Huszar Gabor. Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: Regulation at the cellular and molecular levels. Am J Obstet Gynecol --- 142(2):225-237 Jan 15, 1982.
- 12.- Diczfalusy Egon. Endocrine functions of the human fetus and placenta. - Am J Obstet Gynecol 119(3):419-433 June 1, 1974.
- 13.- Ylikorkala O. Prostacyclin Production increases during human parturition Br J Obst and Gynaec 88:513-516 May 1981.
- 14.- Masson G. M. Changes in plasma oestriol concentration associated with - the onset of labour. J Obst and Gynaec Br Comm 79:970-975 Nov 1972.

- 15.- Raziano Joseph. Effects of antibodies to Estradiol-17 beta and to Progesterone on nidation and pregnancy in rats. *Endocrinology* 90(5):1133-1138 1972.
- 16.- Harrison R. F. Secretion patterns of plasma-progesterone, 17-hydroxy---progesterone and 20 alpha hydroxypregn-4-en-3-one in early normal pregnancy. *Br J Obst and Gynaec* 85:921-926 December 1978.
- 17.- Tulchinsky Dan. Sources of plasma 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. *J Clin Endocr Metab* 35 (6):799-808 1972.
- 18.- Scornegna Antonio. Progesterone and pregnenolone sulfate in pregnancy - plasma. *Am J Obstet Gynec* 113(1):60-65 May 1, 1972.
- 19.- Buster John E. Interrelationships of circulating maternal concentrations in third trimester pregnancies. II. C18 and C19 steroids. *J Clin End and Metab* 48(1):139-142 1979.
- 20.- Buster John E. Interrelationships of circulating maternal steroid concentrations in third trimester pregnancies. I. C21 steroids. *J Clin End and Metab* 48(1):133-138 1979.
- 21.- Florensa Emma. Plasma 20 alpha dihydroprogesterone, progesterone and 17-hydroxyprogesterone in normal human pregnancy. *Acta Endocrinologica* 86: 634-640 1977.
- 22.- Runnebaum B. Progesterone, 20 alpha-dihydroprogesterone and 20 beta-dihydroprogesterone levels in different compartments from the human foeto-placental unit. *Acta Endocrinologica* 80:558-568, 1975.
- 23.- Stabenfeldt G. H. Peripheral plasma progesterone levels in the ewe during pregnancy and parturition. *Endocrinology* 90:144-150 Jun 1972.
- 24.- Hoffman B. Changes of progesterone, total oestrogens, corticosteroids, prolactin and LH in peripheral plasma around parturition with special reference to the effect of exogenous corticoids and a prolactin inhibitor respectively. *Acta Endocrinologica* 73:385-395, 1973.
- 25.- Turnbull A. A. Significant fall in Progesterone and rise in oestradiol levels in human peripheral plasma before onset of labour. *The Lancet* - 101-103 Jan 26, 1974.
- 26.- Kauppila Antty. Serum progesterone, estradiol, and estriol before and during induced labor. *Am J Obstet Gynecol* 137(4):462-466 June 15, 1980.
- 27.- Osins L. M . Serum Progesterone and estradiol-17 beta levels in premature and term labor. *Am J Obstet Gynecol* 127(6):612-615 Mar 77.
- 28.- Mathur Rajesh. Plasma steroid concentrations in maternal and umbilical circulation after spontaneous onset of labor. *J Clin Endocr and Metab* - 51(6):1235-1238, 1980.

- 29.- Chew P. C. T. Serial plasma progesterone levels at the approach of labour. *Endocr* 69:163-164, 1976.
- 30.- Okada Donald M. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone and -- cortisol in normal labor. *Am J Obstet Gynecol* 119(4):502-507 June 15, - 1974.
- 31.- Shaaban Mandouh M. Changes in unconjugated oestrogens and progesterone concentration in plasma at the approach of labour. *J Obst Gynaec Br Comm* 80:210-217, March 1973.
- 32.- Haskins Arthur. The progesterone content of human placentas before and - after the onset of labor. *Am J Obstet Gynec* 67(2):330-338 Feb 1954.
- 33.- Said Dami. Serum Oestrogens and progesterone after normal delivery. *J - Obstet and Gynaec of Br Comm* 80:542-545 Jun 1973.
- 34.- Runnebaum B. Progesterone, 20 alpha dihydroprogesterone and 20 beta dihydroprogesterone and pregnanediol in different human fetal tissues. - *Acta Endocr (Kbh) Suppl* 173 (48):48 1973.
- 35.- Runnebaum B. Progesterone, 20 alpha dihydroprogesterone, 20 beta dihy-- droprogesterone in mother and child at birth. *Acta Endocr* 80:569-576, - 1975.
- 36.- Schwarz Barry E. Initiation of human parturition III Fetal membrane con-- tent of Prostaglandin E2 and F2 alpha precursor. *Obst and Gynec* 46(5):- 564-568 Nov 1975.
- 37.- Okita Janice R. Initiation of human parturition XIV. Increase in the -- diacylglycerol content of amnion during parturition. *Am J Obstet Gynecol* 142(4):432-435 Feb 15, 1982.
- 38.- Okazaki Takeshi. Initiation of human parturition XII. Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine deci-- dua. *Am J Obstet Gynecol* 139(4):373-381 Feb 15, 1981.
- 39.- Ogburn Paul L. Levels of free fatty acids and arachidonic acid in preg-- nancy and labor. *J Lab Clin Med* 95(6):943-949 Jun 1980'
- 40.- Cantor B. Hormonal changes during induction of midtrimester abortion by prostaglandin F 2 alpha. *Am J Obstet Gynecol* 113(5):607-615 July 1, 1972
- 41.- O'Grady J. P. Inhibition of progesterone synthesis in vitro by prosta-- glandin F2 alpha. *J Reprod Fert* 30:153-156, 1972.
- 42.- Ainsworth Louis. Steroid hormone transformations by endocrine organs -- from pregnant mammals. II Formation and Metabolism of progesterone by - bovine and sheep placental preparations in vitro. *Endocrinology* 81:1349- 1356 Dec 1967.

- 43.- Ainsworth L. Steroid hormone transformations by endocrine organs from - pregnant mammals IV. Biosynthesis and metabolism of estrogens and progesterone by primate placental preparations in vitro. *Endocrinology* 84: 1424-1429 June 1969.
- 44.- Díaz-Zagoya Juan C. Synthesis and catabolism of progesterone in placentas from normotensive and severely hypertensive patients before and after parturition. *Am J Obstet Gynecol* 141(6):637-640 Nov 15, 1979.
- 45.- Díaz-Zagoya Juan C. Metabolism of progesterone by placentas from several mammalian species in vitro. *Am J Obstet Gynec* 135(6): 809-813 1979.
- 46.- Howard Phyllenore. Progesterone metabolism by uterine tissue of pregnant rats. *Steroids* 19(1):35-45 Jan 1972.
- 47.- Lisboa B P. Progesterone metabolism in the human myometrium. *J Steroid - Biochem* 6:1137-1144, 1975.
- 48.- Milewich Leon. Initiation of human parturition IX Progesterone metabolism by placentas of early and late human gestation. *Obst and Gynec* 51(3): 278-280 March 1978.
- 49.- Milewich Leon. Initiation of human parturition, VI Identification and - quantification of progesterone metabolites produced by the components - of human fetal membranes. *J Clin Endocr and Metab* 45(3):400-411, 1977.
- 50.- Schwartz Barry E. Progesterone deprivation in the chorioamnion from laboring women. *Gynecol Invest* 8:98, 1977.
- 51.- Tseng Linda. In vitro measurements in human placenta and fetal membranes of rates of entry, metabolism and release of steroids. *Endocrinology* -- 90:405-414 Feb 1972.
- 52.- Wiener Margaret. Abnormal progesterone synthesis in placental tissue -- from a spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 111 (7):942-946 Dec 1, 1971.
- 53.- Maeyama Masao. Conversion of 20 alpha hydroxy-4-pregnen-3-one to progesterone by human endometrium in vitro. *J Steroid Biochem* 4:457-466, 1973.
- 54.- Edwards Dean P. Human placental 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase:delta 5 Isomerase. *J Biol Chem* 251(6):1632-1638, March 25 1976.
- 55.- Díaz-Zagoya Juan C. 20 alpha hydroxysteroid oxidoreductase activity and 20 alpha dihydroprogesterone concentration in human placenta before and after parturition. *Am J Obst Gynec* 133(6):673-676 Mar 15, 1979.
- 56.- Gibb William. In vitro conversion of pregnenolone to progesterone by - term human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 136 (5):631-634 March 1 1980.

- 57.- Winkel Craig A. Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. *Endocrinology* - 106(4):1054-1060, 1980.
- 58.- Chang Jeffrey R. Simultaneous comparison of delta 5-3beta-hydroxysteroid levels in the foeto-placental circulation of normal pregnancy in labor - and not in labor. *J Clin End and Metab* 42(4):744-751, 1976.
- 59.- Wiest Walter G. Conversion of progesterone to 4-pregnen-20-alpha-ol-3--one by rat ovarian tissue in vitro. *J Biol Chem* 234(12):3115-3121 Dec - 1959.
- 60.- Csapo Arpad I. Effect of progesterone on the electric activity and intrauterine pressure of pregnant and parturient rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 91(2):221-231 January 15, 1965.
- 61.- Garfield R. E. Gap junction formation in myometrium: control by estrogens, progesterone, and prostaglandins. *Am J Cell Physiol* 238(7):C81-C89 1980.
- 62.- Garfield R. E. Possible role of gap junctions in activation of myometrium during parturition. *Am J Cell Physiol* 235-4(3):C168-C179, 1978.
- 63.- Schwartz Barry. Initiation of human parturition V Progesterone binding substance in fetal membranes. *Obst and Gynec* 48(6):685-689 Dec 1976.
- 64.- Milgrom E. Progesterone in uterus and plasma: V An assay of the progesterone cytosol receptor of the guinea pig uterus. *Endocrinology* 90(4): 1064-1070, 1972.
- 65.- Younes M. A. Estradiol and progesterone binding in human term placental cytosol. *Am J Obstet Gynecol* 141(2):170-174 Sep 15, 1981.
- 66.- Clark James H. Regulation of estrogen receptor replenishment by progesterone. *Ann NY Acad Sc* 286:161-169, 1977.
- 67.- Levy C. Estradiol and progesterone receptors in human endometrium Normal and abnormal menstrual cycles and early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 136(5): 646-651, March, 1, 1980.
- 68.- Smith Nancy C. Intracellular localization of progesterone in tissues of the foeto-placental unit. *J Endocr* 51:409-410, 1971.
- 69.- Vu Hai M. T. Hormonal control of progesterone receptors. *Ann NY Acad Sci* 5286:199-209 1977.
- 70.- Bedolla Tovar Norma. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis de hormonas esteroides (Capítulo IV) en: *Teoría y Práctica del Radioinmunoanálisis*. Editor Josué Garza F. 1a. Ed. México D. F. 1983 (en prensa).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 71.- Florensa Emma Radioimmunoassay of plasma 20 alpha dihydroprogesterone. Steroids 22(4):451-465 Oct 1973.
- 72.- Skelley D. S. Radioimmunoassay. Clinical Chemistry 19(2):146-186, 1973.
- 73.- Powell John E. Simple Radioimmunoassay of five unconjugated ovarian steroids in a single sample of serum or plasma. Clin Chem 19(2):210-215, - 1973.
- 74.- Ekins R. P. Radioimmunoassay and saturation analysis. Br Med Bull 30(1) 1-31, Jan 1974.
- 75.- Hall Peter E. WHO Special Programme of Research, development and research training in human reproduction. Method Manual 4th edition, January 1980. Unisante Geneva.
- 76.- Marshall N. Principios básicos del radioinmunoanálisis. (Capítulo II) en: Teoría y Práctica del Radioinmunoanálisis Editor Josué Garza F. 1a. Ed. México D. F. 1983 (en prensa).
- 77.- O. de Villa Guillermo. A specific radioimmunoassay of plasma progesterone J Clin Endocr and Metab 35(3):458-460, 1972.
- 78.- Zak Helman Edith. Counting of beta and gamma emitters used in clinical radioimmunoassays and competitive-binding-assays by liquid scintillation counters. Clin Chem 19(2):191-196, 1973.
- 79.- Thorell Jan I. Radioimmunoassay and related techniques. C V Mosby Company. Saint Louis 1978.
- 80.- Malassine André: Etude comparée de L'activité delta.5, 3 beta hydroxysteroide deshydrogenese des fractions mitochondriales et microsomiales de placentas humains et de chatte. C R Acad Sc Paris T. 290 seire D231-234 21 Janvier 1980.
- 81.- Grover P K. Specificity of antisera to sex steroids I The effect of substitution and stereochemistry. J Steroid Biochem Vol 8 121-126, 1977.
- 82.- Schwartz S. A simple computer program for Scatchard plot analysis of -- steroid receptors including non-specific binding correction on a low cost desk top calculator. J Steroid Biochem 11:1641-1646, 1979.
- 83.- Challis John R. The concentrations of progesterone, estrone and estradiol 17 beta in the myometrium of the pregnant rabbit and their relationship to the peripheral plasma steroid concentrations. Endocrinology 95(1) 160-164, 1974.
- 84.- Buster John E. Subhourly variability of circulating third trimester maternal steroid concentrations as a source of sampling error. J Clin End and Metab 46(6):907-910 1978.

- 85.- Ottesen B. Plasma progesterone, serum estriol and plasma HPL determinations during the last trimester to detect changes before spontaneous -- labor. *Acta Obstet Gynecol* 58:423-437, 1979.
- 86.- Hsueh A J W. Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. *Nature* 254:337-339, 1975.
- 87.- Flint A P F. Increased concentrations for 17 alpha, 20 alpha-dihydroxy-pren-4-en-3-one in maternal and foetal plasma near parturition in -- sheep. *J Endocr* 67:89-97 1975.
- 88.- Milewich Leon. Initiation of human parturition VIII Metabolism of progesterone by fetal membranes of early and late human gestation. *Obst -- and Gynec* 50 (1): 45 -48 July 1977.
- 89.- Carsten May E. Calcium accumulation by human uterine microsomal preparations: effects of progesterone and oxytocin. *Am J Obstet Gynecol* 133(6) 598-601 March 15, 1979.
- 90.- Torok I. The effects of progesterone, prostaglandin F2 alpha and oxytocin on the calcium-activation fo the uterus. *Prostaglandins* 12(2):345-355 August 1976.
- 91.- Lorraine A. Ovarian 20 alpha hydroxysteroid dehydrogenase in teh parturient mouse. *J Endocr* 51:599-600, 1971.
- 92.- Veomett Marilyn J. Termination of pregnancy after accelerated lactation in the rat. *J Reprod Fertil* 44, 529-536, 1975.
- 93.- Flint Anthony P. The appearance of and endometrial 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase towards the end of pregnancy in the rat. *Endocrinology* 92 (2):624-627, 1973.
- 94.- Kiesel Ludwig. The role of prostaglandins, cyclic nucleotides and tri-carboxylic acids in the regulation of the human placental 20 alpha hydroxysteroid dehydrogenase in vitro. *Steroids* 40 (1):99-108 July 1982.
- 95.- Labhsetwar Anant P. Some observations on the gonadotrophin inhibiting - and anti-progestational properties of 20 alpha dihydroprogesterone. *Acta Endocrinologica* 71:13-23, 1972.
- 96.- Strickler Ronald C. Estradiol 17 beta dehydrogenase and 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from human placental sytosol:one enzyme with -- two activities. *Steroids* 36(2):243-253 August 1980.
- 97.- Strickler Ronald D. 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and 17 beta estradiol dehydrogenase localize in cytosol of human term placenta. *Am J Phys* 5(3):E178-E183, 1982.