

Receptorul și rolurile gonadotropinei corionice umane în sarcină

Human chorionic gonadotropine receptor and its roles in pregnancy

Roxana Bohilțea¹,
Monica Cirstoiu¹,
Cringu Ionescu²,
Viorica Rădoi³,
Robert Botea¹,
Simona Vlădăreanu⁴

1. UMF „Carol Davila”
București,
Departamentul
de Obstetrică-Ginecologie,
Spitalul Universitar
de Urgență București
2. UMF „Carol Davila”
București,
Clinica
Obstetrică-Ginecologie,
Spitalul Clinic de Urgență
„Sf. Pantelimon”, București
3. UMF „Carol Davila”
București,
Departamentul
de Genetică Medicală
4. UMF „Carol Davila”
București,
Departamentul
de Neonatologie,
Spitalul Universitar
de Urgență Elias,
București

Correspondență:
Dr. Roxana Bohilțea
e-mail: r.bohiltea@
yahoo.com

Abstract

Receptors for human chorionic gonadotropin (hCG) are found in the gonads expressed by the theca cells, interstitial cells, differentiated granulosa and luteal cells, in the endometrial epithelium, myometrium and tubal mucosa, in the breast tissue, in the endothelium and smooth muscle of the uterine artery, in the cervix, thyroid, retina and skin tissue, on lymphocytes, macrophages, neuroendocrine cells, Leydig cells, seminal vesicles and prostate cells, and are present in a series of fetal vital organs. In pregnancy, human chorionic gonadotropin, a glycoprotein which has almost the same structure as the pituitary luteinizing hormone (LH), is one of the earliest products of the cells forming the embryo and can be considered one of the first signals elaborated by the embryo; it is involved in maintaining the corpus luteum, in implantation process, in immunomodulation, placental morphogenesis and function, as well as fetal growth and differentiation. Initially, immature trophoblast cells secrete β -hCG units, than in later pregnancy, complete $\alpha\beta$ hCG is secreted by the trophoblast cells of vSTB phenotype, hCG secretion having a predictable pattern during a successful pregnancy. The hormone is an ideal marker in the diagnosis and monitoring of early intrauterine pregnancy and ectopic pregnancy, gestational trophoblastic disease, fetal aneuploidy, and placental dysfunction.

Keywords: human chorionic gonadotropin (hCG), LH/hCG receptor, aneuploidies, trophoblastic disease, ectopic pregnancy

Rezumat

Receptorii pentru gonadotropina corionică umană (hCG) se găsesc la nivelul gonadelor exprimate pe celulele tecale, interstițiale, granuloase diferențiate și luteale, la nivelul epiteliului endometrial, miometrului, mucoasei tubare, țesutului mamar, în endoteliul și tunica musculară netedă a arterelor uterine, la nivelul cervixului, tiroidei, retinei, țesutului cutanat, limfocitelor, macrofagelor, celulelor neuroendocrine, celulelor Leydig, veziculelor seminale, prostatei, precum și într-o serie de organe vitale fetale. În sarcină, gonadotropina corionică umană, glicoproteina cu structură foarte asemănătoare cu cea a hormonului luteinizant hipofizar (LH), este unul dintre cei mai timpurii produși de secreție ai celulelor embrionare și poate fi considerat unul dintre primele semnale elaborate de embrionul în formare; hCG are rol în menținerea corpului luteal, în implantare, imunomodulare, morfogenază și funcția placentară, precum și în creșterea și diferențierea fetală. Inițial, celulele trofoblastice imature elaborează și secretă subunități β ale hCG, iar mai târziu în sarcină, forma completă $\alpha\beta$ hCG este produsă de celulele trofoblastice mature cu fenotip vSTB, secreția având o evoluție predictibilă în sarcina care se dezvoltă normal. Hormonul reprezintă un marker ideal în diagnosticul și monitorizarea sarcinii incipiente intrauterine și a sarcinii ectopice, a bolii trofoblastice gestaționale, a aneuploidiilor fetale și a disfuncției placentare.

Cuvinte-cheie: gonadotropina corionică umană, receptor LH/hCG, aneuploidii, boala trofoblastică gestațională, sarcină ectopică

Reproducerea, în ansamblul fenomenelor ei, nu poate avea loc în afara interacțiunii adecvate gonadotropină corionică - receptor, fapt ce condiționează în esență supraviețuirea speciei.

Susținerea acestei afirmații se bazează pe revizuirea studiilor privind structura biochimică a gonadotropinei corionice, etapele de biosinteză și reglare a secreției hormonale, dinamica ei în sarcină, modul său de acțiune la nivel de receptor, funcțiile încă incomplet elucidate și aspectele recente legate de utilizarea diagnostică și terapeutică a hormonului.

Structura biochimică, biosinteza și reglarea secreției hCG-ului

Gonadotropina corionică umană (hCG) este un hormon glicoproteic heterodimeric a cărui subunitate α este comună hormonilor foliculostimulant (FSH), luteinizant (LH) și tireotrop (TSH), având 18kd, conținând 92 aminoacizi și fiind codificată de o genă de pe cromozomul 6q21.1-23; subunitatea β , având 30kd și 145 aminoacizi, este codificată de 8 gene aflate pe cromozomul 19 (locusul 19q13.3), fiind specifică hCG-ului. Legarea noncovalentă a subunităților se

realizează anterior eliberării în circulație a moleculei (figura 1).

Conținutul glucidic nu are rol esențial, intervenind în cuplarea hormonului la sistemul efector intracelular al celulei-țintă și în prelungirea duratei de acțiune (24 de ore pentru hCG vs. 2 ore pentru LH) datorită acidului sialic conținut. Un conținut crescut de carbohidrați atașat aceleiași secvențe peptidice caracterizează molecula de „hCG hiperglicozilat” secretat abundent în perioada implantării, în trisomia 21 în care deficiența în acid sialic a acestei molecule pare a fi patognomonică și în afecțiuni maligne⁽¹⁾. Sinteza celor două subunități, α și β , se face separat, formarea moleculei complete aflându-se sub controlul limitării ratei de sinteză a subunității β ; raportul α/β este 1/1 la 9-10 săptămâni de gestație și 10/1 în apropierea termenului. Sincițiotrofoblastul imatur produce subunități β , precedând cu câteva zile sinteza lanțurilor α de către citotrofoblast. Forma hiperglicozilată a hormonului este produsă după un pattern secretor specific, în momentul implantării, exclusiv de către citotrofoblastul invaziv, nediferențiat. La nivelul trofoblastului matur cu fenotip vSTB, molecula hCG este sintetizată în primul rând de către sincițiotrofoblast și doar ocazional de către citotrofoblastul extravilozitar. Limfocitele femeilor gravide secretă în cultură hCG, fenomen ce se poate transmite prin ser la limfocitele femeilor negravidă. De asemenea, niveluri hormonale serice reduse au fost depistate sporadic la femei în afara sarcinii și în anumite tumori benigne sau maligne la sexul masculin.

În serul matern există 5 tipuri de molecule derivate hCG, molecula integră hCG reprezentând hormonul activ, fragmente ale moleculei heterodimerice de hCG, subunități libere α , β și fragmente ale free β hCG; subunitățile free β hCG pot proveni din 3 surse: producția directă a celulelor trofoblastice, disocierea moleculei de hCG și fragmentarea enzimatică a acestei molecule de către macrofage sau neutrofile. Concentrația serică maternă a free β hCG reprezintă doar 0,3-4% din concentrația totală a β hCG⁽²⁾.

În sarcină, sinteza și secreția hCG-ului sunt reglate prin interacțiuni complexe ce au loc între steroizii sexuali, citokine, GnRH și factorii de creștere; GnRh este printre

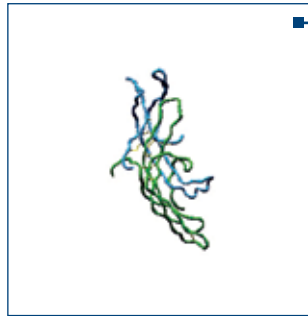


Figura 1. Structura spațială heterodimerică a hCG-ului: subunitatea α (albastră), subunitatea β (verde)

primii reglatori ai secreției de hCG pe care o stimulează pe tot parcursul sarcinii. Experimentele *in vitro* au demonstrat că există o autoreglare directă a hCG-ului prin intermediul AMPc între transcripția genetică a hormonului și regiunea relatorie a genomului. Hormonii de stres stimulează în cultura trofoblastică secreția de hCG prin mărirea amplitudinii pulsațiilor de 2-10 ori. Activina, proteină placentară cu două subunități β , crește eliberarea de hCG și progesteron, efect antagonizat de folistatină. Epidermal growth factor (EGF) are ca efect inducerea diferențierii morfologice a trofoblastului, cu creșterea formării sincițiotrofoblastului și secundar stimularea secreției de hCG⁽³⁾, dar EGF stimulează de asemenea secreția de inhibină a celulelor placentare cu efecte supresoare pe stimularea indusă de GnRH a secreției de hCG, mecanism sugestiv pentru complexitatea reglării funcțiilor placentare (figura 2a).

La nivelul vilozităților crampon s-a identificat recent o fibronectină specifică - trophouteronectina - implicată în reglarea secreției de hCG sub influența β TGF (Transforming Growth Factor) și a LIF (Leukemia Inhibitor Factor). Prolactina frânează pulsativitatea secreției hCG. Inhibina A este o glicoproteină aparținând familiei TGF- β , care inhibă exclusiv în gestație eliberarea de hCG, fără efecte în primul trimestru. Similar acțiunii opiaceelor la nivel hipotalamic, endorfinele exercită o influență majoră inhibitorie a secreției de hCG. Proteinele deciduale - Progesterone Associated Endometrial Protein, IGFBP-1, IL1, Colony-stimulating Factor 1 - contribuie, de asemenea,

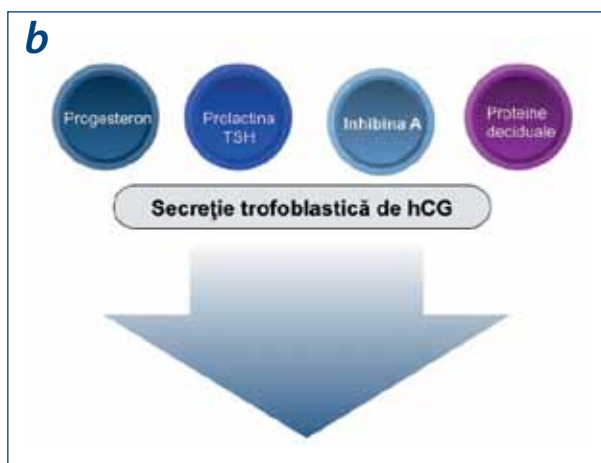
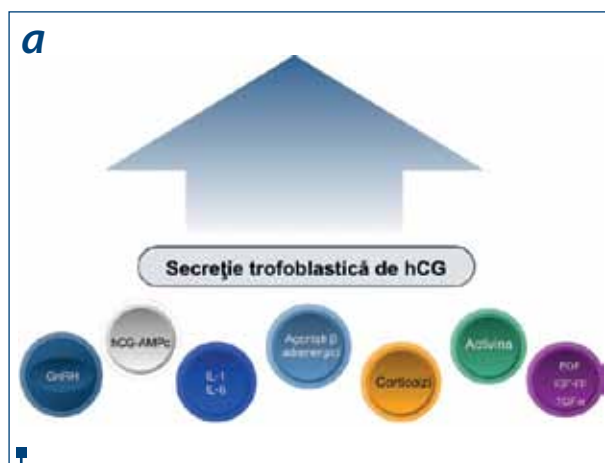


Figura 2 a și b. Reglarea secreției de hCG - factori stimulatori și factori inhibitori

la scăderea secreției trofoblastice de hCG în trimestrul al III-lea (figura 2b).

Dinamica hCG-ului în sarcină

Gonadotropina corionică este considerată în prezent unul dintre primele semnale embrionare, emise chiar anterior implantării, în ciclurile IVF detectându-se prezența ARN mesager pentru β hCG încă din stadiul de 8 celule.

După implantare, hCG crește exponențial, atingând un maxim de 100 000 UI/l în săptămânile 9-10 de gestație (zilele 60-90), urmează o perioadă de platou în săptămânile 11-12, apoi are loc scăderea nivelurilor până la naștere (figura 3a).

Blastocistul uman secretă hCG în mediu de cultură la 5-8 zile după fertilizare. β hCG este detectabil în sângele matern periferic la o săptămână după concepție și nivelurile lui se dublează la 1,4-1,6 zile până în ziua 35 de sarcină, apoi se dublează la 2-2,7 zile între zilele 35-42. hCG este detectat a opta zi în 5% dintre ciclurile ovulatorii fertilizate, a noua zi în 16%, a zecea zi în 53%, iar a 11-a zi după pick-ul de LH preovulator în 100% din cazuri⁽⁴⁾. Astfel, dublarea nivelurilor hCG la 48 de ore semnifică în primul trimestru prezența unei sarcini viabile, normale, intrauterine.

Aproximativ 20% din gonadotropina corionică serică se elimină urinar; concentrația de hCG în urină urmează o curbă aproximativ paralelă cu cea plasmatică, valorile de 1 UI/ml la 6 săptămâni crescând la 100 UI/ml între 60 și 80 de zile de sarcină. Curba concentrației în sângele fetal este similară cu cea maternă, valorile absolute reprezentând 3% din cele materne.

La două săptămâni după naștere și la 4 săptămâni după abort, nivelurile hCG devin nedozabile (figura 3b).

Receptorul pentru hCG și mecanismul său de acțiune

Receptorul comun hCG/LHR este o glicoproteină cu masă moleculară de aproximativ 85-95 kDa, apare prin maturarea și transportul unei forme precursorare diferite conformațional, localizată la nivelul reticulului endoplasmic; rata maturării și turn-overul nu au fost încă studiate în detaliu la specia umană.

Clonat de peste 20 de ani, receptorul hCG/LHR aparține superfamiliei receptorilor care cuplează proteina G la 7 helixuri transmembranare, structura și topologia justificând afilierea la subfamilia receptorilor rodopsin/ β 2 adrenergici⁽⁵⁾. Cele 340 de reziduuri extramembranare N terminale reprezintă principalul domeniu de legare a hormonilor specifici. Helixurile transmembranare sunt legate prin câte 3 punți hidrofile extra- și intracelulare și prezintă un potențial și controversat situs de legare secundar cu afinitate redusă. Capătul carboxi-terminal al celei de-a treia bucle intracitoplasmice în contextul rearanjamentelor spațiale ale domeniului serpentină este principalul responsabil de activarea sistemului transductor al semnalului extern. Zone ale domeniului intracelular sunt implicate în cuplarea proteinei G și în desensibilizare prin fosforilare⁽⁶⁾ (figura 4).

Receptorul este codificat de o singură genă, formată din 10 introni și 11 exoni, localizată pe brațul scurt al cromozomului 2 (2p21)⁽⁷⁾. Dacă mutațiile afectând restrictiv regiunea serpentină intramembranară au ca efect amplificarea funcțiilor receptoare sau activarea receptorului în absența stimulării de către agonist, mutații naturale inactivatoare cu localizare heterogenă pot fi urmate de pierderea afinității pentru hCG, absența transmiterii semnalului sau scăderea expresiei receptorilor prin alterarea proceselor de maturare și transport al precursorilor. Polimorfismul exonilor 1 și 10 pare să nu modifice proprietățile funcționale ale receptorului (figura 5).

Fenotipic, mutațiile inactivatoare ale receptorului hCG/LHR determină infertilitate a ambelor sexe. Femeile prezintă insuficiență ovariană prematură manifestată prin amenoree primară sau secundară, niveluri crescute ale LH și scăzute ale estrogenilor în faza luteală, foliculogeneza neatingând stadiul antral^(8,9). La sexul masculin, datorită imposibilității celulelor Leydig de a răspunde stimulului gonadotrop corionic necesar diferențierii organelor sexuale masculine externe, afectarea în grade variate prin mutații a receptorului se manifestă prin infertilitate, însoțită de micropenis, cu sau fără hipospadias, până la pseudohermafroditism^(10,11,12).

Extodomeniul receptorului prezintă situsurile de legare pentru hormonii specifici, fiind responsabil de recunoașterea și înalta afinitate a receptorului pentru acești liganzi⁽¹³⁾.

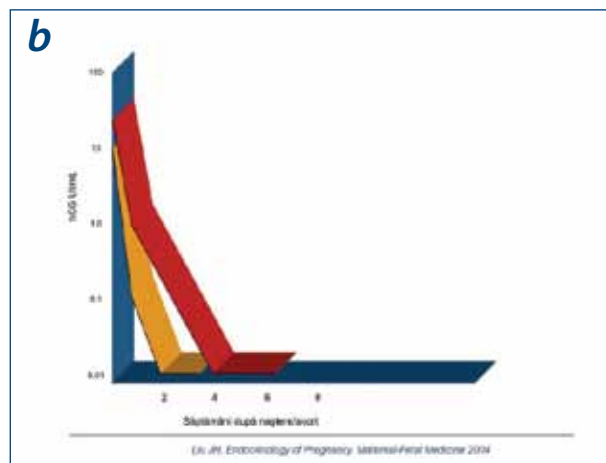
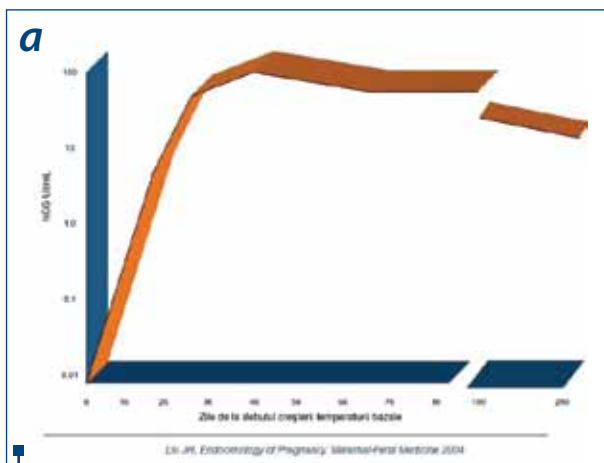


Figura 3 a și b. Dinamica hCG în sarcină, post-partum și post-abortum

Pacienta ta îi poate da copilului mai mult decât ochii ei frumoși.

Un studiu recent arată că până la 75% din sănătatea copilului de-a lungul vieții este influențată de epigenetică - interacțiunea dintre gene și stilul de viață matern.^{1,2}

Recomandă o combinație adaptată pentru a asigura necesarul optim de nutrienți de la planificarea sarcinii până la sfârșitul perioadei de alăptare.³

- Femibion Sarcină Sănătoasă 1 cu 416 μ g Metafolin® pentru asigurarea optimă a rezervelor de foliați, fără metabolizare prealabilă.⁴
- Femibion Sarcină Sănătoasă 2 cu 400 μ g foliați pentru a asigura diviziunea celulară și creșterea tisulară și 200 mg DHA pentru dezvoltarea cerebrală și a acuității vizuale⁵ a copilului din săptămâna 13.

femibion

Mai mult decât dragoste pentru noua viață.



Acest material este dedicat profesioniștilor din domeniul sănătății.

1. Tab AD, et al. Genome Res 2014;24(7):1064-1074. 2. Aproximativ 75% din sănătatea copilului pe parcursul vieții este determinată exclusiv de genetica și până la 75% poate fi influențată de interacțiunea stilului de viață matern cu genele tatălui. Stilul de viață include: nutriția, greutatea normală a mamei și copilului, exortarea fizică și fumatul. 3. Cu suplimentul la alimentația echilibrată și un stil de viață sănătos. 4. Raportul suplimentelor de vitamine pentru prevenirea deficienței de foliați, în nivel scăzut al foliaților materni reprezintă un factor de risc important pentru apariția defectelor de tub neural (DTN). De aceea se recomandă să ai scopul suplimentelor de 400 μ g/zi. 5. Nivelul de acuitate vizuală este de 400 μ g/zi. În afara de nivelul de foliați materni, există și factori ereditari care determină creșterea riscului de apariție a DTN. 6. Raportul evaluării suplimentelor de DHA, contribuția la dezvoltarea normală a creierului și a ochilor fetalului și copilului alimentat la sân. Efectul benefic este obținut de un aport zilnic de 200 mg DHA, suplimentul Feja și Joca alinați recomandată pentru adulți de 300 mg este: greef omega - 3 DHA și EPA. 8. IMS Data, MAT 12/2014. Evidența

Dr. Reddy's Laboratories România S.R.L.

Btr. Nicolae Caramfil nr. 71-73, etaj 5, spațiul 10, sector 1, București.

Tel./Fax: 021-224.00.32; e-mail:office@drreddys.ro; www.drreddys.ro; www.drreddys.com



Figura 4. Structura receptorului hCG/LHR - GPCR rodopsin/β2 adrenergic



Figura 5. Efectul mutațiilor genei hCG/LHR

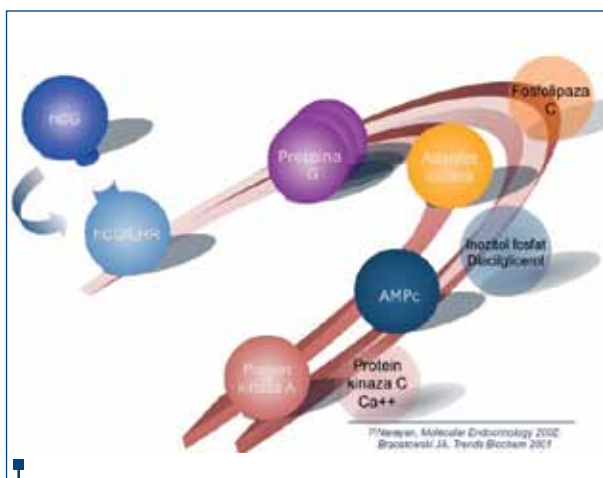


Figura 6. Căile de transmitere intracelulară a semnalului generat de activarea receptorului hCG/LHR

Probabil cea mai cunoscută caracteristică a domeniului extramembranar o reprezintă LRR (leucine rich repeat), secvență repetitivă de aminoacizi bogată în leucină, măsurând aproximativ 25 de reziduuri, situată între cele două capete N și C terminale bogate în cisteină. Rolul funcțional al glicozilării celor 6 situsuri potențial prezente la nivel extramembranar nu este încă elucidat, dar acest proces nu pare să altereze afinitatea și specificitatea legării sau transmiterea semnalului prin membrană; legarea carbohidraților poate însă facilita legarea calnexinei de molecula imatură, în vederea conversiei. Regiunea N terminală, bogată în cisteină în principal, dar și secvențele repetitive 1-7, codificate de exonii 1-7, sunt esențiale pentru afinitatea legării hCG. În schimb, deleția exonului 10 face imposibilă legarea LH, fără a afecta afinitatea receptorului pentru hCG.

Cercetările desfășurate până în prezent în ceea ce privește activarea receptorului hCG/LHR de către hormon au condus la elaborarea a 3 modele⁽⁶⁾:

- primul model presupune legarea hormonului de domeniul extracelular, urmată de interacțiunea și activarea regiunii serpentină de către hormon;
- al doilea model sugerează activarea regiunii serpentină transmembranară de către domeniul extracelular care a recunoscut și a legat anterior hormonul;
- cel de-al treilea model susține rolul domeniului extracelular de menținere inactivă a regiunii serpentină, interacțiune relaxată de atașarea hormonului la domeniul extramembranar.

Ambele subunități ale hCG interacționează cu ectodomeniul receptor prin intermediul a 4 domenii peptidice diferite, ceea ce asigură o înaltă afinitate a legării, superioară LH-ului. Narayan a demonstrat în anul 2002 faptul că formele monomerică nu pot fi agoniști funcționali ai receptorului⁽¹⁴⁾.

hCG este recunoscut și activează, de asemenea, receptorii TSHR și FSHR, fără a împiedica legarea hormonilor specifici de aceștia. Efectul hCG-ului asupra TSHR este argumentat de hipertiroidismul gestațional, mutația Lis în poziția 183 cu Arg la nivelul acestui receptor crescându-i afinitatea pentru hCG. Funcția de cuplare o deține proteina G, activatoare a adenilat ciclazei, care va genera ca răspuns la semnalul extern AMPc, mesager secund intracelular cu rol de activare a proteinkinazei A.

Deși este clar faptul că efectele mediate de LHR asupra celulelor Leydig și granuloase sunt transmise aproape exclusiv pe această cale, se consideră în prezent că există și alte căi de transmitere a semnalului, implicate în proliferarea și diferențierea celulelor ce exprimă receptori hCG/LHR. Astfel, la concentrații mari ale hCG-ului și ale receptorului său, formarea de complexe pare să activeze mai multe subfamilii de proteine G heterotrimerice care pot transmite semnalul și pe calea fosfolipazei C (β2), cu acumulare consecutivă intracelulară de inozitol fosfat și/ sau diacilglicerol și calciu. Această cale pare a fi accesată în principal în sarcină și în pick-ul preovulator al LH. De asemenea, studii recente indică utilizarea căii inozitol fosfatului în cazul mutațiilor ce determină câștigare de funcții receptoare. Bazele moleculare și consecințele activării acestei căi nu au fost încă explorate^(14,15) (figura 6).

În reglarea transcripției receptorului, rolul esențial îl joacă regiunea promotor a genei, care prezintă 3 situsuri Sp1 a căror activare concomitentă are un rol critic asupra nivelului bazal al transcripției genei LHR *via* AMPc. SAS situat în vecinătatea Sp1c crește, de asemenea, transcriptul ARNm pe aceeași cale. În plus, o serie de receptori nucleari au fost recent implicați în reglarea transcripției bazale a receptorului.

Pick-ul preovulator al LH are efect de downregulation a LHR, însoțind scăderea ARNm prin creșterea degradării acestuia; LH receptor binding protein 1 reglează stabilitatea transcriptului ARN. În timpul creșterii și diferențierii celulelor granuloase ale foliculilor în dezvoltare, crește activitatea de legare a LHR dependentă de estrogeni și FSH, creșterea ARNm fiind mediată *via* AMPc. Interesant este faptul că, deși concentrațiile crescute de hCG au același efect de downregulation, scăderea ARN-ului mesager transcript al genei mediată AMPc este nesemnificativă. Astfel, se explică răspunsul prezent al corpului luteal în condițiile scăderii numărului de receptori, determinată de creșterea bruscă a nivelurilor hCG în sarcina incipientă.

Desensibilizarea este o componentă importantă a reglării acțiunii hormonale, realizată în principal prin 4 mecanisme: scăderea activității sau a nivelurilor de 17 α -hidroxilază/17,20-liază, scăderea colesterolului disponibil steroidogenezei, scăderea interacțiunii și activării LHR-proteine G și downregulation posttranscripțional. Afectarea cuplării receptorului cu sistemul efector intracelular și down-reglarea posttranscripțională sunt urmarea fosforilării receptorului (catalizată de o familie de serin/treonin kinaze - GRKs) care crește afinitatea acestuia pentru β arestinele 1 și 2 cu care formează un complex; mai mult decât fosforilarea, formării complexului îi este necesară activarea receptorului. Astfel, lipsa cuplării proteinei G sau internalizarea receptorului conduce la desensibilizare. Complexele internalizate sunt parțial degradate în lizozomi, parțial reciclate⁽⁶⁾.

Funcțiile hCG-ului în sarcină

Studiul receptorilor a dovedit în ultimii ani că efectul endocrin de reglare a steroidogenezei ovariene și testiculare este completat de efecte paracrine prin care hCG influențează comportamentul unui număr important de țesuturi ce exprimă receptori hCG/LHR. Densitatea exprimării receptorilor de către diferitele țesuturi constituie principalul mecanism de modulare a acțiunii hCG. Studii bazate pe detectarea ARNm transcript al LHR, utilizarea de anticorpi sau de hCG marcat au relevat prezența gonadală a receptorilor la nivelul celulelor tecale, interstițiale, granuloase diferențiate și luteale; Rao și colaboratorii⁽¹⁶⁾ susțin prin numeroase cercetări existența receptorilor extragonadali la nivelul epiteliului endometrial, miometrului, mucoasei tubare, țesutului mamar în perioada de alăptare și în cadrul unor leziuni benigne sau maligne.

Reshef et al. constatau în 1990 efectul paracrin reglator pe care hCG-ul secretat de către epiteliul glandular endometrial îl are asupra ciclului endometrial normal⁽¹⁷⁾; opt ani mai târziu, Wolkersdorfer demonstrează imunohistochimic, prin hibridizare *in situ*, culturi celulare și analize enzimatice, precum și prin electroforeză și imunoblotting,

abilitatea celulelor epiteliale, dar și stromale de sinteză a β CG pe parcursul fazei secretorii, cu rol esențial în atașarea, creșterea și stabilirea toleranței imunologice în cadrul complexelor relații ale unității feto-placentare, rămânând încă neclarificate modalitatea de reglare și funcția pe care β CG o are în fiziologia și fiziopatologia endometrială⁽¹⁸⁾.

Receptorii pentru hCG prezenți în endoteliul și tunica musculară netedă a arterelor uterine devin mult mai abundenți la nivelul arterelor mici intramiometriale, având un rol esențial în reglarea rezistenței vasculare uteroplacentare.

La nivel cervical, epiteliul scuamos stratificat exocervical, epiteliul columnar, glandele, vasele și fibrele musculare netede ale endocervixului conțin receptori pentru hCG care ar putea regla funcționalitatea cervicală în sarcină⁽¹⁹⁾.

Tiroida, retina și țesutul cutanat sunt organe receptoare pentru hCG/LH. hCG pare, de asemenea, să intervină în reglarea funcțiilor macrofagice⁽²⁰⁾ la nivel de deciduă, corp luteal și endometru în faza luteală tardivă. Receptori specifici există și la nivelul limfocitelor V γ 1, o serie de celule neuroendocrine exprimând acest tip de receptori.

Sugestive pentru localizarea extragonadală a receptorilor sunt studiile privind femeile în post-menopauză cu hiperplazie adrenală macronodulară ACTH independentă sau sindrom Cushing, care au dezvoltat acest sindrom în fiecare din sarcinile duse la termen⁽²¹⁾; expresia acestor receptori în cortexul adrenal, devenită manifestă sub nivelurile crescute ale hCG în sarcină și respectiv LH în menopauză, constituie o dovadă indirectă a localizării ectopice a acestor receptori. Mai mult decât atât, administrarea de hCG determină creșterea secreției de testosteron, estradiol, dar și de cortizol.

Efectul protector față de dezvoltarea cancerului mamar pe care îl conferă o sarcină obținută la vârstă tânără și menținută până la termen pare a fi datorat, de asemenea, hCG-ului, care manifestă un efect antiproliferativ, dar mai ales antiinvaziv asupra celulelor MCF-7, prin inhibarea activării NF-kB și AP-1, pe calea protein-kinazei A AMPc dependentă⁽²²⁾.

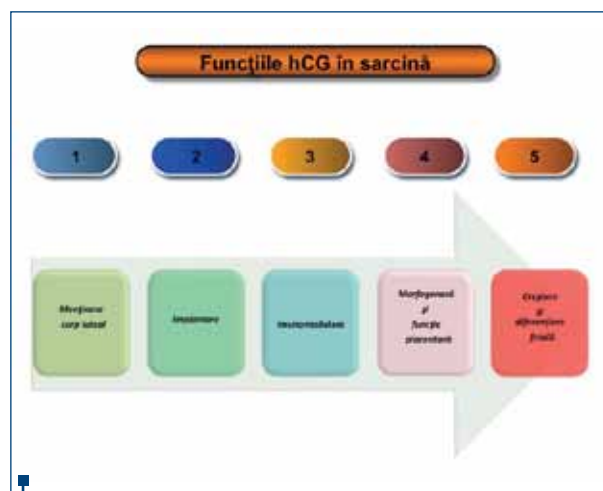


Figura 7. Funcțiile hCG-ului în sarcină

Desigur, toate aceste localizări ridică numeroase întrebări legate de rolul fiziologic al gonadotropinelor și receptorilor hCG/LHR; faptul că mutațiile receptorilor nu implică anomalii decelabile clinic ale acestor sisteme sugerează un rol subtil, încă neelucidat, al acestor receptori în funcționarea lor.

La sexul masculin, receptorii au fost decelați în membrana celulelor Leydig, spermă, vezicule seminale, prostată, tumori benigne și maligne ale acestei glande sau ale altor țesuturi.

hCG este, de asemenea, prezent în circulația fetală, nivelurile reduse fiind derivate din rinichiul fetal, ficatul și hipofiza anterioară, în plus, fătul fiind expus hCG-ului prezent în lichidul amniotic și exocelomic. Stimularea steroidogenezei mediată de receptorii gonadali și adrenalini este cunoscută, dar foarte recent teste de imunocitochimie, Western blott, hibridizare *in situ* și analize genetice moleculare au demonstrat prezența receptorilor hCG/LHR în rinichiul, ficatul, pancreasul, plămânul și intestinul fetal, ceea ce constituie un argument pentru rolul hCG-ului în creșterea și diferențierea țesuturilor fetale⁽²³⁾.

Procesul de adaptare al organismului matern în sarcină se numără printre cele mai remarcabile fenomene naturale. Modificările hormonilor secretați de unitatea fetomaterno-placentară sunt esențiale evoluției și finalității sarcinii (figura 7).

Descoperirea recentă a receptorilor pentru hCG la nivelul uterului și a fenomenului de up-regulation al acestor receptori în fereastra de receptivitate endometrială a condus la explorarea rolului hCG-ului în procesul de implantare. Tot mai evidentă devine în ultimul timp implicarea esențială a hCG-ului în toate etapele dezvoltării placentei, precum și în creșterea și diferențierea fetală. Teoria cel mai larg acceptată privind rolul hCG în sarcină este menținerea în primele 6-8 săptămâni de sarcină a corpului luteal, cu scopul asigurării secreției ovariene continue de progesteron și, posibil, relaxină (hormon peptidic a cărui dinamică este paralelă cu a hCG-ului, având ca efect principal creșterea secreției de prostaciclina miometrială, cu scăderea contractilității), până în momentul preluării acestei funcții de către sincițiotrofoblastul în dezvoltare. O serie de argumente susțin acest concept: administrarea de hCG la femeile negravidă prelungeste cu două săptămâni activitatea corpului galben, în timp ce imunoneutralizarea hCG-ului determină întreruperea precoce a evoluției sarcinii. Culturile placentare au relevat pulsatilitatea secreției de hCG la 18-23 de minute, buna funcționare a corpului galben părând să aibă nevoie de această secreție episodică. hCG, alături de PG și EGF, stimulează producția placentară de inhibină A, care la rândul ei menține, așa cum au dovedit studiile experimentale, sinteza luteală de progesteron și intervine în semnalizarea celulară, stimulând probabil invazia trofoblastică. Steroidogeneza luteală este stimulată de către hCG prin stimularea enzimelor de clivaj ale colesterolului și prin creșterea fixării, internalizării și degradării intracelulare a LDL.

În cadrul etapei de implantare, prin intermediul receptorilor hCG/LHR funcționali identificați la nivelul trofoblastului intermediar, hCG promovează diferențierea

citotrofoblastului în sincițiotrofoblast^(24,25) și modulează sinteza, activarea și inhibiția metaloproteinazelor MMP, enzime proteolitice cu un atom de zinc, secretate de trofoblast, dar și de endometru în procesul de invazie; MMP-9 este exprimată de citotrofoblast, cu rol în degradarea matricei proteice extracelulare; concentrația sa crescută în mediul de cultură embrionar se corelează direct cu succesul transferului în cadrul reproducerii asistate. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) este esențial angiogenezei în endometru periimplanțational. LIF (Leukemia Inhibitor Factor) este o glicoproteină a familiei IL-6, care pe lângă efectul endometrial stimulează diferențierea celulelor trofoblastice în fenotipuri invazive și crește producția de fibronectină a acestor celule, facilitând ancorarea. Insulin-like Growth Factor binding protein se opune invaziei trofoblastice prin legarea IGF-I și II cu blocarea consecutivă a stimulării citotrofoblastului și a creșterii, diferențierii și reglării metabolismului celular local. Glicodelina este o proteină majoră a endometriului secretor, asociată cu imunosupresia și diferențierea epitelială. Antigenul trofoblastului invaziv (ITA) „hCG hiperglicozilat” are un rol independent de cel al hCG-ului, promovând invazia celulară și dovedindu-se a fi un component absolut necesar implantării normale a blastocistului.

Funcția imună în ansamblul ei nu este alterată de sarcină; unele studii afirmă scăderea funcției celulelor T și NK, dar răspunsul matern la administrarea de vaccinuri și reacția de hipersensibilitate întârziată rămân intacte; hCG-ul are acțiune directă de inhibare a proliferării limfocitare, la care se adaugă efectul imunosupresor mediat de progesteron. Macrofagele placentare care exprimă receptori hCG/LHR intervin în prezentarea antigenelor celulelor T, în fagocitoza bacteriană, stimulează creșterea și diferențierea citotrofoblastului, crescând producția de hCG prin producerea de IL-1.

În ceea ce privește morfogeneza și funcția placentară, hCG este un reglator autocrin și paracrin necesar diferențierii sincițiului trofoblastic din citotrofoblastul mononuclear, mediată prin activarea receptorilor hCG/LHR și prin intermediul EGF, TGF α și LIF care cresc producția de hCG; diferențierea consecutivă a citotrofoblastului va induce o creștere suplimentară a concentrației hormonului⁽³⁾. O alternativă a acestui mecanism o constituie activarea directă a proteinkinazei A care șuntează calea hCG, probabil prin activarea genelor responsabile de diferențiere. Formarea deficientă a sincițiotrofoblastului pare a fi implicată în apariția preeclampsiei și a restricției de creștere intrauterină. Cel de-al doilea val de invazie trofoblastică a porțiunii intramiometrice ale arterelor spiralate, necesar creșterii fluxului uteroplacentar în trimestrul al II-lea de sarcină, necesită transformarea trofoblastului din fenotip epitelial în fenotip endotelial. Această pseudovasculogeneză este mediată de hCG prin intermediul VEGF, PIGF și al angiopoietinelor; de asemenea, hCG interferează cu metabolismul eicosanozilor la nivelul peretelui vascular⁽²⁶⁾.

hCG este considerat primul stimul primit de celulele Leydig fetale în vederea producerii nivelurilor crescute de testosteron necesare diferențierii și dezvoltării organelor genitale masculine; fără a fi cunoscute motivele, receptorii

gonadali nu sunt supuși down-reglării, nefiind supuși desensibilizării. Hormonul prin intermediul receptorului său intervine în dezvoltarea și funcția pulmonară, hepatică, renală și pancreatică a fătului.

Rolul diagnostic și terapeutic al hCG-ului

hCG reprezintă un marker ideal pentru diagnosticul și urmărirea evoluției sub tratament a bolii trofoblastice gestaționale; nivelul lui seric este crescut proporțional cu masa de țesut patologic, depășind frecvent 100.000 mUI/ml. Valori înalte ale hCG-ului mergând spre 500.000 mUI/ml pot determina rezultate fals negative ale determinării serice de laborator, fenomen cunoscut drept „hook efect”⁽²⁷⁾. Diagnosticul bolii persistente după evacuarea molei (molă invazivă sau coriocarcinom) se bazează pe stagnarea în platou sau creșterea progresivă a concentrației hormonale. Creșterea titrului consecutivă unei sarcini nonmolare este diagnostică pentru coriocarcinom, în care hCG apare în forma hiperglicozilată în procent crescut de la 4,9%, cât reprezintă în mola hidatiformă completă, la 61-100% din hCG-ul total⁽²⁸⁾. Tumora trofoblastică a situsului placentar, cu origine în citotrofoblastul intermediar, se asociază cu niveluri relativ reduse ale hCG comparativ cu masa tumorală, preponderența fiind forma liberă a subunității β.

Nivelurile scăzute persistente ale hCG-ului sunt deficiente de niveluri ce nu variază cu mai mult decât dublarea valorii într-un interval de 3 luni, situându-se întotdeauna sub pragul de 1000 mUI/mL, în absența unei formațiuni tumorale evidențiable imagic. Cauzele cele mai frecvente sunt sarcina incipientă, boala trofoblastică gestațională și secreția hipofizară în perimenopauză^(29,30), mai rare fiind neoplasmale nontrofoblastice⁽³¹⁾, rezultatele fals pozitive (hCG-fantomă)⁽³²⁾ sau administrarea de hCG. Boala trofoblastică latentă, cu valori hCG sub 212 mUI/mL persistente peste 3 luni în absența unei tumori primare sau metastatice trebuie monitorizată lunar, prin determinare de hCG, în 22% dintre cazuri producându-se reactivarea⁽³³⁾.

Sensibilitatea metodelor actuale face ca dozarea hCG-ului să fie principala metodă de diagnosticare precoce a sarcinii ectopice. Concentrațiile hCG seriate la intervale de 48 de ore sunt inferioare și lipsite de pattern-ul creșterii progresive, caracteristic sarcinii normale, iar chiuretajul uterin e urmat de scăderea concentrației serice cu mai puțin de 15% în 12 ore. Specificitatea free hCG este superioară celorlalte izoforme. De asemenea, nivelul hCG-ului constituie atât un criteriu de selecție a abordării terapeutice conservatoare medicamentoase, cât și o metodă de monitorizare dinamică a resorbției spontane sau evoluției sub tratament. Creșterea sub 66% a nivelurilor de hCG în 48 de ore sau menținerea în platou a concentrațiilor hCG este sugestivă pentru oprirea precoce în evoluție a sarcinii⁽³⁴⁾.

Concentrația hCG-ului sub percentila 10 în trimestrul I de sarcină denotă o disfuncție trofoblastică cu insuficiență placentară ulterioară; în trimestrele II și III, niveluri crescute (2,5MoM) semnifică o creștere de 2-3 ori a riscului. În pre-eclampsie, creșterea hCG-ului în trimestrul al III-lea poate fi consecința invaziei anormale, imaturității placentare

sau răspunsului la hipoxie a trofoblastului; creșterea din trimestrul al II-lea are o acuratețe discutabilă, la un cut-off de 2MoM valoarea predictivă fiind de 30%, similară velocimetriei pe arterele uterine, creșterea fiind mai frecventă la multipare și având semnificația unei forme severe. Nivelul de hCG crescut în trimestrul al II-lea constituie, de asemenea, un factor de prognostic pentru creșterea mortalității perinatale și a riscului de naștere prematură. β hCG peste 50 mUI/ml prezent în secreția cervicovaginală între săptămânile 24 și 28 are semnificația unei creșteri de două ori a riscului de naștere prematură sub 34 de săptămâni.

Hiperemesis gravidarum se asociază frecvent cu niveluri crescute ale hCG-ului în primul trimestru de sarcină⁽³⁵⁾.

Aneuploidiile se caracterizează prin alterarea secreției steroizilor și proteinelor placentare și fetale. Plecându-se de la constatarea lui Merkatz și colab., comunicată în 1987, privind asocierea sarcinilor aneuploide cu niveluri serice scăzute ale α-fetoproteinei, numeroși markeri serici și ecografici, printre care și hCG-ul, au fost utilizați alături de vârsta maternă în scopul detecției sarcinilor cu trisomie 21, 18 sau 13. Concentrațiile trofoblastice crescute de hCG (prin mecanism post-transcripțional, expresia ARNm fiind nemodificată) și ale receptorilor reflectă imaturitatea țesutului trofoblastic ce caracterizează trisomia 21, în timp ce nivelurile scăzute ale hCG (prin blocarea transcripției) asociate supraexpresiei receptorilor în trisomia 18 sunt probabil secundare slabei diferențieri a citotrofoblastului. Asocierea optimă de markeri biochimici și ecografici adăugați riscului bazal determinat de vârsta maternă a fost evaluată în cadrul a două mari trialuri: SURUSS, desfășurat pe 47.000 de paciente din 25 de maternități ale Marii Britanii⁽³⁶⁾, și FASTER, care a analizat 38.000 de screening-uri efectuate în 15 centre ale Statelor Unite⁽³⁷⁾. β hCG-ul a fost coroborat cu proteina plasmatică asociată sarcinii-A (PAPP-A) și măsurarea transluceței nucleice în cadrul testului combinat de trimestrul I, cu α-fetoproteina și estriolul seric neconjugat în cadrul triplului test de trimestrul II, cu adăugarea inhibinei A la markerii de trimestrul II în cadrul cvadruplului test, sau în contextul analizei cumulative a NT, PAPP-A, β hCG, α-fetoproteinei, estriolului, inhibinei A și vârstei materne în cadrul testului integrat. Rezultatele trialurilor au fost similare, relevând o rată de detecție de 85% la o rată minimă de fals pozitiv de 0,8% pentru testul integrat; pentru femeile cu vârsta ≥35 de ani, screeningul combinat de trimestrul I a avut o rată de detecție de 95% cu 22% fals pozitiv, în timp ce testul integrat a detectat 91% dintre cazuri la o rată de 2% a rezultatelor fals pozitive. Nivelurile serice crescute ale β hCG-ului la feții afectați de sindromul Down sunt aproximativ duble comparativ cu sarcinile euploide. Fără a se putea susține cu certitudine superioritatea performanței utilizării free β hCG-ului comparativ cu a β hCG-ului total în cadrul testului combinat, ambele tipuri de molecule își cresc capacitatea de detecție cu avansarea vârstei gestaționale în intervalul 110-13+6 și respectiv 90-13+6 pentru free β hCG^(38,39,40). Antigenul trofoblastului invaziv (ITA) este crescut în trisomia 21, iar absența acidului sialic expune molecula receptorilor hepatici pentru galactoză, explicând eficacitatea scăzută a dozării serice comparativ cu cea urinară a ITA. hCG și β hCG au concentrații scăzute în trisomia 18, a doua aneuploidie ca

frevență diagnostică prin teste biochimice de screening, β hCG utilizat în trimestrul I, alături de PAPP-A depistând 60% din trisomiile 18 la o rată de fals pozitiv de 0,1%, rată la care testul integrat depistează 90% dintre sarcinile efectuate⁽⁴¹⁾.

hCG afectează metabolismul miometrial al prostacilinei și sinteza de eicosanoizi a țesuturilor în timpul gestației, contribuind de asemenea la starea de liniște a miometrului.

hCG este un semnal transductor important în semnalizarea embrio-maternă și joacă un rol important în implantare, fiind, de asemenea, utilizat de mult timp în declanșarea ovulației, forma recombinantă având eficacitate similară celei urinare⁽⁴²⁾.

Prin acțiunea sa la nivelul arterelor uterine, intramio-metriale și endometriale superficiale, scade rezistența și se ameliorează fluxul în circulația uteroplacentară; creș-

terea sintezei eicosanoizilor vasodilatatori și stimularea steroizilor sexuali pot explica deopotrivă acest efect. Administrarea de hCG s-a dovedit a scădea incidența restricției de creștere intrauterină și a nașterii premature, favorizarea angiogenezei ca efect pe termen lung putând explica aceste rezultate.

Carp și colab., într-un review al revistei „Lupus” din 2004, afirmă că progesteronul și β hCG-ul își justifică utilizarea în scopul îmbunătățirii ratei nașterilor la femeile cu avorturi recurente, acționând prin modularea balanței între diferite citokine⁽⁴³⁾.

În concluzie, deși ultimii ani au aprofundat considerabil cunoștințele privind receptorul, funcția și reglarea biosintezei moleculei de hCG, multe aspecte rămân în prezent controversate și tot atât de necunoscute. ■

Bibliografie

1. Valmu L, Alfthan H, Hotakainen K. Site-specific glycan analysis of human chorionic gonadotropin beta-subunit from malignancies and pregnancy by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Glycobiology*. 2006;16(12):1207.
2. Reis FM, D'Antona D, Petraglia F. Predictive value of hormone measurements in maternal and fetal complications of pregnancy. *Endocrine Reviews* 2002; 23(2):230-257.
3. Yang M, Lei ZM, Rao ChV. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 2003; 144(3): 1108-1120.
4. Daya S. Human chorionic gonadotropin increase in normal early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1987;156(2):286.
5. Moyle WR, Campbell RK, Rao SNV et al. Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1999; 270:20020-20031.
6. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL, The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor, A 2002 Perspective. *Endocrine Reviews* 2002; 23(2):141-174.
7. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Atger M et al. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54:77-79.
8. Meehan TP, Harmon BG, Yu KK et al. Gonadal defects and hormonal alterations in transgenic mice expressing a single chain human gonadotropin-lutropin receptor complex. *Journal of Molecular Endocrinology* (2005) 34: 489-503.
9. Toledo S, Brunner H, Kraaij R. et al. An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3850-3854.
10. Gromoll J, Eiholzer U, Nieschlag E. et al. Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:2281-2286.
11. Martens JWM, Verhoef-Post M, Abelin N et al. A homozygous mutation in the luteinizing hormone receptor causes partial Leydig cell hypoplasia: correlation between receptor activity and phenotype. *Mol Endocrinol* 1998; 12:775-784.
12. Misrahi M, Meduri G, Pissard S et al. Comparison of immunocytochemical and molecular features with the phenotype in a case of incomplete male pseudohermaphroditism associated with a mutation of the luteinizing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2159-2165.
13. Galet C, Ascoli M. The differential Binding Affinities of the Luteinizing Hormone (LH)/Choriogonadotropin Receptor for LH and Choriogonadotropin Are Dictated by Different Extracellular Domain Residues. *Molecular Endocrinology*. 2005. 19(5): 1263-1276.
14. Narayan P, Gray J, Puett D. Yoked complexes of human choriogonadotropin and the lutropin receptor: evidence that monomeric individual subunits are inactive. *Mol Endocrinol*. 2002;16(12): 2733-2745.
15. Brzostowski JA, Kimmel AR, Signaling at zero G: G-protein-independent fuctions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 291-297.
16. Rao CV. A paradigm shift on the targets of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin actions in the body. *J Bellevue Obstet Gynecol Soc* 1999; 15:26-32.
17. Reshef E, Lei ZM, Rao CV et al. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin. Endocrinol. Metab*. 1990 (70):421-430.
18. Wolkersdorfer GW, Bornstein SR, Hilbers U. The presence of chorionic gonadotrohin β subunit in normal cyclic human endometrium. *Molecular Human Reproduction* 1998 (4):2: 179-184.
19. Lin PC, Li X, Lei ZM, Rao Ch V. Human cervix contains functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jul; 88(7):3409-14.
20. Zhang YM, Rao ChV, Lei ZM. Macrophages in human reproductive tissues contain luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. *Am J Reprod Immunol*. 2003 Feb; 49(2):93-100.
21. Lacroix A, Hamet P, Boutin JM. Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone-dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1999; 341:1577-1581.
22. Rao CV, Li X, Manna SK et al. Human Chorionic Gonadotropin Decreases Proliferation and Invasion of Breast Cancer MCF-7 Cells by Inhibiting NF-kB and AP-1 Activation. *J Biol Chem* 2004 (279):24:25503-25510.
23. Abdallah MA, Lei ZM, Li X. et al. Human fetal nongonadal tissues contain human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Feb;89(2):952-6.
24. Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 1993 Mar; 132(3):1387-95.
25. Tao YX, Lei ZM, Hofmann GE et al. Human intermediate trophoblasts express Chorionic Gonadotropin/Luteinizing Hormone Receptor Gene. *Biology of Reproduction* 1995(53): 899-904.
26. Zygumnt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Münsted K, Rao CV. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):5290.
27. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem*. 1997;43(12):2233.
28. Cole LA, Dai D, Butler SA, Leslie KK, Kohorn EI. Gestational trophoblastic diseases: 1. Pathophysiology of hyperglycosylated hCG. *Gynecol Oncol*. 2006;102(2):145.
29. Snyder JA, Haymond S, Parvin CA. Diagnostic considerations in the measurement of human chorionic gonadotropin in aging women. *Clin Chem*. 2005 Oct; 51(10):1830-5. Epub 2005 Aug 11.
30. Cole LA, Khanlian SA, Muller CY. Detection of perimenopause or postmenopause human chorionic gonadotropin: an unnecessary source of alarm. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(3):275.e1.
31. Marcillac I, Troalen F, Bidart JM. Free human chorionic gonadotropin beta subunit in gonadal and nongonadal neoplasms. *Cancer Res*. 1992 Jul; 52(14):3901-7.
32. Knight AK, Bingemann T, Cole L, Cunningham-Rundles C. Frequent false positive beta human chorionic gonadotropin tests in immunoglobulin A deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2005; 141(2):333.
33. Khanlian SA, Cole LA. Management of gestational trophoblastic disease and other cases with low serum levels of human chorionic gonadotropin. *J Reprod Med*. 2006;51(10):812.
34. Doublet PM, Benson CB, Bourne T, Blaivas M, Society of Radiologists in Ultrasound Multispecialty Panel on Early First Trimester Diagnosis of Miscarriage and Exclusion of a Viable Intrauterine Pregnancy, Barnhart KT, Benaceraf BR, Brown DL, Filly RA, Fox JC, Goldstein SR, Kendall JL, Lyons EA, Porter MB, Pretorius DH, Timor-Tritsch IE. Diagnostic criteria for nonviable pregnancy early in the first trimester. *N Engl J Med*. 2013 Oct; 369(15):1443-51.
35. Goodwin TM, Montoro M, Mestman JH. The role of chorionic gonadotropin in transient hyperthyroidism of hyperemesis gravidarum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75(5):1333.
36. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM, SURUSS Research Group. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technol Assess*. 2003;7(11):1.
37. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Dukes K, Bianchi DW, Rudnicka AR, Hackshaw AK, Lambert-Messerlian G, Wald NJ, D'Alton ME, First- and Second-Trimester Evaluation of Risk (FASTER) Research Consortium. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med*. 2005;353(19):2001.
38. Canick JA, Lambert-Messerlian GM, Palomaki GE et al. Comparison of serum markers in first-trimester down syndrome screening. First and Second Trimester Evaluation of Risk (FASTER) Trial Research Consortium. *Obstet Gynecol*. 2006;108(5):1192.
39. Palomaki GE, Lambert-Messerlian GM, Canick JA. A summary analysis of Down syndrome markers in the late first trimester. *Adv Clin Chem*. 2007;43:177.
40. Evans MI, Krantz DA, Hallahan TW, Galen RS. Meta-analysis of first trimester Down syndrome screening studies: free beta-human chorionic gonadotropin significantly outperforms intact human chorionic gonadotropin in a multimarker protocol. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(3):198.
41. Palomaki GE, Neveux LM, Knight GJ, Haddow JE. Maternal serum-integrated screening for trisomy 18 using both first- and second-trimester markers. *Prenat Diagn*. 2003;23(3):243.
42. Al-Inany HG, Aboughar M, Mansour R, Proctor M. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotropin for ovulation induction in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005.
43. Carp H. Cytokines in recurrent miscarriage. *Lupus*. 2004;13(9):630-4.