

0306216  
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE UNION Y  
TRANSDUCCION INTRACELULAR DE LA  
GLOBULINA HUMANA TRANSPORTADORA DE  
ESTEROIDES SEXUALES EN CELULAS DEL  
TROFOBLASTO MANTENIDAS EN CULTIVO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A  
GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCIA

MEXICO, D. F.,

1998.

259039

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.

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, por las facilidades proporcionadas para el desarrollo del este trabajo.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo por su tutoría.

Al Ing. José Luis Urrusti por la ayuda prestada en la corrección de estilo del material escrito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero proporcionada para la realización de mis estudios.

## DEDICATORIA

---

A mis padres  
A Juan Pablo  
A mi hijo

## RESUMEN

---

La proteína transportadora de hormonas esteroideas sexuales, *TeBG* o *SHBG* por sus siglas en inglés (*sex hormone binding globulin*), es una glicoproteína de origen hepático que pertenece a la familia de las  $\beta$ -globulinas y su peso molecular es de alrededor de los 90,000 Da. Y esta fue descrita por primera vez en la década de los 60s<sup>(1)</sup>, y desde entonces se inició el estudio de su estructura y función. Del momento de su descripción a la fecha se ha avanzado en gran medida en el conocimiento de este transportador sanguíneo. En un principio, el papel que se le adjudicó fue el de transportar y regular las concentraciones de las hormonas esteroideas sexuales, respecto a las cuales presenta diferente afinidad.

La década de los 80s genera un cambio en el concepto que se tenía de la *SHBG*; (1) se logra la identificación de nuevos sitios de síntesis para la *SHBG* además del hepático ya conocido, (2) se describe la presencia de receptores membranales específicos, y (3) se inicia una nueva etapa en los estudios sobre la fisiología de esta proteína con el fin de encontrar su participación en los efectos biológicos de los órganos con los cuales interactúa. Tanto la *SHBG* como la *ABP* (*androgen binding protein*) se encuentran codificadas por el mismo gen. *ABP* es una proteína con características semejantes a la *SHBG* pero de origen testicular<sup>(60)</sup>. Se ha

demostrado que la placenta también es un sitio de expresión del gen de *SHBG* <sup>(136)</sup>. La síntesis de *SHBG* placentaria se confirmó con estudios de unión, inmunohistoquímica y estudios de *Northern blot*. Este órgano es considerado como la principal barrera entre la madre y el embrión. Tiene importancia funcional durante la gestación ya que controla diversos eventos. Se sabe que la placenta sintetiza y secreta proteínas, como la gonadotropina coriónica humana y el lactógeno placentario. Además los trofoblastos y tienen capacidad para producir hormonas, neurohormonas y esteroides.

La presencia de sitios de unión específicos para *SHBG/ABP* en la placenta humana sugieren que la *SHBG* producida localmente puede estar involucrada en la fisiología regulación de la placenta. Es por esto que este estudio se enfoca a la descripción de los efectos que pudiera tener la *SHBG* humana en la secreción de la gonadotropina coriónica humana (*hGC*) como uno de los principales productos de sinciotrofoblasto.

# CONTENIDO

---

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estructura de la <i>SHBG</i>	4
1.1.1 ADNc	5
1.1.2 Dominios funcionales	5
1.2 Estructura y regulación del gen	7
1.3 Regulación hormonal	8
1.4 Polimorfismo genético	9
1.5 Papeles fisiológicos	10
1.5.1 <i>ABP</i> como marcador de células de Sertoli	10
1.5.2 Transportador de hormonas esteroideas sexuales	11
1.5.3 Receptores de membrana	12
1.6 Nuevas funciones	16
1.7 Tejido placentario	17
1.7.1 Sinciciotrofoblastos	17
1.7.2 Trofoblastos de anclaje	18
1.7.3 Trofoblasto invasivo	18
1.8 Hormonas proteínicas	19
1.8.1 Gonadotropina coriónica	19

2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	22
3.1 Material	22
3.2 Cultivo primario de trofoblasto	23
3.3 Diseño experimental	25
3.4 Purificación de <i>SHBG</i>	26
3.5 Radioinmunoanálisis	27
3.5.1 Iodación	27
3.5.2 Determinación de la Gonadotropina coriónica humana	28
3.5.3 Cuantificación de AMPc	29
3.6 Pruebas estadísticas	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Secreción de hGC	31
4.2 Purificación de <i>SHBG</i>	35
4.3 Efecto de la <i>SHBG</i> sobre la secreción de hGC	36
4.4 Participación de los esteroides sobre la secreción de hCG	37
4.5 Efecto de la <i>SHBG</i> y del complejo <i>SHBG</i> -Esteroides sobre la producción de AMPc	38



5. DISCUSIÓN	42
GLOSARIO	48
BIBLIOGRAFÍA	49

# 1. INTRODUCCIÓN

---

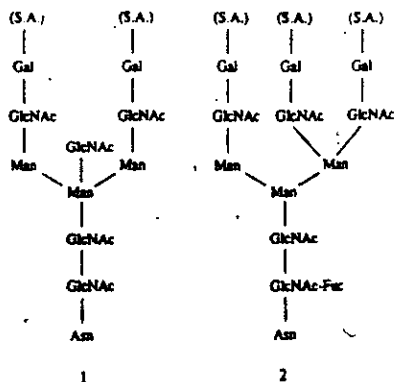
## 1.1 Estructura de la SHBG

La SHBG ha sido identificada en el plasma de numerosas especies incluyendo el humano, así como en otros vertebrados, casi todos los mamíferos la presentan; sin embargo, existen especies que carecen de esta proteína transportadora<sup>(2)</sup>, como la rata, el ratón y el cobayo<sup>(3)</sup>. Sin embargo, la ABP se encuentra en la mayoría de las especies que se han estudiado<sup>(2)</sup>.

Con el desarrollo de la cromatografía por afinidad se logró la purificación de SHBG/ABP en las especies estudiadas, y se han podido establecer importantes datos acerca de su estructura.

En 1981 Larrea y colaboradores<sup>(4,5)</sup> demostraron, por medio de mapeo peptídico, que los componentes estructurales de la ABP y de la SHBG son idénticos entre sí, y en 1988<sup>(6)</sup> Danzo y Bell observaron que las diferencias encontradas en las proteínas (SHBG/ABP) eran debidas a las diferentes formas de glicosilación. De esta forma se mostró que tanto la SHBG como la ABP son proteínas idénticas, y que las variaciones entre ellas son debidas a diferencias en la glicosilación. La SHBG contiene en su estructura tres

cadena biantenarias de oligosacáridos del tipo unidas a asparagina<sup>(86)</sup> y una del tipo unida a treonina <sup>(7,8,9.)</sup>, como se muestra en el siguiente esquema:



Estudios realizados por medio de cromatografías de afinidad seriadas en lectinas han demostrado que existen diferencias entre la proteína humana y la de otras especies, como la ABP de rata, la cual contiene mayor proporción de oligosacáridos triantenarios a diferencia de los biantenarios que presenta la SHBG humana. Las diferencias de glicosilación están dadas por el sitio de síntesis.

Por medio de estudios de mutagénesis dirigida se ha sustituido en la secuencia de aminoácidos un residuo de asparagina por isoleucina, lográndose de esta forma modificar la movilidad electroforética de la proteína en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Estos cambios electroforéticos concuerdan con la pérdida de los carbohidratos unidos a asparagina. Debido a que cuando ambos residuos son substituidos el producto resultante tiene un peso molecular de 39,000 Mr<sup>(10)</sup>.

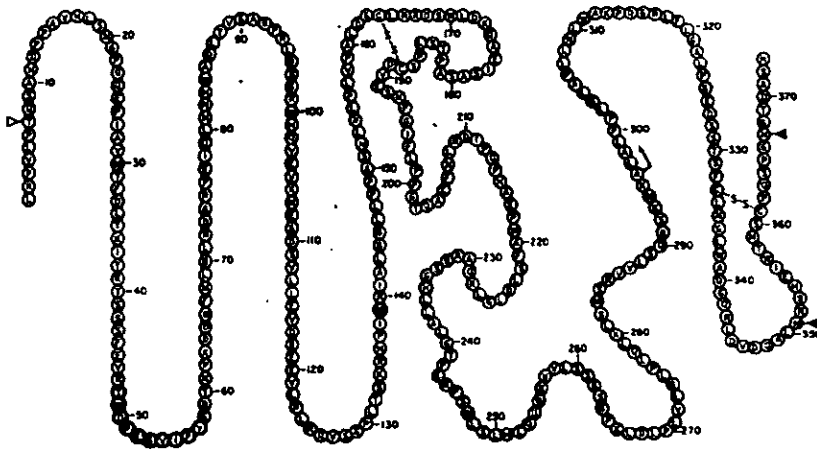
Al analizar la *SHBG* en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, se obtienen dos bandas, cada una de las cuales representa un monómero con uno o dos oligosacáridos unidos a la molécula, como se muestra a continuación:



Por lo general en el humano los dos sitios de glicosilación en asparagina se encuentran glicosilados <sup>(11)</sup>, y los carbohidratos unidos en treonina no están involucrados en las modificaciones en la movilidad electroforética de la proteína, ya que con la eliminación de este carbohidrato, la movilidad no se altera.

Tanto la *ABP* como la *SHBG* contienen cuatro residuos conservados de cisteínas en las posiciones 164, 188, 333 y 361. Estos residuos son los que forman los puentes disulfuro que unen a las diferentes subunidades en la proteína madura; uno de los puentes está formado por la cys 164-188 y el otro por la cys 333-381. Estos enlaces tienen importancia funcional para la

proteína ya que al substituir una de las cisteínas por serina en el residuo 333 se elimina la capacidad de unión para dihidrotestosterona (DHT)<sup>(12)</sup>. La estructura primaria de la proteína se presenta a continuación:



La SHBG tiene un peso molecular estimado de 85,000 a 100,000 Da. En condiciones fisiológicas se encuentra en forma dimérica con una capacidad de unión de 1 mol de esteroide por homodímero.

En su secuencia de aminoácidos se encuentra una larga porción hidrofóbica en la región terminal. El significado funcional de esta característica aún no se ha encontrado, más sin embargo, se puede sugerir que estas regiones pudieran participar en la unión a los ligandos de naturaleza hidrofóbica.

### 1.1.1 ADNc

En 1985 se aisló el ADN complementario (ADNc) que codifica para esta proteína en varias especies, como en el humano, conejo y ratón<sup>(13,14,15)</sup>. El

ADNc fue aislado de hígado fetal sugiriéndolo como su principal sitio de síntesis<sup>(16)</sup>.

La ABP de rata se sintetiza a partir de un ARNm de 1.7 kb que codifica para un precursor de 403 aminoácidos (44.5 kDa), que sin el péptido señal forma una subunidad de 373 residuos (41.1 kDa); Walsh y cols. 1986<sup>(17)</sup> describieron que el ADNc codifica para un péptido de 373 aminoácidos (40.5 kDa), y al igual que en la rata, la SHBG humana tiene un pequeño péptido señal de 29 residuos de aminoácidos.

La homología que comparten la SHBG/ABP humana y la de la rata es del 68% y contiene regiones altamente conservadas, especialmente entre los residuos 32-128, donde están contenidos parte de los dominios de unión al receptor, además de tener los cuatro residuos de cisteína que forman los dos puentes disulfuro que unen al dímero<sup>(17,18)</sup>.

Al caracterizar el ADNc de la ABP humana se encontró que la secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia descrita para la SHBG. De esta manera se mostró que tanto la ABP como la SHBG son productos de un mismo gen<sup>(18)</sup>.

### 1.1.2 Dominios funcionales

La SHBG/ABP consta de tres dominios funcionales: uno de ellos de gran afinidad por los esteroides, otro es la región que interactúa con el receptor de membranas plasmáticas, y uno de ellos involucrado en la estructura dimerica de la proteína.

En 1986 Westphal y colaboradores describieron algunas características importantes de la proteína, como la variación que existe en la afinidad por los diferentes esteroides.

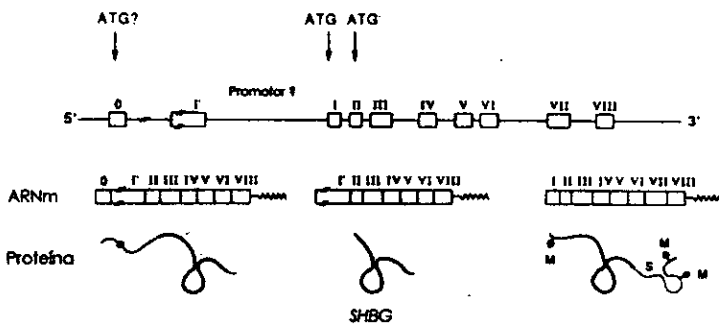
Las constantes de afinidad que existen para los esteroides van desde una constante de asociación ( $K_a$ ) para DHT entre  $1 \times 10^9$  M- $1 \times 10^7$  M, mientras que las constantes de afinidad descritas para la testosterona y el estradiol son mucho menores<sup>(19)</sup>.

La vida media plasmática del complejo proteína-hormona es de 30-60 minutos<sup>(20)</sup> y la región donde se une el esteroide se encuentra localizada en la zona hidrofóbica del extremo carboxilo terminal. En 1993 Joseph y Lawrence<sup>(21)</sup> mostraron que la eliminación de 26 aminoácidos localizados en esta región termina por completo con la secreción y la actividad de unión de la proteína, por lo que el sitio localizado alrededor de los residuos 139-150 es considerado como el sitio más activo de la proteína.

El dominio para el receptor membranar de SHBG/ABP se comprobó en un estudio realizado por Khan y colaboradores en 1990<sup>(22)</sup>, en el que por medio de la digestión enzimática de la proteína humana se identificaron 10 residuos peptídicos que competían con la SHBG marcada por los receptores membranales prostáticos. Estos péptidos corresponden a un residuo de 48-57 aminoácidos, y esta región localizada hacia la región aminoterminal representa por lo menos parte del dominio que se encarga de la unión al receptor de membrana.

## 1.2 Estructura y regulación del gen

El gen de la *SHBG* humana se encuentra localizado en el cromosoma número 17 (región p12-p13)<sup>(23)</sup>. La región que codifica para la proteína consta de 8 exones separados por intrones pequeños, como se muestra en el siguiente esquema:



Hammond<sup>(24)</sup> propone que los sitios iniciadores de la transcripción se encuentran localizados aproximadamente 600 pb en la región 5' antes del codón de metionina, por lo que esta región contiene los elementos reguladores de la proteína. Probablemente las secuencias reguladoras más interesantes localizadas en el gen de *SHBG/ABP* son las secuencias que dictaminan la expresión tejido específico<sup>(25)</sup>. El gen de la *SHBG* humana contiene secuencias potenciadoras hepato-específicas, además se ha mostrado la existencia de secuencias localizadas en la región del promotor en otros órganos y tejidos diferentes al hígado, como es la mama, próstata, endometrio y placenta.

La región codificante en los genes de esta proteína es extremadamente corta, ocupando 3.2 kb del ADN, y la mayoría de los intrones ocupan



únicamente entre 200 y 300 pb. Otra característica de la secuencia de la SHBG es la presencia de elementos repetitivos<sup>(26)</sup>. Estos elementos se encuentran localizados en los intrones, así como en la región 5' donde se localiza el sitio iniciador de la transcripción. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la SHBG, con las secuencias de otras especies como la ABP del ratón, muestra que ambos genes contienen algunos elementos específicos de repetición inmediatamente después de la región 5 homóloga, y esta similitud en la estructura es la que sugiere que estos elementos pudieran tener importancia funcional, participando en la regulación de los procesos de empalmes a los que el ARN es sometido<sup>(27)</sup>.

Recientemente se ha identificado la región promotora alternativa en el gen de la ABP localizada a 1.5 kb de la región 5' de la región promotora previamente caracterizada. Esta región promotora diferente actúa en la síntesis de un ARN alternativo, con un exon 1 diferente (exon A) generando una proteína que contiene en su secuencia los exones del 2 al 8 clásicos a excepción de exon número 7. La proteína resultante se expresa en testículo, hígado fetal y cerebro. Esta proteína ABP-semejante (*ABP like*) (46 KDa) presenta la secuencia N-terminal alterada, por lo que no se secreta a la circulación, y no se une a esteroides<sup>(27,81)</sup>.

## 1.3 Regulación hormonal

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la hormona foliculo estimulante (FSH) y la testosterona están involucrados en la regulación de ABP sintetizada por las células de Sertoli.

El efecto de diferentes hormonas sobre las concentraciones de SHBG en suero han sido estudiados por varios autores<sup>(28,29,2,30)</sup>. Se ha demostrado que los estrógenos y las hormonas tiroideas incrementan las

concentraciones de SHBG circulantes, mientras que los andrógenos tienen un efecto contrario disminuyendo la proteína del suero. Los glucocorticoides, la insulina y la prolactina suprimen a la SHBG de la circulación<sup>(31)</sup>.

Los cambios encontrados en la proteína circulante correlacionan directamente con modificaciones en el ARNm de la proteína <sup>(31)</sup>.

## 1.4 Polimorfismo genético

Se han identificado variantes electroforéticas de la SHBG utilizando isoelectroenfoque. Luckock y Cavalli-Sforza (1983), Gershagen y cols. (1987), Larrea y cols. (1990) y VanBaelen (1992)<sup>(32,33,34,35)</sup>, son los grupos de trabajo que han identificado variantes genéticas de SHBG. Por los resultados obtenidos, estos grupos de trabajo de forma independiente han identificado a la misma variante.

El polimorfismo observado en las proteínas del suero de individuos sanos, se encuentra con una frecuencia alélica de 0.9 y 0.1, y existe variación en las diferentes poblaciones del mundo<sup>(5)</sup>.

La proteína variante encontrada en condiciones de desnaturalización y reducción, migra con un peso molecular de 56, 52 y 48 kDa en lugar de la migración característica observada de 52 y 48 kDa.

La proteína codificada tanto por los alelos homocigotos así como por los alelos heterocigotos tienen secuencias N-terminales idénticas.

Power y cols. 1992<sup>(36)</sup> demostraron que la variante de mayor peso molecular contiene una asparagina en lugar de un ácido aspártico en el

residuo 372, y este cambio de aminoácido genera un sitio potencial de glicosilación, por lo que las modificaciones encontradas en la migración están ocasionadas por una cadena adicional de oligosacáridos. Las diferencias encontradas en la proteína mutante no logran modificar ni el sitio ni la capacidad para unir a los esteroides y fisiológicamente tiene un comportamiento idéntico al de la proteína nativa.

## 1.5 Papeles fisiológicos

### 1.5.1 ABP como marcador de células de Sertoli

La espermatogénesis es regulada de manera primaria por las células de Sertoli en los tubos seminíferos<sup>(37,38,39)</sup> y es en este sitio donde se regulan los andrógenos producidos por las células intersticiales de Leydig y otras células peritubulares<sup>(40)</sup>. Las células de Sertoli contienen receptores nucleares de andrógenos, además de que requieren de la hormona foliculo estimulante (FSH) hipofisaria para su diferenciación, maduración y función<sup>(41,42,43,88)</sup>.

La célula de Sertoli secreta numerosas proteínas que sirven como factores reguladores, para estadios específicos de la espermatogénesis<sup>(44,45,46)</sup>, y como resultado de esta influencia hormonal, las células tienen un funcionamiento cíclico que depende del estado del epitelio seminífero y de las concentraciones de algunas proteínas. Una de estas proteínas es la ABP<sup>(47)</sup>, la mayoría de la cual se secreta dentro del tubo seminífero y solo una pequeña cantidad es secretada de forma basal hacia la circulación<sup>(48)</sup>. Los requerimientos de ABP tanto para su producción como para su secreción son similares a las que se requieren para la espermatogénesis<sup>(49,50)</sup>. Esta proteína puede utilizarse como un marcador del desarrollo y funcionamiento de la célula de Sertoli<sup>(50)</sup>.

### 1.5.2 Transportador de hormonas esteroides sexuales

Las hormonas esteroides se unen a varias proteínas plasmáticas como la albúmina<sup>(59)</sup>, aunque tiene una baja afinidad por los andrógenos y los estrógenos, mientras que la SHBG tiene una mayor afinidad por las hormonas esteroides<sup>(51,52)</sup>.

De manera inicial el papel fisiológico de la SHBG se relacionaba únicamente con la función de transportar y regular concentraciones de esteroides sexuales. El mecanismo de acción planteado fue el de "la hormona libre"<sup>(53,54,55)</sup>, donde se reconoce a la SHBG como un reservorio de hormonas esteroides y sólo la fracción libre de la hormona, es decir la fracción que no se encuentra unida a ningún tipo de transportador, es biológicamente activa y por lo tanto capaz de interactuar con los órganos blanco.

Una característica importante es que el complejo SHBG/hormona tiene alta velocidad de disociación, y esta característica puede estar relacionada con su funcionamiento<sup>(56)</sup>.

Se ha observado que la existencia de otros factores en la sangre y tejidos pueden afectar las propiedades de unión de la proteína y modular el nivel de hormona libre<sup>(138)</sup>. Uno de estos factores que generan una modificación en la capacidad de unión a la proteína son los ácidos grasos<sup>(57,58)</sup>. Se ha observado que los ácidos grasos saturados no esterificados modifican la capacidad de unión y las propiedades inmunológicas y electroforéticas de la proteína sérica. Estas modificaciones pueden ser el resultado de la interacción de los ácidos grasos no esterificados con la proteína, reduciendo el acceso de los esteroides a la SHBG, así como también, cambiando la carga neta de la proteína y modificando la organización

dimérica propia de la estructura proteica; mientras que por otro lado los ácidos grasos saturados no esterificados estabilizan la molécula incrementando la afinidad por los esteroides.

Todas estas evidencias experimentales donde la relación de la proteína con su ligando es mucho más estrecha que sólo el de transportarlo, nos llevan al concepto que esta proteína extracelular tiene otras implicaciones fisiológicas, además de unir y transportar hormonas esteroides sexuales.

### 1.5.3 Receptores de membrana

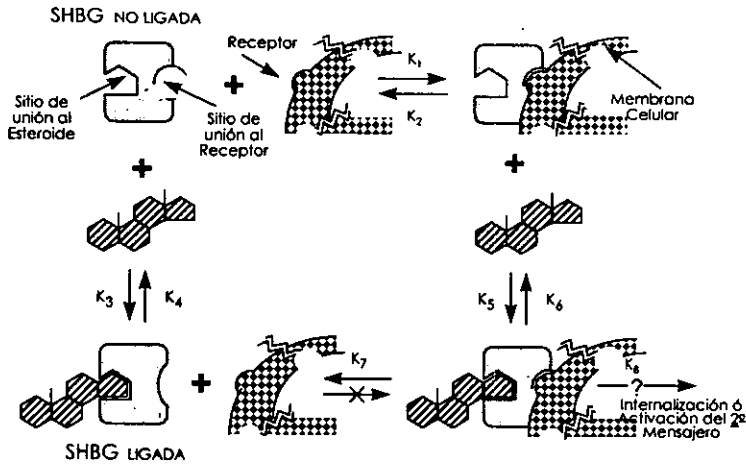
Se ha logrado demostrar que tanto la ABP como la SHBG son capaces de interactuar con proteínas localizadas en las membranas plasmáticas de los tejidos hormonodependientes como la próstata humana, el endometrio, la placenta, mama y algunas líneas celulares específicas derivadas de estos tejidos<sup>(61-66)</sup>. En 1990, Rosner y colaboradores<sup>(61)</sup> denominaron a estas proteínas "receptores membranales", ya que al estudiar las características de estos componentes proteínicos encontró semejanza con las de los receptores ya descritos. Por otro lado se ha demostrado la capacidad que tienen estas proteínas de generar señales de transducción cuando se lleva a cabo la interacción de la SHBG con el receptor.

Todos los datos informados en la literatura concuerdan en la existencia de un sistema de reconocimiento de alta afinidad; sin embargo, este sistema puede variar en su capacidad de unión, dependiendo del tejido estudiado. De acuerdo a estudios de unión y desplazamiento — *Scatchard plot* —, existen por lo menos dos sitios de unión. Uno de ellos es el descrito por Rosner y cols.<sup>(63)</sup>, que consiste en un sistema de reconocimiento en membranas de próstata que cuenta con una constante de disociación (Kd) de  $2 \times 10^{-8}$  M, y otro es el sitio de unión en el endometrio con mayor

afinidad ( $3 \times 10^{-12} \text{ M}$ )<sup>(67)</sup>. Sin embargo, aunque se describan estas diferencias, todos los sistemas estudiados tienen sitios de unión específicos para la SHBG.

Lo que ha hecho más interesante el estudio de estos sistemas de reconocimiento son las diferencias encontradas en la participación de los esteroides, ya que una vez que la proteína se ha unido a la membrana, la presencia o la ausencia del esteroide puede reflejar la interacción de la proteína con el receptor, y su posible repercusión en funciones intracelulares como la internalización o la acumulación de segundos mensajeros.

El grupo encabezado por Roesner demostró en 1990<sup>(65)</sup> que únicamente la proteína libre de ligando es capaz de unirse a las membranas prostáticas, y una vez que la SHBG se encuentra unida a su receptor mantiene su capacidad para unir esteroides, con estas observaciones se ha establecido un modelo de estudio en donde se propone a la SHBG como una proteína alostérica, lo cual explicaría el mecanismo de acción de la SHBG en la membrana plasmática, como se muestra en el siguiente esquema:



Rosner y colaboradores demostraron que la adición de SHBG-DHT al sistema de células neoplásicas de próstata aumenta la concentración de AMPc<sup>(68,69,70)</sup>. Este incremento ocurre cuando la SHBG no unida al esteroide se agrega a las células antes que la hormona, mientras que la adición del complejo SHBG/DHT no detectó ningún efecto en la cuantificación de segundo mensajero. Sin embargo, Strel'chyonok y Avvakumov encontraron que los estrógenos son necesarios para que se lleve a cabo el reconocimiento al receptor. Estos autores no encontraron la participación activa de ningún otro esteroide, por lo que se sugiere que las diferencias encontradas pueden ser debidas a las metodologías utilizadas en los estudios, así como también a una posible influencia de la proporción con la que se une la proteína al receptor. Además, no se debe descartar que existan diferencias estructurales en los receptores K dependiendo del sitio donde se estudie el sistema.

Otro factor importante que se debe considerar para que la interacción proteína-receptor se lleve a cabo es la presencia de carbohidratos, los cuales son requeridos para que se establezca el reconocimiento con la

membrana, ya que se ha observado que la desialización de la SHBG no influye en la unión al esteroide, pero puede resultar en una completa pérdida de la capacidad para unirse a las membranas plasmáticas<sup>(71)</sup>.

En estudios más recientes se han caracterizado receptores para SHBG en otros tejidos. El grupo de la Dra. Porto los identificó en órganos sensibles a la acción de los estrógenos como una línea celular de adenocarcinoma de mama (MCF7), endometrio de mujeres premenopáusicas y mama <sup>(72-79)</sup>.

También se han encontrado sitios de alta afinidad para la ABP en las membranas de epidídimo humano. El peso molecular de los receptores identificados es de alrededor de 174,000 Mr<sup>(77,80)</sup>.

Cuando se estudiaron estos receptores en otros órganos que no son sensibles a la acción de las hormonas esteroides sexuales como el colon, músculo estriado, bazo y el cerebro no se pudieron localizar por lo que se sugiere que únicamente los órganos dependientes de esteroides sexuales presentan este tipo de sistema<sup>(81)</sup>.

La función de estas proteínas de unión localizadas en las membranas dentro de los procesos fisiológicos aún se encuentra en estudio. La caracterización, identificación y clasificación de estas proteínas pudiera dar una pauta para identificar el grupo de receptores que activan, así como también a los procesos de transducción a los que estuviera ligada.



## 1.6 Nuevas funciones

La homología estructural de la *SHBG* con otras proteínas merece especial atención. La secuencia de aminoácidos de la proteína presenta gran similitud con algunas proteínas del plasma, de la matriz extracelular y del desarrollo, como la proteína *S*<sup>(82-85)</sup>, la laminina y algunas proteínas de regulación de la *drosophyla*. Cuando se realizó una comparación entre las secuencias de estas proteínas con la secuencia de *SHBG/ABP*, se observó que la región más conservada pertenece a la identificada como el dominio de unión al receptor<sup>(81)</sup>. Más aún, las cuatro cisteínas características de la estructura de la *SHBG/ABP* se encontraron en todas las secuencias estudiadas.

Estos hallazgos han abierto la posibilidad de que la *SHBG* pueda encontrarse involucrada en algunos eventos fisiológicos de regulación o desarrollo y diferenciación celular, aunado al hecho de que (1) la proteína se encuentre regulada de manera temporal, (2) el ARN esté sujeto a empalmes alternativos perdiendo la propiedad para unir esteroides<sup>(85-88)</sup>, (3) las observaciones de que la rata adulta carece de la *SHBG* pero sin embargo se encuentra presente durante la etapa fetal, puede implicar la posibilidad de que la proteína intervenga en algunos de los eventos fisiológicos ocurridos en los órganos blanco para ella.

## 1.7 Tejido placentario

La placenta es un órgano endócrino, temporal y conforme se diferencia va adquiriendo independencia funcional de la madre, de tal forma que durante la gestación actúa como un eje hipotálamo-hipófisis-órgano blanco. El trofoblasto es la célula derivada de la capa externa del blastocisto y es la encargada de mediar la implantación así como también la placentación. El citotrofoblasto o célula troncal placentaria puede diferenciarse en tres tipos celulares:

- a) vellosidades sincitiotrofoblásticas,
- b) trofoblastos de anclaje o células columnares, y
- c) trofoblastos invasivos<sup>(89)</sup>.

### 1.7.1 Sincitiotrofoblastos

Son las células encargadas de sintetizar y secretar la mayoría de los productos hormonales de la placenta que son críticos para mantener el embarazo en la fase temprana de la gestación<sup>(90,91)</sup>. La gonadotropina coriónica humana (hGC) es la hormona esencial para mantener la síntesis y secreción de la progesterona por el cuerpo lúteo del embarazo. Esta actividad hormonal, al final del primer trimestre, depende casi exclusivamente de la capacidad de la placenta para continuar con el proceso gestacional. Durante el tercer trimestre, la placenta produce lactógeno placentario, así como otros productos tales como la glicoproteína  $\beta$ 1-específica del embarazo<sup>(92)</sup>, el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 2<sup>(93)</sup>, la hormona del crecimiento<sup>(94)</sup>, algunas colagenasas y la trombosmodulina<sup>(96,97)</sup>.

Estudios *in vitro* han identificado diversos compuestos que son capaces de diferenciar a los citotrofoblastos mantenidos en cultivo en un fenotipo

endócrino<sup>(98)</sup>. Algunos de estos factores son el adenosín monofosfato cíclico (AMPC)<sup>(99,100)</sup>, el factor de crecimiento epidermal<sup>(101)</sup>, y la misma hGC<sup>(102)</sup>. La adición de 8-Br-AMPC al cultivo de los citotroblastos, induce su citodiferenciación endócrina caracterizada por la síntesis y secreción de hGC<sup>(102)</sup>, y participa además inhibiendo la secreción de fibronectina y de trofouteronectina<sup>(103, 100)</sup>. Estos datos sugieren la presencia de diferentes respuestas en la citodiferenciación de las células del trofoblasto e implica su activa participación en los procesos bioquímicos y hormonales de la placenta.

### 1.7.2 Trofoblastos de anclaje

Este tipo celular representa a los trofoblastos que proliferan del citotrofoblasto al contacto con las vellosidades coriónicas en el estroma decidual durante el proceso de la placentación<sup>(107)</sup> proteína implicada en este fenómeno que da como resultado el anclaje con el útero es un tipo específico de fibronectina denominada trofouteronectina (TUN)<sup>(104)</sup>. Esta fibronectina es sintetizada cuando los trofoblastos hacen contacto con la matriz extracelular. El factor transformante del crecimiento tipo  $\beta$  ( $TGF\beta$ <sup>(105)</sup>) y el factor inhibidor de leucemia (LIF)<sup>(106)</sup> son considerados como los productos de síntesis del complejo decidua-trofoblasto y endometrio respectivamente<sup>(108)</sup>. Estos factores estimulan la secreción de TUN e inhiben la síntesis y secreción de hGC<sup>(105,106)</sup>.

### 1.7.3 Trofoblasto invasivo

El proceso de placentación involucra la presencia de poblaciones invasoras de células del trofoblasto. Este proceso se acompaña de la formación de vasos de capacitancia permitiendo el flujo sanguíneo necesario para la gestación. Durante la placentación las células invasoras del trofoblasto sintetizan proteasas de matriz extracelular<sup>(95)</sup> llevándose a

cabo la remodelación de la unidad conformada entre la placenta y el endometrio<sup>(109-112)</sup>.

Estas observaciones sugieren la presencia de señales de activación a las diferentes estirpes celulares generadas por el trofoblasto para iniciar y mantener el proceso de la gestación.

## 1.8 Hormona proteínica

### 1.8.1 Gonadotropina coriónica

Esta glicoproteína es de importancia crítica durante el embarazo. Su función es mantener el cuerpo lúteo y las concentraciones de progesterona. Se utiliza como marcador del embarazo por ser uno de los productos secretados en etapas más tempranas. Ohlsson y cols.<sup>(113)</sup> mostraron por medio de hibridación *in situ* la existencia de transcritos para la unidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica en el blastocisto humano antes de la implantación. Kato y Braunstein<sup>(114)</sup> demostraron que los trofoblastos del primer trimestre secretan mayores cantidades de hGC que los trofoblastos de placentas a término, sugiriendo de este modo que el trofoblasto en cultivo mantiene su capacidad reguladora en los diferentes días de cultivo<sup>(115)</sup>. Para estudiar la regulación que existe durante la placentación y la gestación se utiliza el modelo de cultivo primario de trofoblasto. La regulación hormonal de la hGC se muestra en la siguiente tabla.

Factor	Trofoblasto trimestre	Efecto sobre la secreción de hGC
AMP <sup>(108)</sup>	Término	Estimula
hGC <sup>(102)</sup>	Término	Estimula
GnRH <sup>(115)</sup>	Término	Estimula
Agonista $\beta$ -adrenérgico <sup>(117)</sup>	Primero	Estimula
Dexametasona <sup>(118,119)</sup>	Término	Estimula
Inhibina <sup>(120)</sup>	Término	Inhibe
Activina <sup>(120,121,122)</sup>	Primero	Aumenta la estimulación de GnRH sobre la secreción de hGC
EGF <sup>(101,126)</sup>	Primero/Término	Estimula
Hormonas tiroideas <sup>(122)</sup>	Primero/Término	Estimula
TSH <sup>(123)</sup>	Término	Inhibe
ILE-1 <sup>(124)</sup>	Primero	Estimula
ILE-6 <sup>(125)</sup>	Primero	Estimula
Membrana basal <sup>(127)</sup>	Primero	Estimula
Proteínas de la decidua <sup>(127)</sup>	Término	Inhibe
Prolactina <sup>(128)</sup>	Término	Inhibe

Además de las funciones endócrinas ya conocidas <sup>(130)</sup>, la hGC tiene otras funciones a lo largo de la gestación. Shi y colaboradores<sup>(102)</sup> mostraron que durante el fenómeno de placentación las concentraciones de hGC en la parte media de la placenta son mayores, por lo que los citotrofoblastos tienden a diferenciarse y fusionarse para promover el crecimiento placentario. En este periodo de diferenciación del trofoblasto, el anclaje y la invasión es reprimida, sugiriendo de esta forma una función autócrina de la hGC capaz de regular los fenómenos celulares en curso<sup>(102)</sup>.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo general

Conocer el papel funcional de la *SHBG* en la placenta humana mantenida en cultivo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Describir el efecto de la *SHBG* en presencia o ausencia de hormonas esteroides sobre los mecanismos de transducción de células del trofoblasto mantenidas en cultivo.
- Conocer el efecto de la *SHBG* sobre la síntesis de proteínas sintetizadas por el trofoblasto mantenidas en cultivo.
- Describir la movilización de segundos mensajeros del tipo de AMPc estimuladas con *SHBG* y hormonas esteroides.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 3.1 Material

La albúmina sérica bovina (ASB), cloramina T, metabisulfito de sodio, yoduro de potasio (KI), folin fenol Ciocalteu, AMPc, trietil amina, anhídrido acético, ácido acético, Trizma base, glicina, dodecil sulfato de sodio (SDS), tripsina, DNAasa,  $\beta$ -mercapto etanol, Sepharosa 4B, carbón, dextrán, Coloidal PVP coated silica (Percoll), fueron obtenidos de Sigma Chemicals CO. (St Louis Mo). El cloruro de sodio (NaCl), acetato de sodio, hidróxido de sodio (NaOH), etanol, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, bicarbonato de sodio, sulfato cúprico, tartrato de sodio fueron obtenidos de J.T Baker SA (México).

Los materiales para la electroforesis en geles de poliacrilamida utilizados fueron la acrilamida, N N 'metilen bisacrilamida, N N' dialilitartadiamida, N,N,N',N'-tetrametilene diamida (TEMED), persulfato de sodio así como los estándares de peso molecular preteñidos fueron obtenidos de Bio-Rad (Richamond, CA). El Sephadex G-100 se obtuvo de Pharmacia Chemicals (Upssala, Sweden ). Para el cultivo se utilizó medio mínimo modificado de Eagle, la solución salina de Hanks libre de calcio, y el suero fetal de ternera, estos reactivos se obtuvieron de GIBCO BRL. El  $^{125}$ I fue obtenido de

Amersham Int. (England). Los esteroides radioinertes fueron obtenidos de Steraloids Inc. (Wilton, NH).

### 3.2 Cultivo primario de trofoblasto

El modelo biológico utilizado fue el cultivo primario de células del trofoblasto. Éste se realizó siguiendo la técnica descrita por Kliman y cols. (92). Se utilizaron placentas normales a término (obtenidas del hospital Angeles del Pedregal bajo el consentimiento de el comité de ética del Instituto Nacional de la Nutrición) (36-40 semanas) inmediatamente después del parto ya fuera vía vaginal o por operación cesárea.

Se disecaron 30 g de cotiledones de la región correspondiente a la cara materna de la placenta. Se retiró todo el material vascular y fibroso y el tejido se lavó con solución salina al 0.9% a temperatura ambiente para eliminar el exceso de sangre. El tejido fue cortado y sometido a tres digestiones enzimáticas con tripsina y DNAasa en solución salina de Hanks libre de calcio y magnesio como se muestra en la tabla 1. Las digestiones enzimáticas fueron realizadas a 30 °C durante 30 minutos.

<b>DNAasa</b>	<b>Tripsina</b>	<b>Hanks</b>
0.2 mg/ml	125%	150 ml
0.1 mg/ml	104%	100 ml
0.06 mg/ml	93%	75 ml

Tabla 1

Con la finalidad de separar las células, el sobrenadante de las tres digestiones enzimáticas se colocó y centrifugó a 1000×g durante 5 minutos en tubos de 15 ml de poliestireno conteniendo 1.5 ml de suero fetal de ternera (SFT) inactivado a 57 °C. Los precipitados resultantes se



resuspendieron en 0.3 ml de Medio Dulbecco Mínimo modificado de Eagle (DMEM-HG) con 25 mM de HEPES y 25 mM de glucosa. El resultado de las digestiones enzimáticas se colocó en un gradiente discontinuo de Percoll del 5 al 70% (vol./vol.). Como se muestra a continuación (Tabla 2)

Num. Tubo	% de Percoll	ml Percoll 90%	ml HANKS 1X
1	70	2.33	0.67
2	65	2.17	0.83
3	60	2.00	1.00
4	55	1.83	1.17
5	50	1.67	1.33
6	45	1.50	1.50
7	40	1.73	1.67
8	35	1.17	1.83
9	30	1.00	2.00
10	25	0.83	2.17
11	20	0.67	2.33
12	15	0.50	2.50
13	10	0.33	2.67
14	5	0.17	2.83

Tabla 2

El gradiente se centrifugó a  $1200\times g$  durante 20 minutos. Al final de la centrifugación se observan tres regiones: (1) el precipitado compuesto principalmente por eritrocitos y polimorfonucleares, (2) una capa superior que contiene tejido conectivo, vasos sanguíneos y fragmentos de la vellosidades, y (3) en la parte media del gradiente (región que corresponde a la densidad de 1.048-1.062 g/ml) se distingue una banda

que contiene en su mayoría una población uniforme de células mononucleadas. Estas células fueron extraídas, lavadas con DMEM-HG y centrifugadas a  $1200\times g$  durante 10 minutos.

Los trofoblastos purificados se diluyeron a una concentración de  $8 \times 10^6$  cels/ml con DMEM-HG el cual se acondicionó con 4 mM de glutamina, 50  $\mu g$  de gentamicina, y SFT al 20% vol./vol. tratado con carbón dextrán.

Las células se sembraron en cajas de 6 pozos (3.5 mm) y fueron incubadas a 37 °C con una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

### 3.3 Diseño experimental

Los diseños experimentales se llevaron a cabo de la siguiente manera:

La duración del cultivo fue de 4 días (96 h) a partir del momento de la siembra, mismo que fue considerado como tiempo cero. Se utilizaron  $2 \times 10^6$  células por pozo. La formación de sincicios es de 24 a 48 h, momento en el que se considera que el cultivo es capaz de responder a estímulos externos. Los cambios en la diferenciación celular se observaron por medio de microscopía de luz.

Con la finalidad de promover la adhesión y la diferenciación celular durante las primeras 48 h, se utilizó medio de cultivo adicionado con suero fetal de ternera (SFT) al 20%, inactivado a 57 °C y tratado con carbón dextrán, lo que elimina los esteroides presentes en el medio.

A las 48 h se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con medio fresco libre de SFT, y se iniciaron las incubaciones experimentales con medios libres de suero y con diferentes estímulos. A las 72 h de cultivo se realizó un nuevo cambio de medio y se continuó con las diferentes estrategias experimentales. El cultivo finalizó a las 96 h y se realizaron las siguientes determinaciones:

- A. Cuantificación de Proteínas: las células se despegaron y guardaron en 1 ml de solución salina al 0.9% a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la cuantificación de proteínas por el método de Lowry<sup>(133)</sup>.
- B. Cuantificación de AMPc: las células se recuperaron junto con el medio de cultivo. La suspensión celular se sometió a una temperatura de  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, y posteriormente se colocó en hielo guardando las alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.
- C. Cuantificación de hGC: se emplearon los medios de cultivo, los cuales se cambiaron cada 24 horas durante las 96 horas que duró el cultivo. Estos medios se colectaron y congelaron hasta su posterior uso.

En todos los casos se incluyeron como controles células estimuladas con 8-BrAMPc con la finalidad de evaluar viabilidad celular y capacidad para responder estímulos, También se evaluó un grupo control con células no estimuladas.

### 3.4 Purificación de SHBG

La purificación de SHBG se realizó a partir de 2 litros de sangre retroplacentaria, obteniéndose el plasma mediante centrifugación a  $1000\times g$  durante 30 minutos. El resultado de 2 precipitaciones con sulfato de

amonio al 18% se resuspendió en agua y se dializó contra una solución amortiguadora Tris Glicerol pH 7.4 (Tris HCl 0.01 M y glicerol 10%) por 24 h a 4 °C.

El dializado resultante se recirculó por columna de afinidad (CI Sepharosa) activada con un andrógeno sintético y previamente equilibrada con solución amortiguadora de Tris HCl 20 mM dimetil formamida 10% y cloruro de potasio 1 M pH 7.4 TDK) durante 48 h. La SHBG unida a la columna se eluyó con una solución de dihidrotestosterona (DHT). Se determinó la concentración de proteína mediante absorbancia a una longitud de onda de 280 nm y la capacidad de unión se midió por medio de estudios con  $^3\text{H}$ -DHT. Las fracciones de mayor concentración y mayor actividad de unión se concentraron en equipo de ultrafiltración, hasta obtener un volumen de 50 ml. Como paso final de purificación se realizó una cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-200. Las fracciones obtenidas se analizaron nuevamente para determinar su concentración y su capacidad de unión a andrógenos<sup>(129)</sup>.

## 3.5 Radioinmunoanálisis

### 3.5.1 Iodación

La hGC fue marcada con  $^{125}\text{I}$  por el método de cloramina T <sup>(130)</sup> de la siguiente manera: se incubaron 2  $\mu\text{g}$  de hormona pura en solución amortiguadora de fosfatos salinos (fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, NaCl pH 7.4 PBS 0.01 M) con 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  y una solución de cloramina T (1 mg/ml) en PBS 0.01 M, durante 50 segundos. Para detener la reacción se agregó metabisulfito de sodio(2 mg/ml), lavándose

posteriormente el tubo de reacción con yoduro de potasio al 1% y sacarosa 1.5% en amortiguador de fosfatos.

La purificación de la hormona marcada se realizó por medio de una columna de Sephadex G-100 equilibrada con solución amortiguadora PBS y ASB 1%, y se colectaron fracciones de 0.5 ml.

La actividad específica obtenida de la hGC marcada fue de 10-35  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , y el porcentaje de unión al anticuerpo en una dilución fija de 1:100,000 fue de 35-65%.

### 3.5.2 Determinación de la Gonadotropina coriónica humana

La determinación de las concentraciones de hGC en los medios de cultivo se realizó siguiendo la metodología descrita por Sufi y colaboradores<sup>(131)</sup>. Todas las muestras del estudio fueron incluidas en una misma análisis en incubaciones por triplicado. Para el radioinmunoanálisis (RIA) se utilizó como estándar una preparación altamente purificada de hGC (hCG CR 125), proporcionada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Bethesda, MD EUA.

Las concentraciones del estándar fueron de 0.125 ng hasta 30 ng/tubo, obteniéndose así la curva estándar tipo. El anticuerpo anti-hGC se utilizó a una dilución final de 1:100,000. El análisis de la reacción cruzada del anticuerpo mostró para la subunidad  $\beta$  un porcentaje de 3.22% y para la fracción  $\alpha$  libre de 1.23%. La sensibilidad del análisis fue de 0.125 ng/tubo.

El protocolo de reacción se realizó de la siguiente manera: 100  $\mu$ l de estándar o muestra problema, 100  $\mu$ l de  $^{125}$ I hGC (20,000 cpm), y 100  $\mu$ l de anticuerpo anti-hGC. Se incubó la reacción de 16-20 h a temperatura ambiente y se añadieron 100  $\mu$ l de un anticuerpo de  $\gamma$ -globulina anticonejo producida en borrego. Se centrifugó después de 2 h de incubación.

La incubación con segundo anticuerpo se realizó 2 h a temperatura ambiente después de lo cual se centrifugó a 1000xg durante 30 minutos. La radiactividad del precipitado se cuantificó en un contador para radiaciones  $\gamma$ .

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

### 3.5.3 Cuantificación de AMPc

Las concentraciones de AMPc totales se determinaron según la técnica descrita por Knecht y colaboradores<sup>(132)</sup> como se menciona a continuación. Las muestras para la prueba se incluyeron en una misma corrida por triplicado. Para el RIA se utilizó como estándar preparaciones de AMPc. Las concentraciones del estándar partieron de 4 fmol hasta 500 fmol/tubo. La dosis que desplaza un 50% de AMPc se encuentra a una concentración de 40 fmol/tubo y la sensibilidad del análisis es de 4 fmol/tubo. El anticuerpo específico contra AMPc (Anti AMPc CV-27 NDKK EUA), fue utilizado a una dilución final de 1:70,000 con la cual el anticuerpo unió del 35-40% del trazador.

La reacción se llevó a cabo con 100  $\mu$ l del estándar o de las muestras problema en solución de acetato de sodio 50 mM, las cuales fueron previamente acetiladas<sup>(132)</sup>, 100  $\mu$ l de <sup>125</sup>I tirosyl,metyl éster de 2'-O-monosuccinil adenosine 3'-5' monofosfato cíclico (10,000 cpm), y 100  $\mu$ l de anticuerpo antiAMPc en solución de acetato de sodio 5 mM.

Se incubó durante 18-24 h a 4 °C y se añadieron 3 ml de etanol. Se centrifugó a 1000xg durante 30 minutos. Se determinó el porcentaje de unión de radiactividad contenida en el precipitado. La variación intra ensayo fue < 12%.

### 3.6 Pruebas estadísticas

Los valores mostrados en el presente estudio representan la media de 6-20 pozos de un mismo cultivo  $\pm$  la desviación estándar. Todos los experimentos fueron realizados en tres ocasiones.

La significancia estadística se estableció utilizando un análisis de varianza y la prueba de Walter Duncan;  $p < 0.05$  fue considerada como estadísticamente significativa.

## 4. RESULTADOS

---

### 4.1 Secreción de hGC

Para la validación del cultivo de células del trofoblasto se eligió estudiar la secreción de hGC. Esta hormona es uno de los principales productos de síntesis y de secreción del sinciotrofoblasto —célula encargada de las funciones endócrinas durante la placentación y a lo largo de la gestación. Por medio de microscopía de luz se estudió la agregación y citodiferenciación de los trofoblastos *in vitro*. Las células se cultivaron en medios suplementados con suero fetal de ternera (SFT), y una vez diferenciados los trofoblastos, éstos fueron estimulados con un análogo no hidrolizable del AMPc (8-BrAMPc) a una concentración de 1.5 mM. La estimulación se llevó a cabo durante el segundo y tercer día de cultivo (48 y 76 h).

De manera inicial demostramos que al igual que sucede *in vivo*, las células del trofoblasto mantenidas en cultivo son capaces de sintetizar y secretar hGC al medio. Como se muestra en la tabla 1 las células del trofoblasto secretaron 26 ng/mg de proteína durante las primeras 24 horas, con un incremento progresivo a lo largo del tiempo de cultivo hasta alcanzar su máximo a las 96 h de cultivo.



SFT	Tiempo de cultivo (hr)	hGC (ng/mg proteína)
+	24	26±7
+	48	29±6
-	72	29±5
-	96	32±6

Tabla 1

**Secreción basal de hGC en cultivos de citotrofoblasto.**

Las células se cultivaron con suero fetal de ternera durante las primeras 48 hr tiempo en el cual las células se lavaron, y se siguieron cultivando con medios libres de suero fetal. La hGC fue cuantificada por ensayos de RIA en el medio de cultivo de cada 24 hr.

Como se muestra en la fig 1 esta secreción se modificó al haber estimulado el cultivo con el análogo del AMPc. Se observó que existen cambios cuantitativos en la concentración de hGC en las células estimuladas con SFT en relación a las células que se cultivaron sin suero.

Sin embargo, como se muestra en la Figura , ambos grupos son capaces de responder al 8-BrAMPc.

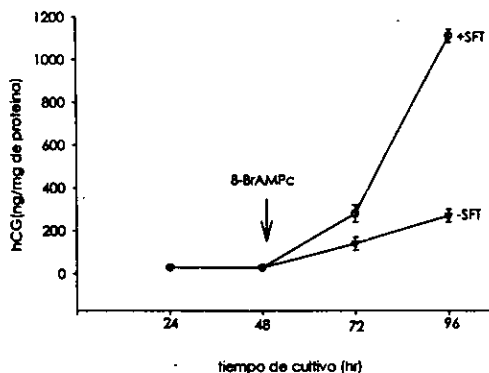


Figura 1

#### Efecto del 8-BrAMPC sobre la secreción de hGC en cultivo de citotroblastos.

Las células fueron cultivadas durante 96 h con (O) y sin (∇) suero fetal de ternera inactivado. Los sincios trofoblastos en cultivo fueron estimulados con el análogo del AMPc (1.5mM) después de 48 h a partir de la siembra. La hGC fue cuantificada por ensayos de Radioinmunoanálisis (RIA) en el medio de cultivo cada 24 h desde el momento de la siembra. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres cultivos, en muestras por triplicado.

Con la finalidad de estudiar cómo las células de la placenta humana a término son capaces de responder a otro agente con efectos asociados a la secreción de hGC, las células del trofoblasto se incubaron en medios libres de suero con *GnRH* 15 nM y 30 nM respectivamente. La *GnRH* se añadió durante el segundo y tercer día de cultivo (48 y 72 h) y la respuesta obtenida en términos de secreción de hGC fue estudiada al cuarto día (96 h) de cultivo (Figura 2).

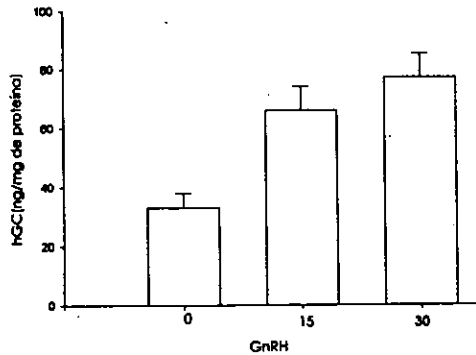


Figura 2

**Efecto de dos dosis de GnRH sobre la secreción de hGC en cultivo de citotrofoblasto.**

Después de 24 h a partir de la siembra, las células fueron incubadas en medios libres de suero conteniendo GnRH en dos dosis diferentes (i. e., 15 y 30 nM, respectivamente). La incubación se llevó a cabo durante dos días consecutivos. Los medios fueron cambiados cada 24 h y al final de la incubación (96 h) se cuantificó hGC por RIA en el medio de cultivo. Cada barra representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres cultivos. Los cultivos tratados con GnRH secretaron más hGC ( $P < 0.001$ ) que los grupos celulares no estimulados (testigos).

La figura 2 muestra que la adición de GnRH a las células de la placenta, induce el aumento significativo de hGC ( $P < 0.001$ ) en comparación de incubaciones paralelas en ausencia del estímulo (basal).

Todos estos resultados demuestran que las células del trofoblasto cultivadas en medios libres de suero y bajo las condiciones experimentales descritas presentaron una adecuada respuesta bioquímica a los agentes estimuladores utilizados.

## 4.2 Purificación de SHBG

Los resultados de la electroforesis de proteínas mostraron que la SHBG purificada es una preparación homogénea y de alto grado de pureza (Figura 3), mientras que los resultados de unión demostraron que la proteína purificada es capaz de unir andrógenos (DHT). La SHBG obtenida mostró tener una actividad específica 2,800 veces mayor a la actividad encontrada en estudios con suero.

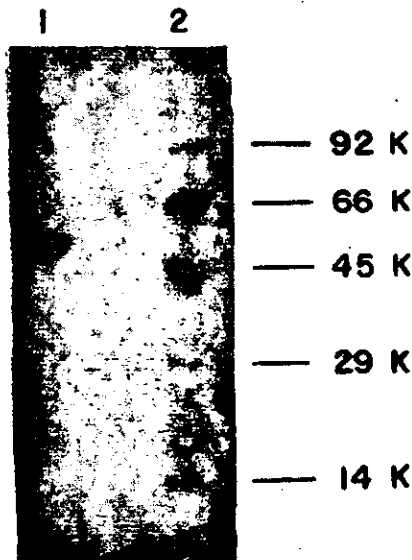


Figura 3

### Electroforesis de SHBG en gel de poliacrilamida.

Se realizó una electroforesis de proteínas con SHBG purificada de suero de mujer embarazada. En un gel desnaturalizante de poliacrilamida (12.5%), se aplicó una alícuota de SHBG (5  $\mu$ g) purificada de suero de mujer embarazada. La línea 1 muestra la proteína pura mientras que la línea 2 muestra los marcadores de peso molecular.

### 4.3 Efecto de la SHBG sobre la secreción de hGC

Con la finalidad de observar el efecto de la SHBG pura sobre nuestro modelo experimental, se realizó un estudio de cinética de tiempo valorando la secreción diaria de hGC al medio de cultivo, tanto en presencia como en ausencia de dicha proteína (Figura 4). A las 48 h de cultivo las células del trofoblasto libres de SFT fueron estimuladas con una concentración final de SHBG de 1 nM. El resultado mostró un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en las concentraciones de hGC secretadas al medio de cultivo en el día 3 (96 h) con respecto al grupo celular incubado en ausencia de SHBG.

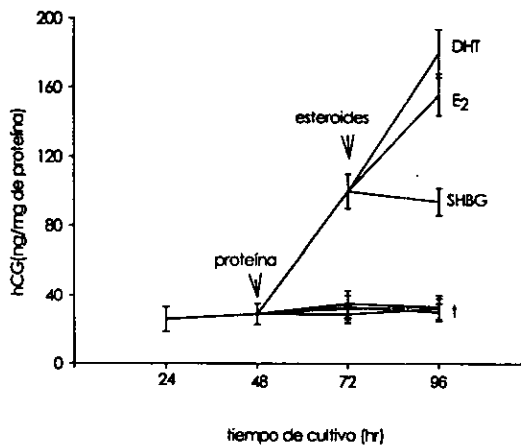


Figura 4

#### Efecto de la SHBG y esteroides, sobre la secreción basal de hGC por los sinciotrofoblastos mantenidos en cultivo.

Las células fueron incubadas con medios acondicionados con SFT al 20% durante las primeras 24 h desde el momento de la siembra. A las 48 h del cultivo se retiró el suero y las células fueron expuestas a 1 nM de SHBG durante 24 h. Posteriormente se lavaron e incubaron en

con y sin (-) esteroides (E) durante un período adicional de 24 h. En los tiempos arriba indicados se recuperó el medio de cultivo y se realizaron cuantificaciones de hGC. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de por lo menos dos experimentos individuales y las muestras fueron analizadas por triplicado. Los testigos El (†) utilizados fueron células incubadas en medios de cultivo sin estímulo alguno y células estimuladas sin SHBG y con esteroides (DHT y E<sub>2</sub>).

#### 4.4 Participación de los esteroides sobre la secreción de hCG

Como muestran los resultados anteriores, la SHBG pura tiene un efecto estimulante sobre las células del trofoblasto mantenidas en cultivo. Para evaluar la participación de los esteroides DHT y estradiol (E<sub>2</sub>) sobre el cultivo celular, se utilizaron células del trofoblasto previamente incubadas con SHBG por un tiempo de 24 h. Las células fueron lavadas e incubadas tanto con como sin los esteroides ya mencionados a una concentración final de 10 nM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Horas de cultivo	Estímulo	hCG (ng/mg proteína)
24	-	26 $\pm$ 7
48	-	29 $\pm$ 6
72	*SHBG -	100 $\pm$ 10
96	SHBG	94 $\pm$ 8
	**E <sub>2</sub>	156 $\pm$ 12
	**DHT	180 $\pm$ 14
	-	32 $\pm$ 6

Tabla 2

\*P < 0.05 vs células no estimuladas

\*\*P < 0.05 vs células estimuladas SHBG (72 hr)

Cuando se comparan los valores obtenidos de las células incubadas con la proteína a las 72 h, se observó que los esteroides incrementaron la secreción de hGC al medio de cultivo. Al evaluar los resultados de células que habían sido incubadas en presencia de SHBG pero sin esteroides, no se encontró ningún efecto significativo en las concentraciones de hGC. Sin embargo, la hormona encontrada en el medio de cultivo permaneció significativamente elevada con respecto a las células que no fueron estimuladas.

#### 4.5 Efecto de la SHBG y del complejo SHBG-esteroide sobre la producción de AMPc

La adición de esteroides biológicamente activos ( $E_2$  y DHT) mostraron tener una respuesta potenciadora en lo que respecta a la síntesis y secreción de hGC al medio de cultivo. Por lo tanto, para estudiar si el efecto observado mostraba alguna relación con la estimulación de adenilato ciclasa, el siguiente aspecto que se investigó fue estudiar el efecto que tenía la SHBG sobre la acumulación de AMPc antes y después de la adición de hormonas esteroides. Como se muestra en la Figura 5, la dosis de SHBG que indujo la mayor respuesta sobre la síntesis y secreción de hGC fue la concentración de  $10^{-9}$  M. La proteína se incubó a las 48 y 72 horas de cultivo y se evaluó la respuesta al cuarto día (96 h). Como se observa en la Figura 5, la respuesta obtenida con 1 nM de proteína correlaciona con los valores de AMPc. El efecto que ejerce la posterior adición de esteroides se evaluó de la misma forma a la descrita previamente. El AMPc total intracelular y en el medio de cultivo fue estudiado por radioinmunoanálisis.

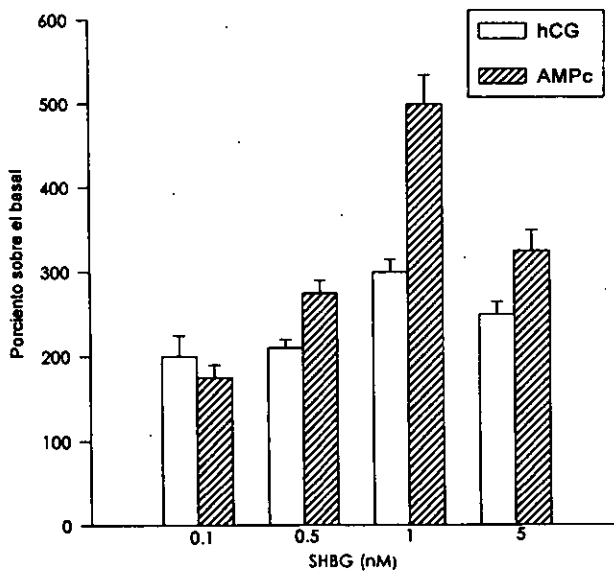


Figura 5

**Efecto de diferentes concentraciones de SHBG sobre la secreción y acumulación de AMPc por los cultivos de citotrofoblastos.**

Las células fueron cultivadas como se describe en la Figura 4 en medios libres de suero conteniendo diferentes concentraciones de SHBG. Los medios de cultivo fueron colectados en intervalos de 24 h, para ser analizados por RIA de hGC y de AMPc. Cada barra representa la media  $\pm$  desviación estándar de por lo menos tres experimentos por triplicado, y los testigos experimentales fueron células cultivadas de igual forma y sin estímulo alguno.

La Figura 6 muestra un incremento estadísticamente significativo ( $P < 0.005$ ) en los valores de AMPc. Estos resultados correlacionan con los datos observados en la cuantificación de hGC.



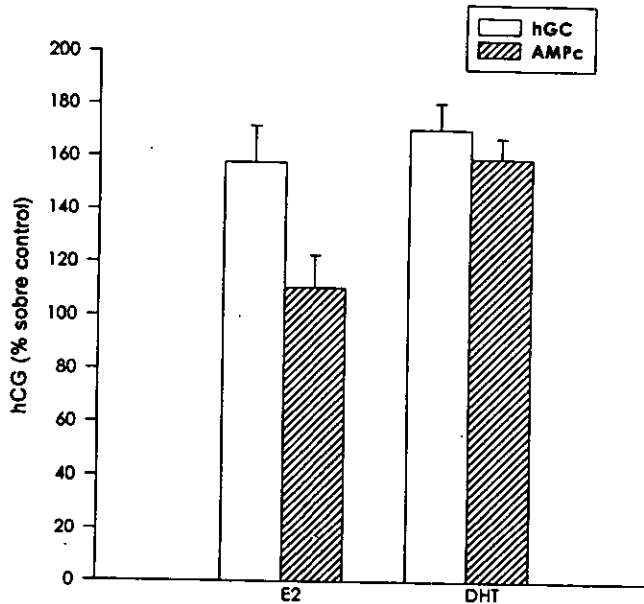


Figura 6

**Efecto sobre la acumulación de hGC y AMPc en cultivos de trofoblastos.**

Se cuantificó tanto hGC como AMPc posteriormente a la incubación con DHT y E2, en células estimuladas previamente con SHBG. Se utilizaron condiciones experimentales similares a las ya descritas en la Figura 4. Cada barra representa la media  $\pm$  desviación estándar de las concentraciones obtenidas de hGC y AMPc a las 96 h de cultivo en ensayos por triplicado (\*P < 0.005 vs. E2)

Para validar que el efecto de los estudios con esteroides dependía de la presencia de SHBG, las células del trofoblasto fueron incubadas con 10 nM de DHT durante 24 h previamente al estímulo con SHBG. Lo que se observó fue que la exposición al complejo SHBG/DHT no tiene ningún efecto sobre la secreción de hormona gonadotropina en los cultivos celulares.

Por último se evaluó la participación de los esteroides en ausencia de SHBG. Se realizaron estudios bajo las mismas condiciones experimentales

descritas y no se encontró efecto alguno sobre la secreción basal de hormona producida por las células (Figura 7).

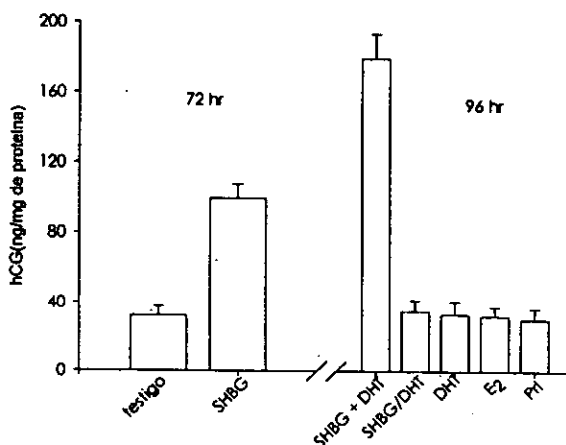


Figura 7

**Efecto de la SHBG sobre cultivos de citotroblastos previamente saturados con DHT (DHT/SHBG). Efecto de prolactina en las células de trofoblasto.**

Las células fueron incubadas con o sino ausencia (control) de (a) un grupo celular estimulado con SHBG + DHT, (b) SHBG, (c) SHBG/DHT (complejos), (d) esteroides(DHT,E<sub>2</sub>) y (e) prolactina. Al final de cada periodo de incubación(72 y 96 hr) se cuantificó hCG mediante un ensayo específico de RIA. Cada barra representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres cultivos en cuantificaciones por triplicado. (\*\*P < 0.005 vs. SHBG).

## 5. DISCUSIÓN

---

Este trabajo de tesis demostró que el cultivo primario de trofoblasto es un modelo biológico que permite estudiar los mecanismos de regulación endócrina durante la placentación, ya que la célula *in vitro* mantiene su capacidad de diferenciación hasta la formación de sincicios, unidad celular encargada de los procesos endócrinos y bioquímicos.

El trofoblasto llega a diferenciarse en sincicio a las 48 h de cultivo y su estructura celular permanece intacta, de tal forma que puede mantener sus procesos bioquímicos característicos a lo largo de 96 h de cultivo<sup>(92)</sup>, tiempo en donde el sistema es capaz de responder a estímulos externos<sup>(98-100)</sup>. Esto fue demostrado mediante la incubación de las células con 8-BrAMPc, tanto en ausencia como en presencia de SFT. En ambos casos el análogo del AMPc estimuló la síntesis y secreción de la hGC al medio de cultivo.

En este estudio se presentan evidencias de que la SHBG pura estimula la secreción de hGC en cultivos de sinciciotrofoblastos humanos. Este efecto se incrementó cuando las células incubadas con SHBG fueron reestimuladas con los esteroides DHT y E<sub>2</sub>, no encontrándose el mismo efecto en células no estimuladas. Además, los valores de hGC

cuantificados en los medios de cultivo correlacionaron directamente con las concentraciones de AMPc.

Es conocido que las concentraciones de *SHBG* se encuentran incrementadas durante el embarazo<sup>(56,135)</sup>, tanto en suero como en el líquido amniótico<sup>(134)</sup>. A pesar de que la razón de esto no es del todo conocida, el estudio de esta proteína ha mostrado evidencias interesantes sobre la probable relevancia fisiológica de *SHBG*, sin descartar su función de transportador de hormonas esteroides.

En 1980 se describieron por primera vez la presencia de sitios de unión específicos para *SHBG* en las membranas de citotrofblastos<sup>(79)</sup>, así como en membranas citoplasmáticas de otros órganos sensibles a la acción de hormonas esteroides<sup>(63,64,65,72,73,74,78)</sup>. Aunque no se ha logrado la caracterización completa del receptor, las descripciones de que la interacción de la proteína con estos receptores es capaz de inducir un incremento en la presencia de segundos mensajeros del tipo del AMPc, apoyan la hipótesis generada por W. Rosner que postula que el receptor membranal de la *SHBG* puede pertenecer a la familia de receptores para proteínas G<sup>(69)</sup>.

Nuestro laboratorio ha demostrado la presencia de ARNm de *SHBG* en células de la placenta humana a término<sup>(136)</sup>. Los datos obtenidos en el laboratorio, más las descripciones de la literatura<sup>(137)</sup>, nos motivaron a estudiar la participación y relevancia fisiológica de la *SHBG* durante los fenómenos biológicos que se llevan a cabo en la placenta desde la implantación. El modelo elegido para este estudio fue el cultivo de trofblastos, debido a la capacidad de citodiferenciación de estas células

*in vitro* (92-98), y que permite estudiar los eventos biológicos durante la placentación.

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio mostraron la capacidad de la SHBG para estimular la síntesis de hGC y AMPc. Estos datos sugieren un significado fisiológico en los fenómenos biológicos que se llevan a cabo en la placenta, especialmente cuando se considera que este órgano es blanco de las hormonas esteroides.

El efecto de SHBG que se observó sobre el trofoblasto mantenido en cultivo a lo largo de el presente estudio, es el de incrementar la síntesis de hGC como consecuencia de un aumento en el AMPc intracelular. Ello únicamente sugiere que la capacidad de la SHBG para activar el metabolismo celular, se debe probablemente a la interacción con los receptores localizados en la membrana del trofoblasto (79).

Existen algunas discrepancias acerca del mecanismo de acción de esta proteína en la interacción con su receptor membranal. La mayoría de los trabajos apoyan el hecho de que el complejo proteína-receptor interactúa cuando la SHBG se encuentra dissociada del esteroide, y una vez que la proteína ha interactuado con la membrana mantiene su capacidad para unir esteroides y así activar el metabolismo celular(65). Estos resultados nos indican que en la placenta la SHBG libre tiene la capacidad para activar el receptor de adenilato ciclasa tanto en presencia como en ausencia de esteroides. Estos resultados son como los reportados en la literatura por la Dra. Porto y su grupo de trabajo, donde el efecto de la SHBG sobre la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF7(139), sensible a estrógenos, incrementa las concentraciones de AMPc, al igual que en nuestros datos. Las diferencias encontradas en los diferentes sistemas biológicos

estudiados pueden explicarse desde el punto de vista metodológico, o bien sugerir la existencia de diferencias fisicoquímicas y de estructura entre los receptores para *SHBG* en los diferentes tejidos.

Los mecanismos que determinan la acumulación tanto de la hGC como del AMPc inducidos por la proteína no unida al esteroide necesitan de mayor estudio. Además, sería interesante poder llevar a cabo la purificación y caracterización del receptor así como a la clonación del ADN correspondiente<sup>(64)</sup>.

Los datos mostrados en este trabajo apoyan la hipótesis sugerida por Hryb y colaboradores<sup>(65)</sup>, que propone a la *SHBG* como una proteína alostérica, que para interactuar con la membrana es necesario que se encuentre libre de esteroides. Los resultados presentados en este estudio, mostraron que las células del trofoblasto al ser saturadas con DHT antes de la incubación con *SHBG* no presentaron efecto alguno en la síntesis de hGC y AMPc. Además, se comprobó que la *SHBG* requiere encontrarse libre de esteroides para ejercer un efecto biológico en el trofoblasto.

De la interpretación de la literatura y de los resultados presentados a lo largo de este estudio, podemos mencionar que los complejos procesos endócrinos y bioquímicos que permiten la diferenciación del trofoblasto se inician aún antes de que el blastocisto se halla implantado<sup>(113,142,143)</sup>. Para que el fenómeno de la placentación se lleve a cabo es necesario regular mecanismos endócrinos, migratorios y de adherencia<sup>(144-146)</sup>, sucesos que se inician desde el reconocimiento célula-substrato en el endometrio. Una vez que se realiza la interacción del blastocisto con la matriz extracelular endometrial<sup>(142-143)</sup>, se inicia el proceso de diferenciación del citotrofoblasto en sus diferentes fenotipos; el endócrino, el invasivo y el de

adherencia<sup>(89)</sup>. Para que estos fenómenos se logren, es necesario un microambiente apto para llevar a cabo los mecanismos propios de la placentación humana.

Recientemente se describió que la hGC promueve la diferenciación del citotrofoblasto<sup>(102)</sup>. Por otra parte, la descripción de que la placenta tiene receptores membranales específicos para *SHBG*<sup>(59)</sup>, y que el resultado de esta interacción tiene efecto directo sobre uno de los principales productos endócrinos del trofoblasto, la hGC abre la posibilidad de que la proteína tenga acción sobre los mecanismos biológicos que ocurren antes y después de la placentación.

Otros datos en la literatura que sugieren esta observación son el hallazgo de secuencias homólogas de *SHBG* con proteínas relacionadas a la diferenciación y el desarrollo<sup>(82-84)</sup>. El estudio en modelos animales como la rata, donde la *SHBG* sólo se encuentra en etapas fetales y desaparece después del nacimiento, mas la demostración de una variante polimórfica de esta proteína en individuos heterocigotos, donde no se ha podido demostrar su presencia en forma de homocigoto para esta variante<sup>(35)</sup>, sugieren que la presencia de la *SHBG* y sus funciones son críticas en etapas tempranas del desarrollo. Además, el presente trabajo muestra que la proteína es capaz de inducir la secreción y síntesis de hGC y de AMPc al medio de cultivo de trofoblastos. Juntos, estos datos pueden sugerir que la *SHBG* tiene implicaciones en los mecanismos de diferenciación celular, lo cual podría llevarse a cabo de diferentes maneras, ya sea regulando y asegurando la producción de hGC crítica en las etapas tempranas de la placentación, o promoviendo la diferenciación endócrina del trofoblasto.

Esta proteína también puede tener un mecanismo de acción directo sobre la célula modulando su respuesta a los gradientes hormonales que suceden durante la etapa de diferenciación.

Por otra parte, sería de gran interés estudiar el efecto de la *SHBG* en los fenómenos de adhesión e invasión del trofoblasto, determinando la participación bioquímica en estos fenómenos. Hipotéticamente, esta podría ser la causa de que, al menos en la placenta, la *SHBG* no requiera de hormonas esteroides para inducir respuesta biológica, participando juntos, la proteína y los esteroides, en la regulación de los fenómenos endócrinos. Sin embargo, en los demás mecanismos que ocurren durante la placentación, probablemente la participación de la proteína no requiera de hormonas esteroides.



## GLOSARIO

---

SHBG	sex hormone binding globulin
ABP	androgen binding protein
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
hGC	hormona gonadotropina coriónica
DHT	dihidrotestosterona
E <sub>2</sub>	estradiol
K <sub>a</sub>	constante de asociación
K <sub>d</sub>	constante de disociación
kDa	kilodaltones
Mr	molecular rate
LIF	leukemia inhibitor factor
TUN	trofótero nectina
ILE	interleucina
GnRH	gonadotropin release hormone
RIA	radioinmunoanálisis

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Mercier, C., Alfsel., and Baulieu, E.E (1990). Testosterone binding globulin in human plasma. *Inf. Congr. Ser. Excerpta Med.* 101, 212 abstr.
2. Westphal, U (1986). Steroid-protein interactions II. "Monograph on Endocrinology". pp. 198-301. Springer, Berlin
3. Stupnick, R., and Bartake, A. (1976). Binding of testosterone mouse plasma. *Endokrinologie* 68, 150-154.
4. Larrea, F., Musto, N. A., Gunsalus, G.L., Mather, J.P., and Bardin, C. W. (1981). Origin of heavy and light protomers of androgen Binding Protein from rat testis. *J. Biol. Chem.* 256, 12566-12573.
5. Larrea, F., Musto, N., Gunsalus, G., and Bardin, C.W. (1981). The microheterogeneity of rat androgen binding protein from the testis rete fluid and epididymis, as demonstrated by immunoelectrophoresis and photoaffinity labeling. *Endocrinol (Baltimore)* 109, 1212-1220.
6. Danzo, B.J., and Bell, B.W. (1988). The microheterogeneity of androgen binding protein in rat serum and epididymus is due to differences in glycosylation of their subunits. *J. Biol. Chem.* 263, 2402-2408.
7. Avvakumov, G.V., Matueentseva, I.V., Akhrem, L.V., Strel'chyonolc, O.A., and Akherem, A.A: (1983). Study of the carbohydrate moiety of human serum sex hormone binding globulin. *Biochem. Biophys. Act* 760, 104-110.
8. Danzo, B.J., and Black, J.H. (1990). Analysis of the oligosaccharides on rat androgen binding protein using serial lectin chromatography. *Biol Reprod.* 43, 219-228.
9. Danzo, B.J., And Black, J.H. (1990). Analysis of the oligosaccharides on rat androgen binding protein using serial lectin chromatography. *Biol Reprod.* 43, 219-228.

10. Joseph, D.R., and Nawremce. W. (1993). Mutagenesis of essential functional residues of rat androgen binding protein/Sex hormone binding globulin. *Mol. Endocrinol.* 7, 488-496.
11. Bocchinfuso, W.P., Wermels-Rodenshiser, S., and Hammond, G.L. (1992). Selective removal of glycosylation sites from sex hormone-binding-globulin by site directed mutagenesis. *Endocrinol.* 131, 2331-2336.
12. Joseph, D.R., and Lawrence, W. (1993). Mutagenesis of essential functional residues of rat androgen-binding-protein/ Sex hormone binding globulin. *Mol. Endocrinol.* 7, 488-496.
13. Joseph, D.R., Hall, S.H., and French, F.S. (1985). Identification of complementary DNA clones that encode rat androgen binding protein. *J. Androl.* 6, 392-395.
14. Reventos, J., Hammond, G.L., Crozato, A., Brookd, D.E., Gunsalus, G.L. Bardin, C.W., and Musto, N.A. (1988), Hormonal regulation of rat androgen-binding protein (ABP) messenger ribonucleic acid and homology of human testosterone-estradiol binding globulin and ABP complementary deoxyribonucleic acid. *Mol. Endocrinol.* 2, 125-135.
15. Wang, Y.-M., Sullivan, P.M., Petruz, P., Yarbrough, W., and Joseph, D.R. (1989). The androgen- binding protein gene in expressed in CD1 mouse testis.
16. Que, B.G., and Petra, D.H. (1987). Characterization of a cDNA coding for sex steroid binding protein of human plasma. *FEBS. Lett.* 219, 405-409.
17. Walsh, K.A., Titani, K., Takio, K., Kumar, S., Hayes, R., and Petra, P.H. (1986). Aminoacid sequence of the sex steroid- binding protein of human blood plasma. *Biochem.* 25, 7584-7590.
18. Hammond, G.L. Underhill, D.A., Rykse, H.M., and Smith, C.L. (1989). The human sex hormone- binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNA's. *Mol. Endocrinol.* 3, 1869-1876.
19. Westphal, U. (1986). Steroid- proteub interactions. II "Monographs and endocrinology". p.p 198-301. Srpnger Verlang- Berlin.
20. Hsu, A.F., and Troen, P.(1987). An androgen binding protein in the testicular cytosol of human testis. *J. Clin. Inves.* 61, 1611-1619.
21. Joseph, D.R., Lawrence. W., and Danzo, B.J. (1992). The role of asparagine linked oligosaccharides in the subunit structure, steroid, and secretion of androgen binding protein. *Mol. Endocrinol.* 6, 1127-1134.

22. Khan, M.S., Hryb, D.J., Hashim, G.A., Romas, N.A., and Rosner, W. (1990). Delineation and synthesis of the membrane receptor-binding domain of sex hormone binding globulin. *J. Biol.Chem.* 265, 18362-18365.
23. Berube, D., Seralini, G.E., Gangné,R., and Hammond, G.L. (1990). Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet,cell genet.* 54, 65-67.
24. Hammond, G.L., Underhill, D.A., Smith, C.L., Gopng, I.S., Harley, M.J., Musto, N.A., Cheng., C.-Y., and Bardin, C.W.(1987). The cDNA deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of steroid-binding domain. *FEBS Lett.* 215, 100-114.
25. Hammond, G.L., Underhill, D.A., Rykse, H.M., and Smith, C.L.(1989). The human sex hormone binding globulin gene contains exons for androgen binding protein and two other testicular messenger RNA's. *Mol. Endocrinol.* 3, 1869-1867.
26. Sullivan, P.M., Petrusz, P., Sapiro, C., and Joseph, D.R.(1990). Alternative processing of androgen binding protein RNA transcript in fetal rat liver, Identification of a transcript formed by trans splicing, *J. Biol. Chem.* 266, 143-154.
27. Sullivan, P.M., Wang, Y.-M., and Joseph, D.R.(1993). Identification of an alterate promoter in the rat androgen binding globulin/Sex hormone binding globulin gene that regulates synthesis of a mRNA encoding a protein with altered function. *Mol. Endocrinol.* 7,702-715.
28. Lobl, T.J., (1981). Androgen Transport protein: Physical properties, hormonal regulation and possible mechanism of TeBG and ABP action. *Arch, Androl.* 7, 133-151.
29. Rosner,W. (1990). The functions of corticosteroid binding globulin recent advances. *Endocr. Rev.* 11,80-91.
30. Blacke, R.E., Rajguru, S., Nolan, G., and Ahluwalia, B.S.(1988). Dexamethasone suppresses sex hormone binding globulin. *Fertil, Steril.* 49, 66-70.
31. Mercier- Bodard, C., Nivet, U., and Baulieu, E.-E.(1991). Effects of hormones on SBP mRNA levels in human cancer cells. *J. Steroid Biochem, Mol. Bio.* 40, 777-785.
32. Luckcock, A., and Cavalli Sforza, L.L. (1983). Detection of genetic variation with radioactive ligand.V.Genetic variations of testosterone-binding globulin in human serum. *Am.J.Hum.Genet.* 35, 49-57.

33. Gershagen,S., Hemmingsson,K., and Fernlund,P.(1987). Subunits of human sex hormone binding globulin. Interindividual variation in size. *J. Biol.Chem.* 262, 8430-8437.
34. Larrea,F., Oliart,R.M., Granados, J., Mutchinick, O., Diaz Sanchez, V., and Musto, N.A.(1990). Genetic polymorphism of the sex hormone binding globulin: Evidence of an isoelectric focusing variant with normal androgen binding affinity. *J. Steroid. Biochem.* 361, 541-548.
35. Van Baelen, H., Convents, R., Cailleau, J., and Heyns, W.(1992). Genetic variation of human sex hormone binding globulin: Evidence form world wide bi-allelic gene. *J. Cvlin. Endocrinol. Metab.* 75, 135-139.
36. Power, S.G.A., Boccinfuso, W.P., Pallesen, M., Warmels Rodenhiser, S., Van Baelen,H., and Hammond, G.L.(1992). Molecular analyses of a human sex hormone binding globulin variant: Evidence of an additional carbohydrate chain. *J. C.lin. Endocrinl. Metab.* 75, 1066-1070.
37. Bardin, C.W., Cheng, C.M., Musto, N.A., and Gunsalus,G.L.(1988). The Sertili cell in "The Physiology of reproduction". (E.knobil and J. Neill, eds), pp 933-973. Raven Press, New York.
38. Grinswold, M.D., Morales, C., and Sylvester, S.R.(1982). Molecular biology of the cell. *Oxford Rev, Reprod. Biol.* 10, 124-136.
39. Russel, L.D., and Grinswold, M.D. eds (1993). "The sertoli cell ". Coche River Press. Clearwater, FL.
40. Skinner, M.K., and Fritz, I.B.. (1985): Testicular Peritubular cells secrets a protein under androgen control that modulates Sertili, cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 114-118.
41. Fritz, I.B.(1979). Sites of actions on androgen and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferus tubule. In "Biochemical Actions of Hormones". (G.Litwack, de.), pp 248-281. Academic Press, New York.
42. Means, A.R., Fakunding, J.L., Hunkings, C., Tindall, D.J., and Vitale, R. (1976). Follicle stimulating hormones, the Seroli cell and spermatogenesis. *Recent Prog. Horm. Re.* 32m 477-522.
43. Means, A.R., Dedman, J.R., Tash, J.S., Tindall, D.J., van Sicke, M., and Welsh, M.J. (1980). Regulation ef the testis Seroli cell by follicle stimulation hormone. *Annu. Rev. Physiol.*
44. Wright, W.W., Musto, N.A., Mather, J.P., and Bardin, C.W. (1981). Sertili cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.* 78, 7565-7569.

45. Kissinger, C., Skinner, M.K., and Grinswold, M.D. (1982). Analysis of Sertoli cell secreted proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Biol. Reprod.* 27, 233-240.
46. DePhilip, R.M., Feldman, M., Spruill, W.A., French, F.S., and Kierszenbaum, A.L. (1982). The secretion of androgen-binding protein and other protein by rat Sertoli cells in culture: A structural and electrophoretic study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 383, 360-371.
47. Ritzen, E.M., Nayef, S.N., French, F.S., and Dobbins, M.C. (1971). Demonstration of androgen-binding components in rat epididymis cytosol and comparison with binding components in prostate and other tissues. *Endocrinology (Baltimore)* 89, 143-151.
48. Gunsalus, G.L., Musto, N.A., and Bardin, C.W. (1980). Bidirectional release of Sertoli cell product, androgen binding protein, into the blood and seminiferous tubule. In "Testicular development: Structure and Function" (A Steinberger and E. Steinberger, eds.), pp 291-297. Raven Press, New York.
49. Anthony, C.T., Danzo, B.J., and Orgebin-Crist, M.C. (1984). Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and the androgen binding protein in the restricted rat. *Endocrinology (Baltimore)* 114, 1413-1418.
50. Anthony, C.T., Danzo, B.J., and Orgebin-Crist, M.C. (1984). Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and the androgen binding protein in the hypophysectomized, pregnenolone-injected rat. *Endocrinology (Baltimore)* 114, 1419-1425.
51. Siiteri, P.K., and Simberg, N.H. (1986). Chaining concepts of active androgens in blood. *Clin. Endocrinol. Metab.* 15, 241-259.
52. Siiteri, P.K., Murai, J.T., Hammond, G.L., Nisker, J.A., Raymoure, W.J., and Kuhn, R.W. (1982). The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 38, 457-510.
53. Mendel, C.M. (1989). The free hormone hypothesis: A physiologically based mathematical model. *Endocr. Rev.* 10, 59-70.
54. Mendel, C.M. (1990). Rates of dissociation of sex steroid hormones from human sex hormone-binding globulin: A reassessment. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 251-255.
55. Mendel, C.M. (1992). The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis. *J. Androl.* 13, 107-116.
56. Anderson, D.C. (1974). Sex hormone-binding globulin. *Clin. Endocrinol. (Oxford)* 3, 69-96.

57. Martin, M-E., Vranckx, R., Benassay, C and Nuñez, E.A.( 1986). Modification of the properties of human sex steroid-binding protein by nonesterified acids. *J. Biol. Chem.* 261,2954-2959.
58. Pardrige, W.M. (1988). Selective delivery of sex steroid hormones to tissues *in vivo* by albumin and by sex hormone binding globulin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 538, 173-192.
59. Pardrige, W.M. (1988). Select delivery of sex steroid hormones to tissue by albumin and by sex hormone-binding globulin. *Oxford. Rev Reprod. Biol.* 10, 237-292.
60. Feldman, M., Lea, O.A., Petruz, P., L.L., Kierszenbaum. A.L., and French, F.S. (1981). Androgen-binding protein. Purification from rat epididymis, characterization and immunocytochemical localization. *J. Biol.Cem.* 256, 51-70-5175.
61. Rosner,W.(1990). The function of corticosteroid-binding globulin and sex hormone binding globulin: Resents advances. *Endocr. Rev.*11, 80-91.
62. Strel'chyonok, O.A., and Avvakumov, G.V. (1990). Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma : Novel data on their structure and function. *J : Steroid Biochem.* 35, 519-534.
63. Hryb, D.J., Khan, M.S., and Rosner, W. (1985). Testosterone-estradiol-binding globulin binds to human prostatic cell membranes. *Biochem. Byophys. Res. Comm.* 128, 432-440.
64. Hryb, D.J., Khan, M.S., Romas, N.A.,and Rosner, W. (1898). The solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate. *J. Biol. Chem.* 264, 5378-5383.
65. Hryb, D.J., Khan, M.S., Romas, N.A., and Rosner, W. (1990). The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with receptor by steroid hormones. *J. Biol. Chem.* 265, 6048-6054.
66. Avvakumov, G.V., Zhuk, N.I., and Strel'chyonok, O.A.(1986). Subellular distribution and selectivity of protein-binding component of the recognition system for sex hormone-binding protein-estradiol component of the recognition system for sex hormone binding-protein- estradion complex in human decidual endometrium. *Biochim. Biphys.Acta.* 881, 489-498.
67. Strel'chyonok, O.A., Avvakumov, G.V., and Survilo, L.I. (1984). A recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes. *Biochim, Biphys,Acta* 802, 459-466.

68. Rosner, W., Hryb, D.J., Khan, M.S., Singer, C.J. and Nakhala, A.M. (1988). Are corticosteroid-binding proteins by a human.
69. Nakhala, A., Khan, M.S., and Rosner, W.(1990). Biologically active steroid activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LNCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 71,-398-404.
70. Nakhala, A., Khan, M.S., Romas, N.P., Rosner, W. (1990). Estradiol cause the rapid accumulation of cAMP in human prostate. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*,
71. Avvakumov, G.V., Zhuk, N.I.,and Strel'chyonod, O.A. (1996). Subcellular distribution and selectivity of the protein-binding component of the recognition system for sex hormone-binding protein-estradiol complexes in human decidual endometrium. *Biochim.Biophys.Acta* 881, 489-498.
72. Fortunati, N., Fissore,F., Fazzari, A., Berta, L., Guidiici, M., and Fraira, R. (1991).Sex steroid-binding protein interacts with a specific receptor on human premenopausal endometrium membrane modulating effect of estradiol. *Steroids* 56, 341-346.
73. Fortunati, N., Fissore, F., Fazzari, A., Bertah, L., Varvello, L., and Fraira, R. (1992).Receptor for sex steroid- binding protein of endometrium membranes: Solubilization, partial characterization and role of estradiol in steroid-binding protein-soluble receptor interaction. *Steroids* 57, 464-470.
74. Fortunati, N., Fraira, R., Fissore, F., Berta, L., Fazzari, A., and Gaidano, G. (1992) The receptor for human sex steroid binding protein (SBP) is expression on membranes of neoplastic endometrium. *J. Steroid Biochem. Mol: Biol.* 42,185-191.
75. Fortunati, N., Fissore, F., Fazzari, A., Berta, L., Benedusi-Pagliano, E., and Frarira, R.(1993), Biological relevance of the interaction between sex steroid binding protein and its specific receptor of MCF-7 cells: Effect on the estradiol- induced cell proliferation. *J Steroid. Biochem:* 32, 545-552.
76. Fraira, R., Fortunati, N., Berta, L., Fazzari, A., Fissore, F., and Gaidano, G. (1991). Sex steroid binding protein (SBP) receptors in estrogen sensitive tissues. *J. Steroid Biochem: Mol. Biol:* 40,805-812.
77. Porto, C.S., Abreu, L., Gunsalus, G.L.and Bardin, C.W. (1992), Binding of sex hormone-binding globulin (SHBG) to testicular membranes and soluble receptors. *Mol. Cell. Endocrinol:* 89, 33-38.



78. Portol, C.S., Musto, N.A., Bardin, C.W., Gunsalus, G.L.(1992), Binding of an extracellular steroid -binding globulin to membranes and soluble receptor from human breast cancer cells (MCF-7 cells). *Endocrinology* (Baltimore) 130. 2931-2936.
79. Krupenko, N.L., Avvakumov, G.V., and Strel'chyonok, O.A.(1990). Binding kof sex hormone -bindign-globullin-androgen complexes to the placental synckytiotrophoblast membrane. *Biochem.Biphys,Res.Comm.* 17(3), 1279-1283.
80. Krupendo, S.A., Krupenko, N.L., and Danzo B.D. (1994). Interaction of sex hormone-binding globulin with plasma membranes from the rat epididymis and other tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
81. Fraira, R., Fortunati, N., Fissore, F., Fazzaei, A., Zeppegno, P., Varvello, L., Orsello, M., and Berta, L. (1992).The membrane receptors for sex steroid binding protein is not ubiquitous. *J. Endocrinol. Invest.* 15, 617-620.
82. Joseph, D.R., and Baker, M.(1992). Sex hormone binding globulin, androgen binding protein , and vitamin K dependent protein S are homologous laminin A, merosin, and Drosophila crumbs protein. *FASEB J.* 6, 2477-2481.
83. Dählback,B., Hildebrand, B., and Malm, J. (1990). Characterization of functionally important domains in human vitamin K-dependent protein S using monoclonal antibodies. *J. Biol.Chem.* 265, 8127-8135.
84. Hoskins, J., Norman, D.K., Beckman, R.J., and Long, G.L. (1987). Cloning and characterization of human liver cDNA encoding a protein S precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78,3824- 3828.
85. Becker, R.R., and Iles, D.J.(1985). Developmental pattern of androgen-binding protein secretion during the critical period of sexual differentiation. *Arc. Androl.* 14, 107-114.
86. Joseph, D.R., Lawrence, W., and Danzo, B.J.(1992). The role of asparagine-linked ologosaccharides in the subunit structure, steroid binding, and secretion of androgen-binding protein. *Mol. Endocrinol.* 6, 1127-1134.
87. Joseph, D.R., Becchis-M., Fenstermacher-DA., Petruz-P. (1996). The alternate N- terminal sequence of rat androgen- binding protein/sex hormone-binding globulin contains a nuclear targeting signal. *Enocrinol.* 137 (3), 1138- 1143.
88. Damassa-D. A., Cates- J.M.(1995). Sex hormone-binding globulin and male sexual development.*Neurosci-Biobehav-Rev.* 19 (2), 165-175.

89. Kliman, H.J., Feinberg, R.F. (1992). Trophoblas differentiation. In: Bamea ER, Hustin J, Jauniaux E. (eds): *The first twelve weeks of Gestation*. Springer-Verlag, New York, pp 3-25.
90. Conley A.J., Mason, J.I. (1990). Placental steroids hormone. *Clin Endocrinol Metab.* 4, 249,272.
91. Petraglia, F., Calza, L., Garuti, G.C. (1990) New aspects of placental endocrinology. *J. Endocrinol Invest.* 13, 353-371.
92. Kliman, H.J., Nesler, J.E., Sermasi, E. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblast from human term placenta. *Endocrinol.* 118, 1567-1582.
93. Feinberg, R.F., Kao, L.C., Haimowitz, J.E. (1989). Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts: PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts. *Lab Invest.* 60, 20-26.
94. Jara, C.S., Salud, A.T., Bryantgreenwood, G.D. (1984). Immunocytochemical localization of the human growth variant in the human placenta. *J. Clin Endocrinol Metab.* 69, 1069-1072.
95. Moll, U.M., Lane, B.L. (1990) Proteolytic activity of 1st trimester human placenta-localization of interstitial collagenase in villous and extravillous trophoblast. *Histochemistry.* 94,555-560.
96. Maruyama, I., Bell, C.E., Majereus, P.W. (1985). Trombomodulina is found on endothelium arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J. Cell. Biol.* 101, 363-371
97. Ohtani, H., Maruyama, Y., Yonezawa, S. (1989). Ultrastructural immunolocalization of thrombomodulin in human placenta with microwave fixation. *Act, Hist, Cyto.* 22, 393-393.
98. Feinman, M.A., Liman, H.J., Catalbiano, S. (1986). 8-Br-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 63, 1211-1217.
99. Ringler, G.E., Kao, L.C., Miller, W.L. (1989). Effects of 8-bromo- cAMP on expression of endocrine functions by cultured human trophoblast cells. Regulation of specific mRNAs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61, 13-21.
100. Ulloa, A.A., August, A.M., Golos, T.G. (1987). 8-Br-3',5'-adenosine monophosphate regulates expression of chorionic gonadotropin and fibronectin in human cytotrophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 1002-1009.

101. Maruo, T., Matsuo, H., Oishi, T. (1987). Induction of differentiated trophoblast function by epidermal growth factor receptor levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 744-750.
102. Shi, Q.J., Lei, Z.M., Rao, C.V.(1990). Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblast. *Endocrinol.* 132,1387-1395.
103. Feinberg, R.F., Kliman, H.J.,Lockwood, C.J.(1991).Oncofetal fibronectina: A trophoblast "glue " for human implantation?.*Am. J. Path.* 138, 537-543.
104. Feinberg, R.F., Kliman, H.J.(1993). Human trophoblast and tropho-uteronectin (TUN):A model for studying early implantation events. *Assisted Reprod. Rev.* 3, 19-25.
105. Feinberg, R.F., Kliman, H.J., Wang, C.L.(1994). Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) stimulates tropho-uteronectin (TUN) synthesis in vitro: Implications for trophoblast implantation in vivo. *J. Clin. Endoc. Metab.* 78,1241-1248.
106. Nechtigall, M.J., Kliman, H.J., Feinberg, R.F. (1994). Potential role of leukemia inhibitory factor (LIF) in human implantation. *Soc Gyn Invest.* 41, 96.
107. Lisiak, J.J., Mc Crae, K.R., Lala, P.K. (1992). Localization of human extravillous trophoblast cells by attachment to laminin- coated magnetic beads. *Placenta.* 10, 407-415.
108. Stewart, C.L.. A cytokine regulation embryo implantation. *NY Acad. Sci.*
109. Pinenborg, R. (1990). Trophoblast invasion and placentation in the human- morphological aspects. *Troph. Res.* 4, 33-47.
110. Fisher, S.J., Cui, T.Y., Zhang, L.(1989).Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J Cell Biol.* 109,891-902.
111. Milwidsky, A., Finci, Y.Z., Yagel, S. Gonadotropin - mediated inhibition of proteolytic enzymes produced by human trophoblast in culture. *J. Clin. Endoc Metab.* 76, 1101-1105.
112. Queenan, J.T ,Kao, L. C., Arboleda, C.E.(1987) Regulation of urokinase-type Plasminogen activator production by cultured human cytotrophoblasts. *J. Biol. Chem.* 262, 10903-10906.
113. Olsson, R., Larsson, E., Nilsson, O.(1989). Blastocyst implantation precedes induction of insulin-like factor II gene expression in human trophoblast. *Development.* 106,555-559.

114. Kato, Y., Braunstein, G.D.(1990) Purified first and third trimester placental trophoblast differ in vitro hormones secretion. *J. Clin. Endoc. Metab.* 68, 814-820.
115. Belisle, S., Petit, A., Bellabarba, D. (1986).  $Ca^{2+}$ , but not membrane lipid hydrolysis, mediates human chorionic gonadotropin production by luteinizing hormone releasing hormone in human term placenta. *J. Clin. Endoc. Metab.* 69,117-121.
116. Szilagy, A., Benz, R., Rossmannith, W.G.( 1992). The human first-term placenta in vitro: Regulation of hCG secretion by GnRH and its antagonist. *Gynecol. Endocrinol.* 6, 293-300.
117. Oike, N., Iwashita, M., Muraki, T: (1990):Effect of adrenergic agonists on human chorionic gonadotropin release by human trophoblast cells obtained from 1st-trimester placenta. *Horm. Metab, Res* 22,188-191.
118. Ringler, G.E., Kallen, C:B., Strauss, J.F.(1989): Regulation of human trophoblast function by glucocorticoids:Dexamethasone promotes increased secretion of chorionic gonadotropin. *Endocrinol* 124,1625-1631.
119. Petraglia, F., Angioni, S., Coukos, G:(1990). Neuroendocrine mechanisms regulating placental hormone production. *Contirb Gynecol Obstet* 18,147-156.
120. Petraglia, F., Swchenko, P., Lim, A.T.(1987).Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta. *Scienci.* 237,187-189.
121. Petraglia, F., Vaugham, J., Vale, W.( 1989). Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86, 5114-5157.
122. Maruo, T., Matsuo, H., Mochizuki, M. (1991): Thyroid hormone as a biological amplifier of differentiated trophoblast function in early pregnancy. *Acta Endocriol* 125, 58-66.
123. Beckman. M.W., Wurfel, W., Austin, R.J.(1992). Suppression of human chorionic gonadotropin in the human placenta at term by human by human thyroid-stimulating hormone in vitro. *Gynecol Obst Invest.* 34, 164-170.
124. Yogel, S., Lala, P.K., Powell, W.A.(1989).Interleukin-1 stimulates human chorionicgonadotropin secretion by first trimester human trophoblast. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 68, 992,995.
125. Nashino, E., Matzuzaki, N., Masuhiro, K.(1990) Trophoblast- derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release

- though IL-6 receptor on human trophoblasts. *J. Clin Endocrinol Metab.* 71,436-441.
126. Truman, P., Ford,H.C.(1986). The effect of substrate and epidermal growth factor on human placental trophoblast cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 22,525-528.
  127. Ren, S.C.Braunstein, G.D. (1991). Decidua produces a protein that inhibits chorio-gonadotropin release from human trophoblast. *J. Clin Inves.* 12,105-119.
  128. Yuen, B.H., Moon, Y.S., Shin, D.H.(1986), Inhibition of human chorionic gonadotropin production by prolactin form term human trophoblast. *Am J Obstet Gynecol.* 154, 336-340.
  129. Petra, P.H; and Lewis, J. (1980). Modification in depurification of sex esteroid - binding protein of human serum by affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 105, 165-169.
  130. Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S. (1963) The preparation of <sup>131</sup>I label human growth of high specific radioactivity. *Biochem J.* 89, 114-118.
  131. Sufi, S.B., Donaldson, A., Jeffcoate, S.L.(1996). World health Organization Special Program of Research Development and Research Training in Human Reproduction. Program for the provision of matched reagents for radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology. Method Manual, Tenth Edition, WHO, Geneva Switzerland.
  132. Knecht, M., Katz, M.S., and Catt, K.J. (1981). Gonadotropin-releasing hormone inhibits cyclic nucleotide accumulation in cultured granulosa cells.*J.Biol. Chem.* 125, 34-36.
  133. Lowry, O.H., Rosenbrougn, N.J., Farrm A.L., and Randall, R.J.(1951).Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193, 265-275.
  134. Caputo, M.J., and Hosty, T.A. (1972). The presence of sex binding globulin in amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 113, 804-811.
  135. Wenn, R.V., Kamberi, I.A., Vossough, P., Kariminejad, M.H., Yorabe, E., Ayoughi, F., Keyvanoajah, M., and Sarebe, N. (1977). Human testosterone-estradiol binding in health and disease. *Acta. Endocr.* 84, 850-859.
  136. Larrea, F., Diaz, L., Cariño, C., Larriva-Shad., Carillo, L., Orozco, H., and Ulloa, Aguirre, A. (1993). Evidence that human placenta is a site of sex hormone-binding globulin gene expression. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 46. 497-507.

137. Younes, M.A., Besch, N.F., and Besch, P.K.(1981). Estradiol and Progesterone binding in human placenta cytosol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141, 170-176.
138. Mercier- Bodard, C., Marchaut, M., Perrot, M., Picard, M.T., Baulieu, E.-E., and Robel, P.(1976). Influence of purified plasma proteins on testosterone uptake and metabolism by normal an hyperplastic human prostate inconstant-flow organ culture. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 43, 374-386.
139. Porto, C.S., Lazar, M.F., Lygia, C., Abreu, C., Bardin, C.W., and Gunsalus, G.L. (1995). Receptors for androgen binding protein: Internalization and intracellular signaling. *J. Sterokd. Biochem. Molec. Biol.* 53, 561-565.
140. Siler-Khodr, T.M., and Khodr, G.S.( 1897). Dose response analysis of Gn-RH stimulation of hGC release from human term placenta. *Science.* 237, 187-189.
141. Mercire-Bodard, C., and Bolieu, E.-E. (1994). Human sex steroid binding protein (SBP) transcription in brain and target organs for steroid hormones IX International Congress of Hormonal Steroid. Sep 24-29 Dalla, Texas. Abst B 179.
142. Aplin, J.D., Charlton, A.K., Ayad, S: (1988). An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy.*Cell Tissue Res.* 253, 231-240.
143. Aplin, J.D. (1991). Implantation, trophoblast differentiation and hemochorial lplacentation: Mechanism evidence in vivo and in vitro. *J. Cell Sci.* 99, 681-692.
144. Glasser, S.R., Clark, J.;H. (1975). A determinanat role for progesterone in the development of uterine sinitivity to decidualization and ovoimplantation. *In Market,C Papaconstantinou J. (eds): The development Biology of Reproduction.* New York, Academic Press,p 311.
145. Psychoyos, A. (1973). Endocrine control of egg implantation. *In Greep RO, Astwood EB, (eds): Handbook of Physiology, vol 2,section 7.* Wasintog, DC, Americn Physiological Society, p 187.
146. Weitlauf, H.M.(1988). Biology of Implantation. *In Knobil E, Neill J, (eds): Physiology of reproduction.* New York, Raven Press, pp 231-262.