

Tesis Doctoral

# Implicancia del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos de FSH en la regulación de la función ovárica: estudios clínicos y experimentales

Loreti, Rosana Nazareth

2012-12-20

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Loreti, Rosana Nazareth. (2012-12-20). Implicancia del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos de FSH en la regulación de la función ovárica: estudios clínicos y experimentales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Loreti, Rosana Nazareth. "Implicancia del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos de FSH en la regulación de la función ovárica: estudios clínicos y experimentales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-12-20.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Implicancia del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos de FSH en la regulación de la función ovárica: estudios clínicos y experimentales”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Lic. Rosana Nazareth Loreti**

Directora de Tesis: Dra. Stella Campo

Consejera de Estudios: Dra. Paula Vissio

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiopatología Hipófiso-Gonadal

Centro de Investigaciones Endocrinológicas

(CEDIE/CONICET)

Buenos Aires, 2012

*“If at first the idea is not absurd...  
then there is no hope for it”*

*Albert Einstein*

*“Nature does nothing  
without a purpose or uselessly”*

*Aristotélēs*

*A mi familia  
Con todo el amor del mundo*

## AGRADECIMIENTOS

### **Mis más sinceros agradecimientos**

*..a mi Directora, la Dra. Stella Campo, por confiar plenamente en mí en todo momento, por enseñarme a desarrollar el pensamiento científico, por guiarme en este extenso trabajo, por su cariño, su optimismo y su infinita paciencia.*

*.. a Verónica y Luz por colaborar conmigo cada vez que lo he necesitado y compartir tantos momentos en el laboratorio y a Manu por su buena onda y comprensión.*

*.. a la Dra. Eliana Pellizzari por enseñarme con infinita paciencia y excelente disposición los secretos del manejo de los cultivos celulares y por estar siempre dispuesta a responder a mis inquietudes.*

*..a la Dra. Selva Cigorruga por estar siempre dispuesta a colaborar y responder inquietudes, por su preocupación y por confiar en mí para formar parte del excelente grupo de la Universidad Austral.*

*.. a Mercedes Astarloa por su colaboración constante e incondicional.*

*.. al Dr. Fernando Larrea Gallo por permitirme conocer y desarrollar metodologías en su laboratorio, que contribuyeron enormemente a esta Tesis.*

*..al Dr. Roberto Coco y a todo el Instituto Fecunditas por permitirme desarrollar los aspectos clínicos de este trabajo.*

*..al Dr. Elmer Fernandez y Cristobal Fresno por guiarme en el desarrollo de los microarreglos.*

*..a la Dra. Paula Vissio por su seguimiento a nivel académico.*

*..a todo el equipo del CEDIE, por su afecto y compañía durante tantos años.*

*.. al grupo de trabajo del Instituto de Nutrición Salvador Zubirán, México, por el afecto que me han brindado durante mi estadía con ellos.*

*.. a la ANPCyT, CONICET y la Fundación de Endocrinología Infantil por su apoyo económico que me permitió desarrollar y terminar mi Doctorado.*

*..a todo el equipo de la Austral, Ana, Horacio, Selva, Guillermo, Silvina, Cristina, Valeria, Florencia, Mariana y Fernanda por tantos lindos momentos vividos los esperados miércoles de la Austral y por su preocupación en lo personal y profesional.*

*..a mis vecinas y amigas de lab, Fer y Marian, por compartir muchos momentos conmigo, por su constante apoyo y por sus consejos.*

*..a mi amiga y colega Luciana, por transitar conmigo tanto el camino profesional como el personal.*

*..a mis amigas del alma, Adri, Lu, Pame, Pao y Romi, por haberme soportado tantas veces hablar de la Tesis y de muchas otras cuestiones más, pero por sobretodo por haberme acompañado incondicionalmente durante tantos años y tantas etapas, siendo un gran apoyo en mi vida.*

*Y muy especialmente ..a mis papás, a mis hermanos, cuñados y sobrinos..Felipe y Rosana, Fabio, Walter, Gisela, Graciela, Karina, Adrián, Maia, Iara, Gian, Matías y Serafín...."mi gran familia"... por estar siempre al lado mío, atentos a cada instante de mi vida, apoyándome incondicionalmente y transmitiéndome toda la confianza y fuerza necesaria para transitar las etapas lindas, feas, fáciles, difíciles.....todas.....al lado mío.*

*"Una vez más muchísimas gracias a TODOS los que, de una manera u otra, contribuyeron a al desarrollo de este trabajo. Y por sobretodo, gracias por ayudarme a transitar y completar este capítulo de mi vida"*

**Este trabajo ha sido realizado con el apoyo de los siguientes Organismos:**

- CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS, PIP N° 5479, 2006-2008.
  
- AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, PICT N° 25365, 2006-2009.
  
- FUNDACION FLORENCIO FIORINI, Investigación en Ciencias Médicas, 2010.
  
- Programa Latinoamericano de Investigación en Salud Sexual y Reproductiva (PLISSER), Octubre 2010- Enero 2011.
  
- CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS, PIP N° 11220090100615, 2010-2013.

Los resultados incluidos en la presente Tesis han originado las siguientes presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales:

**Comunicaciones presentadas en congresos nacionales:**

- **Loreti N, Andreone L, Trigo R, Bussmann U, Ambao V, Campo S. “Efecto del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos de FSH sobre la producción de inhibinas diméricas en células de la granulosa en cultivo”**

*LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Noviembre 2007. Medicina 67, III, R 507, 2007.*

- **Loreti N, Andreone L, Ambao V, Campo S. “Regulación diferencial de la actividad endócrina de células de la granulosa humana por variantes glicosiladas de FSH”**

*LIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Noviembre 2009. Medicina 69, I, R 433, 2009.*

- **Loreti N, Fresno Rodriguez C, Fernandez E, Campo S. “Integración de la información experimental, expresión y ontologías para identificar efectos específicos inducidos por variantes glicosiladas de FSHrh”**

*2<sup>do</sup> Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional, Córdoba, Mayo 2011.*

- **Loreti N, Fresno C, Barrera D, Ambao V, Fernandez E, Larrea F, Campo S. “Expresión génica diferencial inducida por variantes glicosiladas de la hormona foliculo estimulante (FSH) en la línea celular de granulosa humana KGN”**

*LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Noviembre, Mar del Plata. Medicina 71, III, R 613, 2011.*

**Comunicaciones presentadas en congresos internacionales:**

- **Campo S., Andreone L., Trigo R., Ambao V., Loreti N. “Effect of sialylation and complexity of FSH oligosaccharides on inhibin production by rat granulosa cells”**

*Second International Conference on gonadotropins and receptors (ICGR). Hertfordshire, Inglaterra, Julio 2008.*

- **Campo, S., Andreone, L., Trigo, R., Velasquez Opazo, E., Bussman, U., Ambao, V., Loreti, N. Simposio Hormonas y Reproducción, Regulation of the ovarian follicle endocrine activity: role of FSH molecular microheterogeneity. XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología - XXX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile - XXIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas - III Congreso Iberoamericano de Farmacología. Coquimbo, Chile, Octubre 2008.**

- **Loreti N, Andreone L, Trigo R, Ambao V, Campo S. “Efecto del grado de sialización y complejidad de los oligosacáridos de FSH sobre la producción de inhibinas en células de la granulosa en cultivo”**



*XXI Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), Sao Paulo, Brasil, Abril 2009.*

Primer Premio “*Dr. José Barzelatto*” al mejor trabajo de Ciencias Biomédicas.

- **Loreti N**, Irusta G, Andreone L, Ambao V, Tesone M, Campo S. **“Effect of FSH and its glycosylation variants on proliferation, steroid and inhibin production in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN)”**

*43rd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR), Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos. Agosto 2010. Biology of Reproduction 83,645, 2010.*

Publicaciones en revisión:

- **Loreti N**, Ambao V, Andreone L, Trigo R, Bussmann U, Campo S. **“Effect of sialylation and complexity of FSH oligosaccharides on inhibin production by granulosa cells”** *Reproduction*.

- **Loreti N**, Fresno C, Barrera D, Lira S, Fernandez E, Larrea F, Campo S. **“Glycan structure in recombinant human FSH affects endocrine activity and global gene expression on human granulosa cells”** *Molecular and Cellular Endocrinology*.

## **“Implicancia del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos de FSH en la regulación de la función ovárica: estudios clínicos y experimentales”**

La FSH se sintetiza y secreta como una familia de variantes glicosiladas, las cuales difieren en el grado de sialilación y complejidad de sus oligosacáridos y en la inducción de respuestas biológicas en células blanco, *in vivo* e *in vitro*. El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue establecer la relación existente entre las características de los carbohidratos presentes en la molécula de FSH y la inducción de respuestas biológicas en las células de la granulosa. La acción de variantes glicosiladas, aisladas de FSH recombinante humana (FSHrh), fue evaluada *in vitro* utilizando dos modelos experimentales. Se estudió la producción de inhibinas diméricas en células de la granulosa de rata; de esteroides e inhibinas en la línea celular de granulosa humana, KGN, como así también el patrón de expresión génica global y la expresión de enzimas esteroidogénicas y subunidades de inhibinas. Estudios *in vitro* demostraron que el grado de sialilación y la complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh reguló en forma diferencial la producción de esteroides y péptidos. Asimismo, el análisis de ontología génica reveló la capacidad que poseen las variantes glicosiladas de FSHrh de modular en forma diferencial la expresión de genes involucrados en funciones o procesos esenciales para el mantenimiento de la función celular.

Las características de las variantes glicosiladas de la FSH circulante fueron determinadas en condiciones fisiológicas y en pacientes infértiles con ciclos regulares. Se observaron alteraciones en el grado de sialilación de la FSH circulante en las pacientes con trastornos reproductivos y en mujeres jóvenes ovodonantes.

Los resultados obtenidos demuestran que los oligosacáridos de la molécula de FSH regulan distintas funciones de la célula de la granulosa. Alteraciones precoces en el grado de sialilación de la gonadotropina podrían comprometer la capacidad reproductiva en la mujer.

**Palabras clave:** FSH, Variantes Glicosiladas, Granulosa, Esteroidogénesis, Inhibinas, Expresión Génica.

## **“Role of the degree of sialylation and complexity of FSH oligosaccharides in the regulation of ovarian function: clinical and experimental studies”**

FSH is produced and secreted as a family of glycosylation variants which differ from each other in the oligosaccharide sialylation and complexity and in the induction of different biological responses *in vitro* and *in vivo*. The aim of this Doctoral Thesis was to establish the relationship between the FSH carbohydrate characteristics and the induction of biological responses in granulosa cells. The effect of recombinant human FSH glycosylation variants were evaluated in two experimental models *in vitro*. Dimeric inhibin production was assessed in rat granulosa cells, steroids and inhibin production in human granulosa cell line KGN, as well as global gene expression profile and the expression of steroidogenic enzymes and inhibin subunits. *In vitro* studies demonstrated that sialylation and complexity of rhFSH oligosaccharides induced a differential regulation of steroid and inhibin production. Gene ontology analysis revealed the ability of rhFSH glycosylation variants to differentially modulate the expression of genes involved in essential cell biological processes and molecular functions.

Circulating FSH oligosaccharides characteristics were determined under physiological conditions and in infertile patients. Alterations in FSH sialylation were observed in infertile patients and in ovidonors.

The results obtained in this study show that FSH oligosaccharides regulate different functions in granulosa cells. Early alterations in FSH sialylation may jeopardize the reproductive capacity in women.

**Keywords:** FSH, Glycosylation Variants, Granulosa, Steroidogenesis, Inhibins, Gene Expression.

## ABREVIATURAS

AC	Análogos de carga más sialilados
ACVR1	Receptor de tipo I de activitas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AMH	Hormona antimulleriana
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPD	Acetato de medroxiprogesterona de depósito
APE1	Apurínica /apirimidínica endonucleasa 1
arcsen	Arco seno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	Ácido ribonucleico copia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Ácido siálico
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina Trifosfato
BA	Análogos de carga menos sialilados
BMP	Proteína morfogenética del hueso
BP	Procesos Biológicos
C	Control
CC	Componente Celular
CG	Gonadotrofina coriónica
CHO	Chinese hamster ovary
col	Colaboradores
Con A	Concanavalina A
DEPC	Dietilpirocarbonato
DES	Dietilelbestrol
DR	Débilmente retenidas
E <sub>1</sub>	Estrona
E <sub>2</sub>	Estradiol
ECLIA	Ensayo electroquimioluminiscente
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ELISA	Enzimo-inmuno ensayo
ER	Receptor de estrógenos
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
Fig	Figura
FR	Fuertemente retenidas
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHrh	Hormona folículo estimulante recombinante humana

Fuc	Fucosa
Fuc-T	Fucosiltransferasa
Gal	Galactosa
Gal-T	Galactosiltransferasa
GDF-9	Factor de Diferenciación 9
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
Gn-T	N-acetilglucosaminil transferasa
Glu	Glucosa
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
H	Horas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Enzima peroxidada de rábano
HSD	Hidroxiesteroide deshidrogenasa
IBMX	3-isobutil-1metilxantina
IEF	Isoelectroenfoque preparativo
Ig	Inmunoglobulina
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulino-símil
IL-6	Interleuquina 6
InhA	Inhibina A
InhB	Inhibina B
L	Litro
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona Luteinizante
LIF	Factor inhibitorio de leucemia
M	Molar
Man	Manosa
MF	Función molecular
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
NAcGlc	N-acetil glucosamina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ND	No detectable
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal
NR	No retenidas
NS	No significativo
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ov	Ovodonante
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PKA	Proteína quinasa A
PTR	Pacientes con Trastornos Reproductivos
P/V	Peso/volumen
RER	Retículo endoplasmático rugoso
rh	Recombinante humana
RIE	Radioinmuno ensayo
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SGK	Kinasa inducida por glucocorticoides
SHBG	Proteína ligadora de esteroides sexuales
STAR	Proteína Reguladora de la Esteroidogénesis Aguda
ST3Gal III	Galb1,3[4]GlcNAc a2,3-sialiltransferasa
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
Thr	Treonina
tPA	Activador del plasminógeno tisular
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida
TSH	Hormona estimulante de la tiroide
UDG	Uracilo ADN glicosilasa
UI	Unidades Internacionales
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro
UTP	Uridina trifosfato
V/V	Volumen/volumen

## INDICE

### INTRODUCCION

<b>1. Hormona Folículo Estimulante</b>	<b>1</b>
1.1. Estructura molecular	1
1.1.1. Estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH	3
1.1.2. Procesamiento de los oligosacáridos	4
<b>2. Regulación hormonal de la síntesis y secreción de FSH</b>	<b>8</b>
<b>3. Acción de la FSH sobre la función de la gónada femenina</b>	<b>13</b>
3.1. Regulación del desarrollo folicular	13
3.2. Receptor de FSH y mecanismo de acción	15
3.3. Regulación de la función de la célula de la granulosa	16
3.3.1. Regulación de la síntesis de esteroides e inhibinas	17
3.3.2. Niveles hormonales séricos durante el ciclo menstrual	19
<b>4. Microheterogeneidad molecular de FSH</b>	<b>22</b>
4.1. Función de los oligosacáridos en el mecanismo de acción de la FSH	22
4.2. Regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de la FSH	23
4.3. Microheterogeneidad molecular de la FSH circulante	24

### OBJETIVOS

<b>Objetivo General</b>	<b>26</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>26</b>

### MATERIALES y METODOS

<b>1. Drogas y Reactivos</b>	<b>28</b>
<b>2. Material biológico</b>	<b>30</b>
2.1. Células de la granulosa de rata	30

2.2.	Línea Celular de granulosa humana	30
2.3.	Material Clínico	30
<b>3.</b>	<b>Métodos</b>	<b>33</b>
3.1.	Aislamiento de las variantes glicosiladas de FSH	33
3.1.1.	FSH recombinante humana	33
3.1.2.	FSH sérica	33
3.1.3.	Aislamiento de los análogos de carga de la FSH	34
	<i>-Isoelectroenfoque preparativo</i>	34
	<i>-Procesamiento del material obtenido por isoelectroenfoque</i>	35
3.1.4.	Aislamiento de las glicofomas de FSH	36
	<i>-Cromatografía de afinidad en lectina</i>	36
	<i>-Procesamiento de los eluidos cromatográficos</i>	37
3.2.	Cultivos celulares	39
3.2.1.	Aislamiento y cultivo de células de la granulosa de rata	39
3.2.2.	Cultivo de la línea celular de granulosa humana KGN	40
3.3.	Determinación de ADN	41
3.4.	Determinación de AMP cíclico	41
3.5.	Determinaciones hormonales	41
3.5.1.	Determinación de FSH por radioinmunoensayo	41
3.5.2.	Determinación de esteroides en medios condicionados	42
3.5.3.	Determinación de los niveles de inhibinas diméricas A y B y subunidad $\alpha$ de inhibina (Pro- $\alpha$ C) en medios condicionados	42
3.5.4.	Determinación de estradiol y LH en suero	46
3.5.5.	Determinación de los niveles de inhibina B en suero	46
3.6.	Análisis de la expresión génica utilizando la técnica de microarreglos	47
3.6.1.	Extracción de ARN total	48
3.6.2.	Cuantificación del ARN	48
3.6.3.	Verificación de la integridad del ARN	49
3.6.4.	Microarreglos de ADN	50



3.6.5. Análisis estadístico	52
3.7. Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real	53
3.7.1. Extracción de ARN total	53
3.7.2. Cuantificación del ARN	54
3.7.3. Reacción de retrotranscripción (RT) del ARNm	54
3.7.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	55
3.7.5. Condiciones de Reacción	55
3.7.6. Diseño de cebadores	56
3.8. Análisis Estadístico	56

## **RESULTADOS**

### **CAPITULO I**

<b>1. Caracterización de FSH recombinante humana</b>	<b>58</b>
1.1. Abundancia relativa de análogos de carga de FSHrh	58
1.2. Abundancia relativa de variantes glicosiladas de FSHrh con diferente grado de procesamiento de sus oligosacáridos	60
1.3. Curvas de paralelismo	63

### **CAPITULO II**

<b>2. Regulación diferencial de la producción de inhibinas diméricas en cultivos de células de la granulosa de rata por variantes glicosiladas de FSHrh</b>	<b>65</b>
2.1. Producción de inhibinas diméricas en condiciones basales y bajo estímulo con FSHrh nativa	66
2.2. Efecto del grado de sialilación de FSHrh sobre la producción de inhibinas diméricas	67
2.3. Efecto del grado de complejidad de los oligosacáridos de FSHrh sobre la producción de inhibinas diméricas	69

### CAPITULO III

<b>3. Regulación diferencial de la actividad endocrina en la línea celular esteroidogénica de granulosa humana KGN por variantes glicosiladas de FSHrh</b>	<b>73</b>
3.1. Presencia del receptor de FSH en células KGN	73
3.2. Determinación de las condiciones óptimas de cultivo para estudiar el efecto de variantes glicosiladas de FSHrh sobre la actividad endocrina de células KGN	74
3.2.1. Producción de esteroides: efecto de sustratos esteroidogénicos	74
3.2.2. Determinación del tiempo de cultivo para evaluar la producción de péptidos	76
3.2.3. Efecto de la densidad celular de los cultivos en la producción de esteroides y péptidos	77
3.3. Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la producción de esteroides y péptidos en la línea celular esteroidogénica de granulosa humana KGN	78
3.3.1. Efecto de FSHrh nativa	78
3.3.2. Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la producción de esteroides y péptidos	82
<i>-Producción de estradiol</i>	83
<i>-Producción de progesterona</i>	85
<i>-Producción de subunidad <math>\alpha</math> de inhibina</i>	87
<i>-Producción de inhibina A</i>	89
3.4. Correlación de los niveles de inhibina A y de subunidad $\alpha$ de inhibina	91

### CAPITULO IV

<b>4. Regulación diferencial de la expresión génica global en la línea celular esteroidogénica de granulosa humana KGN por variantes glicosiladas de FSHrh</b>	<b>93</b>
--	-----------

---

4.1.	Análisis de la expresión génica por microarreglos de ADN	93
4.1.1.	Diferencias en la expresión génica inducidas por variantes glicosiladas de FSHrh	93
4.2.	Análisis funcional de los genes regulados por las variantes glicosiladas de FSHrh	96
4.2.1.	Análisis funcional de los genes regulados por los análogos de carga AC	98
4.2.2.	Análisis funcional de los genes regulados por los análogos de carga BA	102
4.2.3.	Análisis funcional de los genes regulados por las glicoformas NR	106
4.2.4.	Análisis funcional de los genes regulados por las glicoformas FR	110

## **CAPITULO V**

<b>5.</b>	<b>Regulación de la expresión génica de enzimas esteroideogénicas y subunidades de inhibina en la línea celular esteroideogénica de granulosa humana KGN por variantes glicosiladas de FSHrh</b>	<b>115</b>
5.1.	Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real	115
5.1.1.	Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la expresión del transportador de colesterol y de enzimas involucradas en la síntesis de progesterona	115
5.1.2.	Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la expresión de enzimas responsables de la síntesis y metabolización del estradiol	118
5.1.3	Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la regulación de la expresión de subunidades de inhibina/activina en la línea celular esteroideogénica de granulosa humana KGN	120
5.1.4	Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la regulación de la expresión del receptor de FSH en la línea celular esteroideogénica de granulosa humana KGN	122

---

**CAPITULO VI**

<b>6. Características de las variantes glicosiladas de FSH sérica en ovodonantes y en pacientes con trastornos reproductivos</b>	<b>123</b>
6.1. Perfil hormonal sérico	124
6.2. Respuesta al tratamiento de estimulación ovárica	127
6.3. Análisis de la microheterogeneidad molecular de FSH	128
6.3.1. Perfil de distribución de los análogos de carga	128

<b>DISCUSION</b>	<b>132</b>
------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>160</b>
---------------------	------------

**ANEXOS****1. Anexo I**

1.1. Lista de genes estimulados por análogos de carga AC en células KGN	178
1.2. Lista de genes inhibidos por análogos de carga AC en células KGN	182
1.3. Lista de genes estimulados por análogos de carga BA en células KGN	185
1.4. Lista de genes inhibidos por análogos de carga BA en células KGN	188
1.5. Lista de genes estimulados por glicoformas NR en células KGN	192
1.6. Lista de genes inhibidos por glicoformas NR en células KGN	194
1.7. Lista de genes estimulados por glicoformas FR en células KGN	199
1.8. Lista de genes inhibidos por glicoformas FR en células KGN	201

**2. Anexo II**

2.1. Aprobación del Comité de Docencia e Investigación	206
2.2. Aprobación del Comité de Bioética	207
2.3. Modelo de Consentimiento Informado	208

# *Introducción*

## 1. Hormona Folículo Estimulante

La hormona folículo estimulante es una de las gonadotropinas sintetizada y secretada por los gonadotropos de la hipófisis anterior o adenohipófisis. Esta gonadotropina juega un rol esencial en la regulación de la función gonadal ya que interviene en la gametogénesis, el crecimiento folicular y la ovulación.

### 1.1. Estructura molecular

La FSH pertenece a una familia de glicoproteínas heterodiméricas formada por la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica (CG), las cuales se relacionan entre sí por tener una subunidad  $\alpha$  común unida en forma no-covalente a la subunidad  $\beta$  específica (Pierce & Parson, 1981). Esta última subunidad es la que le confiere especificidad funcional y estructural a cada hormona; sin embargo evidencias más recientes sugieren que ambas subunidades serían necesarias para establecer contacto con los receptores específicos e inducir una respuesta biológica (Fan & Hendrickson, 2005).

En humanos la estructura primaria de la subunidad  $\alpha$  común esta formada por 116 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 24 aminoácidos, el cual es clivado durante el procesamiento de la cadena peptídica, conduciendo a una proteína madura de 92 aminoácidos (Boothby y col., 1981; Naylor y col., 1983). El gen que codifica esta subunidad consiste en 4 exones separados por 3 intrones, localizado en el cromosoma 6 (Naylor y col., 1983). La estructura primaria de la subunidad  $\beta$  de la FSH presenta una secuencia de 120 aminoácidos, que luego del clivaje del péptido señal, resulta en la proteína madura de 111 aminoácidos. Su gen esta localizado en el cromosoma 11 y esta formado por 3 exones y 2 intrones (Watkins y col., 1987).

Cada una de las subunidades peptídicas que forman la FSH presenta dos sitios de glicosilación donde se unen los oligosacáridos a través de uniones covalentes N-glicosídicas. Estos carbohidratos son un importante componente estructural debido a que representan entre el 20-30% del peso molecular de la gonadotropina. En humanos la subunidad  $\alpha$  se encuentra glicosilada en la posición Asn<sub>52</sub> y Asn<sub>78</sub> (Matzuk & Boime,

1988 y 1989) y la subunidad  $\beta$  en las posiciones Asn<sub>7</sub> y Asn<sub>24</sub> (Watkins y col., 1987). Evidencias más recientes han descrito una variante de FSH humana que posee solamente oligosacáridos en la subunidad  $\alpha$  (Walton y col., 2001; Bousfield y col., 2007). Al igual que otras hormonas glicoproteicas, la FSH se sintetiza y secreta como una familia de diferentes variantes moleculares denominadas **variantes glicosiladas**, **glicoformas** o **isoformas**, las cuales difieren entre sí en el grado de procesamiento de sus oligosacáridos y en la inducción de respuestas biológicas en las células gonadales.

En la Figura 1 se observa el modelo propuesto para la estructura molecular de la FSH humana (Días y col., 1998; Fox y col., 2001).



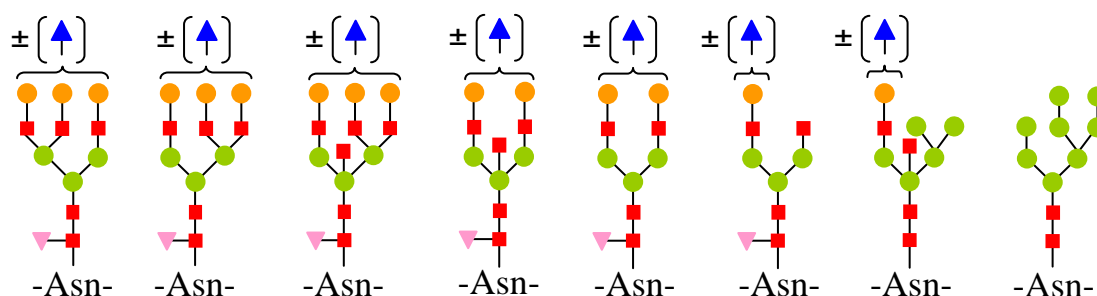
**Figura 1:** Modelo de la estructura molecular de la FSH humana (tomada y modificada de Fox y col., 2001).

### 1.1.1. Estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH

Renwick y col. (1987) y Baenziger & Green (1988) han determinado la estructura molecular de la porción carbohidratada de la FSH hipofisaria humana luego de separar los carbohidratos del polipéptido por medio de hidrazinólisis o aplicando una N-glicanasa, respectivamente. Utilizaron una combinación de técnicas tales como cromatografía de afinidad en diferentes lectinas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y digestión enzimática con endo y exoglicosidasas. Las estructuras caracterizadas por estos autores se muestran en la Figura 2, y constituyen el 80% de los oligosacáridos que se encuentran en las moléculas de FSH hipofisaria, los cuales pueden clasificarse de acuerdo al grado de procesamiento que alcanzó la cadena carbohidratada en:

- estructuras de alto contenido en manosa,
- estructuras de tipo híbrido,
- estructuras de tipo complejo,

Las distintas estructuras de oligosacáridos pueden incorporar ácido siálico como último azúcar (Green & Baenziger, 1988), razón por la cual cada molécula de FSH presenta una carga negativa particular que determina el punto isoelectrico característico de la misma (Ulloa-Aguirre y col., 1995).



**Figura 2:** Estructura de los distintos oligosacáridos presentes en la molécula de FSH hipofisaria humana. ▲ AS: ácido siálico; ● Gal: galactosa; ■ NACGlc: N-acetilglucosamina; ● Man: manosa;



▼ Fuc: fucosa; Asn: asparagina; ± presencia/ausencia (tomado y modificado de Green & Baezinger, 1988).

### 1.1.2. Procesamiento de los oligosacáridos

Los distintos péptidos que forman las subunidades de FSH se sintetizan en los ribosomas como cadenas pre- $\alpha$  y pre- $\beta$ , ya que contienen en la región N-terminal señales de clivaje y glicosilación. El procesamiento de estos péptidos señal ocurre mientras la cadena polipeptídica aún esta siendo sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso (RER) (Pierce & Parsons, 1981). Así mismo, la formación del heterodímero  $\alpha\beta$  tiene lugar en esta organela (Hoshina & Boime, 1982; Peters y col., 1984).

El proceso de glicosilación de las subunidades también comienza en el retículo endoplasmático rugoso con la transferencia co-traducciona de un oligosacáridos precursor común, compuesto por 14 residuos de azúcar [(Glc)<sub>3</sub>(Man)<sub>9</sub>(NAcGlc)<sub>2</sub>], desde el transportador lipídico dolicol a un aminoácido asparagina (Asn) de la cadena polipeptídica. Esta reacción está catalizada por la enzima oligosacaril transferasa del RER (Fig. 3, reacción 1), la cual reconoce una secuencia específica: Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. Por acción de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa I y II se remueven del oligosacárido precursor los tres residuos glucosa (Fig. 3, reacciones 2 y 3), y posteriormente un residuo manosa terminal por acción de una  $\alpha$ -manosidasa específica del RER (Fig. 3, reacción 4).

En la siguiente etapa estas moléculas son transportadas a la cisterna cis del aparato de Golgi, a través de la formación de vesículas.

Dentro del compartimiento cis del aparato de Golgi se produce la remoción de uno a tres residuos  $\alpha$ -1,2-manosa por la enzima  $\alpha$ -manosidasa I (Fig. 3, reacción 5), quedando conformada la siguiente estructura carbohidratada: Man<sub>5</sub>NAcGlc<sub>2</sub>-Asn. El polipéptido es transferido a la cisterna media del Golgi donde la N-acetilglucosaminil transferasa I (Gn-T I) incorpora un residuo NAcGlc al brazo Man $\alpha$ 1-3 (Fig. 3, reacción 6).

En este mismo compartimiento se encuentra la enzima fucosiltransferasa (Fuc-T) que agrega fucosa al residuo NAcGlc unido a la Asn (Longmore & Schachter, 1982).

De acuerdo a la reacción enzimática que ocurra sobre este último producto pueden obtenerse dos tipos de estructuras carbohidratadas: precursores de oligosacáridos de tipo híbrido o precursores de oligosacáridos complejos.

❖ **Precursor de oligosacáridos de tipo híbrido:** Este tipo de precursor se producirá si la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III (Gn-T III) agrega un residuo NAcGlc por unión  $\beta$ 1,4 al residuo interno  $\beta$ -manosa de la estructura núcleo (Fig. 3, reacción 8a). Esta transferencia impide que la enzima  $\alpha$ -manosidasa II elimine los dos residuos terminales  $\alpha$ -manosa del brazo  $\text{Man}\alpha$ 1-6. Finalmente, esta estructura podrá o no incorporar en etapas posteriores de la biosíntesis residuos galactosa y ácido siálico terminal sólo en una de sus ramas.

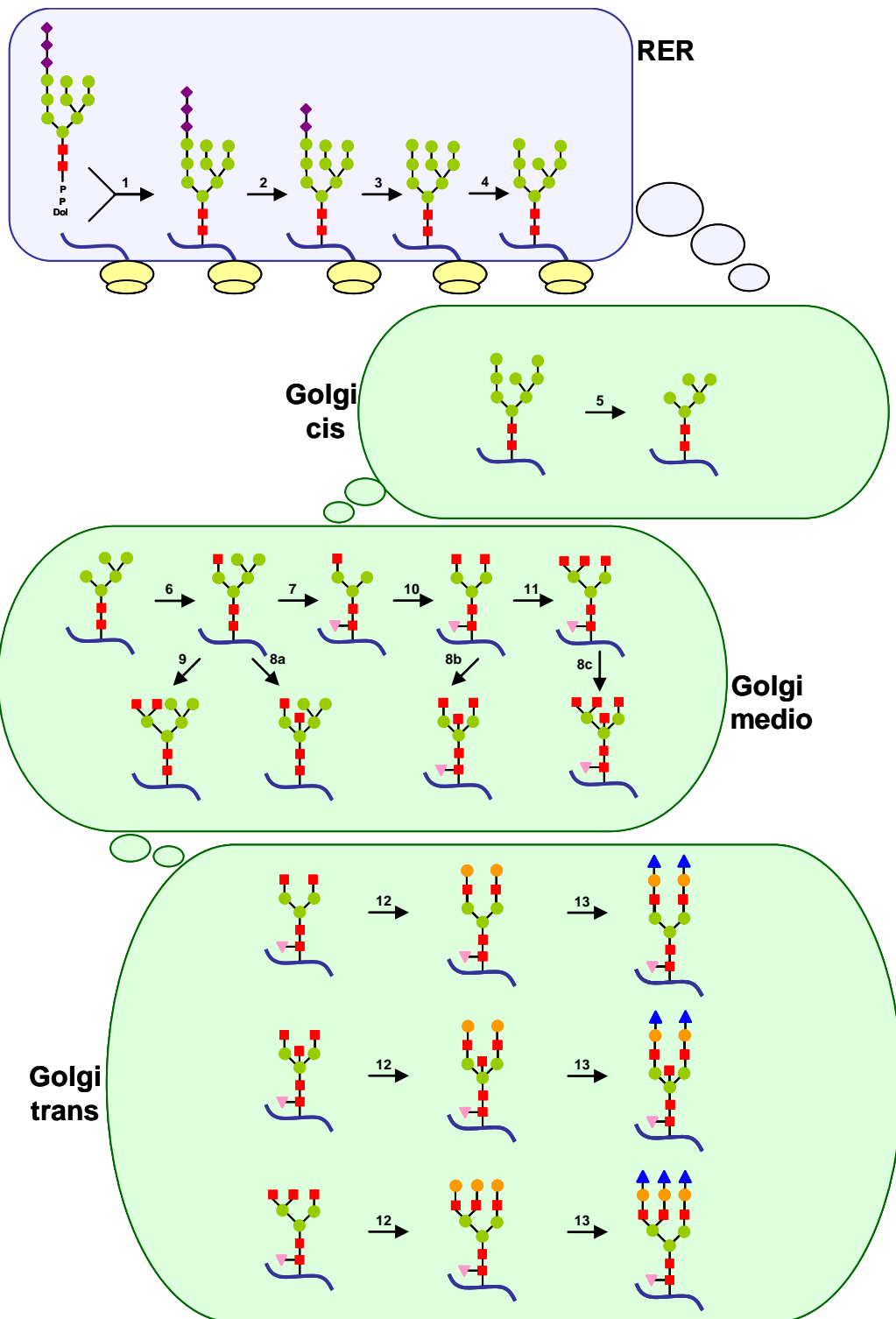
Por acción de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa IV (Gn-T IV) sobre la estructura  $\text{NAcGlcMan}_3\text{NAcGlc-Asn}$  también se pueden obtener estructuras denominadas híbridos triantenarios (Fig. 3, reacción 9). A su vez, sobre este tipo de oligosacáridos puede actuar posteriormente la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III originando oligosacáridos de tipo híbrido (no se muestra en la figura).

❖ **Precursor de oligosacáridos complejos:** los residuos  $\alpha$ -manosas terminales unidos al brazo  $\text{Man}\alpha$ 1-6 son eliminados por la enzima  $\alpha$ -manosidasa II, debido al reordenamiento estérico sufrido por el agregado del residuo NAcGlc (Fig.3, reacción 7). De esta forma se da origen a una estructura de tipo monoantenaria que será precursora de estructuras de tipo complejo, pues permitirá la incorporación de varios residuos NAcGlc por la acción sucesiva de N-Acetilglucosaminil transferasas (Fig. 3, reacciones 10, 11 y subsiguientes).

El primer producto es una estructura biantenaria, producida por la acción de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa II, que agrega un residuo NAcGlc al brazo  $\text{Man}\alpha$ 1-6 (Fig. 6, reacción 10). Esta misma estructura puede ser convertida en productos altamente ramificados por la incorporación de sucesivos NAcGlc a los brazos

Man $\alpha$ 1-3 o Man $\alpha$ 1-6 mediante la acción de las enzimas Gn-T IV o V, respectivamente (Fig. 3, reacción 11).

A partir de las estructuras biantenarias y triantenarias también se pueden sintetizar estructuras de tipo bisectadas, si se incorpora un residuo NAcGlc por unión  $\beta$ 1,4 con el residuo interno  $\beta$ -manosa de la cadena núcleo (Fig. 3, reacciones 8b y 8c, respectivamente).



**Figura 3:** Biosíntesis de oligosacáridos N-glicosídicos. Retículo endoplasmático rugoso (RER). 1) oligosacaril transferasa; 2)  $\alpha$ -glucosidasa I; 3)  $\alpha$ -glucosidasa II; 4)  $\alpha$ -manosidasa del RER; 5)  $\alpha$ -manosidasa I; 6) N-acetilglucosaminil transferasa I; 7)  $\alpha$ -manosidasa II y fucosiltransferasa; 8 a), b) y c) N-acetilglucosaminil transferasa III; 9) N-acetilglucosaminil transferasa IV; 10) N-acetilglucosaminil transferasa II; 11) N-acetilglucosaminil transferasa IV o V. 12)

galactosiltransferasa; 13) sialiltransferasa. ◆ Glc: glucosa; ● Man: manosa; ■ NacGlc: N-acetilglucosamina; ▼ Fuc: fucosa; ● Gal: galactosa; ▲ AS: ácido siálico.

Finalmente, cualquier estructura de tipo complejo o monoantena puede ser aceptora de un residuo galactosa por acción de la enzima galactosiltransferasa (Gal-T) (Fig. 3, reacción 12) en el compartimiento trans del Golgi, y sobre el residuo  $\beta$ -galactosa terminal se podrá incorporar un residuo de ácido siálico por acción de la enzima sialiltransferasa (ST6Gal I, ST3Gal III) (Fig. 3, reacción 13).

La estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH será el resultado del procesamiento anteriormente descrito. Las estructuras de alto contenido en manosa, resultan como consecuencia de la ausencia de remoción e incorporación de nuevos azúcares en la cisterna media del aparato de Golgi. Las estructuras de tipo híbrido, si bien no han completado las etapas de remoción e incorporación de nuevos azúcares, poseen una rama con un número variable de residuos manosa, una rama con NAcGlc, y pueden o no, haber incorporado galactosa y ácido siálico. Este tipo de estructura resulta del predominio de la actividad de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III sobre la  $\alpha$ -manosidasa II y N-acetilglucosaminil transferasa IV. Las estructuras de tipo complejo son aquellas que han recibido un procesamiento mayor y poseen residuos NAcGlc y galactosa. Se sintetizan al predominar la actividad de la enzima  $\alpha$ -manosidasa II sobre las N-acetilglucosaminil transferasas III y IV.

## 2. Regulación hormonal de la síntesis y secreción de FSH

La síntesis y secreción de FSH son procesos regulados por factores proteicos y esteroideos producidos por los distintos componentes del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

El estímulo más importante es la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH, un decapeptido secretado de forma pulsátil por el hipotálamo hacia la eminencia media hipotalámica, a través de la cual ingresa a la circulación portal hipofisaria. En respuesta a la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH, los gonadotropos sintetizan y liberan

diferencialmente LH y FSH (Haisenleder y col., 1991; 1993). La secreción pulsátil de GnRH es muy importante para la adecuada producción de las gonadotropinas, ya que se ha demostrado que la exposición crónica al GnRH induce una supresión reversible de la liberación de estas hormonas como consecuencia de una disminución del número de receptores de GnRH de los gonadotropos (Clayton, 1982; Loumaye & Catt, 1983).

La expresión del gen de la subunidad  $\beta$  de LH es altamente dependiente de la amplitud del pulso de GnRH (Papavasiliou y col., 1986), mientras que la expresión de la subunidad  $\alpha$ , común a todas las glicoproteínas, y de la subunidad  $\beta$  de FSH, son relativamente independientes de la amplitud del mismo (Marshall y col., 1991)

Los gonadotropos pueden responder de manera diferencial a las variaciones en la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH. Una alta frecuencia de pulsos (aprox. cada 30 minutos) favorece la liberación de LH (Papavasiliou y col., 1986), mientras que pulsos de menor frecuencia (2 a 4 horas) estimulan preferencialmente la secreción de FSH (Dalkin y col., 1989). Esta regulación estaría dada tanto a nivel de la transcripción de los genes de la subunidad  $\beta$  de LH y FSH, como a través de la modificación del número de receptores de GnRH a nivel hipofisario (Katt y col., 1985). Hasta el momento no se conoce el mecanismo a través del cual las células de la hipófisis pueden distinguir la frecuencia de los pulsos hipotalámicos. Sin embargo, se ha propuesto que la activación transcripcional del gen de la subunidad  $\beta$  de FSH estaría relacionada con la activación diferencial de determinadas vías de señalización y con la abundancia relativa de factores transcripcionales estimulatorios e inhibitorios en el promotor de este gen, como por ejemplo FOS y JUN, SKIL y TGIF1 (Kanasaki y col., 2005; Bernard y col., 2010; Mistry y col., 2011).

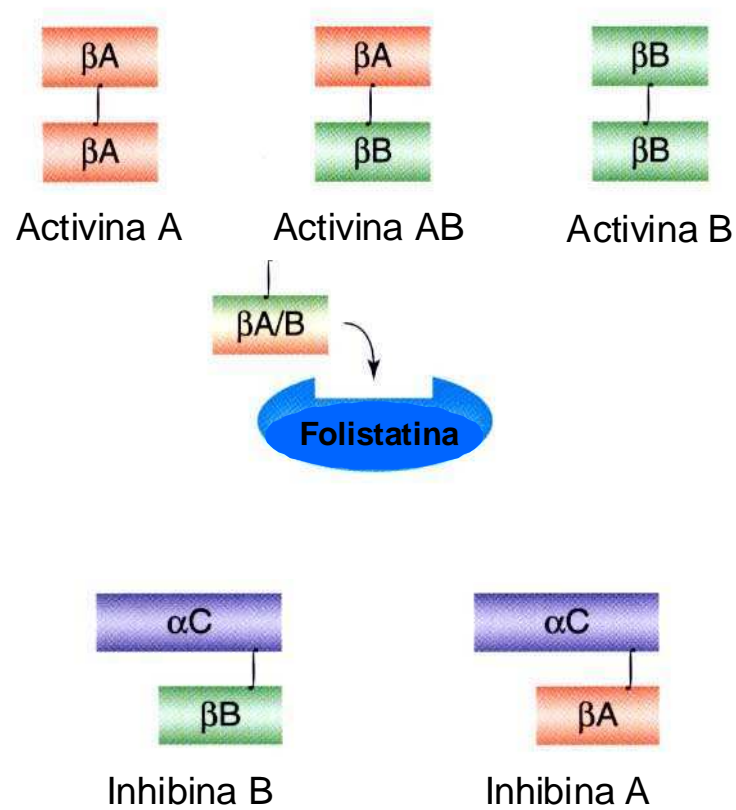
Otros productos secretados por los componentes del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal intervienen en los mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de esta gonadotropina; las activinas, inhibinas y folistatinas son factores regulatorios específicos (Ying, 1988; Bilezikjian y col., 2001; 2011) (Fig. 4).

Las activinas, inicialmente llamadas Proteínas Liberadoras de FSH (FSH Releasing Protein, FRP) son hormonas glicoproteicas formadas por dos subunidades  $\beta$  unidas por

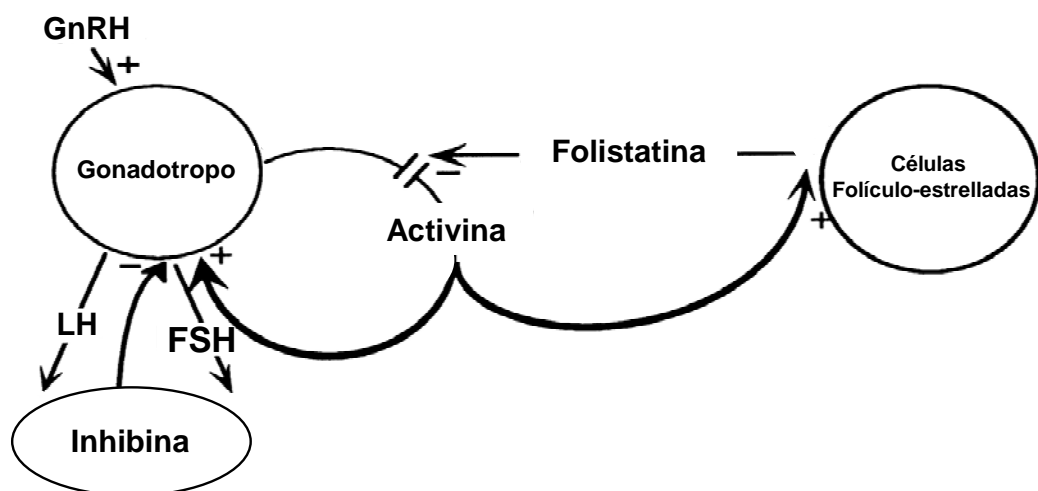
puentes disulfuro; en mamíferos se han identificado hasta el momento subunidades  $\beta$ A,  $\beta$ B,  $\beta$ C y  $\beta$ E (Hötten y col., 1995; Hashimoto y col., 2002). La unión de dos subunidades  $\beta$ A da lugar a la formación de activina A, dos subunidades  $\beta$ B activina B y el heterodímero  $\beta$ A- $\beta$ B, forma la activina AB (Fig. 4). Se ha demostrado la presencia de subunidad  $\beta$  en varios órganos: hipófisis, riñón, hígado, gónadas, etc. (Meunier y col., 1988). Estos dímeros actúan sobre los gonadotropos mediante la interacción secuencial con uno de los dos receptores tipo II de activinas (ACVR2A/B) y el receptor de tipo I (ACVR1), estimulando la expresión de la subunidad  $\beta$  de FSH como también la secreción de la gonadotropina y la sensibilidad de los gonadotropos al GnRH, pues estimula la expresión de su receptor (Ying, 1988; Weis y col., 1995; Fernández-Vázquez y col., 1996; Norwitz y col., 2002).

Las inhibinas son hormonas glicoproteicas, secretadas por las células de la granulosa en el ovario o por las células de Sertoli en el testículo, formadas por una subunidad  $\alpha$  común, la cual está unida por puentes disulfuros a la subunidad  $\beta$ A o  $\beta$ B de inhibina/activina (Schwall y col., 1990; Roberts y col., 1989). El heterodímero resultante de la unión de las subunidades  $\alpha$ - $\beta$ A es llamado inhibina A, mientras que la proteína formada por las subunidades  $\alpha$ - $\beta$ B constituye la inhibina B (Fig. 4). Estas proteínas forman parte del sistema endocrino que regula específicamente la función del eje hipófiso-ovárico, uniéndose a los receptores de activinas en los gonadotropos y de esta manera, ejercen un efecto antagónico competitivo (Lewis y col., 2000) (Fig. 5). El betaglicano, un co-represor también conocido como TGFBR3, aumenta la afinidad de las inhibinas por los receptores de activina acentuando el efecto antagónico de estos péptidos (Lewis y col., 2000; Waiter y col., 2009).

Finalmente, la folistatina, inicialmente llamada Proteína Inhibidora de FSH (FSH Suppressing Protein, FSP), tiene la capacidad de regular la actividad biológica de las activinas, pues se une a las mismas con alta afinidad y de esa manera el complejo activina-folistatina es biológicamente inactivo (Nakamura y col., 1990; de Kretser y col., 2002). Ejerce su acción de forma autocrina o paracrina ya que es sintetizada por los gonadotropos y por las células folículo-estrelladas (Bilezikjian y col., 2003) (Fig. 5).



**Figura 4:** Representación esquemática de las estructuras de las activinas, folistatina e inhibinas (tomado y modificado de Bilezikjian y col., 1994).



**Figura 5:** Mecanismos de regulación autocrina, paracrina y endocrina a nivel hipofisario por parte de la familia de péptidos inhibinas/activinas y folistatina (tomado y modificado de Bilezikjian y col., 1994).

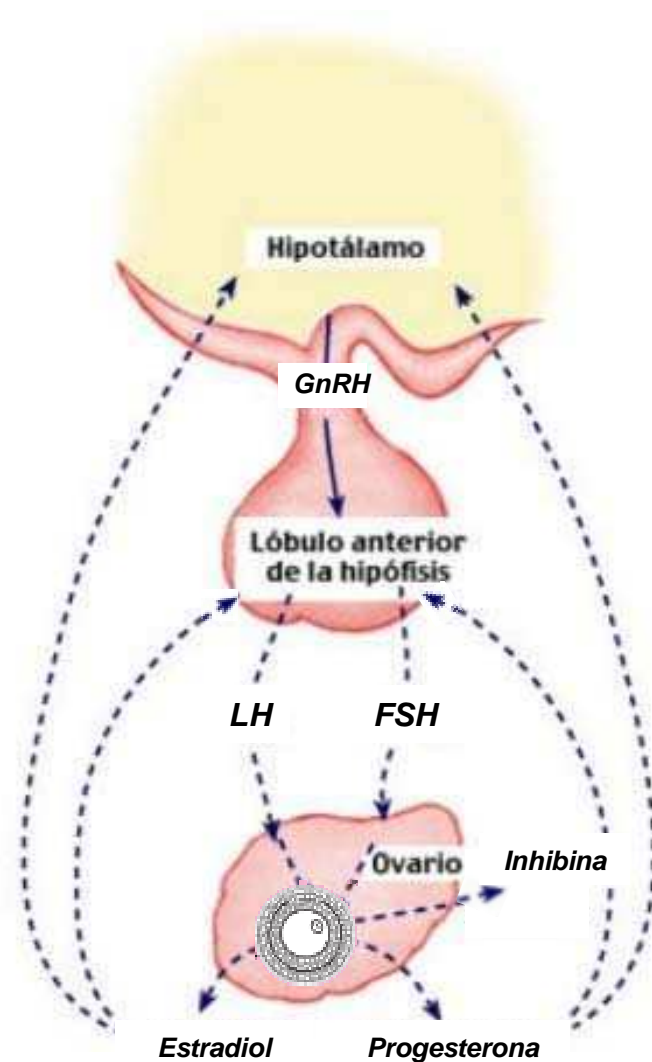


Las gónadas, en respuesta principalmente a las gonadotrofinas y también a un complejo sistema de regulación autocrina y paracrina, secretan esteroides sexuales, los cuales actúan a nivel hipotalámico o directamente sobre la hipófisis, regulando la síntesis y secreción de las gonadotrofinas.

Los estrógenos ejercen, en forma dosis-dependiente, efectos inhibitorios y estimulatorios sobre la secreción de LH y FSH (Nakai y col., 1978). Bajas concentraciones de estrógenos ejercen una acción inhibitoria tanto a nivel hipotalámico, modificando la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH, como a nivel hipofisario, modulando el número de receptores de este péptido (Kamel y col., 1987; Kaiser y col., 1993). En cambio, una exposición prolongada del hipotálamo a concentraciones crecientes de estrógenos induce la liberación de GnRH y como consecuencia, estimulan la descarga de ambas gonadotrofinas (Levine y col., 1985).

La acción de la progesterona sobre la secreción de las gonadotrofinas es compleja y se ha observado puede ejercer un efecto inhibitorio o estimulatorio de acuerdo al tono estrogénico que la acompaña y a la presencia de activina (Leadem & Kalra, 1984; Miyake y col., 1993).

Los principales componentes y factores reguladores endocrinos de la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal se esquematizan en la Figura 6.



**Figura 6:** Regulación endocrina de la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, FSH: hormona folículo estimulante, LH: hormona luteinizante.

### 3. Acción de la FSH sobre la función de la gónada femenina

#### 3.1. Regulación del desarrollo folicular

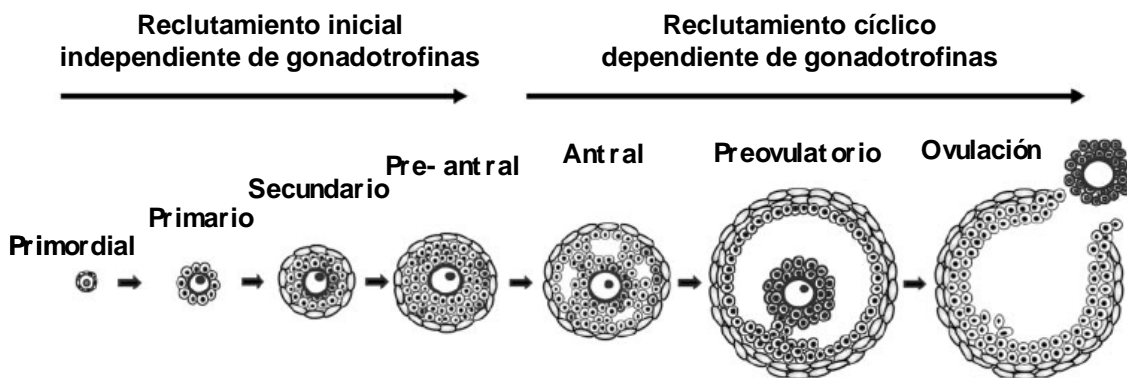
La FSH es el principal estímulo para el crecimiento y maduración folicular. La importancia de esta gonadotropina fue demostrada en ratones hembras deficientes en la subunidad  $\beta$  de FSH o “knockout” del receptor de FSH, ya que en estos animales los folículos han alcanzado el estadio antral, pero no se observan grados más avanzados de

desarrollo ni ovulación, razón por la cual resultan ser infértiles (Kumar y col., 1997; Abel y col., 2000). También la infertilidad se ha asociado a mujeres que expresan variantes no funcionales del receptor de FSH (Aittomaki y col., 1995).

El desarrollo folicular es dependiente de cambios secuenciales en las interacciones célula-célula, en la expresión de factores locales y endocrinos como las gonadotrofinas hipofisarias (McGee & Hsueh, 2000; Richards, 2001; Knight y col., 2012) (Fig. 7). Durante el reclutamiento inicial, independiente de gonadotrofinas, una cohorte de folículos primordiales comienza su crecimiento estimulado por factores, principalmente intraováricos, entre los cuales se conocen el Factor de Diferenciación 9 (GDF-9), el factor inhibitorio de leucemia (LIF) y la Proteína Morfogenética del Hueso 4 (BMP-4) (Elvin y col., 1999). El desarrollo de estos pequeños folículos hasta folículos primarios y secundarios es regulado por otros factores, derivados de la célula de la granulosa como la hormona antimulleriana (AMH), WT1, Wnt 4, inhibinas, activinas, Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Transformante  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF), Factor de Crecimiento Insulino-símil (IGF-1), los que provienen de las células de la teca, Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) y los producidos por el ovocito, GDF-9, BMP15 (Liu y col., 1999; Monget & Bondy, 2000). Entre estos factores la activina y el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF) han sido propuestos como responsables de la inducción de la síntesis de los receptores de FSH en las células de la granulosa (Findlay y col., 2000; Romero y col., 2002).

A medida que el folículo se desarrolla adquiere la capacidad de responder a FSH, de sintetizar los tres tipos de esteroides ováricos (progestágenos, andrógenos y estrógenos) y comienza a acumularse el fluido folicular en los espacios intercelulares hasta formar el antro. En el estadio antral la mayoría de los folículos de la cohorte sufre atresia; sin embargo, un cierto número de ellos continúa su desarrollo por acción de la FSH, también denominada *factor de rescate*. Este reclutamiento cíclico ocurre si la concentración de la gonadotrofina es lo suficientemente elevada. Posteriormente, de este grupo de folículos se selecciona el folículo dominante, o más de uno, en el caso de las especies poliovulares como la rata. Si bien no se conoce el mecanismo exacto por el

cual esta selección ocurre, se ha propuesto que uno de los folículos crece más rápidamente, probablemente por presentar una mayor sensibilidad a la FSH y secretar a circulación niveles altos de estrógenos e inhibina B. En estas condiciones se suprime la liberación hipofisaria de FSH hasta niveles que son insuficientes para el desarrollo de los otros folículos de la cohorte (Baker & Spears, 1999). Concomitantemente, un aumento local de factores de crecimiento y factores angiogénicos contribuyen a la selección del folículo dominante, asegurando su crecimiento final y eventual ovulación.



**Figura 7:** Clasificación de los principales estadios del desarrollo folicular (tomado y modificado de Edson y col., 2009).

### 3.2. Receptor de FSH y mecanismo de acción

La acción de FSH sobre el ovario se inicia cuando la gonadotrofina se une a sus receptores específicos en la membrana plasmática de las células de la granulosa (Midgley, 1973; Simoni y col., 1997). Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), o también denominada de 7 pasos transmembrana. La secuencia aminoacídica deducida para el receptor humano tiene aproximadamente un 90% de homología con el receptor clonado de rata (Heckert y col., 1992), siendo los dominios transmembrana las regiones más conservadas con un 95% de similitud (Simoni & Gromoll, 2005). La unión de la FSH con su receptor (FSH/FSHR), a

través del dominio NH<sub>2</sub>-terminal extracelular, involucra una serie de cambios conformacionales que se propagan a través de la membrana, y permiten la exposición de motivos o secuencias particulares importantes para el acoplamiento y activación de los efectores intracelulares (Días y col., 2005). Múltiples mecanismos de señalización se han descrito por activación del complejo FSH/FSHR (Hunzicker-Dunn & Maizels, 2006; Ulloa-Aguirre y col., 2007; Gloaguen y col., 2011).

El mecanismo clásico de transducción de la señal de FSH involucra la activación de una proteína G<sub>s</sub> (proteína G estimuladora) seguido de la disociación de la subunidad  $\alpha$ , la cual estimula la adenilato ciclasa provocando un incremento en los niveles intracelulares de AMPc. Como consecuencia de la producción del nucleótido cíclico se produce la activación de la proteína quinasa A (PKA). La fosforilación específica por PKA origina cambios en la estructura y función de enzimas, factores regulatorios o proteínas estructurales de la célula blanco (Griswold, 1993).

Aunque la activación de PKA ha sido considerada fundamental para mediar la acción de FSH, numerosos efectos no han podido ser explicados por el mecanismo clásico AMPc/PKA y se ha demostrado que diferentes cascadas son activadas por FSH a través de mecanismos dependiente e independientes de esta vía. Se ha descrito, por ejemplo, que FSH induce la movilización de iones Ca<sup>2+</sup>, la activación de las cascadas de proteínas kinasas activadas por mitógenos (RAF/MEK1,2/ERK1,2), fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/PKB), kinasa inducida por glucocorticoides (SGK), tirosinas kinasas SRC (Rous sarcoma oncogene) (SFK), entre otros (Gloaguen y col., 2011).

### 3.3. Regulación de la función de la célula de la granulosa

La FSH desempeña un importante papel en el desarrollo de los folículos ováricos debido a que ejerce su acción específicamente sobre las células de la granulosa, modulando:

- ❖ la esteroidogénesis, ya que estimula la actividad y expresión de la enzima P450-aromatasa (Erickson & Hsueh, 1978; Fitzpatrick & Richards, 1991);

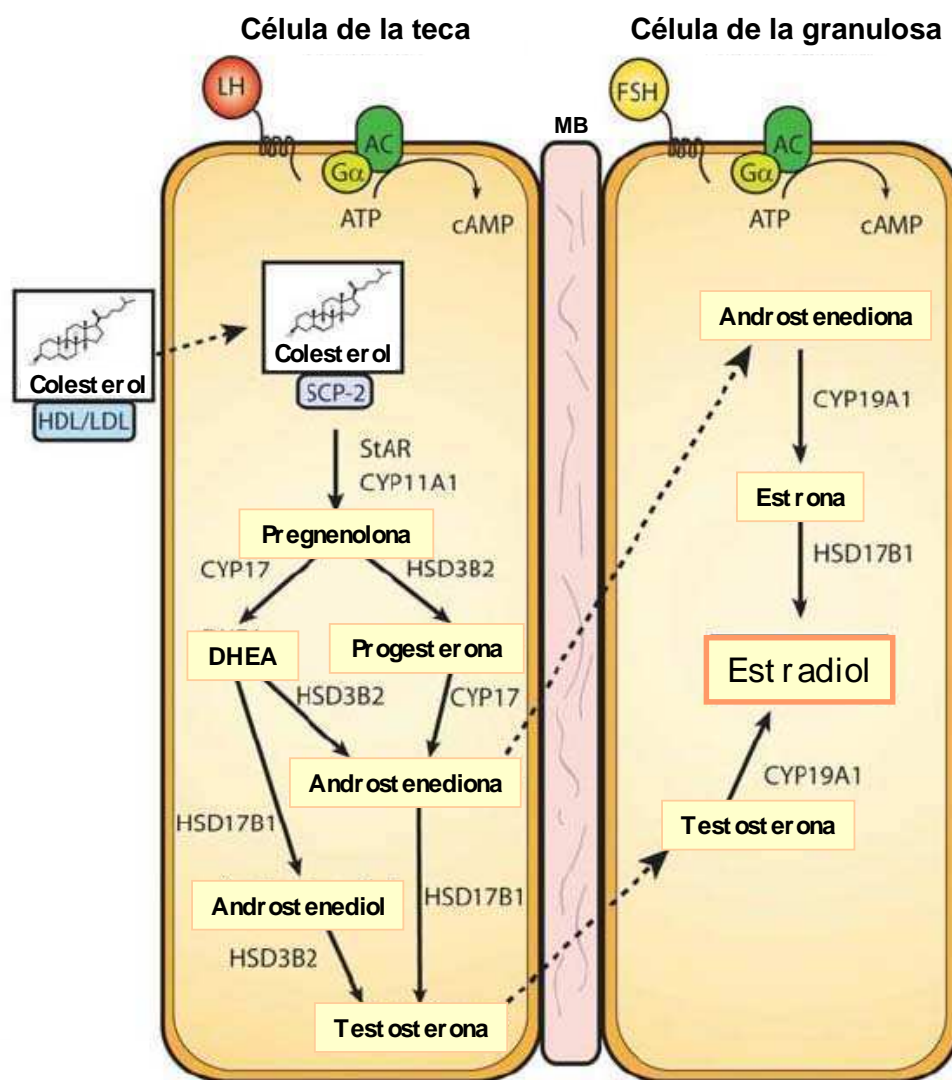
- ❖ la proliferación celular, regulando la expresión de proteínas como ciclina D2 y PCNA, actuando sinérgicamente con los estrógenos y la activina, entre otros factores (Sicinski y col., 1996; Robker & Richards, 1998; El-Hefnawy & Zeleznick, 2001);
- ❖ el metabolismo energético, contribuyendo a la incorporación de glucosa y formación de lactato (Roy y col., 1999; Roberts y col., 2004);
- ❖ la diferenciación celular, induciendo la expresión de receptores de LH (Zeleznik y col., 1974; Piquette y col., 1991);
- ❖ la adquisición de la capacidad enzimática necesaria para la ruptura folicular y síntesis de progesterona, regulando la expresión del activador del plasminógeno tisular (tPA) (Karakji y col., 1995; Yang y col., 2008), la Proteína Reguladora de la Esteroidogénesis Aguda (STAR), la enzima citocromo P450SCC, la 3- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II (3 $\beta$ HSDII) (Goldring y col., 1987; Eimerl & Orly, 2002), receptor de lipoproteínas de baja densidad, LDLR (LaVoile y col., 1999);
- ❖ la formación de uniones comunicantes entre células o “gap junctions”, modificando la expresión de las conexinas, implicadas en la formación de estas estructuras (Johnson y col., 2002; Barrios-de Tomasi y col., 2006);
- ❖ la expresión de péptidos, a través de la regulación de las subunidades de inhibina/activina (Woodruff et al., 1987; LaPolt y col., 1990; Lanuza y col., 1999).

### 3.3.1. Regulación de la síntesis de esteroides e inhibinas

Las células de la granulosa y de la teca del ovario responden diferencialmente a las gonadotrofinas, FSH y LH, desarrollando distintas capacidades enzimáticas para sintetizar y metabolizar los andrógenos a estrógenos. Varios estudios sobre estos dos tipos celulares llevaron a proponer la hipótesis de *dos células-dos gonadotrofinas* (Armstrong y col., 1979; Hiller y col., 1994) (Fig. 8).

De acuerdo a esta hipótesis, la unión de LH a su receptor en las células de la teca lleva a la expresión de una serie de genes involucrados en la producción de andrógenos.

Debido a que las células de la granulosa no cuentan con el complejo citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa:C-17,20 liasa necesario para la síntesis de los mismos, la producción de estrógenos depende del aporte del sustrato aromatizable (principalmente androstenediona) proveniente de la célula de la teca. Estos precursores de esteroides C19 son transferidos a través de la membrana basal del folículo a las células de la granulosa las cuales, por acción de la aromatasa sintetizan los estrógenos bajo estímulo de FSH.



**Figura 8:** Esquema de la hipótesis de dos células-dos gonadotropinas en la producción folicular de estrógenos. LH: Hormona Luteinizante; FSH: Hormona Folículo-Estimulante; MB: membrana basal; ATP: Adenosina Trifosfato ; AMPc: Adenosina Monofosfato cíclico; AC: adenilato ciclasa; STAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis; aguda, CYP11A1: P450SCC, colesterol desmolasa; HSD3B2: 3- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II; CYP17: citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa:C-

17,20 liasa ; CYP19A1: citocromo P450 aromatasas; HSD17B1: 17  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I; SCP-2: proteína transportadora de esteroides tipo 2; HDL/LDL: lipoproteínas de alta y baja densidad (tomado y modificado de Lapointe y col., 2011).

Las células de la granulosa tienen la capacidad de producir varios de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ : inhibinas, activinas y follistatina. El principal estímulo para la producción de inhibinas es la FSH; este efecto estimulador es más marcado sobre la producción de la subunidad  $\alpha$  de inhibina. Factores como IGF-I, TGF- $\beta$  y activina A intervienen en el mecanismo de regulación de las inhibinas afectando la relación inhibina A/inhibina B (Lanuza y col., 1999). La expresión del gen de la subunidad  $\beta$  de inhibina y la consecuente síntesis de inhibina B, estaría regulada principalmente por los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  (activina A, TGF- $\beta$ ) y por factores provenientes del ovocito. La acción de FSH, estrógenos e IGF-I, producido en la misma célula de la granulosa, favorecería la síntesis de inhibina A (Lapolt y col., 1990; Drummond y col., 2000; Kaivo-Oja y col., 2003).

### **3.3.2. Niveles hormonales séricos durante el ciclo menstrual**

El ciclo menstrual refleja el funcionamiento cíclico del ovario como producto del complejo mecanismo de regulación del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico por factores endocrinos, autocrinos y paracrinos que modulan el desarrollo folicular, la ovulación, la luteinización y la luteólisis. Durante el ciclo menstrual, los niveles circulantes de gonadotropinas, esteroides y péptidos gonadales se modifican presentando perfiles cíclicos, bien definidos (Muttukrishna y col., 1994; Groome y col., 1996; Sehested y col., 2000) (Fig. 9).

Durante la transición luteo-folicular, los niveles de FSH se incrementan y sus niveles máximos se alcanzan en la fase folicular media. El aumento de la secreción de esta gonadotropina inicia el reclutamiento folicular, contribuyendo al incremento en los niveles de inhibina B y estradiol. Los niveles de FSH, en respuesta al efecto inhibitorio del estradiol e inhibina B, disminuyen en la fase folicular tardía; limitándose de esta forma la producción de estrógenos en los folículos que no han sido seleccionados. En



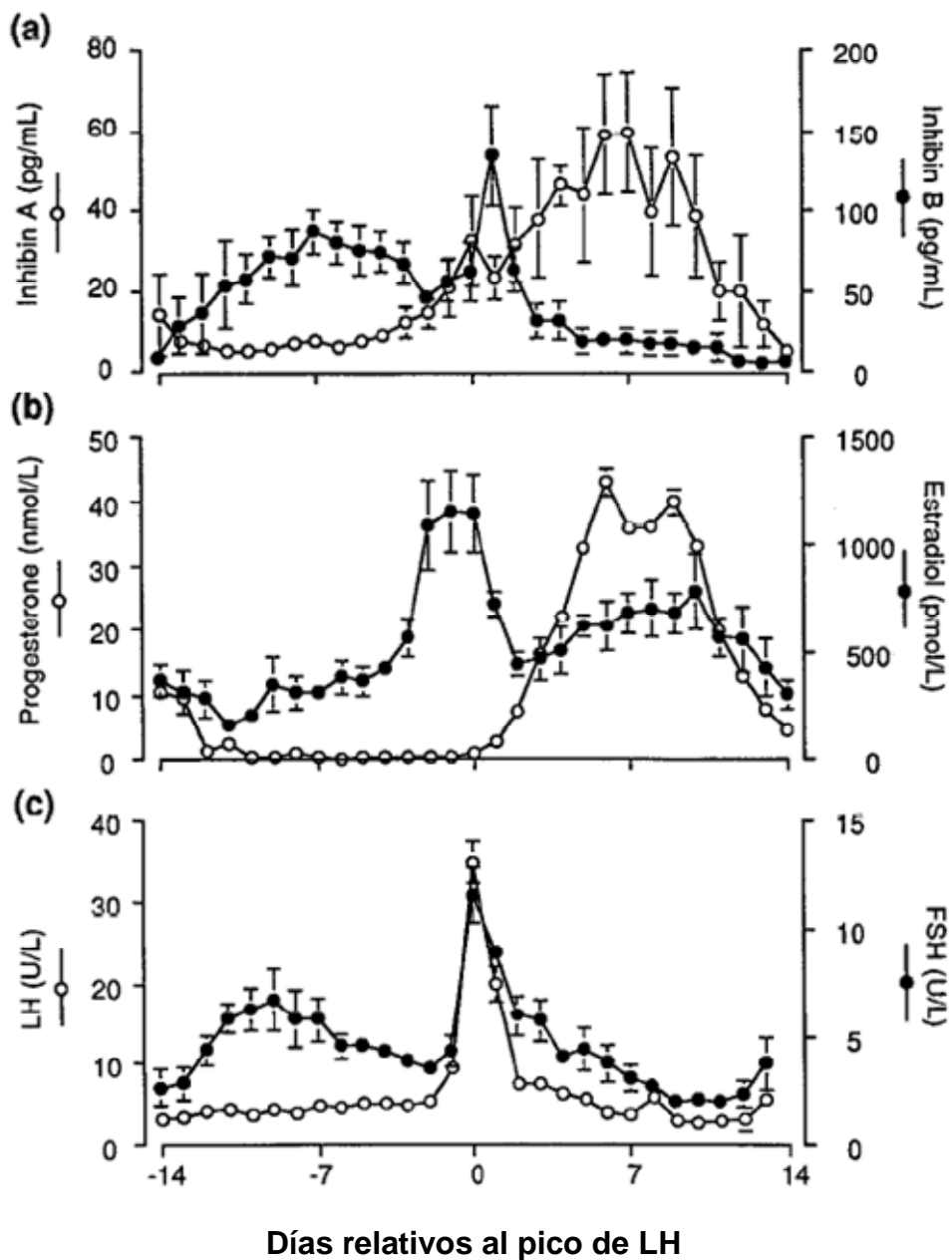
este entorno hormonal, se interrumpe la proliferación de células de la granulosa y se inicia una secuencia de eventos asociados al proceso irreversible de atresia folicular.

Los niveles circulantes de inhibina A comienza a aumentar en la fase folicular tardía, como producto de la actividad endocrina del folículo dominante.

Durante el período preovulatorio se desencadena la retroalimentación positiva ejercida por los altos niveles de estrógenos circulantes, induciendo la descarga ovulatoria de gonadotrofinas que culmina con la liberación de un oocito fertilizable.

La luteinización de las células de la granulosa y de la teca se traduce en una capacidad aumentada para sintetizar progesterona e inhibina A y en menor grado estradiol. Hacia el final del ciclo, en el caso de no producirse la fertilización del oocito y la posterior implantación, la esteroidogénesis cesa y el cuerpo lúteo regresa. Como consecuencia de la desaparición de la acción inhibitoria de los esteroides y de la inhibina A, se produce un incremento en los niveles de FSH y de este modo se asegura el reclutamiento folicular del ciclo siguiente.

La subunidad  $\alpha$  libre de inhibina también está presente en circulación tanto en la fase folicular como en la lútea del ciclo menstrual. Se ha propuesto que el ovario produce un exceso de subunidad  $\alpha$  de inhibina para posibilitar la formación de heterodímeros ( $\alpha$ - $\beta$ ). No se ha demostrado hasta el momento ninguna función de esta molécula a nivel de la regulación de la producción de FSH.



**Figura 9:** Niveles séricos de inhibina A e inhibina B (panel a), progesterona y estradiol (panel b) y gonadotrofinas (panel c) determinados durante el ciclo menstrual de mujeres jóvenes. Los días del ciclo se tomaron en relación al pico de LH (tomado y modificado de Groome y col., 1996).

## 4. Microheterogeneidad molecular de FSH

### 4.1. Función de los oligosacáridos en el mecanismo de acción de la FSH

La presencia de oligosacáridos en las moléculas de las hormonas glicoproteicas determina las características funcionales y físico-químicas de estas hormonas (Chappel, 1995). En particular, la ausencia de oligosacáridos en la molécula de FSH, si bien no interfiere en el reconocimiento y en la unión con alta afinidad al receptor específico de membrana, no permite desencadenar los mecanismos de transducción de señales en la célula blanco (Sairam & Manjunath, 1982; Manjunath y col., 1982).

El grado de procesamiento de los oligosacáridos y en consecuencia, las diferencias en la estructura de las cadenas carbohidratadas de FSH determina el tiempo de permanencia en circulación, la afinidad por el receptor y la respuesta biológica en la célula blanco (Ulloa-Aguirre y col., 1992).

El ácido siálico, residuo terminal de la cadena de carbohidratos de la molécula de FSH, está directamente involucrado en la tasa de depuración plasmática y la actividad biológica *in vivo*. Se ha demostrado que la exposición de residuos terminales de galactosa disminuye el tiempo de permanencia en circulación de la hormona a través de un mecanismo que involucra receptores para asialoglicoproteínas en las células hepáticas (Ashwell & Harford, 1982). Aquellas moléculas de hormona con menor grado de sialilación se unirán con alta afinidad al receptor antes mencionado y serán rápidamente depuradas. Por el contrario, aquellas que han incorporado ácido siálico a sus cadenas permanecerán más tiempo en circulación pues evaden el sistema de depuración hepática (Wide, 1986; Ulloa-Aguirre y col., 1992).

El ácido siálico también modula la biopotencia *in vitro* de la hormona, ya que las variantes de glicosilación más sialiladas presentan una menor afinidad por el receptor de membrana y, en consecuencia, producen una menor respuesta biológica en las células blanco (Ulloa-Aguirre & Chappel, 1982; Zambrano y col., 1999). Numerosos estudios han determinado el efecto del grado de sialilación de la FSH sobre diversos parámetros funcionales de la célula de la granulosa (Timossi y col., 2000). Utilizando como modelo experimental el cultivo de folículos aislados de ratón, se ha demostrado

que las variantes glicosiladas de FSH con menor grado de sialilación son más bioactivas debido a que inducen un mayor crecimiento de los folículos preantrales a expensas de un incremento en el número de células de la granulosa, rápida formación del antro y temprana producción de estradiol (Vitt y col., 1998).

#### 4.2. Regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de la FSH

Numerosos estudios han demostrado que el entorno hormonal modula la microheterogeneidad molecular de la FSH. Estas variaciones se observan tanto a nivel del grado de sialilación como de la complejidad de los oligosacáridos unidos a la cadena polipeptídica. Los cambios en la microheterogeneidad de la FSH estarían regulados principalmente por la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de los esteroides sexuales (Wide & Albertsson-Wikland, 1990; Wide & Naessén, 1994).

Se han descrito variaciones en la microheterogeneidad molecular de la FSH durante el ciclo menstrual. Variantes glicosiladas con alto grado de sialilación se han observado durante la fase folicular temprana y lútea, por el contrario, glicofomas con menor grado de sialilación caracterizan el periodo preovulatorio (Padmanabhan y col., 1988).

Los estrógenos favorecerían la síntesis de variantes glicosiladas de FSH con menor contenido de ácido siálico. Se ha observado que la administración de dietilelbestrol a pacientes con disgenesia gonadal disminuye significativamente el contenido de ácido siálico de la FSH circulante durante el tratamiento (Padmanabhan y col., 1988). Este efecto podría deberse a la inhibición que ejercerían los estrógenos sobre los niveles de ARNm de la enzima responsable de la adición del ácido siálico, ST3Gal III hipofisaria (Damián-Matsumura y col., 1999).

La acción del GnRH sobre microheterogeneidad molecular de la FSH ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro*. La administración de GnRH a varones y mujeres normales y niñas con síndrome de Turner, indujo en todos los casos la aparición en circulación de variantes glicosiladas de FSH con menor grado de sialilación (Wide & Albertsson-

Wikland, 1990; Zambrano y col., 1995). Un efecto similar ha sido demostrado al agregar GnRH a cultivos de células hipofisarias (Ulloa-Aguirre y col., 1992).

### **4.3. Microheterogeneidad molecular de la FSH circulante**

Se ha demostrado que las características de la microheterogeneidad molecular de la FSH sérica varían en distintas condiciones fisiológicas de la mujer. Diferencias en el grado de sialilación y complejidad de las cadenas de carbohidratos unidas a la FSH fueron descritas cuando se comparó el grado de procesamiento de los oligosacáridos en la fase folicular de ciclos espontáneos en mujeres jóvenes respecto del observado en mujeres post-menopáusicas. Estos cambios no solo se relacionaron con el tipo de variante glicosilada que se secreta, sino también con la abundancia relativa de las mismas. Durante la fase folicular de ciclos menstruales ovulatorios en mujeres jóvenes se han encontrado en circulación solamente glicoformas de FSH con alto grado de procesamiento de sus oligosacáridos: la hormona presenta proporciones similares de glicoformas con oligosacáridos altamente ramificados y de tipo biantenarios y truncados. En cambio, en las mujeres post-menopáusicas desaparecen las glicoformas con oligosacáridos altamente ramificados, predominan las moléculas de FSH con cadenas biantenarias y aparecen en circulación glicoformas que no han completado el procesamiento de sus carbohidratos. Si bien en ambas situaciones fisiológicas se observan 2 tipos de variantes glicosiladas con diferente grado de procesamiento de sus oligosacáridos, comparten sólo un grupo de ellas, las que poseen cadenas biantenarias y truncadas (Creus y col., 1996; Velásquez y col., 2006).

En la perimenopausia, definida solo por la edad de la mujer, existe una alteración tanto en el grado de procesamiento como en la abundancia relativa de las variantes glicosiladas de FSH cuando se las compara con las observadas en la fase folicular de ciclos ovulatorios en mujeres jóvenes. Durante este período aumenta el grado de sialilación de la hormona y disminuyen las glicoformas con oligosacáridos altamente ramificados con la concomitante aparición en circulación de las que presentan un procesamiento incompleto de sus carbohidratos; es decir que aparecen

en circulación los tres tipos de glicofomas con distinto grado de complejidad en sus oligosacáridos. Los cambios dados en la microheterogeneidad molecular de la FSH no se evidencian en alteraciones de los niveles séricos de la gonadotropina ni en la longitud de los ciclos menstruales; sin embargo, estas características se asocian con una disminución en los niveles circulantes de inhibina B (Loreti y col., 2009). Cambios similares habían sido descritos durante la amenorrea de la lactancia, período caracterizado por la anovulación, niveles normales de estradiol y de FSH inmunológica (Velásquez y col., 2006).

# *Objetivos*

## OBJETIVO GENERAL

*El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue establecer la relación existente entre las características de los carbohidratos presentes en la molécula de FSH y la inducción de respuestas biológicas en las células de la granulosa*

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### **Objetivo 1**

Caracterizar y aislar las variantes glicosiladas presentes en una preparación de FSH recombinante humana, de acuerdo al grado de sialilación y complejidad de sus oligosacáridos.

### **Objetivo 2**

Determinar el efecto del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh sobre la producción de inhibinas diméricas en células de la granulosa de rata en cultivo.

### **Objetivo 3**

Evaluar la respuesta biológica inducida por las diferentes variantes glicosiladas de FSHrh sobre la actividad endocrina de la línea celular de granulosa humana, KGN.

### **Objetivo 4**

Analizar el efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre el perfil de expresión génica global de la línea celular de granulosa humana, KGN.



**Objetivo 5**

Determinar la posible implicancia del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh sobre la expresión de genes de interés en la línea celular de granulosa humana, KGN.

**Objetivo 6**

Determinar las características de los oligosacáridos presentes en la FSH sérica en mujeres jóvenes infértiles que recurren a técnicas de reproducción asistida.

# ***Materiales y Métodos***

## **1. Drogas y Reactivos**

La FSHrh (AFP8468A), los estándares de referencia de FSH, LER 907, el estándar de FSH utilizado para marcación, FSH-I-SIAFP-1 y el anticuerpo de FSH, anti-hFSH-6, fueron provistos por el National Hormone & Peptide Program, NIDDK, Harbor-UCLA Medical Center (Torrance, CA, USA). El anticuerpo anti-IgG de conejo fue provisto por el Dr. Enriori.

El dietilestilbestrol (DES) y los anfolitos (Pharmalyte, con rango de pH 3.5-10 y 2.5-5) fueron obtenidos en Sigma-Aldrich Co, (St. Louis, MO, USA) y las membranas concentradoras Centriprep, con un tamaño de poro de 10.000 fueron provistas por Amicon (Beverly, MA, USA).

La lectina Concanavalina A conjugada a Sepharosa 4B, el detergente CHAPS (3-[[3-colamidopropil] dimetilamonio])-1-propano sulfonato) y las columnas utilizadas para purificar la FSH marcada (Sephadex G-25, PD-10) fueron adquiridas en GE Healthcare Bio-Sciences AB, (Uppsala, Suecia).

El medio de cultivo DMEM:F12, el suero fetal bovino y los antibióticos: gentamicina, penicilina, estreptomycin y anfotericina B fueron obtenidos en Gibco® by Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA).

El estradiol radiactivo [6,7-<sup>3</sup>H(N)] (<sup>3</sup>H-estradiol) actividad específica (AE): 60 Ci/mmol y la progesterona radiactiva [1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N)] (<sup>3</sup>H-progesterona) AE: 97 Ci/mmol fueron provistos por PerkinElmer NEN® (Boston, MA, USA). Los esteroides no radioactivos utilizados en los radioinmunoensayos se adquirieron en Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA). El anticuerpo anti-progesterona fue gentilmente cedido por el Dr. G.D. Niswender (Animal Reproduction and Biotechnology Lab, Department of Physiology, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) y el anticuerpo anti-estradiol fue adquirido en Immunocorp (Montreal, Canadá).

Las placas adsorbidas con los anticuerpos monoclonales para la detección de inhibina A, B y subunidad  $\alpha$  de inhibinas (E4, C5, INPRO), los anticuerpos de detección (R1 acoplado a fosfatasa alcalina) y el kit amplificador para ELISA utilizado para la determinación de inhibina B fueron provistos por Oxford Bio-Innovation Ltd.

(Oxfordshire, Inglaterra). Las inhibinas A y B recombinantes humanas utilizadas como estándares para la determinación de estas proteínas diméricas fueron adquiridas en Genentech (San Francisco, CA, USA). El kit amplificador para ELISA (ELISA Amplification System) utilizado para la determinación de Pro- $\alpha$ C e inhibina A fue adquirido en Invitrogen by Life Technologies Corporation, (Carlsbad, CA, USA).

El kit de detección de inhibina B sérica GenII ELISA (A81301) fue provisto por Beckman Coulter, Inc. (Chaska, MN, USA).

El bisbenzimidazol (Hoechst 33258) fue adquirido en Sigma-Aldrich Co, (St. Louis, MO, USA). El dietilpirocarbonato (DEPC) y la agarosa fueron provistos por GE Healthcare Bio-Sciences AB, (Uppsala, Suecia). El kit de extracción de ARN ("RNeasy Mini Kit") fue adquirido en Qiagen (Hilden, Alemania) y el reactivo de Trizol<sup>®</sup> fue provisto por Invitrogen by Life Technologies, (Carlsbad, CA, USA). Para la retrotranscripción y las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis y kit LightCycler<sup>®</sup> Taqman<sup>®</sup> Master, respectivamente, provistos por Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). Los cebadores fueron adquiridos en Integrated DNA Technologies Inc (México DF, México).

Todos los reactivos empleados para la preparación de soluciones y medios fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co, (St. Louis, MO, USA).

## **2. Material biológico**

### **2.1 Células de la granulosa de rata**

Las células de la granulosa de rata se obtuvieron de ovarios provenientes de ratas hembra (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley de 21-23 días de edad, tratadas con dietilestilbestrol (DES). Los animales fueron criados en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET) y mantenidos en un esquema de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con humedad y temperatura (21-23°C) controladas, a las cuales se les suministró alimento balanceado estándar y agua a voluntad. Todos los procedimientos utilizados para la manipulación de los animales se realizaron de acuerdo a las pautas establecidas por el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH, USA).

### **2.2 Línea Celular de granulosa humana**

La línea celular KGN, obtenida a partir de un carcinoma de células de la granulosa, fue cedida gentilmente por el Dr. Mashatoshi Nomura, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Science, Kyushu University.

### **2.3 Material Clínico**

Participaron en este estudio 23 mujeres, las cuales manifestaron el deseo de participar como voluntarias y firmaron el correspondiente consentimiento informado. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital de Niños, R. Gutiérrez, el cual se adjunta a esta Tesis Doctoral.

Los grupos de estudio fueron los siguientes:

➤ **Grupo control (C)**

Se seleccionaron 8 mujeres entre 21 y 40 años, de edad de fertilidad comprobada.

Se extrajeron dos muestras de sangre de cada voluntaria, la primera fue tomada en la fase folicular media (día  $9 \pm 1$ ) y la segunda se obtuvo en la fase lútea (día  $21 \pm 1$ )

del ciclo menstrual. Las muestras fueron centrifugadas a 700 x g durante 10 minutos y los sueros obtenidos se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

➤ **Ovodonantes (Ov)**

Se estudiaron 7 mujeres (22-32 años de edad) con fertilidad comprobada, las cuales participaron en los protocolos de estimulación ovárica como donantes de ovocitos en el Instituto de Medicina Reproductiva *Fecunditas*.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en la fase folicular media del ciclo menstrual (día  $9 \pm 1$ ) previo a la estimulación con gonadotrofinas.

➤ **Pacientes con Trastornos Reproductivos (PTR)**

Se estudiaron 6 pacientes, mayores de 30 y menores de 40 años, que concurren a la consulta al Instituto de Medicina Reproductiva *Fecunditas* por infertilidad, luego de haberse sometido a Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) que no resultaron exitosas.

La Infertilidad se define, siguiendo las pautas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (2008), como la incapacidad de una pareja de lograr un embarazo clínico, luego de mantener relaciones sexuales durante un año o más sin la utilización de métodos anticonceptivos. La existencia de alteraciones en el factor masculino en estas pacientes fue descartada.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en la fase folicular media del ciclo menstrual (día  $9 \pm 1$ ), previo a un nuevo tratamiento de estimulación con gonadotrofinas.

Criterios de inclusión para los tres grupos estudiados:

- a) ciclos menstruales regulares entre 25 y 35 días;
- b) índice de masa corporal  $\leq 30 \text{ Kg/m}^2$ ;
- c) no fumadoras;
- d) que no recibieran ningún tratamiento hormonal ni se encontraran bajo medicación alguna al momento de participar de este estudio;

- e) en caso de que las ovodonantes o las pacientes con trastornos reproductivos hubieran participado anteriormente de un protocolo de estimulación ovárica, se requirió un período previo sin tratamiento hormonal no menor a 90 días.
- f) con consentimiento informado para participar de la investigación.

Las determinaciones hormonales de FSH, LH, estradiol, Pro- $\alpha$ C e inhibina B y el análisis de los análogos de carga de FSH se realizaron en forma individual a partir de los sueros obtenidos en fase folicular del ciclo menstrual en los tres grupos de estudio. La determinación de los niveles de progesterona, para corroborar la ovulación en el grupo control, se realizó en la fase lútea del ciclo menstrual.

#### Protocolo de estimulación ovárica

Las ovodonantes y las pacientes con trastornos reproductivos realizaron el siguiente protocolo habitual de estimulación hormonal del Instituto *Fecunditas*.

En el día  $18 \pm 1$  del ciclo inicial, se realizó una ecografía ovárica transvaginal para corroborar la ovulación. A partir de ese momento se inició el protocolo con un régimen de Acetato de Norestisterona que se administró durante 7 días. El análogo de GnRH, acetato de Leuprolide, fue administrado en forma conjunta con el progestágeno y posteriormente, hasta el día en que se suspendió la administración de gonadotrofinas. Una vez discontinuada la administración del progestágeno y habiendo transcurrido tres días de menstruación se inició la estimulación con FSHrh en dosis diarias de 1200 y 1750 UI/día. Cuando los folículos alcanzaron un diámetro mayor de 20-22 mm se suspendió la administración de FSHrh y se sincronizó la ovulación con hCG. Se realizó la aspiración de los folículos, se recuperaron los ovocitos de los fluidos foliculares y se clasificaron previamente a la inseminación o inyección de los espermatozoides dentro de los óvulos. Se verificó la fecundación con la realización del score de pronúcleos y se registró el tiempo de clivaje temprano.

Los ovocitos obtenidos fueron evaluados morfológicamente de acuerdo a la cantidad de capas de células del cumulus y homogeneidad del ooplasma en cuatro categorías:

- categoría A: ovocitos con ooplasma homogéneo y multicapas ( $\geq 5$ ) de células del cumulus densas y compactas.
- categoría B: ovocitos con ooplasma homogéneo y multicapas (3-4) de células del cumulus densas y compactas.
- categoría C: ovocitos con ooplasma semi-homogéneos y capas (1-2) de células del cumulus menos densas.
- categoría D: ovocitos desnudos degenerados.

### **3. Métodos**

#### **3.1. Aislamiento de las variantes glicosiladas de FSH**

##### **3.1.1. FSH recombinante humana**

-Para aislar los análogos de carga de la FSHrh se resuspendieron 4 ampollas de la preparación original (equivalentes a 100 mg LER 907) en 1.5 mL de agua ultrapura (Barnstead NANOPure II, Thermo Scientific, Baltimore, MD, USA); se reservó una alícuota de 0.1 mL para la determinación del contenido de FSH por RIE y el remanente se sembró en la celda de isoelectroenfoque con el objetivo de separar las variantes glicosiladas de acuerdo al grado de sialilación de los oligosacáridos.

-Para aislar las glicofomas de la FSHrh de acuerdo al grado de complejidad de los oligosacáridos se resuspendieron 4 ampollas de la preparación original (equivalentes a 100mg LER 907) en 0.6 mL de agua ultrapura (Barnstead NANOPure II, Thermo Scientific, Baltimore, MD, USA), reservando 0.1 mL para la determinación del contenido de FSH por RIE. El volumen remanente se aplicó a la columna de lectina.

##### **3.1.2. FSH sérica**

Los sueros a analizar por isoelectroenfoque preparativo fueron dializados para disminuir la fuerza iónica y adecuarla a los requerimientos de la metodología. La diálisis



se realizó a 4°C durante 90 min, en una relación de volúmenes de 2 mL de suero/2 L de NaCl 10 mM, con un cambio de la solución salina transcurridos los primeros 45 min, para acelerar el proceso.

### **3.1.3. Aislamiento de los análogos de carga de la FSH**

#### ***-Isoelectroenfoque preparativo***

El isoelectroenfoque preparativo (IEF) permite la separación de una proteína en sus componentes microheterogéneos, de acuerdo a sus puntos isoeléctricos. El aislamiento de los análogos de carga de FSH (moléculas con distinto punto isoeléctrico) presentes en la preparación de FSHrh se realizó mediante la utilización de esta técnica, ampliamente utilizada en el laboratorio (Bedecarrás y col., 1998; Loreti y col., 2009).

El isoelectroenfoque preparativo se realizó utilizando una celda Rotofor Cell (Bio Rad, Laboratories Inc., CA, USA) con capacidad para 50 mL de muestra, una fuente de poder de potencia constante (Power/Pac 3000, Bio Rad, Laboratories Inc., CA, USA) y un baño refrigerante (Forma Scientific Inc, Marietta, OH, USA).

La celda de isoelectroenfoque posee una cámara de enfoque de forma cilíndrica con una varilla cerámica de refrigeración ubicada en forma longitudinal en el centro de la celda. La cámara de enfoque está dividida en compartimientos determinados por membranas de poliéster de 6 µm de espesor, dispuestas en forma paralela, transversalmente al eje de la celda. Estas membranas determinan 20 compartimientos, cada uno de los cuales corresponde a una fracción con un pH determinado. La separación de la muestra ocurre dentro del espacio que se establece entre la cámara y la varilla cerámica. El diseño de esta celda permite realizar todo el procedimiento de separación de análogos de carga en fase líquida y a baja temperatura, conservando de esta manera la actividad biológica de la glicoproteína analizada.

Antes de efectuar el enfoque, se realizó un pre-enfoque para establecer el gradiente de pH con una combinación de anfólitos al 3/ V/V con un rango de pH 3-10 y al 0.75/ V/V con un rango de pH 2.5-5 con el objeto de aumentar la resolución en el intervalo de pH donde enfoca la FSH. En esta misma etapa se adicionó 1/ P/V de

detergente no iónico CHAPS, alcanzando un volumen final de 35 ml con agua ultrapura (Barnstead NANOPure II, Thermo Scientific, Baltimore, MD, USA). La concentración total de anfolitos utilizada en el enfoque fue 1.5/ V/V en un volumen final de 50 mL, máxima capacidad de la cámara.

Posteriormente se sembró la alícuota de FSHrh preparada como se describió en el ítem 3.1.1 o el suero dializado como se detalló en el ítem 3.1.2. El enfoque se realizó durante 3 h a potencia constante de 12 W, manteniendo siempre refrigerada la celda. Luego de finalizado el enfoque, el contenido de cada compartimiento fue aspirado mediante un sistema de recolección simultánea. Se recogieron 20 fracciones de 2 mL las cuales fueron centrifugadas 10 min a 1700xg. De cada fracción se tomaron alícuotas de 100 µl para la determinación del pH. El material remanente fue almacenado a -20°C con el agregado de 500 µl de NaCl 4M para evitar la interacción de los anfolitos con la proteína de interés.

#### ***-Procesamiento del material obtenido por isoelectroenfoque***

Luego de determinar el pH, todas las fracciones se dializaron para eliminar los anfolitos y el detergente. La diálisis se realizó a 4°C en una relación de volúmenes de 2 mL de muestra/ 1 l de solución de NaCl 1 M. Luego de las primeras 4 h de diálisis se efectuó un cambio de la solución salina y se dejó progresar la diálisis durante toda la noche. Al día siguiente nuevamente se cambió la solución salina, transcurridas las siguientes 3 h se continuó la diálisis con agua destilada y posteriormente se efectuaron dos cambios más a la hora; el primero nuevamente con agua destilada y finalmente un cambio con solución NaCl 10 mM. Se tomaron alícuotas adecuadas de las fracciones dializadas para la posterior determinación de FSH inmunológica por RIE. Tanto estas alícuotas como el material restante fueron almacenados a -70°C hasta su posterior análisis.

### **3.1.4. Aislamiento de las glicoformas de FSH**

#### ***-Cromatografía de afinidad en lectina***

La cromatografía de afinidad en lectinas constituye un método ampliamente utilizado para el fraccionamiento de variantes moleculares de una glicoproteína. Se basa en la interacción de azúcares presentes en el oligosacárido, unido a la cadena polipeptídica, con una secuencia específica de la lectina.

El uso de diferentes lectinas inmovilizadas en un soporte inerte, con especificidades de unión perfectamente establecidas, permite fraccionar e identificar estructuralmente las diferentes glicoformas o variantes de glicosilación de una glicoproteína.

La Concanavalina A (Con A) ha sido ampliamente usada para la separación de glicoformas de diversas proteínas, entre las que se encuentran FSH (Chappel, 1981; Ulloa-Aguirre & Chappel, 1982; Foulds & Robertson, 1983; Papandreou y col., 1993), hCG (Blithe, 1990), LH (Dufau y col., 1972) y la proteína ligadora de esteroides sexuales (SHBG) (Danzo & Black, 1990).

Esta lectina posee alta afinidad de unión a residuos manosa o glucosa terminales, o a residuos glucosa o manosa internos sustituidos únicamente en la posición C-2 por otro azúcar (Ogata y col., 1975).

Teniendo en cuenta la especificidad de unión de esta lectina se pueden separar tres tipos de estructuras siguiendo el esquema de elución propuesto por Narasimhan y col. (1979):

**NR:** no retenidas por la lectina, que corresponden a polipéptidos con cadenas de carbohidratos muy ramificadas y cadenas biantenarias complejas con un residuo NAcGlc bisectado;

**DR:** débilmente retenidas por la lectina, que corresponden a polipéptidos con cadenas biantenarias completas y truncadas con residuos galactosa unidos a NAcGlc.

**FR:** fuertemente retenidas por la lectina, que corresponden a polipéptidos con cadenas con alto contenido en manosa o cadenas de tipo híbrido.

En la Figura 10 se muestran las estructuras de oligosacáridos presentes en los grupos de glicofomas de FSH aisladas.

La cromatografía en Concanavalina A se realizó de acuerdo al método descrito por Cheng y col. (1984), modificado por Creus y col. (1996). Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se utilizaron columnas de 0.6 cm de diámetro por 30 cm. de alto conteniendo 2.5 mL de gel de lectina inmovilizada. La columna fue equilibrada con solución amortiguadora (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.4).

Una vez aplicado el material a fraccionar y habiendo ingresado en la columna, se añadió 0.5 mL de solución amortiguadora y luego de que el mismo entrara en la lectina, se interrumpió el flujo durante media hora para permitir la interacción de la muestra con la Concanavalina A. Luego de este período de incubación, se agregaron a la columna 7 mL de solución amortiguadora y se recogieron en 4 fracciones (las tres primeras de 2 mL y la tercera de 1 mL) las glicofomas no retenidas (NR).

Posteriormente se añadió 0.5 mL de solución amortiguadora conteniendo metil  $\alpha$ D-glucopiranosido 10 mM (glucósido) y se interrumpió el flujo por media hora. Se agregaron 7 mL de la misma solución y se recogieron en 4 fracciones (las 3 primeras de 2 mL y la cuarta de 1 mL) las glicofomas débilmente retenidas (DR).

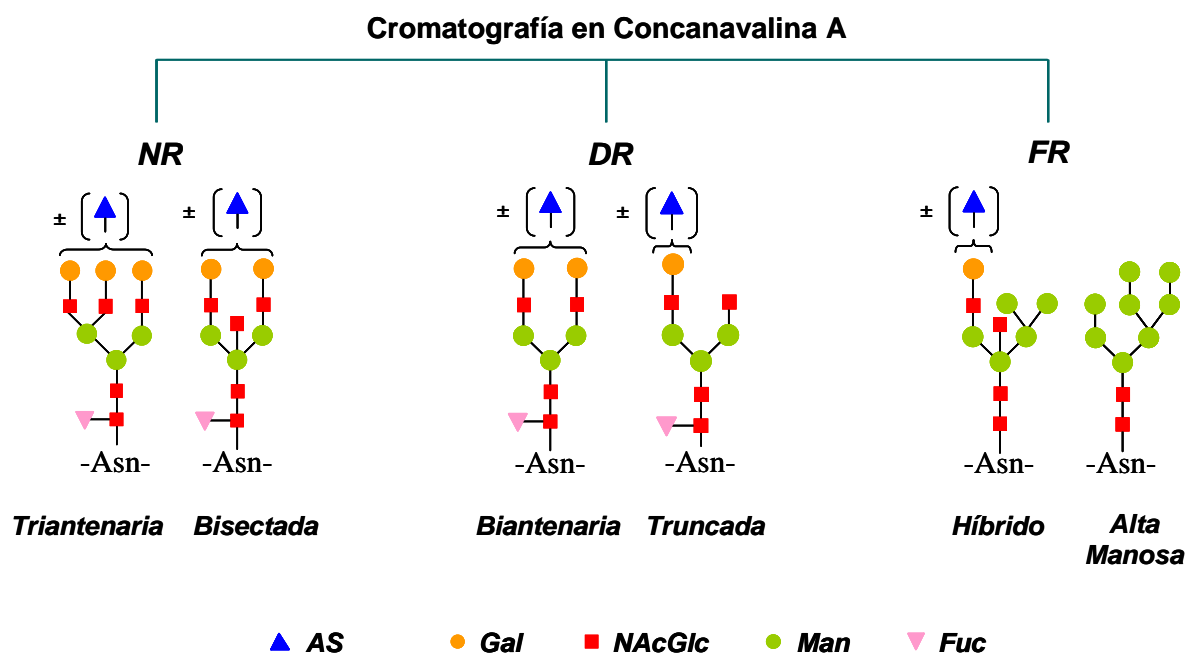
Finalmente, se añadieron 0.5 mL de solución amortiguadora conteniendo metil  $\alpha$ D-manopiranosido 100 mM (manósido) y se dejó interactuar por media hora. Se agregaron 7 mL adicionales de manósido y se recogieron en 4 fracciones (las 3 primeras de 2 mL y la cuarta de 1 mL) las glicofomas fuertemente retenidas por la lectina (FR). El flujo de la columna se mantuvo en 14 mL/h.

#### ***-Procesamiento de los eluidos cromatográficos***

Todos los eluidos cromatográficos conteniendo las glicofomas NR, DR y FR de FSHrh fueron dializados contra NaCl 10 mM en forma individual, con el objeto de eliminar los azúcares presentes en las fracciones DR y FR, procesando de la misma manera las fracciones NR para mantener las mismas condiciones experimentales en todas las preparaciones de glicofomas. Los eluidos se dializaron durante toda una

noche a 4°C, en una relación de volúmenes de 7 mL de muestra/2 l de solución de NaCl. Al día siguiente se cambió la solución salina y luego de 3 h se realizaron tres nuevos cambios a intervalos de 1h.

Una vez dializadas las muestras se tomaron alícuotas adecuadas para la posterior determinación de FSH inmunológica por RIE. Tanto estas alícuotas como el material restante fueron almacenados a -70°C hasta su posterior análisis.



**Figura 10:** Cromatografía de afinidad en Concanavalina A de FSH. Se muestran las estructuras de los oligosacáridos presentes en los grupos de glicofomas aisladas luego de la cromatografía en lectina, siguiendo el esquema de elución propuesto por Narasimhan y col. (1979) y confirmados por Creus y col. (1996).

## **3.2. Cultivos celulares**

### **3.2.1. Aislamiento y cultivo de células de la granulosa de rata**

Las células de la granulosa se aislaron según la técnica descrita por Bley y col. (1992), a partir de ovarios de ratas inmaduras tratadas con DES.

Ratas hembra, de 21-23 días de edad, fueron inyectadas por vía subcutánea con 1 mg de DES disuelto en aceite de maíz, diariamente, durante 3 días. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical 24 h después de la última inyección y los ovarios se extrajeron en condiciones de esterilidad.

Los ovarios se recogieron en medio DMEM:F12 (1:1 V/V) suplementado con Hepes 10 mM, anfotericina B 250 µg/mL y gentamicina 10 µg/mL; todo el procedimiento posterior se realizó bajo flujo laminar. Una vez extraídos los ovarios, se eliminó el tejido adherente y se realizaron múltiples punciones con una aguja fina (30G). Los ovarios punzados se incubaron durante 15 min a 37 °C en el medio de cultivo suplementado con EGTA 6.8 mM; luego se aspiró el medio, se agregó medio suplementado con sacarosa 0.5 M y se incubó durante 5 min adicionales a 37 °C. Finalizada la incubación se agregaron 2 volúmenes de medio y la preparación se dejó decantar. Las células de la granulosa fueron obtenidas presionando los ovarios en forma suave entre dos trozos de malla fina de nylon (Nitex) y recogiendo el filtrado celular en medio. La suspensión celular fue centrifugada a 200xg durante 10 min y el precipitado fue resuspendido en 0.5 mL de medio. La preparación cruda de células de la granulosa fue sembrada sobre una solución de Percoll al 40% V/V en solución salina y centrifugada a 400xg durante 20 min para eliminar la contaminación con células intersticiales. Se aspiró la capa de células de la parte superior del colchón de Percoll y se realizó un lavado con medio. Las células de la granulosa purificadas se recogieron por centrifugación a 200xg durante 5 min y se resuspendieron en medio. El porcentaje de células viables se determinó mediante la prueba de exclusión del colorante Azul de Tripán por recuento en cámara de Neubauer.

Las células de la granulosa purificadas se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) recubiertas con colágeno tipo I, a una densidad de

$3.5 \times 10^5$  células viables/pocillo y se cultivaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% : aire 95%. Luego de 3 h, se removió el medio para eliminar las células no adheridas a la placa y se reemplazó por 350 µL de medio fresco.

Luego de realizado el aislamiento, las células de la granulosa de rata fueron incubadas durante 24 h en condiciones basales, bajo estímulo con FSHrh nativa o sus variantes glicosiladas en rango de concentración variable.

### **3.2.2. Cultivo de la línea celular de granulosa humana KGN**

Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% : aire 95% en medio DMEM:F12 suplementado con NaHCO<sub>3</sub> 1.2 g/L, anfotericina B 2.5 µg/mL, penicilina-estreptomicina 10 u/mL, 10 µg/mL respectivamente y suero fetal bovino (SFB) al 10% V/V en frascos plásticos (Corning). Los sucesivos pasajes de la línea se hicieron de la siguiente manera: se lavaron las células con medio DMEM:F12 sin SFB y se incubaron durante 1-2 min a 37°C con tripsina 0.25% P/V -EDTA 1mM. Una vez que la monocapa celular se desprendió de la superficie a la cual estaba adherida, se agregó el doble de volumen de medio DMEM:F12 con SFB al 20% V/V para inactivar la enzima. Las células se recogieron por centrifugación a 500xg durante 3 min y se resuspendieron en medio DMEM:F12 10% V/V SFB. Posteriormente fueron sembradas en los frascos o placas de cultivos correspondientes y cultivadas por 24 h para permitir la adhesión a la superficie.

Para realizar los experimentos las células se incubaron en medio fresco suplementado con 1% V/V de SFB en condiciones basales, bajo estímulo con FSHrh nativa o sus cuatro preparaciones de variantes glicosiladas en rango de concentración y tiempo variable, dependiendo de los parámetros a estudiar. Para la determinación de esteroides las células fueron incubadas en presencia o ausencia de dos sustratos esteroideogénicos: androstenediona como sustrato aromatizable a una concentración 100 nM (Ohno y col., 2004) y 25-OH-colesterol (5 µg/mL), propuesto clásicamente como el sustrato esteroideogénico de elección para la producción de pregnenolona y progesterona en células ováricas (Toaff y col., 1982).

### **3.3. Determinación de ADN**

Se evaluó la densidad celular óptima para realizar los estudios. Para ello, el contenido de ADN se determinó utilizando la técnica fluorométrica descrita por Labarca & Paigen (1980). Este método se basa en el aumento de fluorescencia que se produce cuando el bisbenzimidazol (Hoechst 33258) se une a las moléculas de ADN.

Una vez finalizado el cultivo se retiró el medio condicionado de cada pocillo y a la monocapa celular se le agregó 500 µL de una solución de EDTA 2 mM pH 7.4 en frío y se homogeneizó por irradiación ultrasónica, con 3 pulsos de 5s cada uno a 50 W de potencia, utilizando un sonicador Branson Sonifier S150 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA). Una alícuota adecuada de los homogeneizados se llevó a 500 µL con la misma solución de EDTA anteriormente mencionada y se agregó 1 mL de una solución 0.15 µg/mL de fluorógeno en solución amortiguadora de fosfato 0.03 M pH 7.4 conteniendo cloruro de sodio 1.9 M. La lectura se realizó en un minifluorómetro TKO 100 (Hofer Scientific Instrument, CA, USA). La longitud de onda de excitación utilizada fue 365 nm y se determinó la fluorescencia emitida a 460 nm. Los resultados obtenidos se compararon contra una curva estándar de ADN de timo de ternera.

### **3.4. Determinación de AMP cíclico**

Los medios condicionados y la curva estándar de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) fueron acetilados y ensayados por radioinmunoensayo (RIE) utilizando el protocolo descrito previamente por Del Punta y col. (1996). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron menores del 10% .

### **3.5. Determinaciones hormonales**

#### **3.5.1. Determinación de FSH por radioinmunoensayo**

La determinación del contenido de FSH inmunológica en las fracciones obtenidas en el isoelectroenfoque preparativo, en la cromatografía en Concanavalina A y en los sueros se realizó utilizando un radioinmunoensayo de doble anticuerpo. Como trazador se utilizó el estándar hFSH-I-SIAFP2 marcado con <sup>125</sup>I, la iodinación se realizó siguiendo



el método de cloramina-T (Greenwood y col., 1963) y la hormona iodada se purificó a través de una columna de Sephadex G-25. La incubación con el primer anticuerpo (IgG de conejo anti-hFSH-6; dilución 1:80.000) y el trazador se realizó a 4°C durante 18 h. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo (suero de cabra anti IgG de conejo; dilución 1:15) y se incubó durante 3 h a 4°C. Se separó la fracción libre de la unida con el agregado de polietilenglicol al 6% P/V y posterior centrifugación, determinándose la radioactividad presente en los precipitados que contenían la fracción unida. Como preparación de referencia se utilizó LER 907 (1 ng LER-907 equivale a 0.02 mUI del segundo estándar de referencia IRP 78/549 de la OMS y a 0.01 ng del estándar hFSH-2). La sensibilidad del ensayo fue de 4.6 ng (LER 907) por tubo. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron menores a 10%.

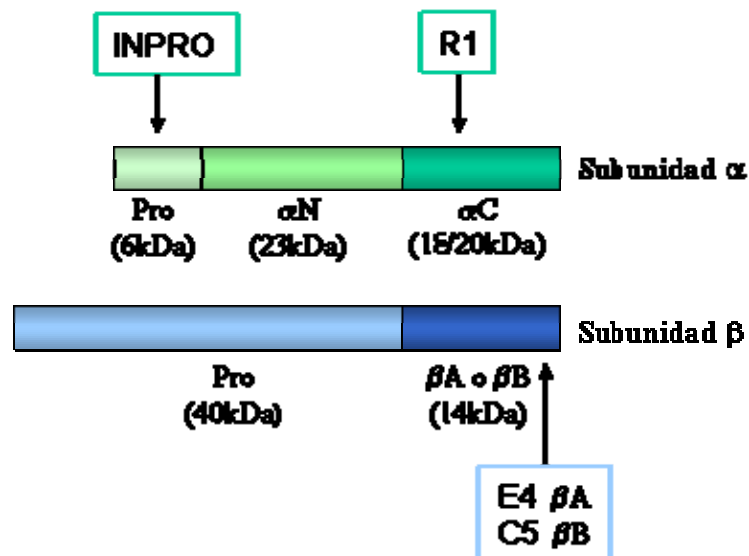
### **3.5.2. Determinación de esteroides en medios condicionados**

La determinación de esteroides en los medios condicionados se realizó utilizando radioinmunoensayos (RIE) desarrollados en el laboratorio. Los niveles de estradiol se determinaron como describieron previamente Escobar y col. (1976). Este ensayo utiliza un anticuerpo específico que posee una reacción cruzada menor a 1% con estrona y estriol. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron 8 y 15% respectivamente. Los niveles de progesterona se determinaron utilizando anticuerpos específicos según se describió previamente (Irusta y col., 2003). Los coeficientes de variación intra- e interensayo para la determinación de progesterona fueron 14.5% y 14.2% respectivamente.

### **3.5.3. Determinación de los niveles de inhibinas diméricas A y B y subunidad $\alpha$ de inhibina (Pro- $\alpha$ C) en medios condicionados**

Los niveles de inhibinas se determinaron a través de un enzimoimmunoensayo específico de dos sitios (ELISA) específico para cada péptido, según describieron previamente Groome y col. (1994, 1995 y 1996). Dicho enzimoimmunoensayo se basa en el uso de un anticuerpo monoclonal inmovilizado que actúa como anticuerpo de

captura y un segundo anticuerpo monoclonal el cual está conjugado a fosfatasa alcalina y actúa como anticuerpo de detección (R1). Los anticuerpos de captura se encuentran acoplados covalentemente a través de sus residuos carbohidratados en la región Fc a una placa especialmente tratada (Avidplate-HZ) y están dirigidos contra la región  $\beta$ A (E4),  $\beta$ B (C5) o Pro- $\alpha$  (INPRO) según la inhibina que se desee detectar (Fig. 11).



**Figura 11:** Reactividad de los anticuerpos utilizados en el ELISA para inhibinas:

- ❖ el ensayo para Pro- $\alpha$ C utiliza INPRO y R1,
- ❖ el ensayo para inhibina A utiliza E4 y R1,
- ❖ el ensayo para inhibina B utiliza C5 y R1.

Las muestras se diluyeron con una solución compuesta por Tritón X-100 4.5/ V/V, BSA 10/ P/V, azida sódica 0.01/ P/V y NaCl 0.15 M en Tris-HCl 0.1M, pH 7.5 (solución diluyente) para la determinación de Pro- $\alpha$ C o con suero fetal bovino para la determinación de inhibinas diméricas.

Para la determinación de las inhibinas diméricas las muestras fueron tratadas previamente. Un volumen de 50  $\mu$ L de una solución acuosa de SDS al 6/ P/V se adicionó a 100  $\mu$ L de las muestras diluidas y los estándares y se llevaron a 100°C durante 3-5 min. Luego, se agregaron 100  $\mu$ L de solución diluyente y 50  $\mu$ L de una

solución recién preparada de peróxido de hidrógeno 6/ V/V y se dejó en contacto por 30 min a temperatura ambiente.

Las muestras se sembraron (100  $\mu$ L para inhibina A y B; 50  $\mu$ L para Pro- $\alpha$ C) en placas de 96 pocillos conteniendo el anticuerpo de captura inmovilizado y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Luego se realizó el lavado de las placas con solución de lavado (Tween 20 0.05/ V/V y NaCl 0.15 M en Tris-HCl 0.025 M, pH 7.5) utilizando un lavador automático de microplacas (Wellwash 4M K2, Thermo Scientific, Baltimore, MD, USA) y se adicionó el segundo anticuerpo. Éste es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la región  $\alpha$ C de la subunidad  $\alpha$  (R1) que está acoplado a fosfatasa alcalina. Las muestras se dejaron en contacto con este segundo anticuerpo durante 3 h a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo se removió mediante un lavado muy exhaustivo con la solución de lavado mencionada anteriormente.

Con el objeto de optimizar la sensibilidad de los ensayos de inhibina, todos incluyen, en la última etapa del procedimiento, la amplificación de la señal de color generada por la fosfatasa alcalina acoplada al segundo anticuerpo. Con este fin, se utiliza un sistema especial de amplificación para ELISA. Este sistema se caracteriza por la interacción de la enzima con un sustrato que inicia una reacción enzimática secundaria, que resulta en desarrollo de color como producto final. Cada molécula de producto de la primera reacción (fosfatasa alcalina) participa en numerosos ciclos de la segunda reacción. De esta forma, la señal generada por la primera reacción es “amplificada” por su participación en la segunda reacción.

El sustrato utilizado en este sistema es la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), la cual es desfosforilada por la fosfatasa alcalina convirtiéndose en la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). Este NADH activa un sistema enzimático secundario que está constituido por un ciclo de óxido-reducción accionado por una diaforasa y una alcohol-deshidrogenasa. En este ciclo, el NADH, en presencia de la diaforasa, reduce a una sal de tetrazolio (violeta de INT) para formar un pigmento de intenso color (Formazán) y se transforma en

nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD<sup>+</sup>). Este es reducido a NADH y el alcohol es oxidado a acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa. De esta manera, la magnitud de la reducción de la sal de tetrazolio es directamente proporcional a la concentración de NADH originalmente formada por la enzima conjugada al segundo anticuerpo.

El resultado de la reacción es una coloración roja cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de inhibina presente en la muestra original. La absorción fue determinada en un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Scientific, Baltimore, MD, USA) a una longitud de onda de 492 nm con un filtro de referencia a 620 nm.

Se utilizaron como estándares inhibina A e inhibina B recombinante humana. El estándar utilizado en el ensayo de Pro- $\alpha$ C es una preparación que alcanza un 75% de pureza para Pro- $\alpha$ C preparada a partir de fluido folicular humano. La sensibilidad de estos ensayos fue de: 15 pg/mL para inhibina B, 7 pg/mL para inhibina A y 2 pg/mL para Pro- $\alpha$ C.

El contenido de los péptidos en las muestras fue calculado utilizando regresión lineal realizada en función de las lecturas obtenidas para cada dosis de la curva estándar de cada ensayo.

Los ensayos de inhibinas diméricas presentan una reacción cruzada menor del 0.1% con la activina A, activina B y folistatina. La reacción cruzada entre inhibina B e inhibina A en el ensayo de inhibina B es menor del 0.5% y entre inhibina A e inhibina B en el ensayo de inhibina A es menor del 0.1%. El ensayo de Pro- $\alpha$ C presenta una reacción cruzada menor al 0.1% con las formas recombinantes de inhibinas, activinas y folistatina.

En cada placa, además de la curva estándar, se incluyeron controles de calidad internos y externos a dos niveles de detección. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron menores del 10% para ambas determinaciones.

Los enzimoimmunoensayos para la detección de las inhibinas diméricas, desarrollados para la determinación de inhibina humana, fueron validados para

aplicarlos en modelos experimentales por Fahy y col. (1995) y Woodruff y col. (1996) en ratas hembra. Estos resultados fueron confirmados realizando análisis de paralelismo entre las curvas estándar y diluciones sucesivas de los medios condicionados provenientes de los cultivos de células de rata en los cuales se debían determinar las inhibinas monoméricas y diméricas.

#### **3.5.4. Determinación de estradiol y LH en suero**

Las determinaciones de estradiol y LH fueron realizadas utilizando un ensayo electroquimioluminiscente (ECLIA), sistema cobas e411 (Roche Diagnostics). La sensibilidad funcional de los ensayos fue de 5 pg/mL (18.4 pmol/L) para estradiol, estandarizado por ID-GC/MS ("dilución isotópica – cromatografía de gas y espectrometría de masa") y de 0.10 UI/L para LH, de acuerdo a la preparación del 2<sup>do</sup> estándar internacional de referencia 80/552 (2<sup>nd</sup> WHO IRP 80/552). Todas las mediciones fueron efectuadas por duplicado. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron, en ambos casos, menores a 10 / para el estradiol y para LH fueron de 3.9 y 11.1 / .

#### **3.5.5. Determinación de los niveles de inhibina B en suero**

Los niveles séricos de inhibina B se determinaron a través de un enzimo-inmunoensayo específico de tres etapas (GENII) como describió previamente Kalra y col. (2010). Dicho inmunoensayo se basa en el uso de dos anticuerpos monoclonales; uno de ellos inmovilizado, que actúa como anticuerpo capturante y un segundo anticuerpo, conjugado a biotina, que actúa como intermediario para la detección. El anticuerpo capturante está dirigido contra la subunidad  $\beta$ B (46A/F). El segundo anticuerpo es un anticuerpo de ratón, dirigido contra la porción de 20 kDa de la subunidad  $\alpha$  (R1).

En la primera etapa del ensayo se sembraron los calibradores, controles y muestras en la placa con el anticuerpo capturante inmovilizado y fueron diluidas con solución amortiguadora TRIZMA (tris-maleato 50mM, pH 7.2). Las muestras se

incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Luego se lavó la placa con solución de lavado para eliminar los péptidos no capturados.

En la segunda etapa del ensayo se adicionó el segundo anticuerpo conjugado a biotina y se dejaron en contacto con el mismo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. El exceso de anticuerpo se removió mediante sucesivos lavados.

En la tercera etapa del ensayo la placa fue incubada por 30 min a temperatura ambiente con la enzima peroxidada de rábano (HRP) conjugada a estreptavidina, la cual interacciona con la biotina del segundo anticuerpo. Una vez eliminado el exceso de enzima por sucesivos lavados se adicionó a la placa el sustrato cromógeno tetrametilbenzidina. El grado de aparición del color en cada pocillo es proporcional a la concentración de inhibina presente en cada muestra. La absorción fue determinada en un lector de placas a una longitud de onda de 492 nm. Este ensayo no presenta reacción cruzada con la inhibina A, activina A, activina B y folistatina. La sensibilidad fue de 5 pg/mL.

En cada placa, además de la curva estándar, se incluyeron controles de calidad internos y externos a dos niveles de detección. Los coeficientes de variación intra- e inter ensayo fueron menores del 10% .

### **3.6. Análisis de la expresión génica utilizando la técnica de microarreglos**

Para evaluar la expresión génica las células de la granulosa humana de la línea KGN fueron incubadas en presencia o en ausencia de las distintas variantes glicosiladas de la FSHrh (análogos de carga: AC, BA; glicofomas con distinto grado de procesamiento: NR, FR; dosis: 20 ng/mL) durante 24 horas. Luego del tratamiento con la hormona, se evaluó en los medios condicionados la producción de progesterona por radioinmunoensayo como control de la respuesta celular al estímulo de FSHrh.

### **3.6.1. Extracción de ARN total**

Para analizar la expresión génica por la técnica de microarreglos se procedió a extraer el ARN total utilizando el kit comercial “RNeasy Mini Kit” siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo se retiraron los medios condicionados y las células de la monocapa se obtuvieron por tratamiento con tripsina-EDTA (0.25% P/V; 1 mM, respectivamente). Las células se lisaron por el agregado de 600  $\mu$ l de solución de lisis y por disrupción mecánica con jeringa (aguja de 1 mm de diámetro). Se agregaron 600  $\mu$ l de etanol 70% en H<sub>2</sub>O-DEPC. Inmediatamente se transfirieron 600  $\mu$ l de los homogenatos a las columnas de filtración y se centrifugaron a 9600xg durante 1 minuto a 4°C, se descartó el eluido. Esta etapa se repitió con los restantes 600  $\mu$ l. Posteriormente se agregaron 700  $\mu$ l de la solución de lavado RW1 a las columnas y se centrifugaron a 9600xg durante 1 minuto a 4°C, luego se descartó el eluido. Se agregaron 500  $\mu$ l de la segunda solución de lavado RPE y se centrifugó a 9600xg durante 1 minuto a 4°C. Este procedimiento se repitió por segunda vez, pero la centrifugación fue a 16200xg durante 2 min.

Finalmente las columnas se transfirieron a tubos estériles y se agregaron 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas. Se centrifugaron a 9600xg durante 1 minuto para obtener las muestras de ARN total en el eluido final.

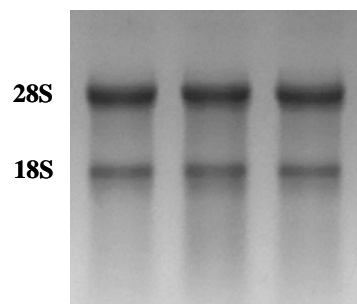
### **3.6.2. Cuantificación del ARN**

La concentración de ARN en cada muestra se determinó midiendo absorbancia a una longitud de onda de 260 nm con un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). El grado de pureza del ARN se determinó por el cociente obtenido de la absorbancia a 260/280 nm (contaminación con proteínas, óptimo entre 1.8 y 2.0) y 260/230 nm (contaminación con solventes orgánicos, óptimo mayor a 1.8).

### 3.6.3 Verificación de la integridad del ARN

La integridad del ARN luego de la extracción se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1/ P/V empleando la solución amortiguadora MOPS 1X (MOPS 20 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0) y 6/ V/V de formaldehído como agente desnaturizante. Se tomó 2 µg de ARN total de cada muestra, se completó hasta un volumen de 10 µL con agua libre de ARNasas y se adicionaron 20 µL de la solución desnaturizante FMF: 50 / V/V formamida, MOPS 2X, 7/ V/V formaldehído. Las muestras se desnaturalizaron por incubación a 75°C durante 5 min y después se mantuvieron en hielo. Se adicionaron 2 µL de la solución de carga para ARN (glicerol 50/ V/V, azul de bromofenol 0.25/ P/V y xilén cianol 0.25/ P/V) y 0.3 µL de una solución 2.5 mg/mL de bromuro de etidio. Se sembraron las muestras en las calles del gel y la corrida electroforética se realizó con solución de MOPS 1X durante 50 min a 70 V. Se fotografió el gel con un sistema digital de captación de imagen Digi Doct, unido a cámara Canon Powershot G10 14.7 MP, utilizando un transiluminador UV (UVP, Inc. Upland, CA, USA) (Fig. 12).

El ARN ribosomal constituye >80/ del ARN total, una clara visualización de las bandas correspondientes a la subunidad mayor (28S) y a la subunidad menor (18S) indican la integridad del ARN.



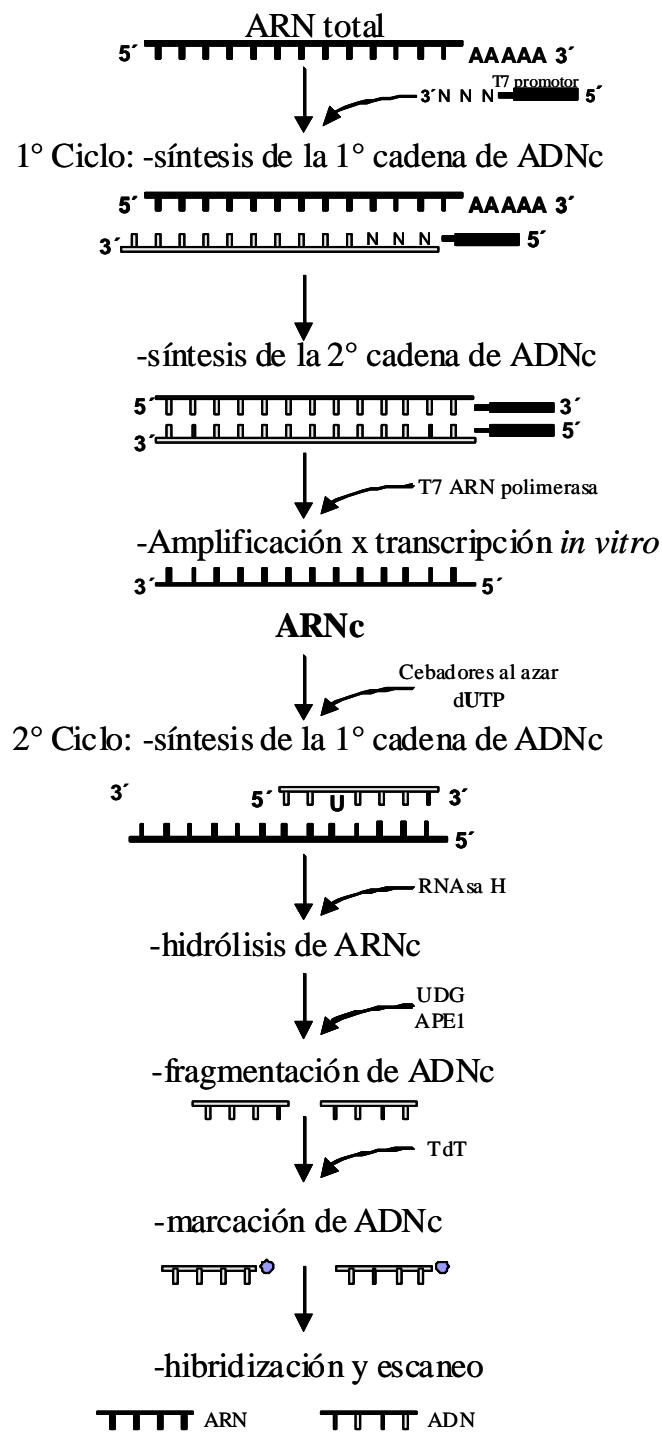
**Figura 12:** Electroforesis de ARN en condiciones desnaturizantes. Se muestra la imagen digital de un gel de agarosa al 1/ P/V teñido con bromuro de etidio correspondiente a 3 muestras de ARN total extraído a partir de un cultivo de células de la granulosa humana. Se observan claramente las bandas correspondientes a la subunidad mayor y menor del ARN ribosomal (28S y 18S).



#### **3.6.4. Microarreglos de ADN**

Esta metodología permite evaluar la expresión de 28869 genes en forma simultánea y se basa en la capacidad de las moléculas complementarias de ADN de hibridar entre sí. Distintas sondas correspondientes a pequeñas secuencias específicas de diversos genes son ancladas a una plataforma (chip) sobre la cual posteriormente, se deposita el ADN copia marcado. El mismo se sintetiza a partir del ARN a analizar. Cada muestra hibrida con su molécula de ADN complementaria y posteriormente se evalúa la expresión de los distintos genes determinando la intensidad de marcación en la plataforma. En el esquema experimental (Fig. 13) se detallan las distintas etapas del procedimiento.

En este estudio se utilizó la plataforma GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), creada a partir de las secuencias genómicas descritas en la base del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las muestras fueron procesadas en el Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura (IFEVA), Facultad de Agronomía, UBA.



**Figura 13:** Esquema experimental del ensayo de amplificación y marcado de las muestras de ARN para la técnica de microarreglos. UDG: uracilo ADN glicosilasa; APE1: apurínica /apirimidínica endonucleasa 1, TdT: deoxinucleotidil transferasa terminal.

### **3.6.5. Análisis estadístico**

El análisis de los datos fue realizado en colaboración con el Grupo de Minería de Datos en Bio-Ciencias de la Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de Córdoba, bajo la dirección del Dr. Elmer A. Fernández.

La expresión génica se evaluó bajo un diseño experimental con dos réplicas biológicas para cada una de las condiciones experimentales

El procesamiento de las muestras se realizó en cinco etapas: estimación de expresión/intensidad, filtrado, obtención de genes diferencialmente expresados, análisis de ontología génica e integración del correlato funcional de las variantes glicosiladas de FSH.

Para estimar el nivel de expresión de los genes como una medida indirecta de la intensidad del fluoróforo de marcación se utilizó el software Affymetrix® Expression Console 1.1. Así, las sondas fueron procesadas a nivel de exones utilizando el algoritmo RMA-Sketch con valores por defecto (Affymetrix Inc. 2004 y 2006), junto con el estadístico de control de calidad de la señal.

En la segunda etapa, las sondas se filtraron utilizando el lenguaje R (R Development Core Team, 2009) con el criterio de conservar solo aquellas informativas. Se eliminaron del análisis todas las sondas que cumplieron los siguientes criterios de exclusión: i) no estuvieran presentes en la base de datos Entrez Genes ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), Maglott y col., 2011) y/o Gene Ontology (GO, [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org), Ashburner y col., 2000), ii) posean secuencias que puedan hibridizar con más de un gen (no permite definir a qué gen está asociada la expresión), iii) sondas que presenten niveles de intensidad menores al umbral de ruido.

Los genes que se expresaron diferencialmente y la estimación de los contrastes de medias específicos del dominio biológico, es decir, de todas las combinaciones de dos tratamientos que presenten la condición basal (AC-BS, BA-BS, FR-BS, NR-BS) se obtuvieron con el paquete “limma” (Smyth, 2004), a partir de un modelo lineal de efectos principales. En cada uno de los contrastes se fijó un valor de corte para p-

valor  $< 0.05$  y  $|\log_2(\text{fold change})| > 0.04$ . Posteriormente se realizaron mapas de calor para los candidatos de cada contraste.

Una vez obtenido los genes candidatos de cada contraste de tratamientos, se procedió a correlacionar los cambios a nivel transcripcional de dichos genes con cambios a nivel de las funciones/términos biológicos de las células. Para ello se consultaron las bases de datos con vocabulario controlado (ontologías) para obtener las funciones de cada uno de los genes candidatos. Gene Ontology es la ontología más extensamente difundida en la comunidad científica (Khatri & Drăghici, 2005) y se encuentra estructurada jerárquicamente en tres grafos acíclicos dirigidos a procesos biológicos (BP), funciones moleculares (MF) y componentes celulares (CC). Posteriormente se realizó un análisis estadístico para determinar si existía enriquecimiento biológico de dichas ontologías producto del experimento, se utilizó el Multi-Reference Contrast Method (MRCM, Fresno y col., 2012) con el programa DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; Huang y col., 2007, 2009) como plataforma de procesamiento de GO.

El correlato funcional de las diferentes variantes glicosiladas de FSH, dado los contrastes propuestos, se llevo a cabo integrando la información de genes diferenciales y enriquecimiento funcional a través de diagramas de Venn y grafos de GO para las categorías BP y MF.

### **3.7. Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real**

#### **3.7.1. Extracción de ARN total**

El ARN utilizado para el análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real se extrajo con el reactivo comercial Trizol® basado en la técnica desarrollada por Chomczynski & Sacchi (1987) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo se retiraron los medios condicionados y las células de la monocapa se lisaron por agregado de 1 mL de Trizol/10 cm<sup>2</sup> y disrupción mecánica. Inmediatamente se transfirió el homogenato a un tubo de microcentrífuga y se agregó 0,2 mL de cloroformo/mL de Trizol. Luego de agitar

vigorosamente se centrifugó a 12.000 xg durante 20 min a 4°C, para recuperar la fase acuosa superior y agregarle 0,5 mL de isopropanol. Se incubó a -20°C al menos por 1 h y se centrifugó a 12.000 xg durante 20 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 75/ V/V en agua libre de ARNasas. Luego de centrifugar a 13.000 xg durante 20 min, se dejó secar el precipitado. Para resuspender el ARN se utilizaron 20 µl de agua libre de ARNasas.

El agua libre de ARNasas se obtuvo por esterilización de agua destilada previamente tratada con dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O-DEPC; 0.1/ V/V).

### **3.7.2. Cuantificación del ARN**

La concentración de ARN en cada muestra se determinó tal como se describió en el ítem 3.6.2.

### **3.7.3. Reacción de retrotranscripción (RT) del ARNm**

La retrotranscripción se realizó utilizando el kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis siguiendo las instrucciones del fabricante y cebadores (primers) formados por nucleótidos con base timina (oligo(dT)<sub>18</sub>), los cuales son complementarios a la terminación poliadenilada (cola de Poli-A) presente en el ARNm, de esta manera permiten la transcripción reversa específica de este tipo de ácido nucleico.

En microtubos estériles de 0.2 mL de pared delgada, se tomaron alícuotas de 1 µg de ARN, se agregó 1 µl de oligo(dT) (50 pmol/µl) y cantidad suficiente de agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 13 µl. Se incubó durante 10 min a 65°C para permitir la desnaturalización del ácido nucleico en un termociclador T-Gradient (Biometra, Goettingen, Alemania). Transcurrido este tiempo se colocaron los tubos en hielo durante 1 min y se les agregó 4 µl de solución de reacción 5X, 0.5 µl de inhibidor de ARNasas (40U/µl), 2 µl de dNTPs (10 mM) y 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa (20U/µl). Se incubó a 55°C durante 30 min. Finalmente, la enzima se inactivó por

incubación a 85°C durante 5 min y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

#### **3.7.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)**

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando el equipo LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) y el kit comercial LightCycler® Taqman® Master especialmente diseñado para este sistema. La amplificación de los productos de PCR fue monitoreada en tiempo real con sondas “taqman” de la Biblioteca Universal para genoma humano (Universal ProbeLibrary Set, Human, Roche Applied Science). Esta metodología se basa en la utilización de una sonda marcada en sus dos extremos que hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. El extremo 5' tiene un fluoróforo (fluoresceína) y el 3' tiene adosado una molécula que bloquea la emisión de fluorescencia. Cuando la polimerasa copia a partir de los cebadores específicos, se encuentra con la sonda, la degrada y esto provoca la separación del fluoróforo de la molécula bloqueante y como consecuencia se emite fluorescencia. Por ende, la fluorescencia emitida se relaciona con la cantidad de amplicón producido.

#### **3.7.5. Condiciones de Reacción**

Por cada reacción se utilizó 1 µl de ADNc, 0.1 µl de sonda taqman y cebadores (sentido y antisentido, 20 µM) y 2 µl de la mix provista por el kit que contiene la enzima FastStart Taq DNA polimerasa, la solución de reacción, MgCl<sub>2</sub> y los dNTPs. Se utilizó agua grado PCR para obtener un volumen final de 10 µl, que fueron sembrados en los capilares LightCycler®. Se incubó durante 10 min a 95°C para desnaturalizar el ADNc y activar la enzima Taq Polimerasa, seguido de 45 ciclos de amplificación.

Se siguió el siguiente ciclo de temperaturas:

- desnaturalización a 95°C por 10 s
- apareamiento a 60°C por 30 s
- extensión a 72°C por 1 s

La normalización fue realizada en todos los casos por comparación de los genes de interés con el gen que codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ya que la expresión de su ARNm se mantiene estable con los tratamientos.

### 3.7.6. Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados para la amplificación en tiempo real de los ADN copia fueron diseñados específicamente por el programa Universal ProbeLibrary Assay Design Center de Roche (<http://qpcr2.probefinder.com/organism.jsp>), las secuencias se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1: Secuencias de cebadores utilizados.**

Gen	NCBI Reference Sequence	Secuencias Nucleotídicas (5'-3')		Amplicon (nt)	Sonda (n°)
		Sentido	Antisentido		
<i>CYP19A1</i>	NM_000103.3	caaaccatgaatttactcttga	caaaccatgaatttactcttga	111	76
<i>HSD17B8</i>	NM_014234.3	cgtaggaaaggtgggaac	tggtcagccaatcact	72	89
<i>STAR</i>	NM_000349.2	ggcatccttagcaaccaaga	actttgtcccattgtcctg	62	11
<i>CYP11A1</i>	NM_000781.2	gaccataggagtcctgttga	ttcttggtggccttgga	94	79
<i>HSD3B2</i>	NM_000198.2	ctggacaaggcctcagac	tcaagtacagtcagcttgctct	78	50
<i>INHA</i>	NM_002191.2	gtctccaagcctcctttt	tggtcagctgactgtcctc	61	5
<i>INHBA</i>	NM_002192.2	ctcgagatcatcagtttg	ccttggaatctcgaagtgc	68	72
<i>FSHR</i>	NM_000145.2	ggtgcatttcaggatttg	tcacctcaagacatcattctg	67	80
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	agccacatcgtcagacac	gcccaatcagacaaatcc	66	60

### 3.8. Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (EEM).

Para realizar el análisis estadístico de los resultados expresados en porcentaje se utilizó la transformación  $\arcsen(p)^{1/2}$ , siendo p la proporción ( $0 < p < 1$ ).

El análisis de las curvas dosis-respuesta se realizó transformando las dosis a logaritmo decimal y se utilizó el modelo de ecuación de tres parámetros.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando la prueba t de Student cuando se compararon dos grupos. Para las comparaciones múltiples se utilizó análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey-Kramer. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p resultó menor de 0.05.

Los coeficientes de correlación entre dos variables fueron determinados mediante el análisis de correlación lineal de Spearman.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).



# *Resultados*

## CAPITULO I

### 1. Caracterización de FSH recombinante humana

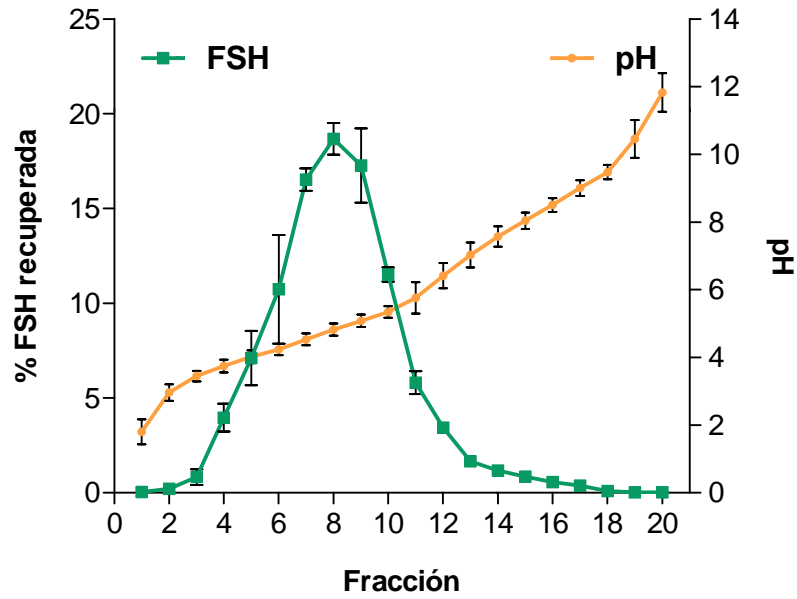
#### 1.1. Abundancia relativa de análogos de carga de FSHrh

Los análogos de carga de FSHrh, con diferencias en su grado de sialilación, fueron aislados utilizando isoelectroenfoque (IEF) preparativo, como se ha descrito en *Materiales y Métodos*.

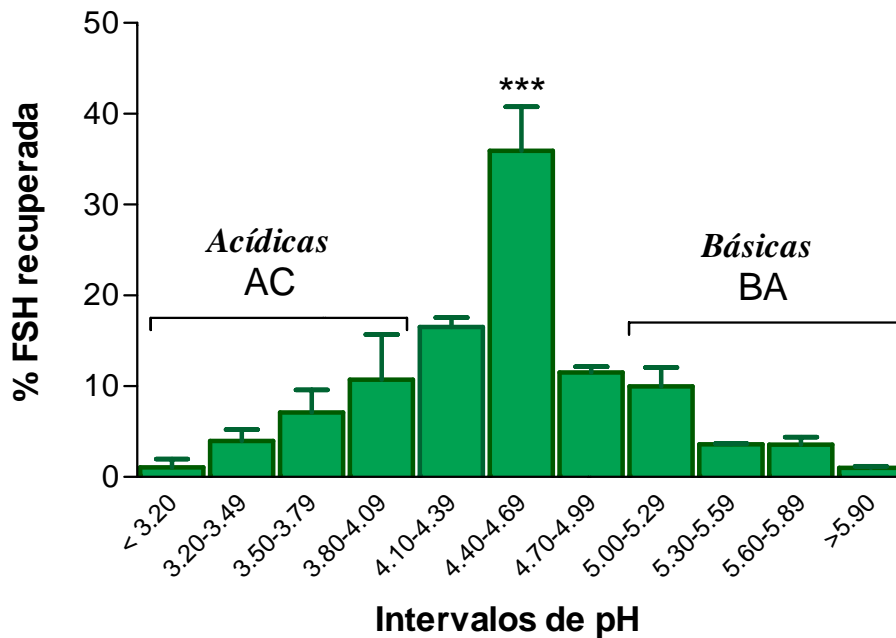
Se realizaron tres fraccionamientos consecutivos de FSHrh en la celda de IEF preparativo para reunir el material necesario que sería utilizado en los estudios de biopotencia *in vitro* que se describen en los capítulos II, III, IV y V de esta Tesis. La hormona fue detectada en un rango amplio de pH, entre 2.56 y 8.11, correspondiente a las fracciones 3 a 17 de un total de 20 obtenidas en cada corrida.

En la Figura 14 se muestra el gradiente de pH, con alta resolución en el intervalo en el cual enfoca la mayor proporción de FSHrh (8 fracciones) y la proporción relativa de hormona presente en cada una de las fracciones obtenidas durante el aislamiento. La recuperación del material sembrado fue del  $61.0 \pm 13.1$  / .

La proporción predominante de FSHrh alcanzó un  $35.9 \pm 4.8$  / ( $p < 0.001$ ) y fue recuperada en el intervalo de pH 4.40-4.69 (Fig. 15). Los análogos de carga más acídicos, recuperados por debajo de pH 4.1, representaron el  $22.8 \pm 8.3$  / de la preparación analizada; los de menor grado de sialilación, recuperados a pH mayor a 5.0, alcanzaron un  $17.0 \pm 1.7$  / del total de hormona aplicada a la celda de IEF preparativo.



**Figura 14:** Perfil de distribución de análogos de carga de FSHrh. Se muestra el gradiente de pH obtenido en tres fraccionamientos consecutivos de FSHrh utilizando una combinación de anfolitos de pH 3-10 y 2.5-5 y la proporción (✓ del total de FSH recuperada) determinada en cada una de las fracciones obtenidas en la celda de IEF preparativo. Los resultados se expresan como media ± EEM.



**Figura 15:** Abundancia relativa de análogos de carga de FSHrh. Se muestra la proporción (✓ del total de FSH recuperada) de análogos de carga de FSHrh obtenida en tres IEFs consecutivos

combinando fracciones en intervalos de 0.29 unidades de pH. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. \*\*\* $p < 0.001$ , proporción predominante de FSHrh (intervalo de pH: 4.40-4.69).

En estudios previos se había observado que la proporción de FSH circulante aislada en el rango de pH 4-5 permanecía sin cambios en diferentes condiciones fisiológicas de la mujer. Sin embargo, la proporción de FSH aislada en los intervalos de pH menores a 4 y mayores a 5 presentaba diferencias significativas asociadas a los cambios en el perfil hormonal sérico dependiente del grado de la actividad gonadal existente en el momento del estudio (Padmanabhan y col., 1988; Wide y col., 1993; Zambrano y col., 1995). Asimismo, diferencias en la relación Bio/Inmunoactividad in vitro de estos análogos habían sido reportados (Zambrano y col., 1996; Timossi y col., 2000). En base a estas evidencias, se decidió utilizar dos preparaciones de análogos de carga de FSHrh para determinar el posible efecto diferencial del grado de sialilación de los oligosacáridos en la regulación de la función endocrina y expresión génica en las células de la granulosa.

Las dos preparaciones mencionadas se obtuvieron de la siguiente manera:

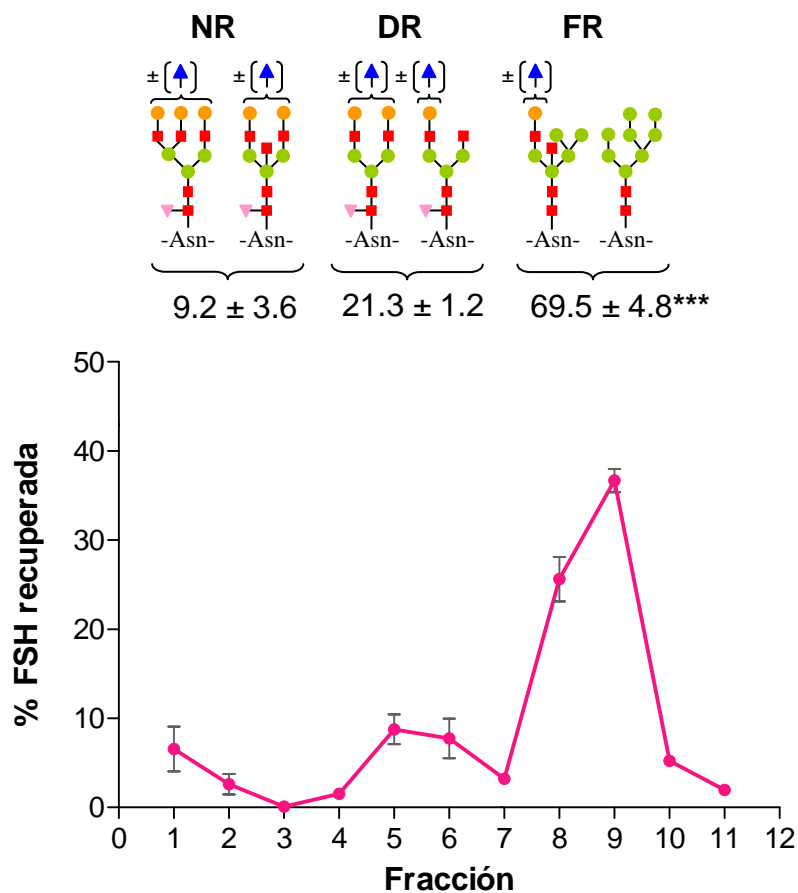
- análogos de carga con mayor grado de sialilación, **AC**, combinando las fracciones aisladas a pH menor de 4;
- análogos de carga con menor grado de sialilación, **BA**, combinando las fracciones aisladas a pH igual o mayor de 5.

Estas preparaciones fueron tratadas como se describió en el ítem 3.1.3 de *Materiales y Métodos* y conservadas en pequeñas alícuotas, a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su posterior utilización.

## **1.2. Abundancia relativa de variantes glicosiladas de FSHrh con diferente grado de procesamiento de sus oligosacáridos**

Las variantes glicosiladas de FSHrh con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos fueron aisladas mediante cromatografía de afinidad en Concanavalina A, como se ha descrito en *Materiales y Métodos*.

En la Figura 16 se muestra la proporción relativa de FSHrh presente en cada una de las fracciones (2 mL) obtenidas luego de tres aislamientos consecutivos realizados por cromatografía de afinidad, considerando como 100% el total de la FSHrh recuperada. Se observó que la proporción predominante en la preparación de FSHrh aplicada a la columna de lectina alcanzó el  $69.5 \pm 4.8\%$  ( $p < 0.001$ ) del total de la FSHrh recuperada, y correspondió a glicofomas fuertemente retenidas, FR, con oligosacáridos que no han completado el procesamiento de sus oligosacáridos, de tipo híbrido y alta manosa. Una proporción marcadamente menor, el  $21.3 \pm 1.2\%$  del total de FSHrh recuperada, correspondió a glicofomas débilmente retenidas por la lectina, DR, las cuales poseen cadenas de carbohidratos de tipo biantenarias y truncadas. Asimismo, se observó que las glicofomas no retenidas en la columna, NR, las cuales poseen oligosacáridos complejos, con alto grado de ramificación y bisectados constituyeron solo una pequeña proporción del total de FSHrh recuperada,  $9.2 \pm 3.6\%$ . Para confirmar el predominio de glicofomas con oligosacáridos de tipo híbrido y alta manosa, FR, las dos fracciones con mayor porcentaje de FSH (8 y 9) fueron recromatografiadas y el 90% de la hormona fue retenida nuevamente por la columna.



**Figura 16:** Perfil de distribución de glicofomas de FSHrh en Concanavalina A. Se muestra la abundancia relativa ( $\%$  del total de FSH recuperada) de glicofomas de FSHrh obtenida en cada una de las fracciones luego de tres fraccionamientos consecutivos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.  $\blacktriangle$  AS;  $\bullet$  Gal;  $\blacksquare$  NAcGlc;  $\bullet$  Man;  $\blacktriangledown$  Fuc. NR: glicofomas No Retenidas por la lectina, con oligosacáridos complejos, con alto grado de ramificación; DR: glicofomas Débilmente Retenidas, con cadenas biantenarias completas y truncadas; FR: glicofomas Fuertemente Retenidas, con oligosacáridos de tipo híbrido y de alta manosa. \*\*\* $p < 0.001$ , FR vs NR y DR.

En estudios previos realizados en diferentes condiciones fisiológicas en la mujer se observó la presencia en circulación de proporciones similares de glicofomas de FSH con oligosacáridos de tipo biantenario o truncados, DR; por el contrario, se hallaron variaciones significativas en la abundancia relativa o ausencia de las glicofomas con características específicas en el grado de procesamiento de sus oligosacáridos ya sea de tipo complejo, altamente ramificados, glicofomas NR, o las glicofomas con oligosacáridos que no han completado la incorporación de azúcares a sus cadenas, glicofomas FR (Creus y col., 1996; Velásquez y col., 2006; Loreti y col., 2009). En base a

estas evidencias se decidió utilizar las variantes glicosiladas NR y FR para determinar el posible efecto diferencial del grado de procesamiento de los oligosacáridos presentes en la FSHrh sobre la regulación de la función endócrina y la expresión génica en células de la granulosa.

Se obtuvieron dos preparaciones aisladas en la cromatografía de afinidad:

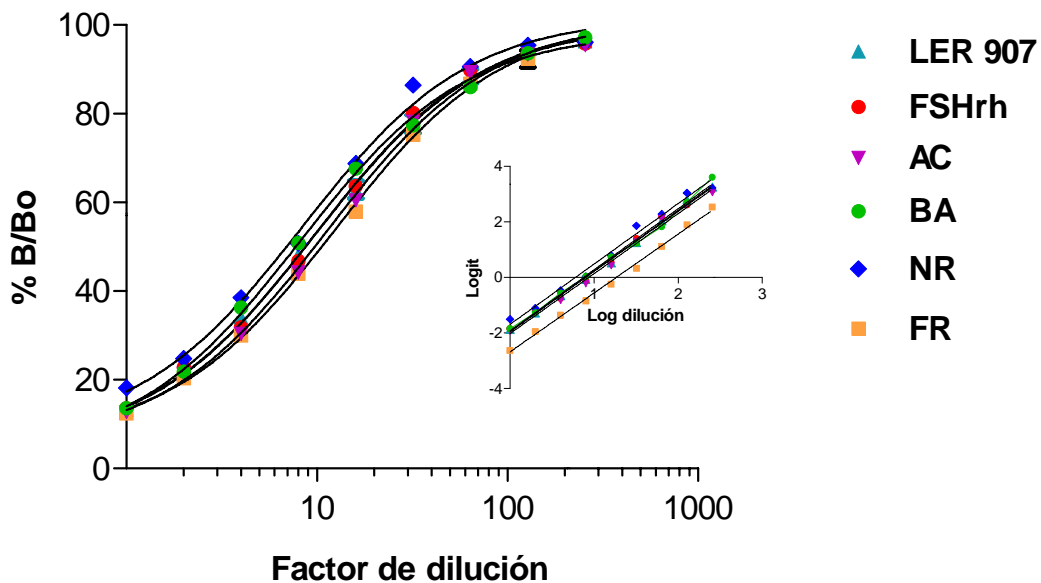
- glicofomas de FSHrh NR que poseen oligosacáridos complejos, con alto grado de ramificación y bisectados, contenidas en la fracción 1, eluidas con solución amortiguadora;

- glicofomas de FSHrh FR con oligosacáridos que no han completado su procesamiento, de tipo híbrido o de alta manosa, combinando las fracciones 8 y 9, eluidas con solución amortiguadora conteniendo una elevada concentración de manosa.

Estas preparaciones fueron tratadas, como se describió en el ítem 3.1.4 de *Materiales y Métodos*, y conservadas en pequeñas alícuotas a -70°C hasta su posterior utilización.

### **1.3. Curvas de paralelismo**

Para validar el método utilizado en la determinación de los niveles inmunológicos de FSH (RIE) y verificar que el anticuerpo empleado para tal fin reconoce de la misma forma cada una de las diferentes preparaciones de las variantes glicosiladas de FSHrh, se realizó un análisis de paralelismo. Para ello se evaluaron por RIE diluciones seriadas (1:2) de la FSHrh nativa, de cada grupo de variantes de glicosilación y del estándar utilizado (LER 907).



**Figura 17:** Análisis de paralelismo. Curvas dosis-respuesta de las diferentes variantes glicosiladas de FSHrh evaluadas por radioinmunoensayo. Se muestra la relación entre el porcentaje de unión en presencia de hormona fría y el de unión máxima en función del logaritmo de la dilución de hormona utilizada. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM (triplicados de cada condición) obtenidos en un ensayo representativo de tres experimentos independientes. LER907: estándar de referencia; AC y BA: análogos de carga de FSHrh aislados a pH < 4 y a pH > 5 respectivamente; NR y FR glicofomas de FSHrh con oligosacáridos complejos, y de tipo híbrido y de alta manosa, respectivamente.

La Figura 17 muestra el paralelismo hallado entre las curvas dosis-respuesta correspondientes a las distintas variantes de glicosilación y la FSHrh nativa respecto de la curva del estándar LER 907. Las pendientes obtenidas del análisis de regresión lineal de las curvas de desplazamiento, luego de la transformación Logit-Log para el estándar LER907, FSHrh nativa y sus variantes glicosiladas: AC, BA, NR y FR fueron:  $2.19 \pm 0.04$ ,  $2.15 \pm 0.04$ ,  $2.16 \pm 0.05$ ,  $2.19 \pm 0.06$ ,  $2.17 \pm 0.07$ ,  $2.12 \pm 0.05$ , respectivamente. No se observaron diferencias significativas al comparar dichas pendientes. Estos resultados demuestran que el anticuerpo IgG de conejo anti-hFSH-6 reconoce de la misma manera tanto la FSHrh nativa como sus distintas variantes glicosiladas y el estándar de referencia utilizado en el RIE, FSH (LER 907).



## CAPITULO II

### **2. Regulación diferencial de la producción de inhibinas diméricas en cultivos de células de la granulosa de rata por variantes glicosiladas de FSHrh**

En trabajos previos realizados en el laboratorio (Lanuza y col., 1999), utilizando como modelo experimental células de la granulosa de rata, se había demostrado que la regulación de la producción de inhibina A y B es compleja, ya que existen mecanismos específicos para estimular la producción de cada uno de los dímeros. La FSH es el principal estímulo, clásicamente descrito, para la síntesis de ambas inhibinas. Sin embargo, factores provenientes del mismo tipo celular, así como también, de la teca y del ovocito participan en este mecanismo de regulación.

En base a las evidencias obtenidas en modelos experimentales y en mujeres jóvenes, las cuales demostraron que la microheterogeneidad molecular de la FSH se modifica a lo largo del ciclo y al disminuir la actividad del ovario, se propuso evaluar el efecto del grado de sialilación y de la complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh sobre la regulación de la producción de inhibinas diméricas en las células de la granulosa.

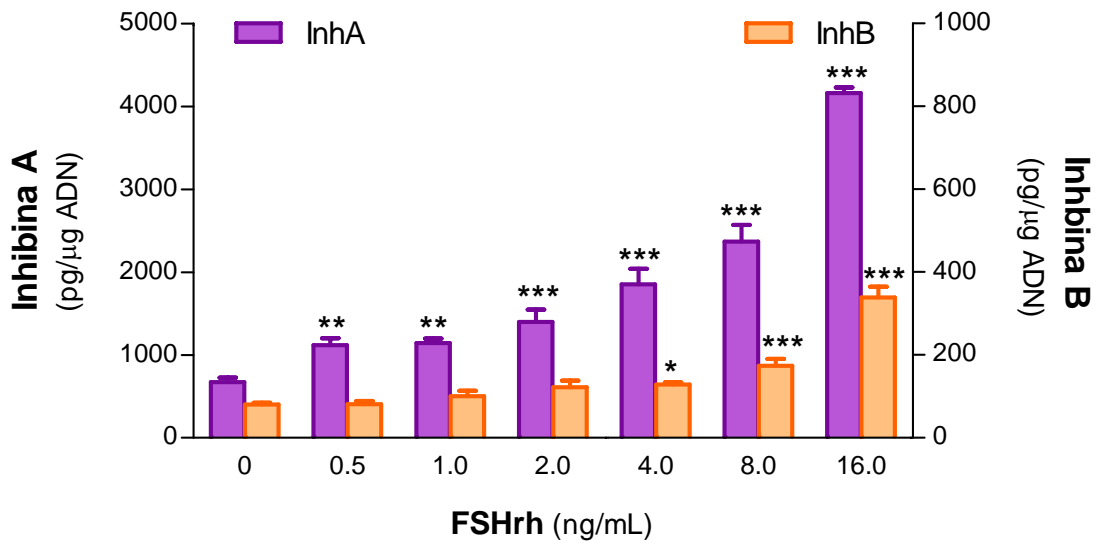
Como se mencionó en el capítulo de *Materiales y Métodos* se utilizó para este estudio el cultivo de células de la granulosa provenientes de ratas inmaduras tratadas con DES pues Bley y col. (1991, 1992) habían demostrado que este tratamiento favorecía el desarrollo folicular homogéneo hasta el estadio antral temprano, a partir de los cuales se pueden obtener células de la granulosa altamente sensibles al estímulo con FSH.

## **2.1. Producción de inhibinas diméricas en condiciones basales y bajo estímulo con FSHrh nativa**

Confirmando los resultados obtenidos en estudios previos, en condiciones basales las células de la granulosa produjeron ambas formas diméricas de inhibina, con un claro predominio de la producción de inhibina A (InhA:  $673 \pm 55$ , InhB:  $80 \pm 4$  pg/mL, Fig. 18), siendo la relación Inh A/Inh B:  $8.4 \pm 0.3$ .

El rango de concentración de FSHrh para estimular los cultivos fue determinado en base a la respuesta bifásica de la producción de inhibinas diméricas que se había observado previamente en este modelo experimental utilizando dosis superiores a los 22 ng/mL de FSH ovina (Lanuza y col., 1999).

Cuando las células fueron estimuladas con dosis crecientes de FSHrh nativa (0.5-16 ng/mL) se observó un estímulo más potente sobre la producción de inhibina A respecto de la producción de inhibina B a todas las dosis analizadas (por ejemplo, a la dosis de 16 ng/mL: InhA:  $4159 \pm 69$  vs InhB  $338 \pm 27$  pg/ $\mu$ g ADN,  $p < 0.001$ ) (Fig. 18). El estímulo ejercido por la hormona sobre la producción de inhibina A alcanzó significancia estadística respecto de la producción basal a partir de la menor dosis evaluada (0.5 ng/mL,  $p < 0.01$ ). Por el contrario, la producción de inhibina B se modificó respecto de la condición basal a partir de la dosis de 4 ng/mL ( $p < 0.001$ ).

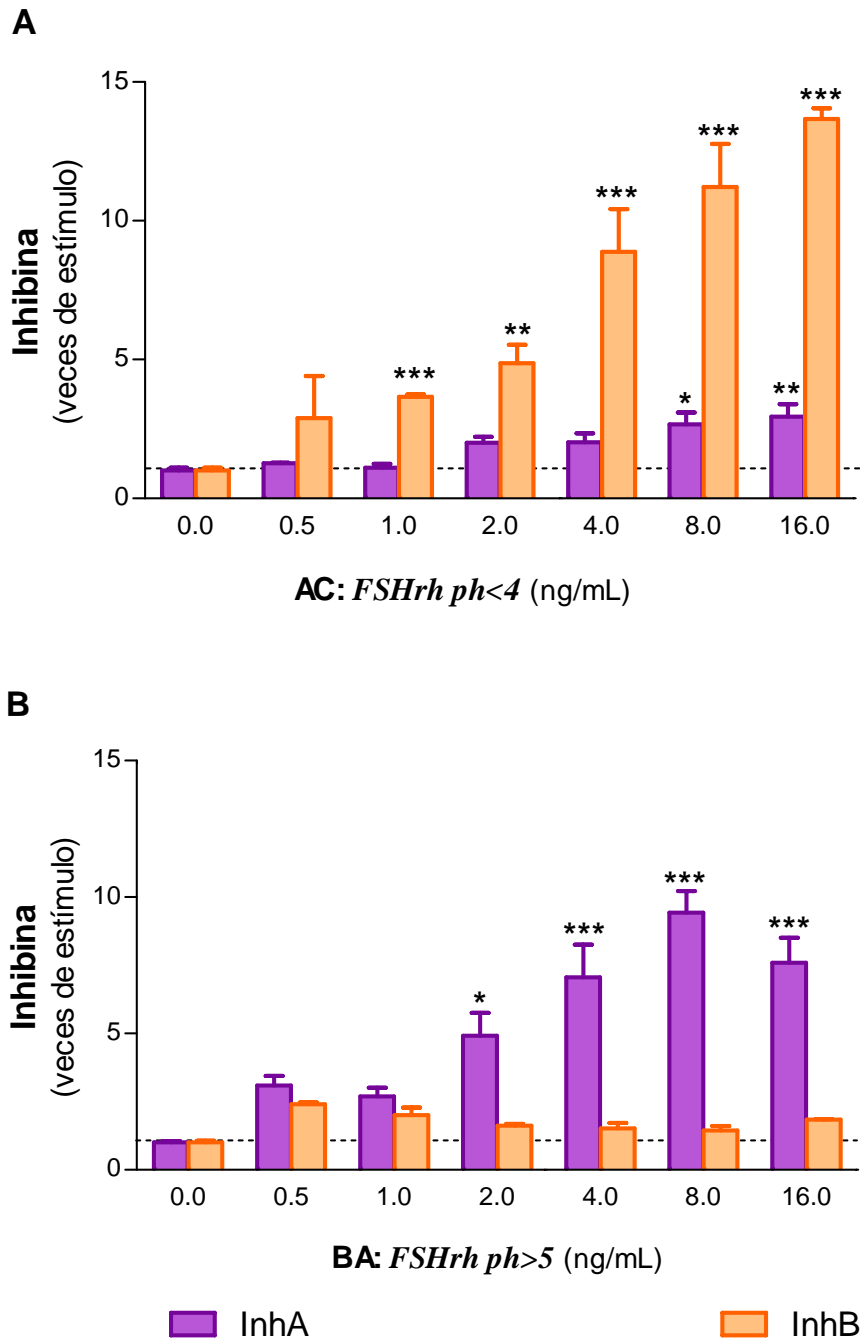


**Figura 18:** Producción de inhibinas diméricas en condiciones basales y bajo estímulo con FSHrh nativa en células de la granulosa de rata. Las células se cultivaron en condiciones basales y con 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 ng/mL de FSHrh durante 24 h. Se determinaron los niveles de inhibina A (InhA) e inhibina B (InhB). Las concentraciones de FSHrh se expresan en términos del estándar hFSH-2. Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres cultivos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  respecto de la condición basal.

## 2.2. Efecto del grado de sialilación de FSHrh sobre la producción de inhibinas diméricas

El grado de sialilación de la FSHrh afectó la regulación de la producción de inhibinas diméricas ejerciendo un efecto diferencial sobre esta producción. Cuando se estimularon las células de la granulosa con dosis crecientes de análogos de carga con alto grado de sialilación, AC (Fig. 19, panel A), se observó un estímulo más potente sobre la producción de inhibina B respecto de la producción de inhibina A a todas las dosis analizadas (por ejemplo, a la dosis de 8 ng/mL: InhB:  $11.2 \pm 1.5$  vs InhA  $2.7 \pm 0.4$  veces de estímulo respecto del basal,  $p < 0.01$ ). El estímulo ejercido por estos análogos de carga sobre la producción de inhibina A alcanzó significancia estadística respecto de la producción basal ( $p < 0.05$ ) a partir de la dosis de 8 ng/mL. Por el contrario, los análogos de carga con menor grado de sialilación, BA (Fig. 19, panel B), estimularon la producción de inhibina A a partir de la dosis de 2 ng/mL ( $p < 0.05$ ); no se observaron

cambios en los niveles de inhibina B bajo la acción de estos mismos análogos a ninguna de las dosis evaluadas.



**Figura 19:** Efecto de análogos de carga de FSHrh sobre la producción de inhibinas diméricas en células de la granulosa de rata. Las células se cultivaron en condiciones basales y con 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 ng/mL de análogos de carga de FSHrh aislados a pH < 4: AC (Panel A) y a pH > 5: BA (Panel B) durante 24 h. Se determinaron los niveles de inhibina A (InhA) e inhibina B (InhB). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres cultivos independientes, expresados como veces de

estímulo respecto de la condición basal (media  $\pm$  EEM). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  respecto de la condición basal.

### **2.3. Efecto del grado de complejidad de los oligosacáridos de FSHrh sobre la producción de inhibinas diméricas**

El grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh también afectó de forma diferencial la regulación de la producción de inhibinas A y B. Cuando las células se estimularon con dosis crecientes de glicofomas de FSHrh no retenidas por la lectina, NR, con oligosacáridos de tipo complejo (Fig. 20, panel A), se observó un estímulo más potente sobre la producción de inhibina B respecto de la producción de inhibina A. Este grupo de glicofomas estimuló significativamente la producción de inhibina B a partir de la dosis de 1 ng/mL ( $4.87 \pm 0.53$  veces de estímulo respecto de la condición basal,  $p < 0.05$ ); la producción se mantuvo en niveles similares a las dosis mayores evaluadas (2 a 16 ng/mL).

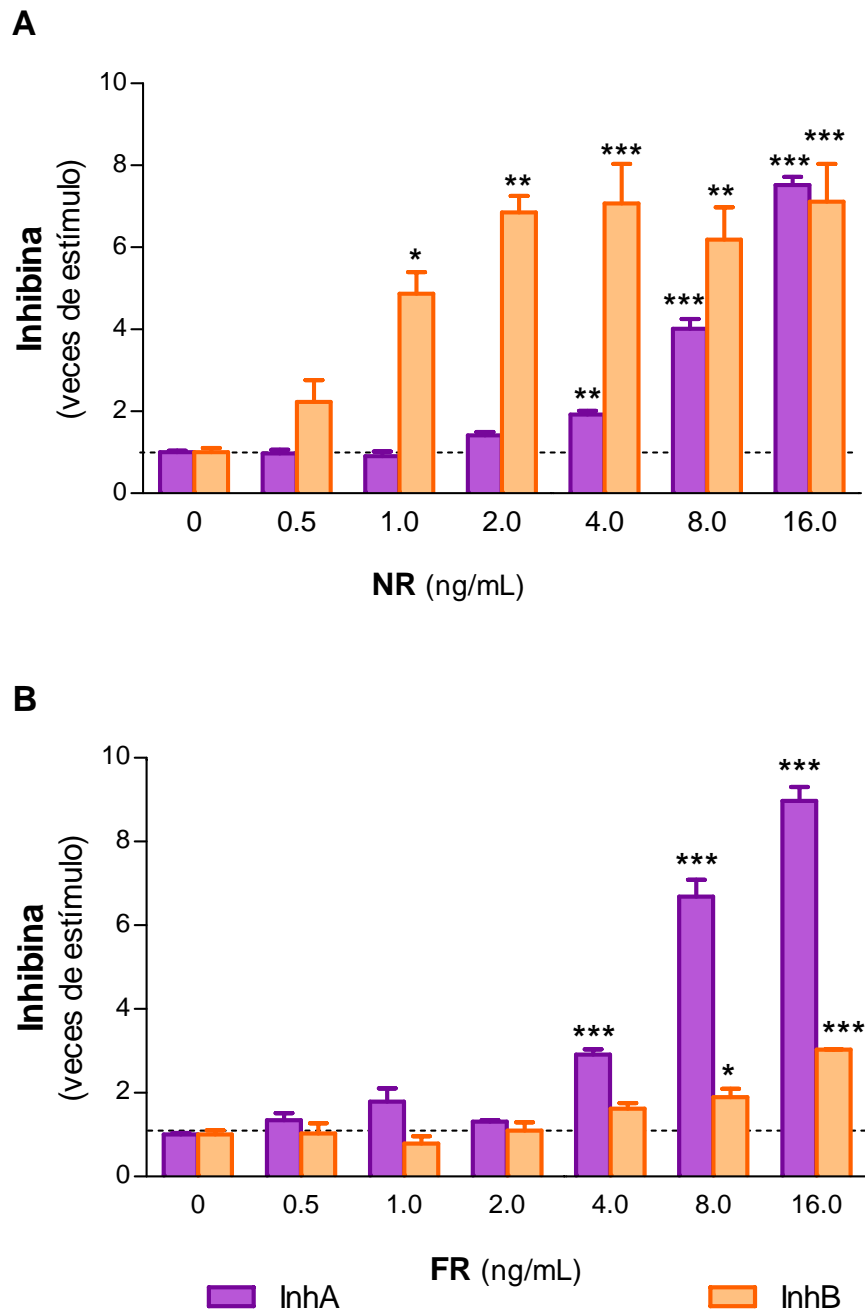
El estímulo ejercido por estas glicofomas sobre la producción de inhibina A fue dosis-dependiente, alcanzando significancia estadística respecto de la producción basal a partir de la dosis de 4 ng/mL ( $1.92 \pm 0.09$  veces de estímulo respecto de la condición basal,  $p < 0.01$ ).

El predominio de la inhibina B respecto de la inhibina A se mantuvo cuando se utilizaron dosis menores a 16 ng/mL. En esta condición experimental el estímulo inducido por las glicofomas NR fue similar para ambos dímeros (InhA:  $7.53 \pm 0.19$ , InhB:  $7.12 \pm 0.93$  veces de estímulo respecto de la condición basal, NS).

Las glicofomas de FSHrh fuertemente retenidas por la lectina, FR, que no completaron el procesamiento de sus oligosacáridos, favorecieron la producción de inhibina A respecto de la inhibina B. Estas glicofomas estimularon significativamente la producción de inhibina A a partir de la dosis de 4 ng/mL ( $2.92 \pm 0.12$  veces respecto de la condición basal,  $p < 0.01$ ); la respuesta fue dosis-dependiente.

La producción de inhibina B no fue favorecida por las variantes FR, solo se observó un estímulo en la producción de este dímero a las mayores dosis evaluadas, 8 y 16 ng/mL ( $1.9 \pm 0.2$ ;  $3.0 \pm 0.01$  veces de estímulo, respectivamente,  $p < 0.05$ ). La

magnitud de estas respuestas fue significativamente menor al compararla con el incremento inducido por estas glicoformas sobre la producción de inhibina A ( $p < 0.001$ ). Por ejemplo, las variantes FR a la dosis de 16 ng/mL produjeron una estimulación de  $3.0 \pm 0.01$  veces de inhibina B y de  $8.9 \pm 0.3$  veces de inhibina A sobre la producción basal ( $p < 0.01$ ).



**Figura 20:** Efecto de glicofomas de FSHrh con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos sobre la producción de inhibinas diméricas en células de la granulosa de rata. Las células se cultivaron en condiciones basales y con 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 ng/mL de glicofomas NR: variantes de glicosilación con oligosacáridos complejos, y FR: variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido o alta manosa durante 24 h. Se determinaron los niveles de inhibina A (Panel A) e inhibina B (Panel B). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres cultivos independientes, expresados como veces de estímulo respecto de la condición basal (media  $\pm$  EEM). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  respecto del basal.

Estos resultados demuestran que si bien las células de la granulosa tienen la capacidad de sintetizar ambos dímeros, inhibinas A y B, determinadas estructuras de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSHrh son necesarias para mantener el predominio de la producción de uno u otro dímero, característica esencial del perfil de inhibinas circulantes durante las fase folicular y lútea del ciclo menstrual.



## CAPITULO III

### **3. Regulación diferencial de la actividad endocrina en la línea celular esteroidogénica de granulosa humana KGN por variantes glicosiladas de FSHrh**

Para profundizar el estudio de la regulación diferencial de la actividad endocrina de las células de la granulosa inducida por el grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh, descrito en el capítulo II de esta Tesis, se eligió un nuevo modelo experimental. Considerando que las variantes glicosiladas en estudio fueron aisladas de hormona recombinante humana, se utilizó una de las líneas celulares de granulosa humana descritas en la literatura cuyas características se adecuaran al objetivo de este estudio. La línea celular KGN fue obtenida por el Dr. Mashatoshi Nomura, del Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, a partir de un carcinoma humano de células de la granulosa. Nishi y col., (2001) demostraron la capacidad esteroidogénica de estas células ya que producen pregnenolona y progesterona en ausencia de sustrato esteroidogénico y además, responden al estímulo de FSH, a través de su receptor específico. La actividad aromatasa es estimulada por esta gonadotropina ya que estas células producen estradiol y estrona en presencia de un sustrato aromatizable. Por otro lado, estas células tienen la capacidad de sintetizar péptidos pertenecientes a la superfamilia del TGF- $\beta$  ya que se ha demostrado la expresión de subunidad  $\beta$ A de inhibina/activina en estas células (Wu y col., 2005).

#### **3.1. Presencia del receptor de FSH en células KGN**

Previamente al inicio del estudio del posible efecto diferencial de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la actividad endocrina de las células en cultivo, fue necesario confirmar la presencia del receptor funcional de la gonadotropina. El mecanismo clásicamente descrito a través del cual el receptor de FSH responde a la

hormona, involucra la activación de la proteína heterotrimérica Gs con la subsecuente activación de la enzima adenilato ciclasa, lo cual conduce a un aumento en los niveles del AMPc. Por esta razón, se determinaron por RIE desarrollado los niveles del segundo mensajero, AMPc, en presencia o ausencia de FSHrh (50 ng/mL hFSH-2) y 3-isobutil-1metilxantina (IBMX, 0.1mM), inhibidor de fosfodiesterasas, en el medio condicionado de cultivos de células KGN, luego de 24 h de estímulo.

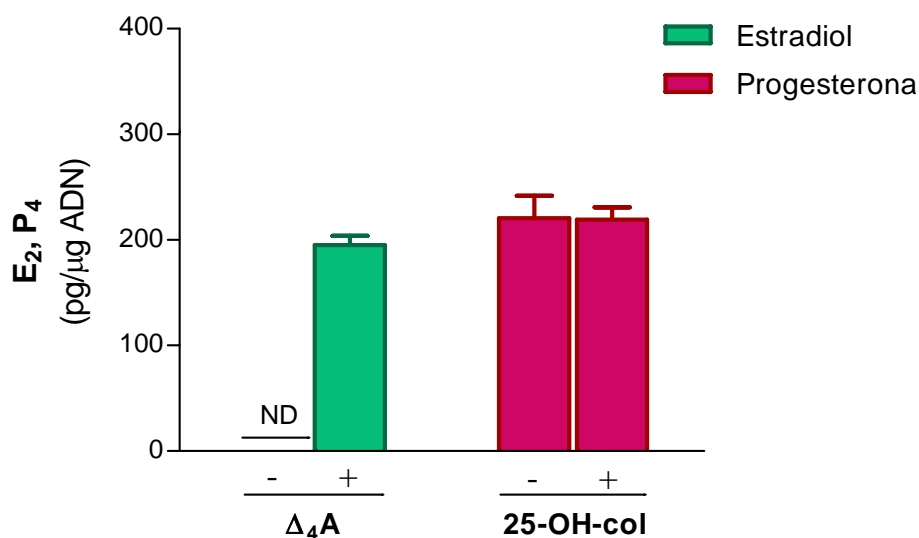
La producción de AMPc se incrementó significativamente luego del agregado de la gonadotropina; FSHrh  $7.43 \pm 0.01$  vs basal  $3.76 \pm 0.19$  pmol/mL ( $p < 0.01$ ). Estos resultados confirmaron que la línea celular de granulosa humana KGN en cultivo mantiene la expresión del receptor funcional de FSH, como se había reportado previamente en la literatura (Nishi y col., 2001).

### **3.2. Determinación de las condiciones óptimas de cultivo para estudiar el efecto de variantes glicosiladas de FSHrh sobre la actividad endocrina de células KGN**

Se establecieron las condiciones experimentales óptimas en términos de: requerimiento de sustrato, tiempos de cultivo y densidad celular para evaluar el efecto de variantes glicosiladas de FSHrh sobre la producción de esteroides y péptidos en esta línea celular.

#### **3.2.1. Producción de esteroides: efecto de sustratos esteroidogénicos**

Se determinó la capacidad de las células KGN de producir estradiol y progesterona en presencia o ausencia de dos sustratos esteroidogénicos: androstenediona como sustrato aromatizable y 25-OH-colesterol, propuesto clásicamente como el sustrato esteroidogénico de elección para la producción de pregnenolona y progesterona en células ováricas (Toaff y col., 1982). El tiempo de cultivo utilizado fue de 24 h ya que este período era necesario para alcanzar niveles detectables de estradiol y progesterona en los medios condicionados (Fig. 21).

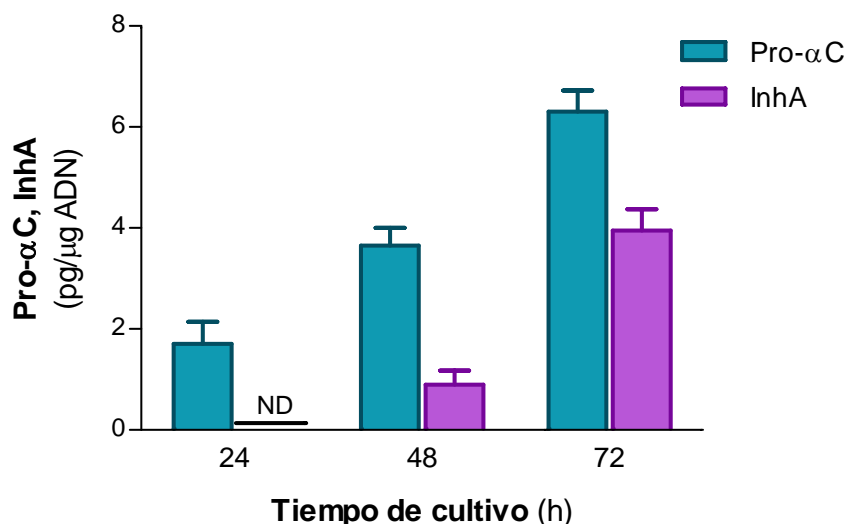


**Figura 21:** Producción de esteroides en presencia de sustratos esteroidogénicos. Las células KGN fueron cultivadas durante 24 h en ausencia o presencia de androstenediona ( $\Delta_4A$ , 100nM) y 25-hidroxicolesterol (25-OH-col, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para determinar los niveles de estradiol y progesterona, respectivamente. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. ND: no detectable.

La producción de estradiol en la línea celular de granulosa KGN es dependiente de la presencia de androstenediona como sustrato aromatizable;  $195.2 \pm 8.5$  pg/ $\mu\text{g}$  ADN fueron producidos en esta condición experimental mientras que en ausencia del sustrato esteroidogénico no pudo ser detectada la presencia de estradiol en los medios condicionados luego de 24 h de cultivo. Por el contrario, la producción de progesterona no requirió el agregado de un sustrato exógeno, tal como se había reportado previamente en la literatura (Nishi y col., 2001); la presencia de 25-OH-col, no indujo cambios significativos en la capacidad de producción de este esteroide:  $220.6 \pm 21.1$  vs  $219.0 \pm 11.8$  pg/ $\mu\text{g}$  ADN (25-OH-col vs basal  $p=0.8853$ ).

### 3.2.2. Determinación del tiempo de cultivo para evaluar la producción de péptidos

Se analizó la capacidad de las células de la granulosa KGN para producir subunidad  $\alpha$  de inhibina, los dímeros de inhibina A y B, activina A y AMH en condiciones basales durante 24, 48 y 72 h (Fig. 22).



**Figura 22:** Determinación del tiempo de cultivo óptimo para evaluar la producción de péptidos. Las células de la granulosa humana fueron cultivadas en condiciones basales durante 24, 48 y 72 h. Se evaluaron los niveles de subunidad  $\alpha$  de inhibina (Pro- $\alpha$ C) e inhibina A (InhA) en los medios condicionados. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. ND: no detectable.

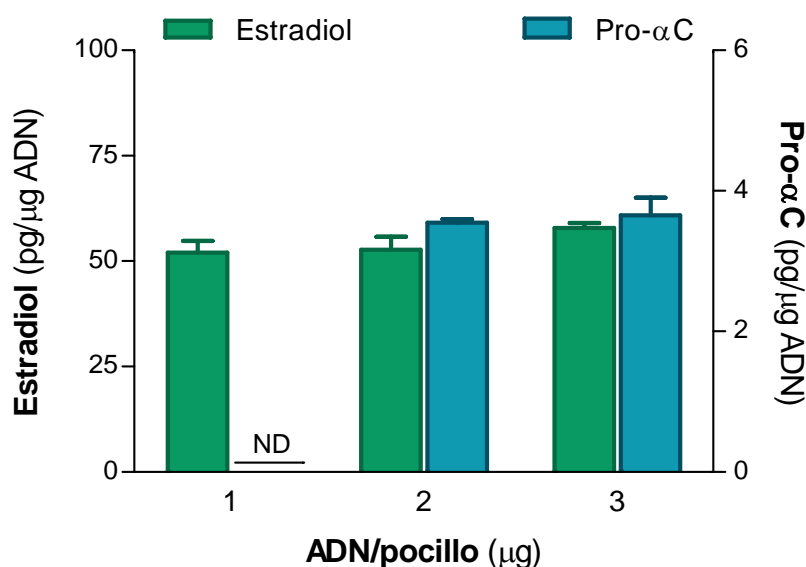
La producción de subunidad  $\alpha$  de inhibina se pudo detectar a partir de las 24 h:  $1.70 \pm 0.25$  pg/ $\mu$ g ADN; su producción aumentó progresivamente al prolongar el tiempo de cultivo: 48 h:  $3.65 \pm 0.20$  y 72 h:  $6.30 \pm 0.24$  pg/ $\mu$ g ADN. Los niveles de inhibina A fueron no detectables a las 24 h de cultivo y estuvieron muy próximos al límite de detección del ensayo a las 48 h:  $0.90 \pm 0.16$  pg/ $\mu$ g ADN; luego de 72 h el nivel de inhibina A en los medios condicionados fue:  $3.95 \pm 0.24$  pg/ $\mu$ g ADN.

En base a estos resultados, se realizaron cultivos de 72 h para evaluar con mayor precisión la producción de ambos péptidos.

La activina A fue detectada en los medios de cultivo a los tres tiempos evaluados; los niveles de inhibina B y AMH se mantuvieron por debajo del límite de detección de los ensayos utilizados en estas condiciones experimentales.

### 3.2.3. Efecto de la densidad celular de los cultivos en la producción de esteroides y péptidos

Para determinar si la densidad celular podría afectar la respuesta endocrina de la línea celular KGN, se sembraron células a diferentes densidades: 1, 2 y 3  $\mu\text{g}$  de ADN/pocillo. Se evaluó el efecto de la densidad celular sobre la producción en los medios condicionados de dos parámetros, estradiol y subunidad  $\alpha$  de inhibina, en condiciones basales y bajo estímulo con FSHrh (Fig. 23).



**Figura 23:** Efecto de la densidad celular sobre la producción de estradiol y subunidad  $\alpha$  de inhibina, Pro- $\alpha\text{C}$ , en condiciones basales. Las células fueron sembradas a una densidad celular de 1, 2 y 3  $\mu\text{g}$  de ADN/pocillo y cultivadas por 24 y 72 h en condiciones basales para determinar los niveles de estradiol y subunidad  $\alpha$  de inhibinas (Pro- $\alpha\text{C}$ ), respectivamente. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. ND: no detectable.

La densidad celular no afectó la producción de estradiol y de Pro- $\alpha$ C en estas células ya que no se observaron diferencias significativas en los niveles del esteroide y del péptido en los medios condicionados provenientes de pocillos conteniendo 1, 2 o 3  $\mu$ g de ADN para estradiol y entre 2 y 3  $\mu$ g de ADN para Pro- $\alpha$ C (no se llegó a detectar este péptido en pocillos con una densidad celular de 1  $\mu$ g de ADN).

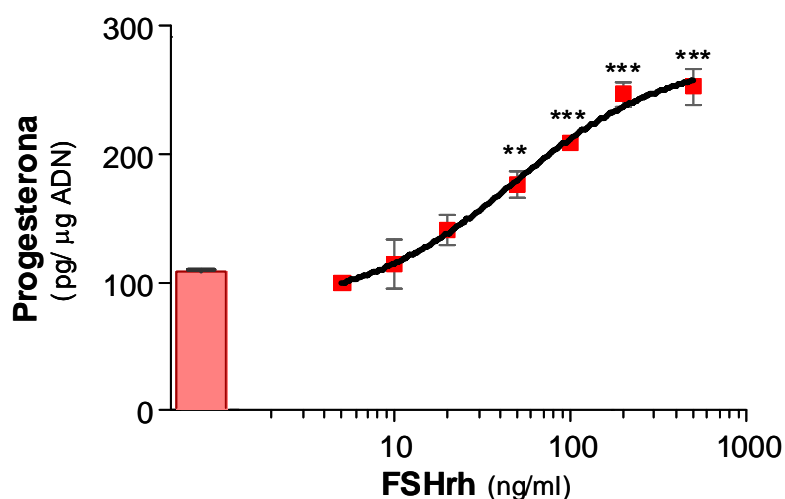
Se evaluó el posible efecto de las variaciones en la densidad celular sobre la capacidad de respuesta al estímulo con FSHrh. Para ello, las células fueron sembradas a una densidad celular de 2 y 3  $\mu$ g de ADN y estimuladas durante 24 h con 20 ng/mL de gonadotrofina. El incremento de la producción de estradiol observado a una densidad celular de 2  $\mu$ g ADN/pocillo fue de  $1.21 \pm 0.02$  y de Pro- $\alpha$ C  $1.63 \pm 0.08$  veces respecto de la condición basal. Un estímulo de magnitud similar se observó en pocillos con una densidad celular de 3  $\mu$ g de ADN, E<sub>2</sub>:  $1.14 \pm 0.01$ , Pro- $\alpha$ C:  $1.79 \pm 0.04$  veces de estímulo (FSHrh vs basal, NS).

Con el fin de utilizar condiciones de cultivo idénticas para evaluar la producción de esteroides e inhibinas, se consideró una densidad celular óptima de 3  $\mu$ g de ADN/pocillo para todos los tratamientos.

### **3.3. Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la producción de esteroides y péptidos en la línea celular esteroideogénica de granulosa humana KGN**

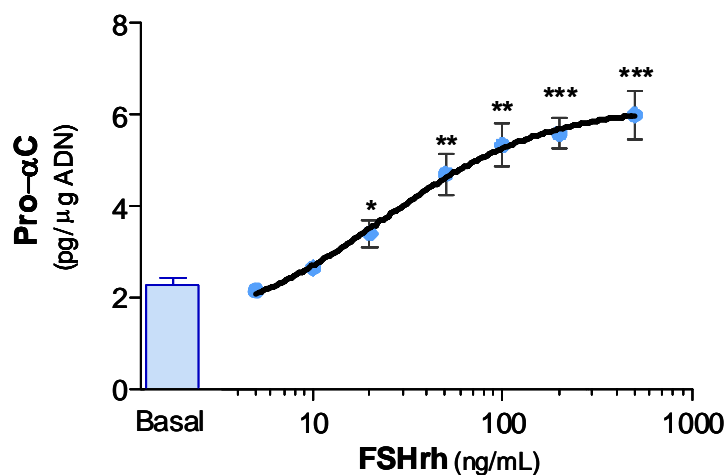
#### **3.3.1. Efecto de FSHrh nativa**

Se utilizaron dosis crecientes de FSHrh en su estado nativo con el objeto de determinar las concentraciones óptimas para evaluar el efecto inducido por las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la producción de progesterona y subunidad  $\alpha$  de inhibina.



**Figura 24:** Curvas dosis-respuesta de FSHrh nativa. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con diferentes dosis de FSHrh nativa. Las concentraciones de FSHrh se expresan en términos del estándar hFSH-2. Se determinaron en los medios condicionados los niveles de progesterona. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes; expresados como media  $\pm$  EEM de triplicados en cada condición. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  respecto del basal.

El agregado de dosis crecientes de FSHrh nativa (5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500 ng/mL) produjo una estimulación en forma dosis-dependiente de la producción de progesterona. La mínima dosis de hormona necesaria para inducir un aumento significativo en la producción del esteroide fue de 50 ng/mL (FSHrh 50ng/mL:  $176.4 \pm 9.9$  pg/ $\mu$ gADN vs basal:  $107.0 \pm 1.6$  pg/ $\mu$ g ADN,  $p < 0.01$ ). Esta producción se incrementó, alcanzándose la respuesta máxima a la dosis de 200 ng/mL (200 ng/mL:  $247.0 \pm 9.7$  vs 500ng/mL:  $252.8 \pm 13.9$  pg/ $\mu$ g ADN, NS) (Fig. 24).



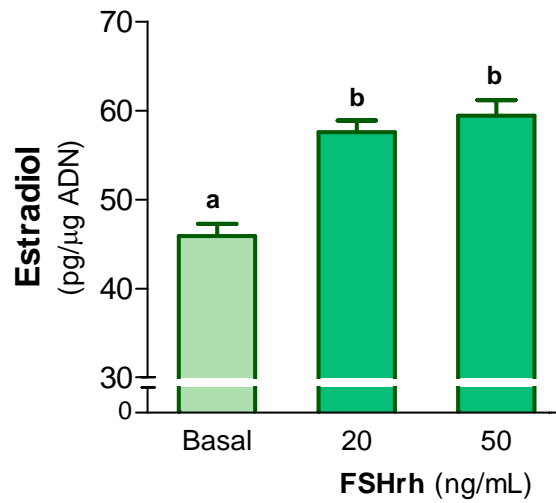
**Figura 25:** Curvas dosis-respuesta de FSHrh nativa. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con diferentes dosis de FSHrh nativa. Se determinaron en los medios condicionados los niveles de subunidad  $\alpha$  de inhibina (Pro- $\alpha$ C). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes; expresados como media  $\pm$  EEM de triplicados en cada condición. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  respecto del basal.

La curva dosis-respuesta de la subunidad  $\alpha$  de inhibina (Fig. 25) mostró que 20 ng/mL de FSHrh fueron necesarios para inducir un incremento significativo en los niveles de este péptido (20 ng/mL:  $3.4 \pm 0.2$  vs basal:  $2.3 \pm 0.2$  pg/ $\mu$ g ADN,  $p < 0.05$ ). La respuesta máxima de las células KGN se alcanzó a la concentración de 50 ng/mL:  $4.7 \pm 0.3$  pg/ $\mu$ g ADN (FSHrh 50 vs 100, 200 y 500 ng/mL, NS).

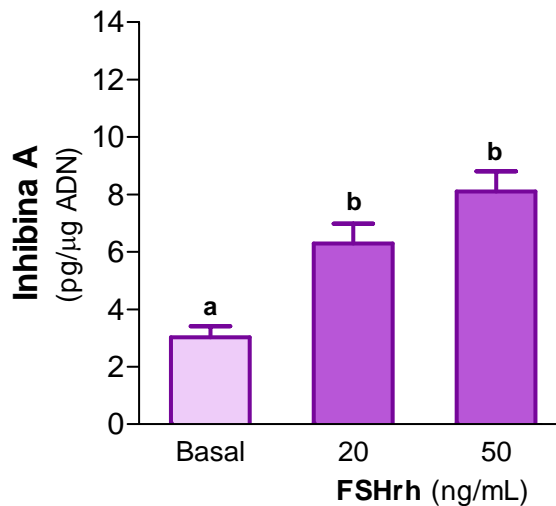
En base a estos hallazgos, se decidió utilizar las dosis de 20 y 50 ng/mL de FSHrh para determinar la respuesta de las células al estímulo de esta gonadotropina sobre la producción de estradiol, inhibina A y activina A (Fig. 26).



A



B



**Figura 26:** Efecto de la FSHrh nativa sobre la producción de estradiol e inhibina A. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con 20 y 50 ng/mL de FSHrh. Se determinaron en los medios condicionados los niveles de estradiol (Panel A) e inhibina A (Panel B). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes; expresados como media  $\pm$  EEM de triplicados en cada condición. Distintas letras indican diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales analizadas,  $p < 0.05$ .

La FSHrh no ejerció ningún efecto sobre la producción de activina A; los restantes parámetros evaluados fueron estimulados por la gonadotropina; sin embargo, la magnitud de este estímulo presentó diferencias de acuerdo a las dosis utilizadas.

La FSHrh estimuló la producción de estradiol (Fig. 26, panel A); no se observaron diferencias significativas en la respuesta a la gonadotropina entre las dosis de 20 y 50 ng/mL; basal:  $45.89 \pm 1.36$ , FSHrh 20 y 50 ng/mL:  $57.55 \pm 1.35$  y  $59.40 \pm 1.76$  pg/ $\mu$ g ADN, respectivamente (basal vs 20 ng/mL:  $p < 0.01$ ; dosis 20 vs 50 ng/mL, NS).

Si bien la producción de inhibina A fue estimulada en forma significativa por la FSHrh ( $p < 0.01$ ), no se observaron diferencias en la respuesta entre las dosis de 20 y 50 ng/mL; basal:  $3.03 \pm 0.38$ ; FSHrh 20 y 50 ng/mL:  $6.29 \pm 0.68$  y  $8.10 \pm 0.71$  pg/ $\mu$ g ADN, respectivamente (basal vs 20 ng/mL:  $p < 0.01$ ; dosis 20 vs 50 ng/mL, NS, panel B).

En condiciones basales se observó que la línea celular de granulosa humana KGN posee la capacidad de producir activina A,  $256.5 \pm 6.6$  pg/ $\mu$ g ADN, pero a diferencia de los parámetros ya descritos, la producción de este péptido no fue estimulada por la gonadotropina: FSHrh 20 ng/mL:  $221.9 \pm 6.1$  pg/ $\mu$ g ADN; FSHrh 50 ng/mL:  $240.1 \pm 15.7$  pg/ $\mu$ g ADN (basal vs 20 vs 50 ng/mL de FSHrh, NS).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la FSHrh nativa regula la actividad endocrina de las células KGN en términos de la producción de estradiol, progesterona, subunidad  $\alpha$  de inhibina e inhibina A. En base a estas evidencias se utilizarán las dosis de 20 y 50 ng/mL para evaluar el posible efecto diferencial que las variantes glicosiladas, aisladas a partir de FSHrh, podrían ejercer sobre la actividad endocrina de estas células.

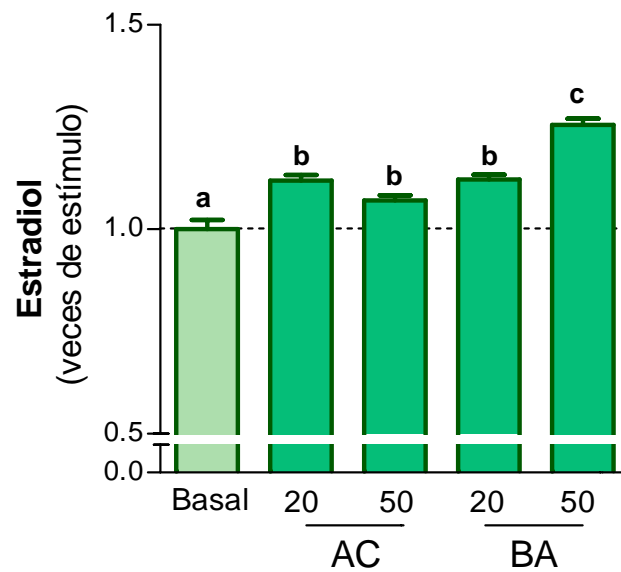
### **3.3.2. Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la producción de esteroides y péptidos**

A continuación se evaluó la posible implicancia del grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh sobre la producción de esteroides y péptidos en la línea celular de granulosa humana KGN.

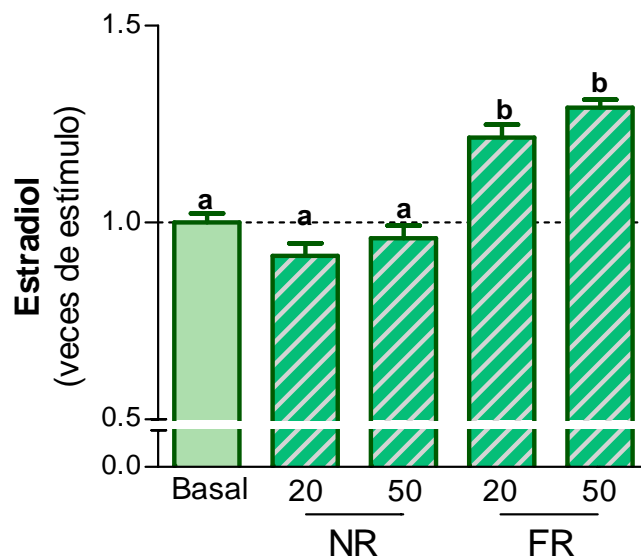
### ***Producción de estradiol***

El grado de sialilación de la FSHrh moduló en forma diferencial la producción de estradiol en este modelo experimental. Si bien ambas preparaciones de análogos de carga, aisladas a partir de la FSHrh nativa, estimularon la producción de estradiol (basal vs AC y BA,  $p < 0.05$ ) se observaron diferencias en la magnitud de este efecto. Los análogos de carga AC ejercieron un efecto estimulador similar a las dos dosis estudiadas. El estímulo inducido por los análogos de carga con menor grado de sialilación, aislados a  $\text{pH} > 5$ , BA, fue más marcado cuando se utilizó la mayor dosis: 50 vs 20 ng/mL:  $1.26 \pm 0.02$  vs  $1.12 \pm 0.01$  veces de estímulo respecto del basal,  $p < 0.01$  (Fig. 27, panel A).

A



B



**Figura 27:** Efecto de las variantes glicosiladas de la FSHrh sobre la producción de estradiol. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con 20 y 50 ng/mL de variantes glicosiladas de FSHrh; panel A: análogos de carga con mayor grado de sialilación, AC, y análogos de carga con menor grado de sialilación, BA; panel B: variantes glicosiladas con oligosacáridos complejos, NR y variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido, FR. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal (línea de puntos), como media  $\pm$  EEM de quintuplicados en cada condición. Distintas letras indican diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales analizadas,  $p < 0.05$ .

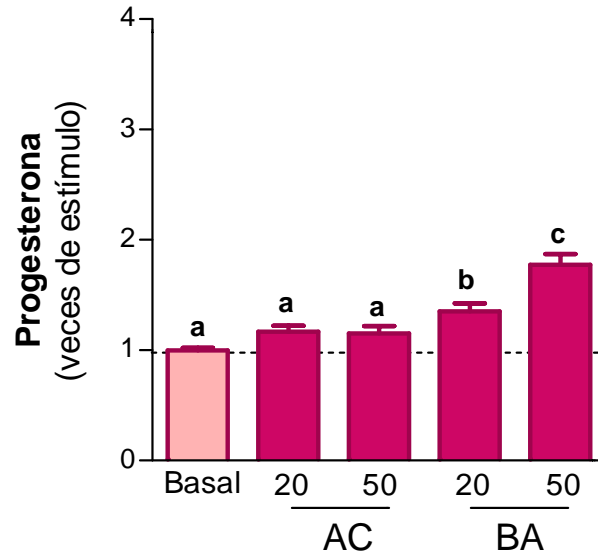
Al estudiar el efecto del grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh sobre la producción de este esteroide, se pudo observar que las glicoformas con oligosacáridos complejos, NR, no tuvieron la capacidad de estimular la producción de estradiol. Por el contrario, las glicoformas con oligosacáridos que no han completado su procesamiento, FR, estimularon significativamente la producción de estradiol ( $p < 0.001$ ); la magnitud de este efecto fue similar a las dos dosis analizadas (20 ng/mL:  $1.21 \pm 0.03$ ; 50 ng/mL:  $1.29 \pm 0.02$  veces respecto del basal) (Fig. 27, panel B).

### ***Producción de progesterona***

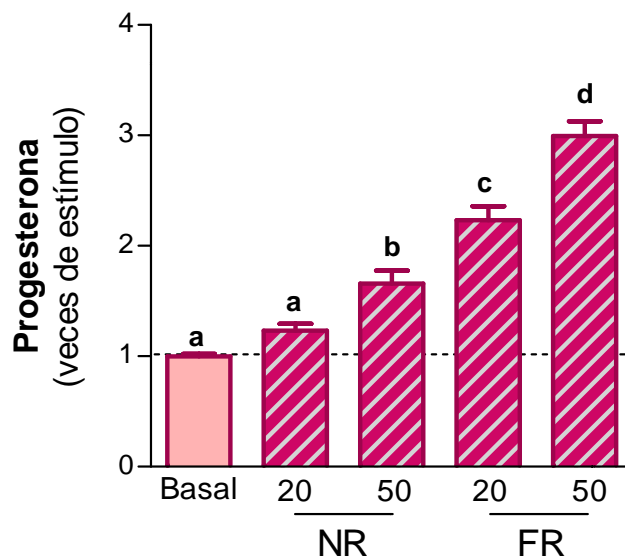
Los análogos de carga aislados a  $pH < 4$ , AC, no ejercieron ningún efecto sobre la producción de este esteroide a las dosis estudiadas. Por el contrario, los análogos de carga con menor grado de sialilación, aislados a  $pH > 5$ , BA, estimularon significativamente la producción de progesterona ( $p < 0.05$ ); el incremento fue más marcado cuando se utilizó la mayor dosis: 50 vs 20 ng/mL:  $1.78 \pm 0.09$  vs  $1.35 \pm 0.07$  veces de estímulo respecto del basal,  $p < 0.05$  (Fig. 28, panel A).

Cuando se estimularon las células con variantes glicosiladas de FSHrh con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos, ambas preparaciones de glicoformas, NR y FR aislados a partir de la hormona nativa, estimularon la producción de progesterona. Si bien las variantes NR tuvieron un efecto estimulador a la mayor dosis evaluada, 50 ng/mL:  $1.66 \pm 0.12$  veces respecto del basal ( $p < 0.05$ ) las glicoformas FR resultaron ser más biopotentes pues estimularon la producción de progesterona a una dosis menor, 20 ng/mL:  $2.23 \pm 0.13$  veces de estímulo respecto del basal ( $p < 0.05$ ). El incremento fue de mayor magnitud al utilizar la dosis de glicoformas FR de 50 ng/mL:  $2.99 \pm 0.14$  veces respecto de la condición basal; 20 vs 50 ng/mL,  $p < 0.001$  (Fig. 28, panel B).

A



B



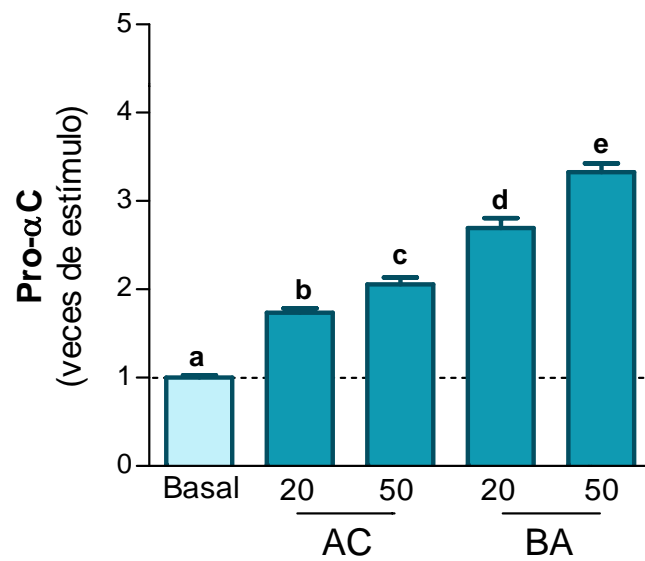
**Figura 28:** Efecto de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre la producción de progesterona. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con 20 y 50 ng/mL de variantes glicosiladas de FSHrh; panel A: análogos de carga con mayor grado de sialilación, AC, y análogos de carga con menor grado de sialilación, BA; panel B: variantes glicosiladas con oligosacáridos complejos, NR y variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido, FR. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM (quintuplicados de cada condición) en veces de estímulo respecto de la condición basal (línea de puntos). Distintas letras indican diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales analizadas,  $p < 0.05$ .

### ***Producción de subunidad $\alpha$ de inhibina***

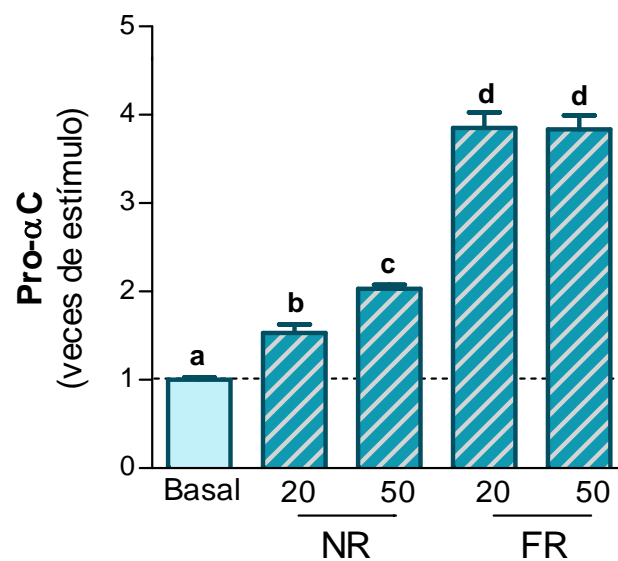
Ambas preparaciones de análogos de carga aisladas a partir de la FSHrh estimularon la producción de subunidad  $\alpha$  de inhibina en los cultivos a la menor dosis evaluada (basal vs AC y BA,  $p < 0.001$ ). Los análogos de carga aislados a  $\text{pH} < 4$ , AC, y a  $\text{pH} > 5$ , BA, estimularon la producción de la subunidad  $\alpha$  de inhibina, Pro- $\alpha\text{C}$ , en forma dosis-dependiente. El incremento inducido por las variantes glicosiladas con menor grado de sialización, BA, fue más marcado tanto a la dosis de 20 como 50 ng/mL cuando se comparó con el estímulo inducido por los análogos de carga AC: dosis 20 ng/mL: BA vs AC:  $2.69 \pm 0.11$  vs  $1.73 \pm 0.05$  veces respecto del basal ( $p < 0.001$ ); dosis 50 ng/mL: BA vs AC:  $3.33 \pm 0.10$  vs  $2.06 \pm 0.08$  veces respecto del basal, ( $p < 0.001$ ) (Fig. 29, panel A).

Las dos preparaciones de glicoformas de FSHrh con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos evaluadas estimularon la producción de la subunidad  $\alpha$  de inhibina, Pro- $\alpha\text{C}$  (Fig. 29, panel B). El efecto inducido por las variantes NR fue dosis-dependiente. A la dosis de 20 ng/mL la respuesta fue de  $1.53 \pm 0.10$  y a la dosis de 50 ng/mL:  $2.03 \pm 0.05$  veces respecto del basal ( $p < 0.05$ ). Al evaluar el estímulo de las glicoformas FR a la menor dosis estudiada se observó un efecto más marcado respecto del inducido por las glicoformas NR ( $3.85 \pm 0.18$  vs  $1.53 \pm 0.10$  veces respecto del basal,  $p < 0.001$ ). La magnitud de este estímulo no se modificó con la dosis de 50 ng/mL (NS).

A



B



**Figura 29:** Efecto de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre la producción de subunidad  $\alpha$  de inhibina (Pro- $\alpha$ C). La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con 20 y 50 ng/mL de variantes glicosiladas de FSHrh; panel A: análogos de carga con mayor grado de sialilación, AC, y análogos de carga con menor grado de sialilación, BA; panel B: variantes glicosiladas con oligosacáridos complejos, NR y variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido, FR. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM (quintuplicados de cada condición) en veces de estímulo respecto de la condición basal (línea de puntos). Distintas letras indican diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales analizadas,  $p < 0.05$ .

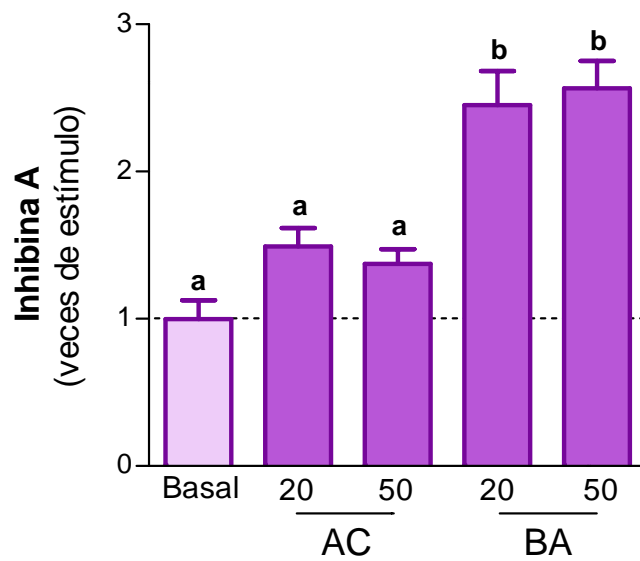


### ***Producción de inhibina A***

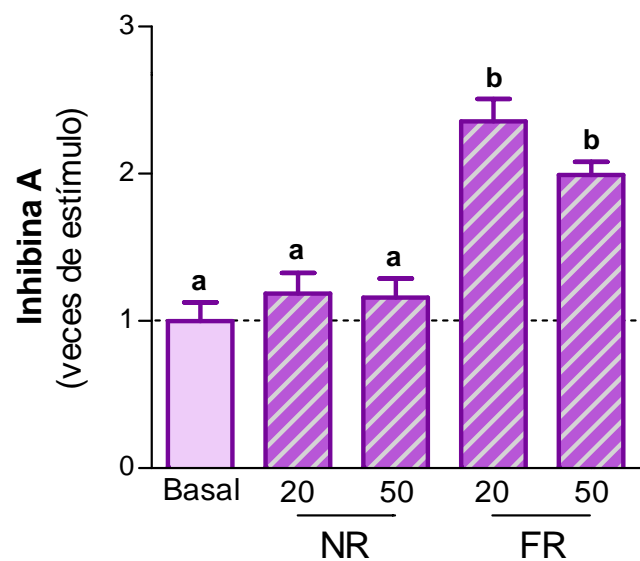
Al estudiar el efecto del grado de sialilación de los oligosacáridos presentes en la FSHrh sobre la producción de este inhibina A, se pudo observar que los análogos con mayor grado de sialilación, AC no ejercieron ningún efecto sobre la producción de este péptido. Los análogos con menor grado de sialilación, BA, estimularon significativamente la producción de inhibina A a las dos dosis analizadas. El incremento en los niveles de inhibina A en células estimuladas con 20 ng/mL de BA fue de  $2.45 \pm 0.23$  veces respecto del basal ( $p < 0.001$ ). Un estímulo de magnitud similar se mantuvo a la dosis de 50 ng/mL; en esta condición experimental los análogos de carga BA incrementaron en  $2.57 \pm 0.19$  veces la producción basal ( $p < 0.001$ ) (Fig. 30, panel A).

A diferencia de la respuesta observada en la producción de Pro- $\alpha$ C, cuando se estimularon las células con variantes glicosiladas de FSHrh con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos, solo las glicoformas con oligosacáridos que no han completado su procesamiento, FR, estimularon la producción de inhibina A. El incremento inducido por las variantes FR fue significativo a la menor dosis evaluada, 20 ng/mL:  $2.36 \pm 0.15$  veces de estímulo respecto del basal ( $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias en la respuesta entre las dosis de 20 y 50 ng/mL (NS) (Fig. 30, panel B).

A



B

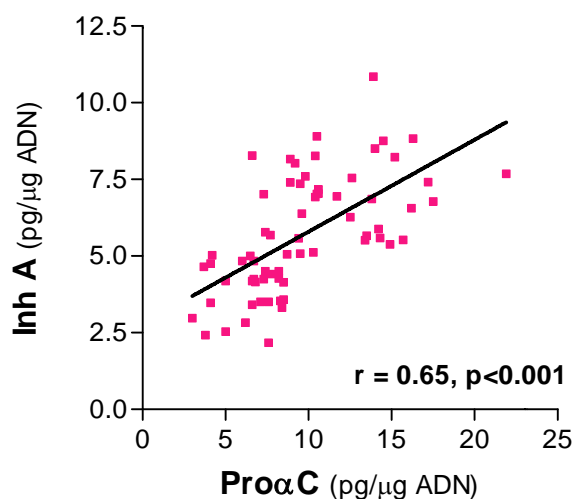


**Figura 30:** Efecto de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre la producción de inhibina A. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con 20 y 50 ng/mL de variantes glicosiladas de FSHrh; panel A: análogos de carga con mayor grado de sialilación, AC, y análogos de carga con menor grado de sialilación, BA; panel B: variantes glicosiladas con oligosacáridos complejos, NR y variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido, FR. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM (quintuplicados de cada condición) en veces de estímulo respecto de la condición basal (línea de puntos). Distintas letras indican diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales analizadas,  $p < 0.05$ .

Estos resultados nos permiten demostrar que la actividad endocrina de la línea celular de granulosa humana KGN, en términos de producción de estradiol, progesterona, subunidad  $\alpha$  de inhibinas e inhibina A, esta regulada diferencialmente tanto por el grado de sialilación como por el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en las variantes glicosiladas de FSHrh.

### 3.4. Correlación de los niveles de inhibina A y de subunidad $\alpha$ de inhibina

La inhibina A es un dímero formado por la subunidad  $\beta$ A y la subunidad  $\alpha$  de inhibina; en consecuencia, ambas subunidades deben estar disponibles en la célula en proporciones adecuadas para la formación del dímero. Para determinar la posible relación entre la producción del dímero y de la subunidad  $\alpha$  de inhibina se realizó un análisis de correlación lineal con los datos de estos dos parámetros obtenidos en medios de cultivo provenientes del mismo pocillo en condiciones basales y bajo el estímulo de las distintas preparaciones de variantes glicosiladas.



**Figura 31:** Correlación entre los niveles de inhibinas A y subunidad  $\alpha$  de inhibina. El coeficiente de correlación entre las dos variables fue determinado mediante el análisis de correlación lineal de Pearson, los datos fueron transformados a logaritmo decimal previo al análisis.

Se observó una correlación positiva, altamente significativa, entre los niveles de la forma dimérica de inhibina (inhibina A) y los de subunidad  $\alpha$  de inhibina: coeficiente de correlación de Pearson: 0.6524 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 31). Estos resultados demuestran que la producción del heterodímero es directamente proporcional a la producción de la subunidad  $\alpha$  de inhibinas.

## CAPITULO IV

### **4. Regulación diferencial de la expresión génica global en la línea celular esteroidogénica de granulosa humana KGN por variantes glicosiladas de FSHrh**

En el capítulo anterior se ha demostrado que las variantes glicosiladas de la FSHrh modulan diferencialmente la actividad endocrina, en términos de producción de esteroides sexuales e inhibinas en la línea celular de granulosa humana KGN. Asimismo, numerosos trabajos han descrito la acción de esta gonadotropina a nivel transcripcional, modulando de esta manera la respuesta celular (Fitzpatrick y col., 1991; Selvaraj y col., 1996; Lavoie y col., 1999). En base a estas evidencias se decidió avanzar con los estudios a nivel transcripcional para evaluar el efecto del grado de sialilación y de la complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh sobre el perfil de expresión génica global de la línea celular de granulosa humana KGN y explorar el posible efecto sobre funciones intrínsecas de este tipo celular.

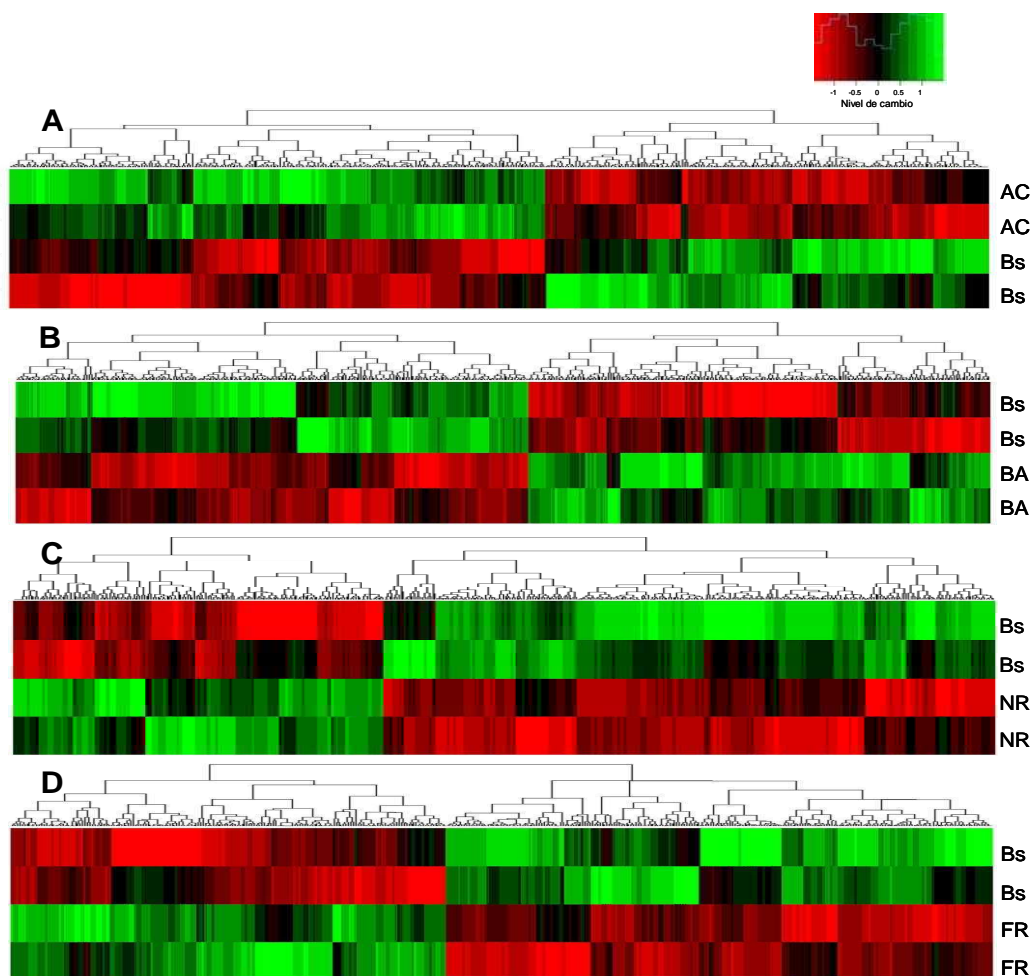
#### **4.1. Análisis de la expresión génica por microarreglos de ADN**

Se utilizó la técnica de microarreglos de ADN ya que esta metodología permite evaluar la expresión de un gran número de genes en forma simultánea.

##### **4.1.1. Diferencias en la expresión génica inducidas por variantes glicosiladas de FSHrh**

En primer lugar se obtuvo el perfil de expresión global inducido por las distintas preparaciones de las variantes glicosiladas de FSHrh al estimular la línea celular KGN; se comparó la respuesta inducida por cada condición experimental con el perfil de expresión obtenido en condiciones basales; es decir, sin estímulo agregado ( $p < 0.05$ ). Estos resultados se muestran en los mapas de calor (Fig. 32). Se puede observar que el patrón de expresión basal cambia al estimular la línea celular con las diferentes preparaciones de variantes glicosiladas de FSHrh.

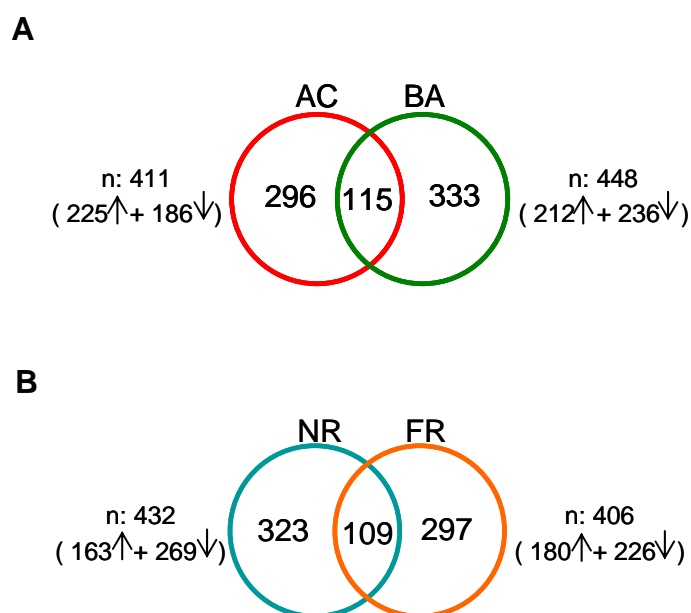
El listado completo de genes cuya expresión se modificó por acción de las variantes glicosiladas de FSHrh se incluye en la sección anexos de esta Tesis Doctoral.



**Figura 32:** Perfil de expresión génica: mapas de calor. Agrupamiento jerárquico de genes regulados diferencialmente por las distintas variantes glicosiladas de FSHrh: AC, BA, NR y FR respecto de la condición basal (Bs): panel A: Bs vs análogos de carga con mayor grado de sialilación; panel B: Bs vs análogos de carga con menor grado de sialilación; panel C: Bs vs variantes glicosiladas con oligosacáridos complejos; panel D: Bs vs variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido. Las filas representan réplicas por condición y cada columna un gen. Los colores indican niveles de expresión relativa.

Este análisis permitió identificar grupos de genes que modificaron sus niveles de expresión como consecuencia del tratamiento de las células KGN con las distintas variantes glicosiladas de FSHrh. Los resultados mostraron que del total de genes estudiados, los análogos de carga aislados a pH<4, AC y pH>5, BA afectaron significativamente ( $p<0.05$ ) la expresión de 411 y 448 genes, respectivamente; mientras

que las glicofomas de FSHrh con diferente grado de complejidad de sus oligosacáridos, NR y FR, modificaron significativamente la expresión de 432 y 406 genes, respectivamente. Los cambios se evaluaron respecto del patrón de expresión obtenido en condiciones basales. En la Figura 33 se muestra el número de genes y el sentido de cambio en el nivel de expresión, ya sea aumento o disminuido, inducido por las diferentes preparaciones de variantes glicosiladas de FSHrh.



**Figura 33:** Perfil de expresión génica inducida por las variantes glicosiladas de FSHrh. Las diferencias y similitudes entre los perfiles de expresión se esquematizan en los diagramas de Venn. Panel A: análisis comparativo de expresión génica en condición basal (Bs) y bajo estímulo con variantes glicosiladas AC y BA. Panel B: análisis comparativo de expresión génica en condición basal (Bs) y bajo estímulo con variantes glicosiladas NR y FR. Número de genes cuya expresión se modificó ( $\uparrow$  aumentado,  $\downarrow$  disminuido) significativamente ( $p < 0.05$ ) por efecto del tratamiento con las distintas variantes glicosiladas de FSHrh respecto de la condición basal.

Una vez identificados los genes cuya expresión fue afectada por cada una de las preparaciones de FSHrh se pudo comprobar, como era de esperar, que más de una preparación de variantes glicosiladas indujo cambios a nivel transcripcional sobre el mismo gen (ver información en anexo). Por esta razón, se consideró necesario realizar

un análisis comparativo con el fin de identificar los genes cuya expresión había sido afectada por grupos de variantes glicosiladas específicas.

En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos: el grado de sialilación afectó el nivel de expresión de 629 genes; los análogos de carga con mayor grado de sialilación, AC, indujeron cambios en el nivel de expresión de 296 genes y los de menor grado de sialilación, BA, 333 genes. Sin embargo, se pudo observar que 115 genes no fueron afectados por el grado de sialilación de la hormona ya que la respuesta al estímulo con ambas preparaciones de análogos de carga, fue similar (NS).

El grado de procesamiento de los oligosacáridos presentes en la FSHrh, NR y FR, afectó el nivel de expresión de 620 genes; las glicofomas con oligosacáridos complejos, NR, indujeron cambios en el nivel de expresión de 323 genes y las que presentan oligosacáridos de tipo híbrido, FR, de 297 genes. Sin embargo, se pudo observar que 109 genes no fueron afectados por el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la hormona ya que la respuesta al estímulo con ambas preparaciones fue similar (NS).

#### **4.2. Análisis funcional de los genes regulados por las variantes glicosiladas de FSHrh**

Para tratar de comprender el significado biológico que tendrían los cambios inducidos por las diferentes variantes glicosiladas de FSHrh en el perfil de expresión génica, se realizó un análisis funcional a partir de la información obtenida con la técnica de microarreglo. En este estudio se incluyó la totalidad de los genes cuyo nivel de expresión fue modificado por las diferentes variantes moleculares de FSHrh respecto de la condición basal.

Se utilizó el programa DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) para realizar el análisis de enriquecimiento de ontologías génicas; los tres tipos de ontologías definidas son procesos biológicos (BP), función molecular (MF) y componentes celulares (CC). Este análisis permite identificar términos enriquecidos por la expresión diferencial de genes (respecto del basal). Los términos



dentro de una ontología están estructurados en forma jerárquica; términos padres generales contienen términos hijos específicos. A su vez estos términos hijos son padres de términos hijos aún más específicos y de esta manera, se llega a identificar los términos con el mayor grado de especificidad de los cuales no parten más hijos. En las siguientes figuras los términos enriquecidos se han representado por círculos coloreados y aquellos que no lo fueron en círculos sin color.

Cuando se analizaron los términos enriquecidos relacionados con la ontología Componente Celular pudo observarse que tanto los términos padres como los términos hijos más específicos no presentaban cambios en la asociación en este tipo de ontología en respuesta al estímulo con las cuatro preparaciones de variantes glicosiladas de FSHrh. Los términos enriquecidos mostraron asociación con proteínas extracelulares e integrales de membrana.

El análisis de la ontología Procesos Biológicos (BP) mostró términos comunes bajo el efecto de las 4 preparaciones de FSHrh, mientras que otros eran propios de cada condición experimental. En cuanto a las categorías comunes relacionadas a procesos biológicos se destaca “señalización con receptores acoplados a proteínas G”, “respuesta a estímulos” y “respuesta inflamatoria”.

El análisis de la ontología Función Molecular (MF) también mostró que el término padre, actividad molecular de traducción y el término hijo, actividad de receptor acoplado a proteína G fue común en las cuatro condiciones experimentales analizadas. Sin embargo, los genes agrupados dentro de esta categoría presentaron diferencias que se detallan más adelante. Los términos enriquecidos específicamente por cada preparación se describen en las siguientes secciones.

Los términos comunes a las 4 preparaciones fueron representados en las siguientes figuras con círculos de color amarillo.

A continuación se detalla el análisis de ontologías de cada una de las variantes glicosiladas de FSHrh.

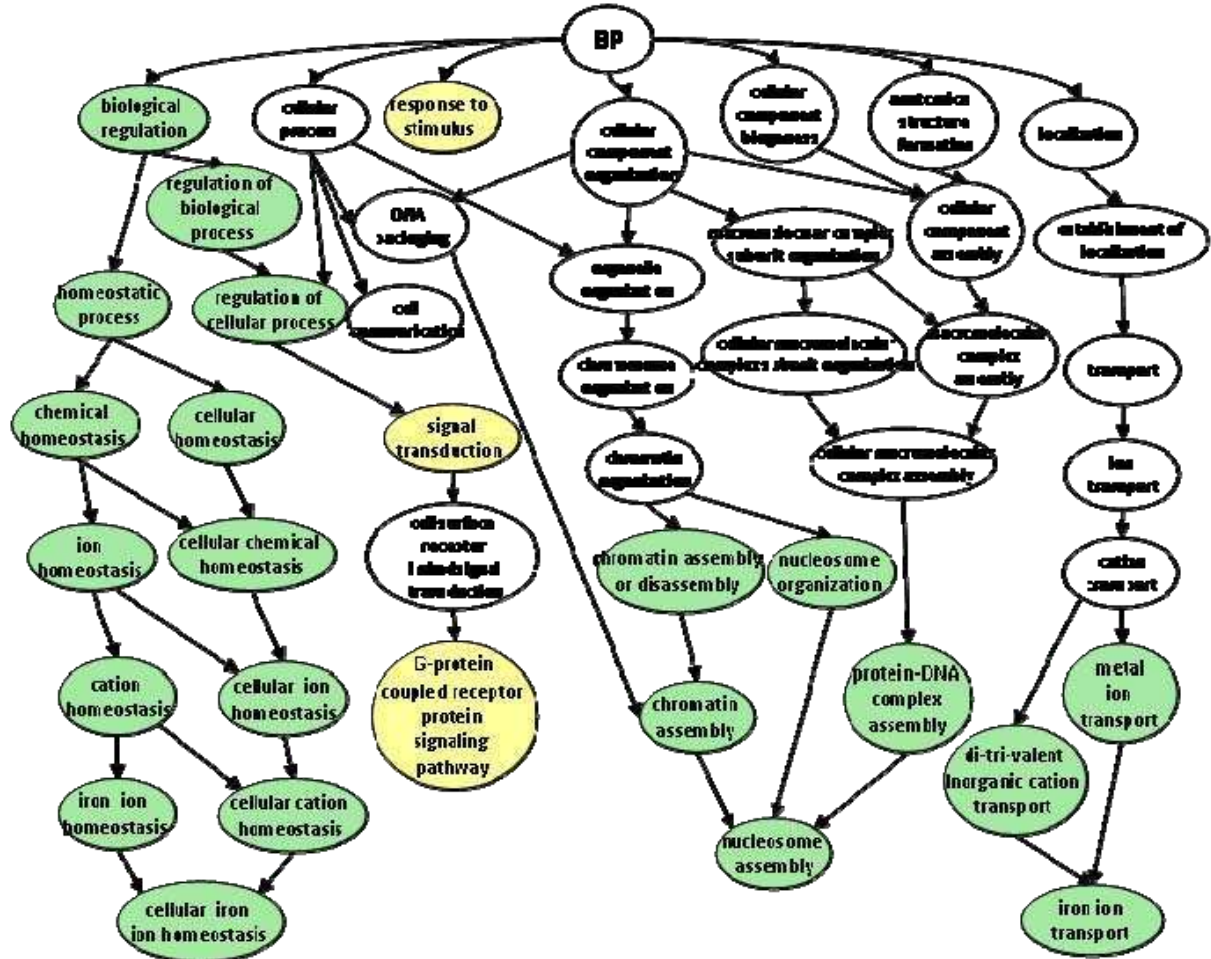
#### **4.2.1. Análisis funcional de los genes regulados por los análogos de carga AC**

Los análogos de carga con mayor grado de sialilación de sus oligosacáridos, AC, modificaron la expresión de genes relacionados con los siguientes procesos biológicos: homeostasis celular, ensamblaje del nucleosoma y transporte de iones (Fig. 34).

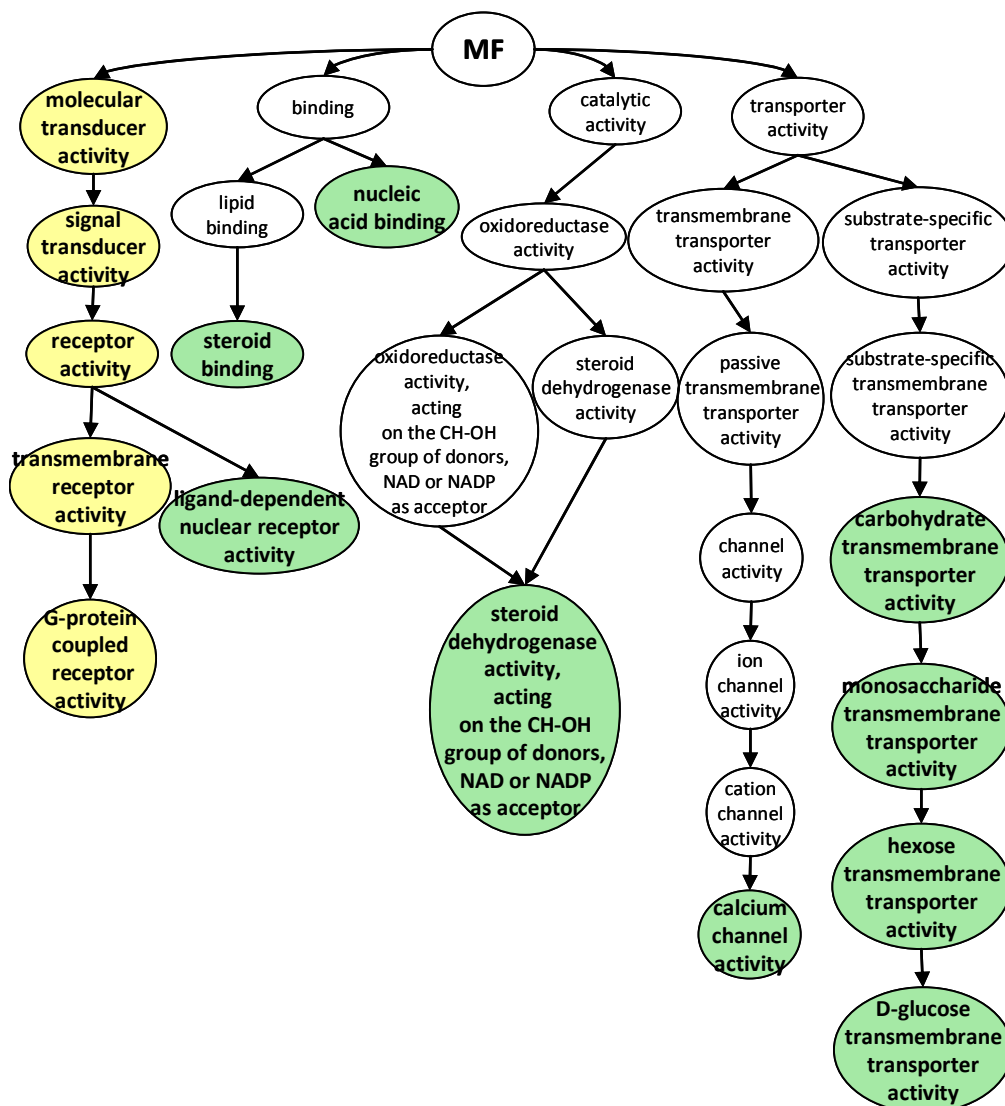
En cuanto a las funciones moleculares, los términos enriquecidos afectados por este grupo de variantes de glicosilación fueron unión a esteroides, actividad esteroide deshidrogenasas, receptores nucleares dependientes de ligando, actividad de los canales de calcio y transportadores de glucosa (Fig. 35).

En la Figura 36 se detallan algunos de los genes agrupados dentro de cada término relacionados a procesos biológicos y funciones moleculares y el nivel de expresión relativa ya sea aumentado (valor positivo) o disminuido (valor negativo).

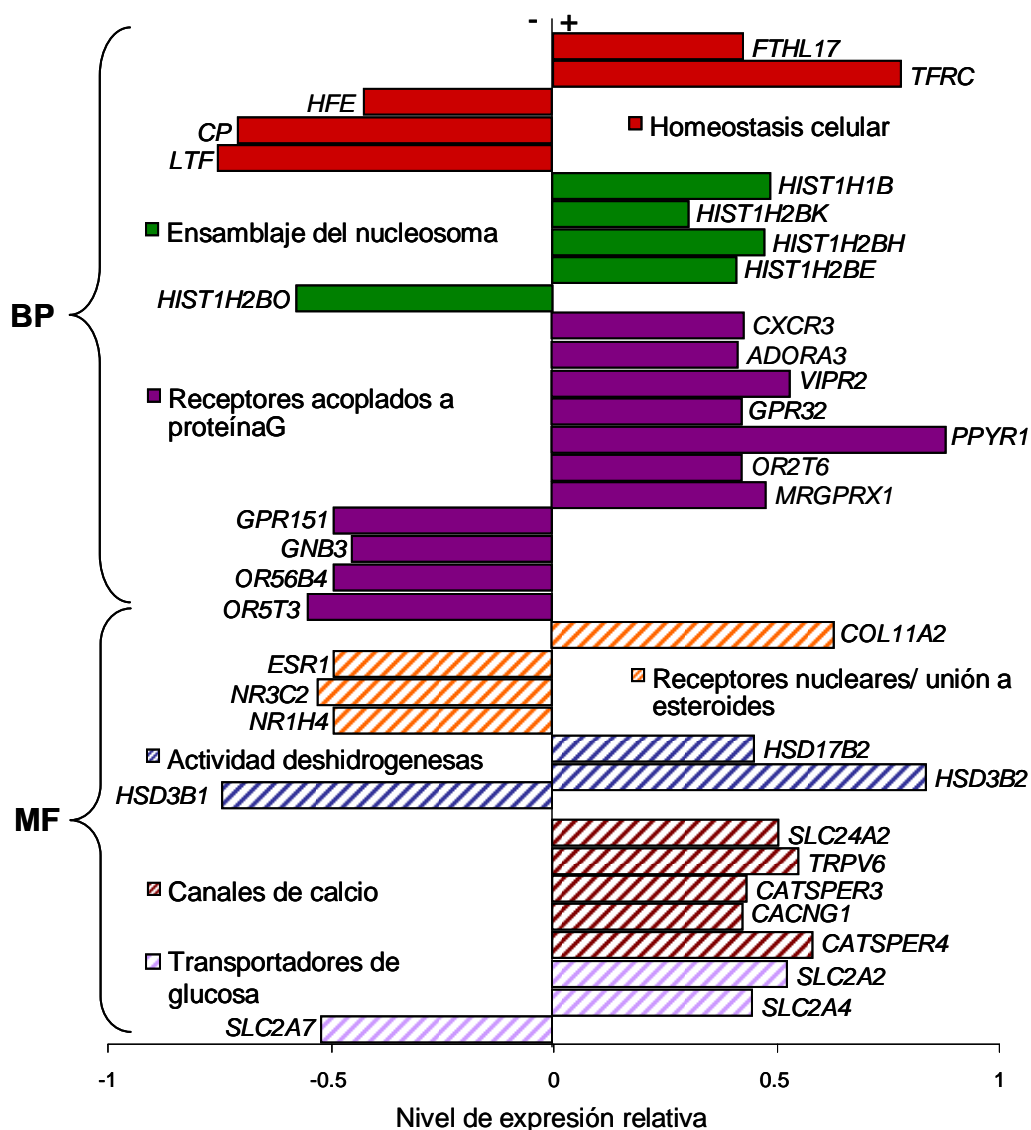
Análisis de la ontología: Procesos Biológicos (BP)



**Figura 34:** Integración visual de categorías enriquecidas relacionadas a procesos biológicos. Análisis de ontologías (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) realizado a partir de los genes expresados diferencialmente por los análogos de carga AC respecto de la condición basal.

Análisis de la ontología: **Función Molecular (MF)**

**Figura 35:** Integración visual de categorías enriquecidas relacionadas a funciones moleculares. Análisis de ontologías (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) realizado a partir de los genes expresados diferencialmente por análogos de carga **AC**, respecto de la condición basal.



**Figura 36:** Análisis funcional de los genes regulados por las variantes glicosiladas de FSHrh. Se detallan los genes diferenciales agrupados dentro de los términos enriquecidos según el análisis de ontologías génicas (BP: procesos biológicos; MF: funciones moleculares) y el nivel de expresión relativa, bajo el efecto de los análogos de carga más sialilados, AC. Barras llenas indican procesos biológicos y patrón a rayas indican funciones moleculares.



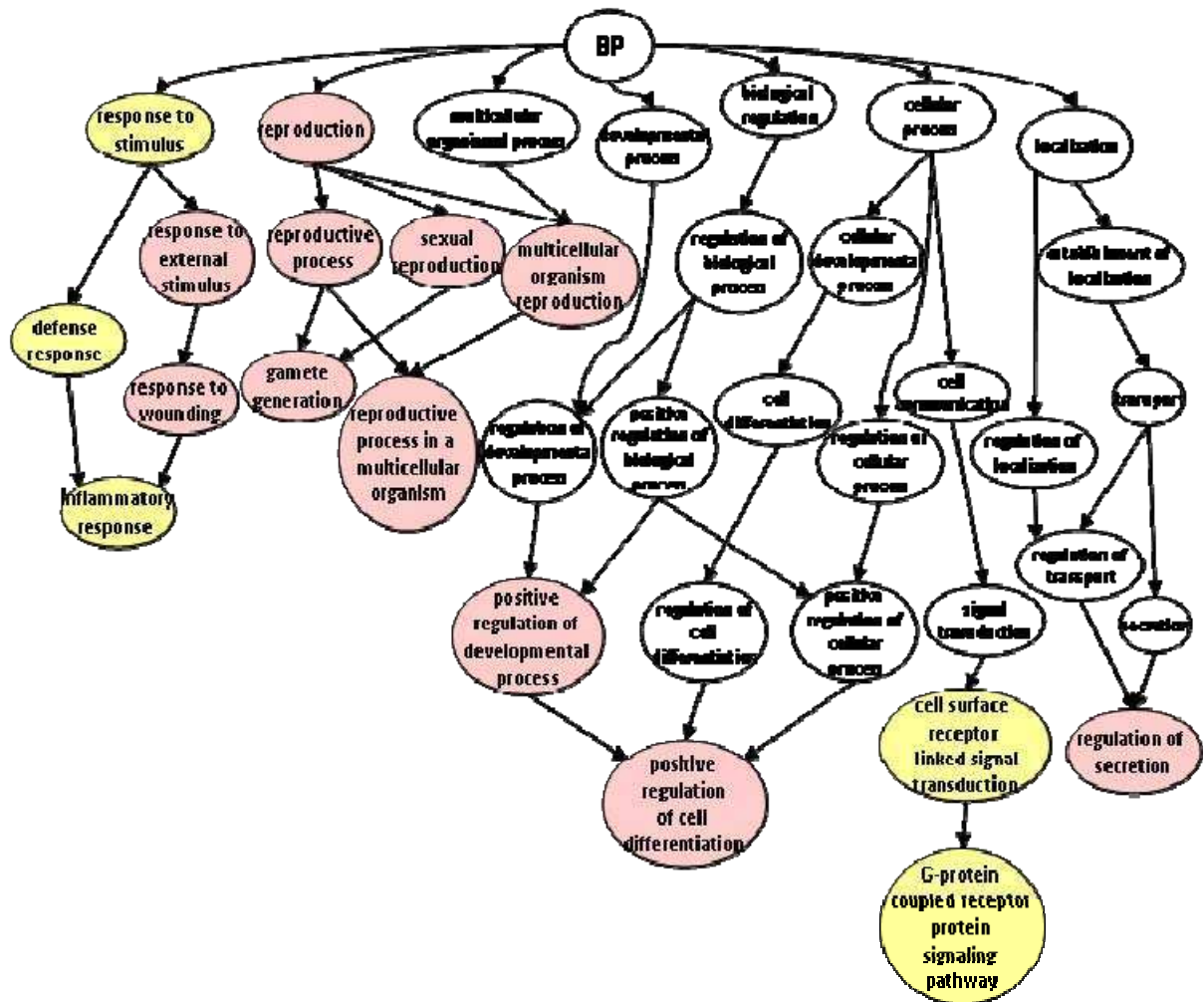
#### **4.2.2. Análisis funcional de los genes regulados por los análogos de carga BA**

Los análogos de carga con menor grado de sialilación de sus oligosacáridos, BA, modificaron la expresión de genes relacionados con los siguientes procesos biológicos: generación de gametas, regulación de la diferenciación celular y regulación de la secreción (Fig. 37).

En cuanto a las funciones moleculares, los términos enriquecidos afectados por este grupo de variantes de glicosilación se destacan: actividad de factores de crecimiento, la regulación de la óxido-nítrico sintetasa, unión de iones calcio y actividad de tirosina quinasa (Fig. 38).

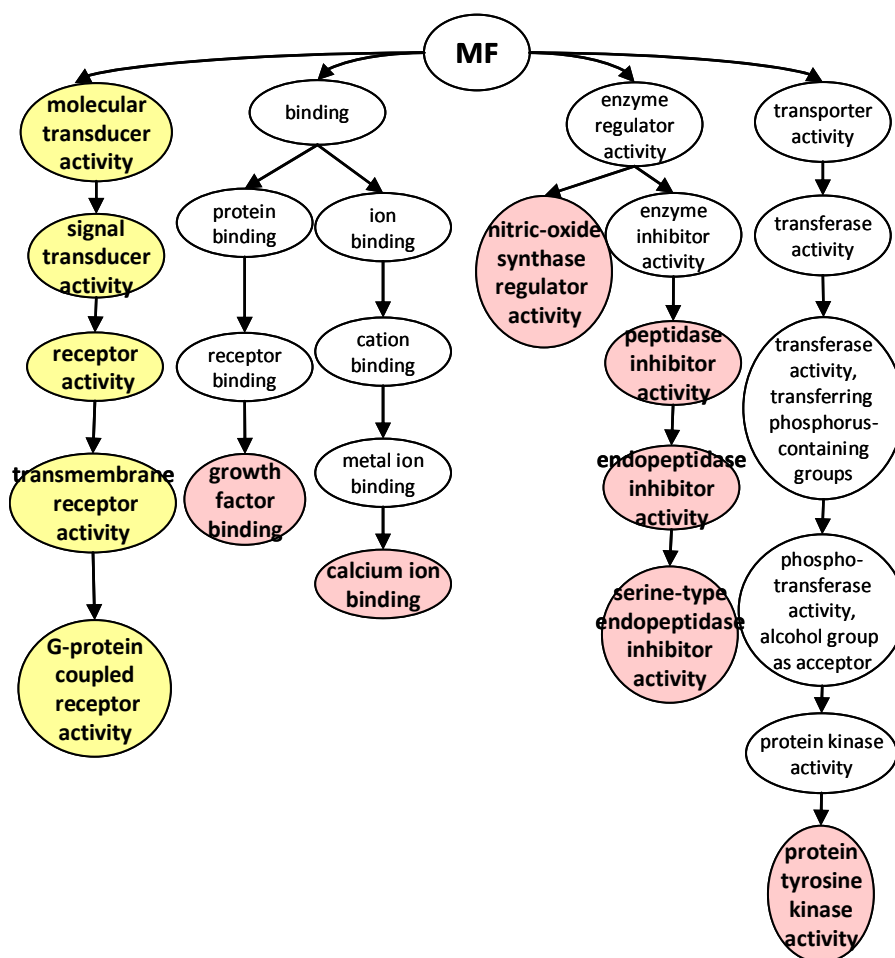
En la Figura 39 se detallan algunos de los genes agrupados dentro de cada término relacionados a procesos biológicos y funciones moleculares y el nivel de expresión relativa ya sea aumentado (valor positivo) o disminuido (valor negativo).

Análisis de la ontología: Procesos Biológicos (BP)

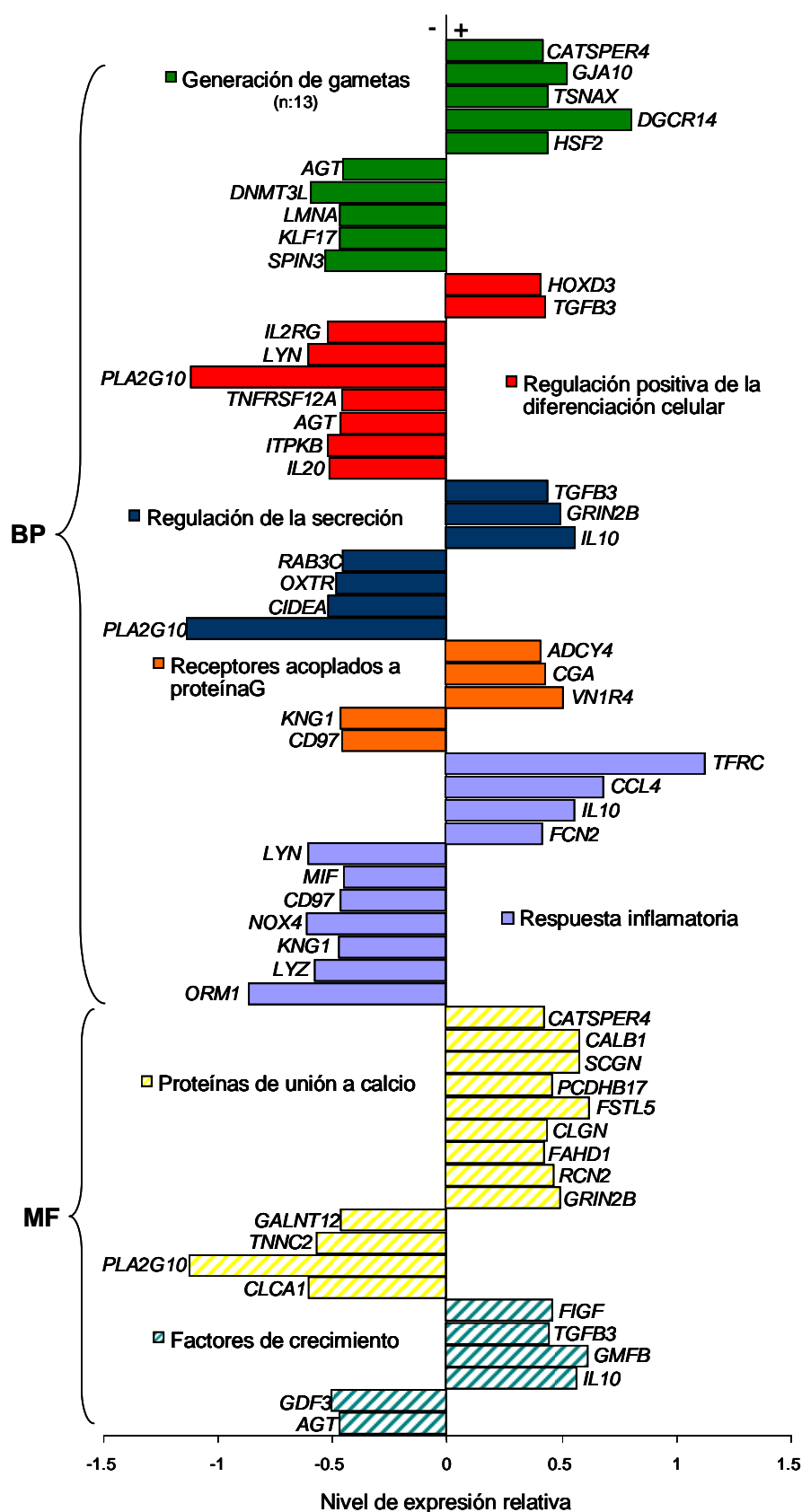


**Figura 37:** Integración visual de categorías enriquecidas relacionadas a procesos biológicos. Análisis de ontologías (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) realizado a partir de los genes expresados diferencialmente por los análogos de carga BA respecto de la condición basal.



Análisis de la ontología: Función Molecular (MF)

**Figura 38:** Integración visual de categorías enriquecidas relacionadas a funciones moleculares. Análisis de ontologías (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) realizado a partir de los genes expresados diferencialmente por análogos de carga **BA**, respecto de la condición basal.



**Figura 39:** Análisis funcional de los genes regulados por las variantes glicosiladas de FSHrh. Se detallan los genes diferenciales agrupados dentro de los términos enriquecidos según el análisis de

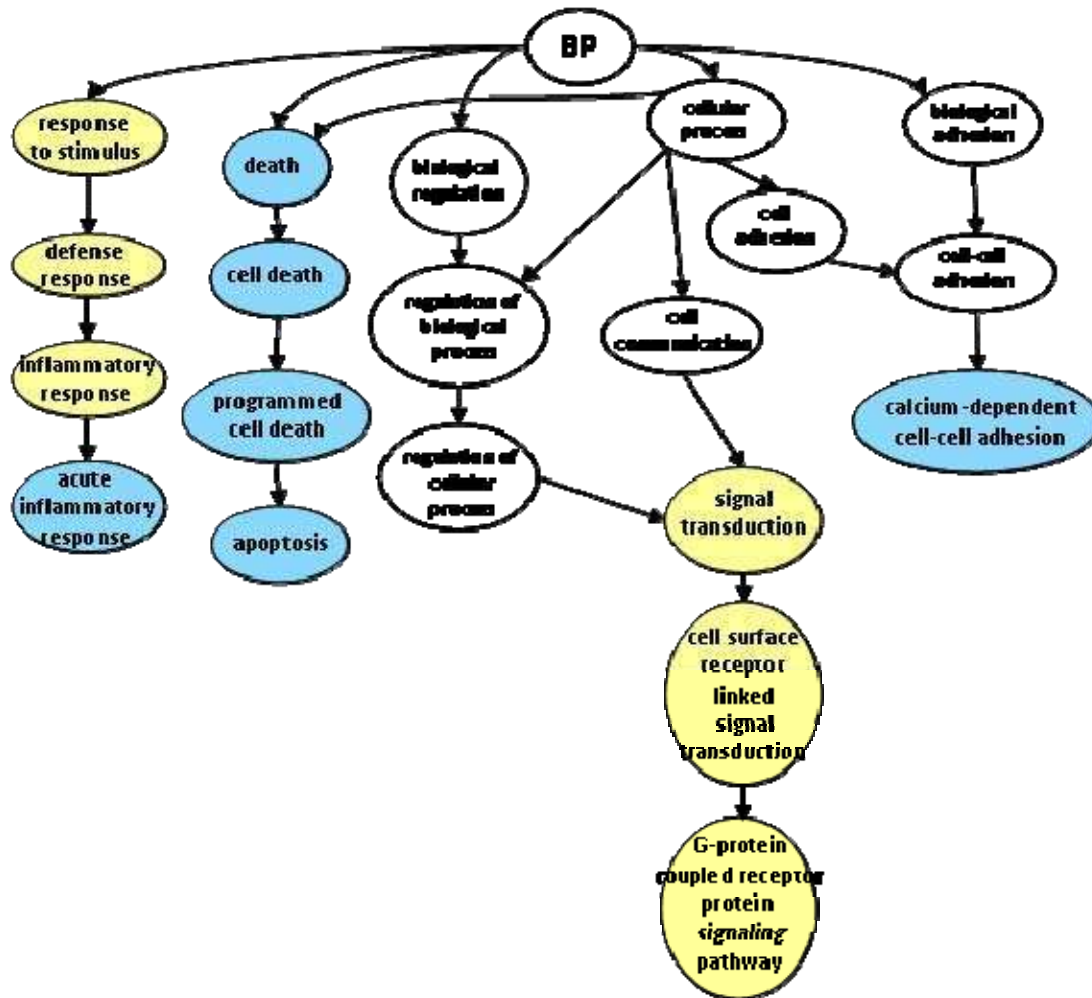
ontologías génicas (BP: procesos biológicos; MF: funciones moleculares) y el nivel de expresión relativa, bajo el efecto de los análogos de carga menos sialilados, **BA**. Barras llenas indican procesos biológicos y patrón a rayas funciones moleculares.

#### **4.2.3. Análisis funcional de los genes regulados por las glicoformas NR**

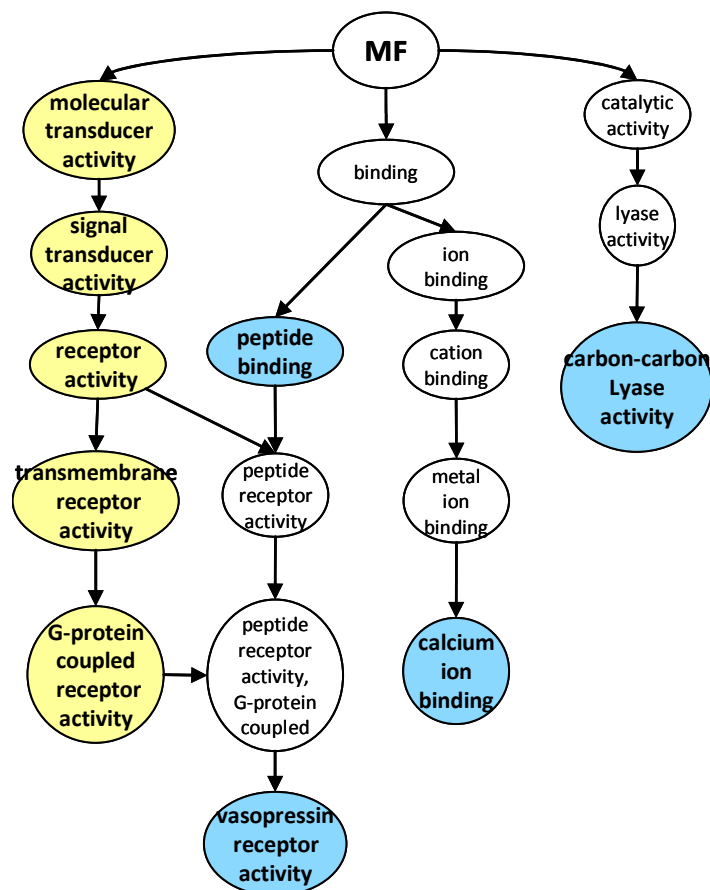
Las variantes glicosiladas de FSHrh con mayor grado de complejidad de sus oligosacáridos, NR, modificaron la expresión de genes relacionados con los siguientes procesos biológicos: apoptosis, respuesta inflamatoria aguda y adhesión celular dependiente de calcio (Fig. 40).

En cuanto a las funciones moleculares, los términos enriquecidos afectados por este grupo de glicoformas se destacan: unión a iones calcio, actividad carbono-carbono liasa, actividad del receptor de vasopresina (Fig. 41).

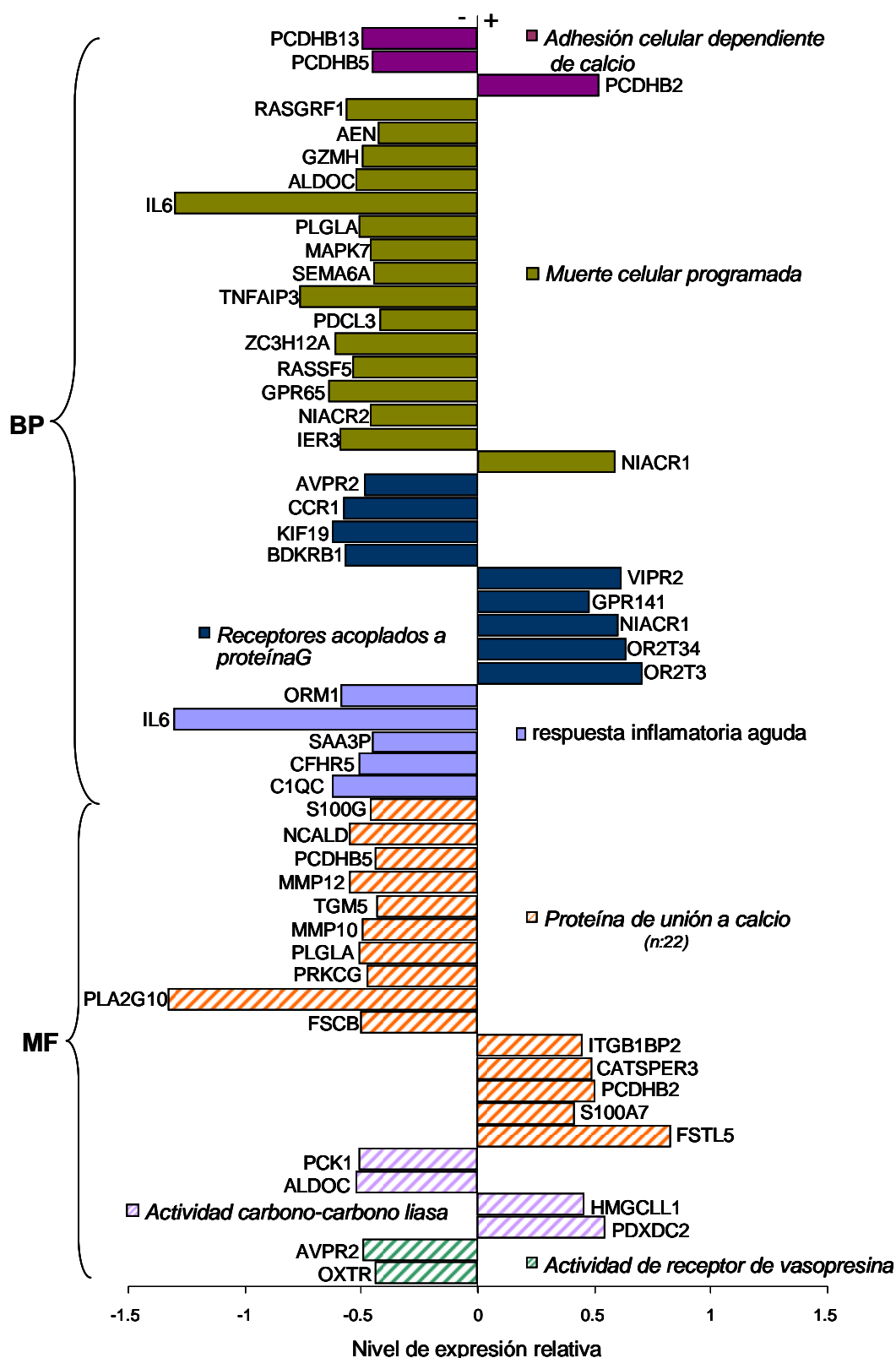
En la Figura 42 se detallan algunos de los genes agrupados dentro de cada término relacionados a funciones moleculares y procesos biológicos y el nivel de expresión relativa ya sea aumentado (valor positivo) o disminuido (valor negativo).

Análisis de la ontología: Procesos Biológicos (BP)

**Figura 40:** Integración visual de categorías enriquecidas relacionadas a procesos biológicos. Análisis de ontologías (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) realizado a partir de los genes expresados diferencialmente por las glicofomas **NR** respecto de la condición basal.

Análisis de la ontología: **Función Molecular (MF)**

**Figura 41:** Integración visual de categorías enriquecidas relacionadas a funciones moleculares. Análisis de ontologías (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) realizado a partir de los genes expresados diferencialmente por las glicofomas **NR**, respecto de la condición basal.



**Figura 42:** Análisis funcional de los genes regulados por las variantes glicosiladas de FSHrh. Se detallan los genes diferenciales agrupados dentro de los términos enriquecidos según el análisis de ontologías génicas (BP: procesos biológicos; MF: funciones moleculares) y el nivel de expresión

relativa, bajo el efecto de las variantes de glicosilación **NR**. Barras llenas indican procesos biológicos y patrón a rayas funciones moleculares.

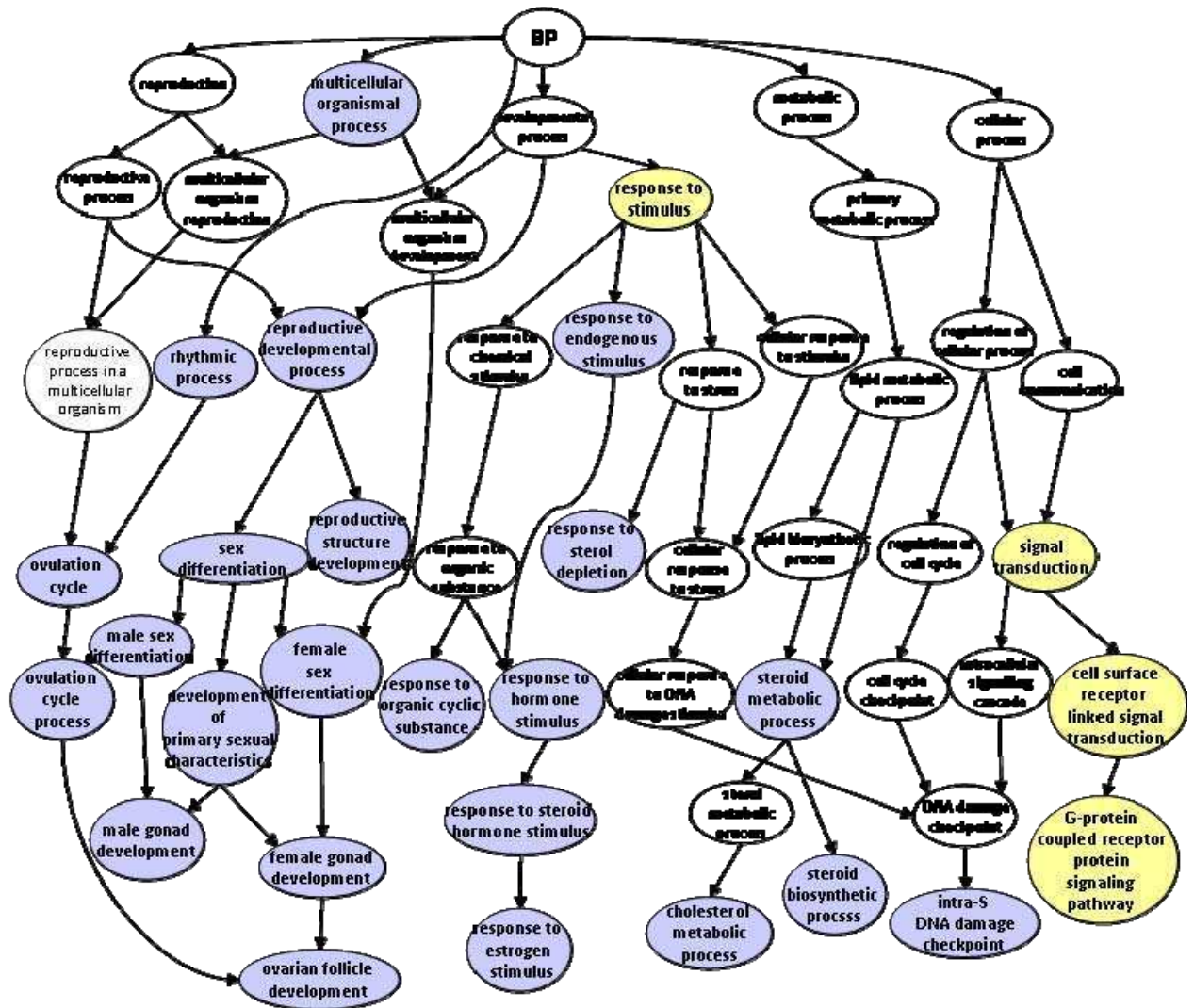
#### **4.2.4. Análisis funcional de los genes regulados por las glicoformas FR**

Los términos enriquecidos por acción de las glicoformas con oligosacáridos de tipo híbrido, FR, se focalizaron en procesos biológicos relacionadas con la biosíntesis de esteroides, metabolismo de colesterol, respuesta a esteroides, desarrollo folicular y control del daño al ADN (Fig. 43).

En cuanto a las funciones moleculares, entre los términos enriquecidos afectados por este grupo de glicoformas se destacan: unión de ligandos a sus receptores específicos y la actividad de estos receptores, incluyendo aquellos acoplados a proteína G (Fig. 44).

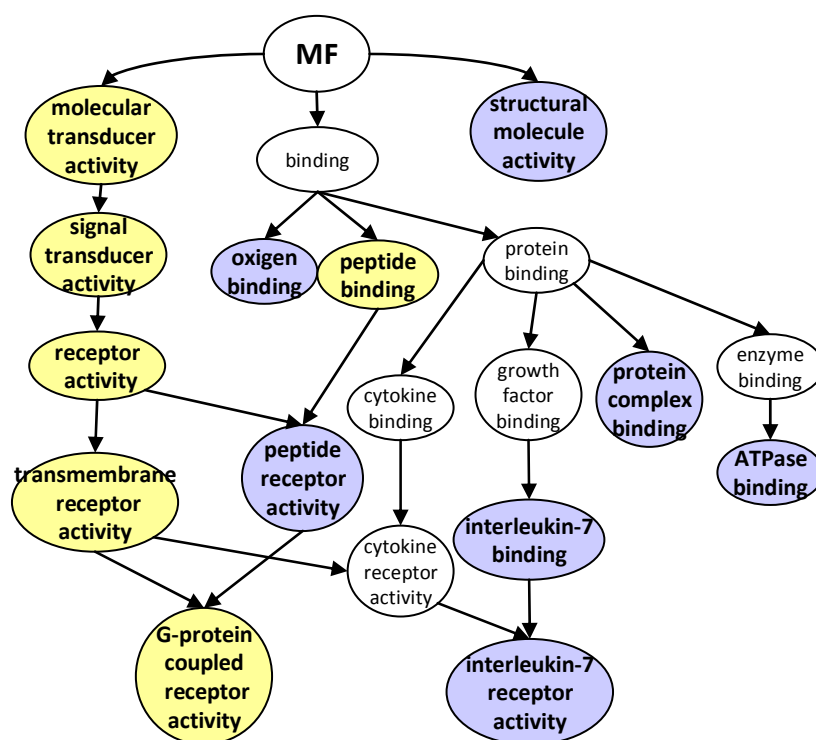
En la Figura 45 se detallan algunos de los genes agrupados dentro de cada término relacionados a procesos biológicos y funciones moleculares y el nivel de expresión relativa ya sea aumentado (valor positivo) o disminuido (valor negativo).

Análisis de la ontología: Procesos Biológicos (BP)

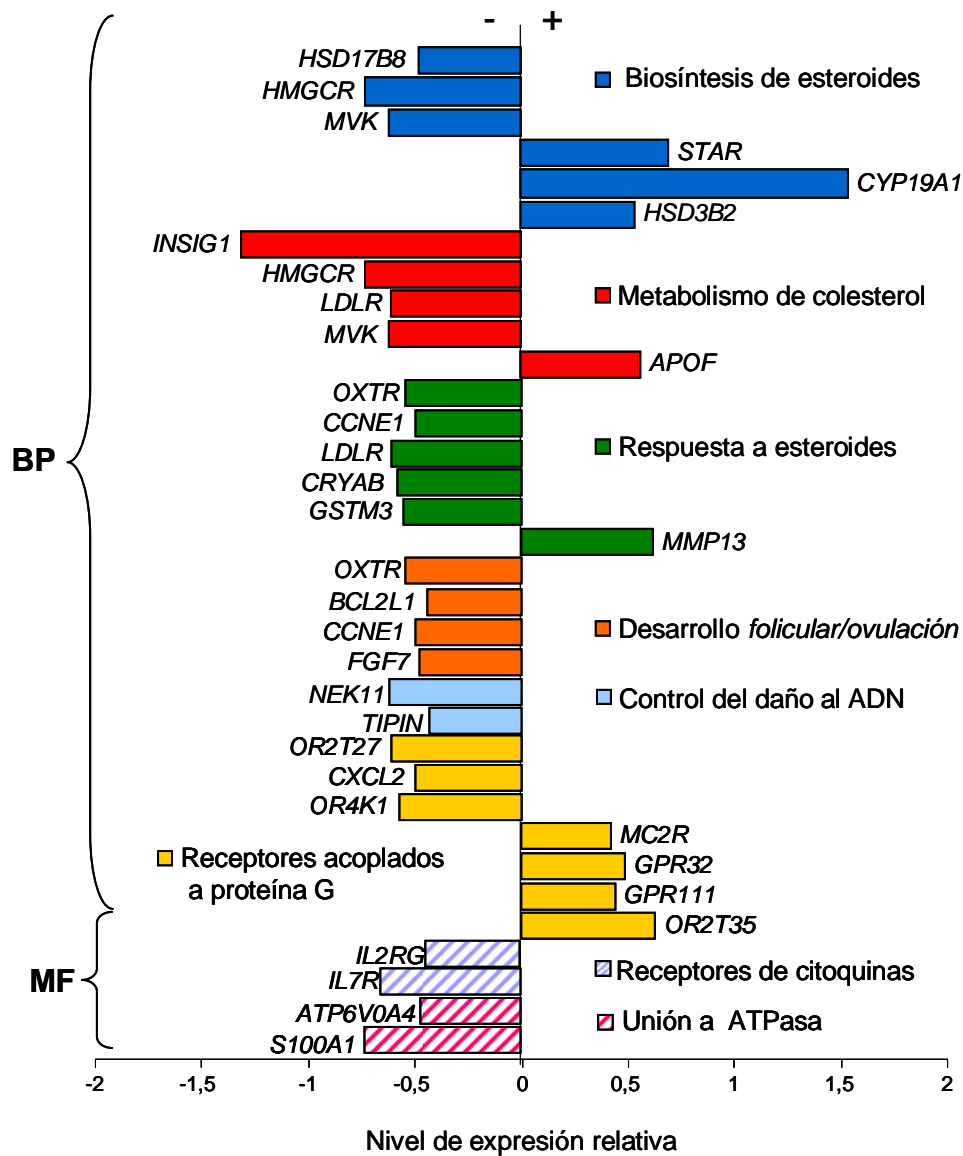


**Figura 43:** Integración visual de categorías enriquecidas relacionadas a procesos biológicos. Análisis de ontologías (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) realizado a partir de los genes expresados diferencialmente por las glicofomas **FR** respecto de la condición basal.



Análisis de la ontología: Función Molecular (MF)

**Figura 44:** Integración visual de categorías enriquecidas relacionadas a funciones moleculares. Análisis de ontologías (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) realizado a partir de los genes expresados diferencialmente por las glicofomas **FR**, respecto de la condición basal.



**Figura 45:** Análisis funcional de los genes regulados por las variantes glicosiladas de FSHrh. Se detallan los genes diferenciales agrupados dentro de los términos enriquecidos según el análisis de ontologías génicas (BP: procesos biológicos; MF: funciones moleculares) y el nivel de expresión relativa, bajo el efecto de las variantes de glicosilación FR. Barras llenas indican procesos biológicos y patrón a rayas funciones moleculares.

La siguiente tabla resume el análisis de ontología relacionado con los procesos biológicos y las funciones moleculares afectadas por cada una de las variantes

glicosiladas de FSHrh. Se detalla el número de genes agrupados en cada término y cuantos de ellos fueron estimulados o reprimidos.

**Tabla 2:** Términos específicos enriquecidos por genes cuya expresión fue modificada por las distintas variantes glicosiladas de FSHrh.

	<b>Procesos Biológicos (BP)</b>	<b>Función Molecular (MF)</b>
<b>AC</b>	-Homeostasis celular (5:2/3)	-Receptor nuclear (5:2/3)
	-Ensamblaje del nucleosoma (5:4/1)	-Actividad deshidrogenasa (3:2/1)
	-Transporte de iones (3:1/2)	-Canales de calcio (5:5/0)
	-Señalización con receptores acoplados a proteína G (33:23/10)	
<b>BA</b>	-Generación de gametas (13:5/8)	-Unión a iones calcio (24:15/9)
	-Diferenciación celular (9:2/7)	-Factores de crecimiento (7:4/3)
	-Regulación de la secreción (8:3/5)	-Actividad tirosina-kinasa (9:3/6)
	-Respuesta inflamatoria (11:4/7)	
	-Señalización con receptores acoplados a proteína G (31:11/20)	
<b>NR</b>	-Apoptosis (20:1/19)	-Unión a iones calcio (22:6/16)
	-Adhesión celular dependiente de calcio (3:1/2)	-Actividad carbono-carbono liasa (4:2/2)
	-Respuesta inflamatoria aguda (5:0/5)	-Actividad de receptor de vasoprecina (2:0/2)
	-Señalización con receptores acoplados a proteína G (58:21/37)	
<b>FR</b>	-Biosíntesis de esteroides (8:3/5)	-Receptores de citoquinas (2:0/2)
	-Metabolismo del colesterol (5:1/4)	-Unión a ATPasa (3:0/3)
	-Respuesta a hormonas esteroideas (6:1/5)	
	-Desarrollo del folículo ovárico (5:0/5)	
	-Control del daño al ADN (2:0/2)	
	-Señalización con receptores acoplados a proteína G (47:22/25)	

Entre paréntesis se indica el número de genes agrupados y cuántos de ellos fueron aumentados/disminuidos.

Este método permitió identificar una serie de procesos biológicos asociados al patrón de expresión diferencial inducido por las diferentes preparaciones de FSHrh estudiadas. El análisis mostró categorías comunes a las cuatro variantes, tales como señalización de receptores acoplados a proteínas G, mientras que otras eran propias de cada una de ellas.

## CAPITULO V

### **5. Regulación de la expresión génica de enzimas esteroideogénicas y subunidades de inhibina en la línea celular esteroideogénica de granulosa humana KGN por variantes glicosiladas de FSHrh**

Para profundizar el estudio del efecto diferencial de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la actividad endocrina y la expresión génica en las células de la granulosa (Capítulos III y IV), se seleccionó un grupo de genes relacionados con las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides y la producción de péptidos para su evaluación por PCR en tiempo real.

#### **5.1. Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real**

Este estudio se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”, DF, México, en colaboración con el Dr. Fernando Larrea en el marco de una Beca de Capacitación otorgada por el Programa Latinoamericano de Investigación en Salud Sexual y Reproductiva (PLISSER).

##### **5.1.1. Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la expresión del transportador de colesterol y de enzimas involucradas en la síntesis de progesterona**

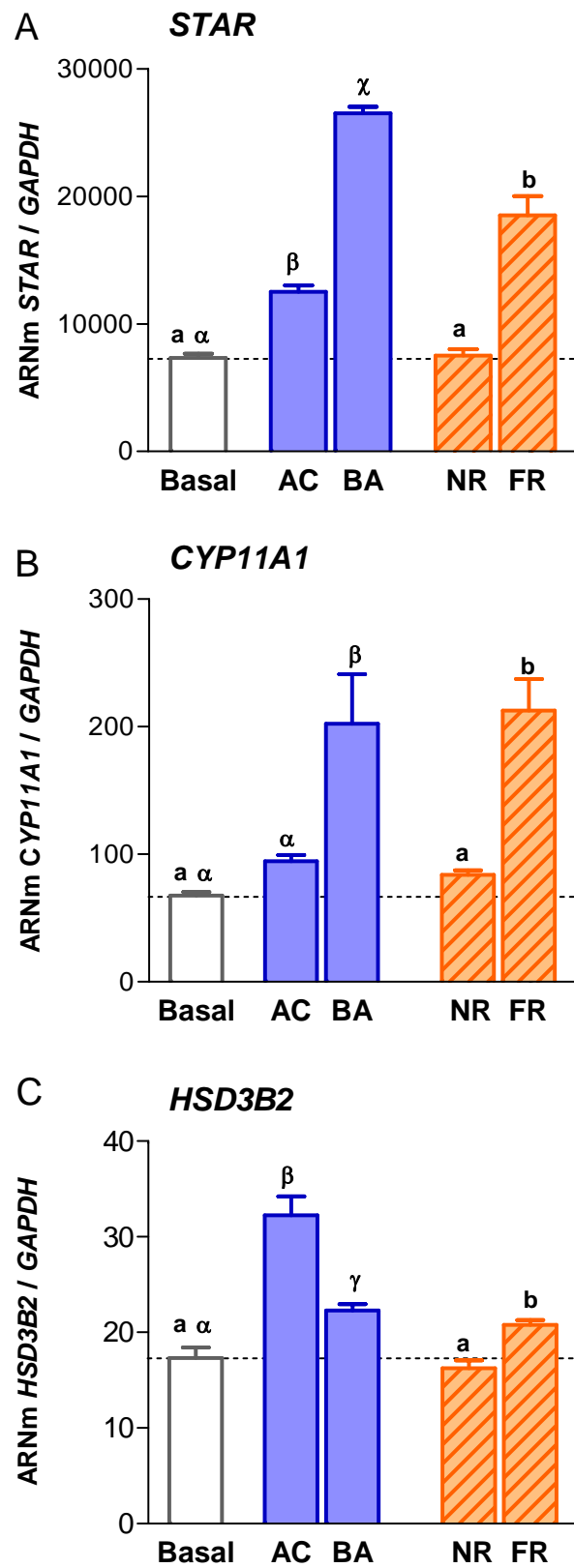
Se evaluó la expresión génica de la proteína *STAR* (Proteína Reguladora de la Esteroidogénesis Aguda), la cual desempeña un papel importante en la síntesis de progesterona ya que es el transportador responsable de la incorporación del colesterol a la mitocondria. En la Figura 46 (panel A), puede observarse que ambas preparaciones de análogos de carga aisladas a partir de FSHrh, AC y BA, ejercieron un efecto estimulador sobre la expresión de este gen (basal vs AC y BA,  $p < 0.01$ ); sin embargo, el incremento fue significativamente mayor al estimular la línea celular con los análogos de carga con menor grado de sialilación, BA (BA vs AC,  $p < 0.001$ ). Al estudiar el efecto del grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh pudo observarse que

solo las glicoformas con oligosacáridos que no han completado su procesamiento, FR, estimularon significativamente la expresión de este transportador (FR vs NR y basal,  $p < 0.01$ ).

Se estudiaron los niveles de expresión del gen *CYP11A1*, que codifica para la enzima citocromo P450SCC, responsable de la ruptura de la cadena lateral del colesterol, para dar como producto final pregnenolona y el gen *HSD3B2* que codifica para la enzima 3- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II que cataliza la conversión final de pregnenolona a progesterona.

Al evaluar los niveles del transcrito de la enzima P450SCC, luego de estimular las células KGN con las distintas preparaciones de FSHrh, se pudo determinar que las dos características moleculares de la hormona, el grado de sialilación y la complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh afectaron la expresión de este gen. Los análogos de carga con menor grado de sialilación aislados a  $pH > 5$ , BA, y las glicoformas con oligosacáridos que no completaron su procesamiento, FR, estimularon significativamente la expresión del gen *CYP11A1* (BA vs AC y basal,  $p < 0.05$  y FR vs NR y basal,  $p < 0.05$ ).

Diferentes resultados fueron observados al estudiar la regulación de la expresión de la última enzima responsable de la síntesis de progesterona, 3 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II. Ambas preparaciones de análogos de carga de FSHrh, AC y BA, fueron capaces de estimular la expresión de esta enzima (AC y BA vs basal,  $p < 0.01$ ). Sin embargo, en este caso los análogos de carga con mayor grado de sialilación, AC, ejercieron un efecto más acentuado respecto de la acción de los análogos con menor grado de sialilación (AC vs BA,  $p < 0.001$ ) sobre la expresión de la enzima 3- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II. Cuando se estimularon las células con glicoformas de FSHrh con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos, solo las variantes con menor procesamiento de sus oligosacáridos, FR, estimularon la expresión de este gen (FR vs NR y basal,  $p < 0.05$ ).



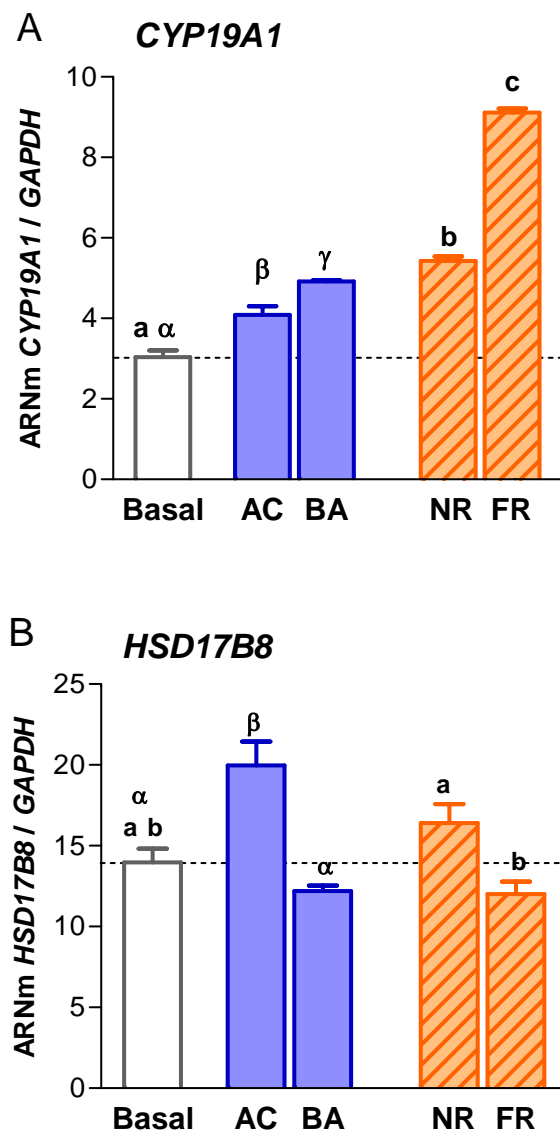
**Figura 46:** Efecto de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre la expresión génica de *STAR*, *CYP11A1* y *HSD3B2*. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y

bajo estímulo con variantes glicosiladas de FSHrh, AC: análogos de carga con mayor grado de sialilación, BA: análogos de carga con menor grado de sialilación, NR: variantes de glicosilación con oligosacáridos complejos, y FR: variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes; expresados como media  $\pm$  EEM (cuadruplicados de cada condición). Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (entre análogos de carga, AC y BA, letras griegas; entre glicoformas NR y FR, letras latinas). *STAR*: proteína reguladora de la esteroidogénesis; aguda, *CYP11A1*: P450SCC, colesterol desmolasa; *HSD3B2*: 3- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II; *GAPDH*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

### **5.1.2. Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la expresión de enzimas responsables de la síntesis y metabolización del estradiol**

Se evaluó la expresión del gen *CYP19A1*, el cual codifica para la enzima citocromo P450 aromatasa responsable de la síntesis de estradiol y del gen *HSD17B8*, que codifica para la enzima 17  $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 8, la cual cataliza la conversión de estradiol ( $E_2$ ) a estrona ( $E_1$ ).

En la Figura 47 (panel A), puede observarse que ambas preparaciones de análogos de carga aisladas a partir de FSHrh, AC y BA, ejercieron un efecto estimulador sobre la expresión del gen de la enzima P450 aromatasa (basal vs AC y BA,  $p < 0.01$ ); sin embargo, el incremento fue significativamente mayor al estimular la línea celular con los análogos de carga con menor grado de sialilación, BA (BA vs AC,  $p < 0.05$ ). El grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh también afectó la expresión de este gen ya que el incremento inducido por las glicoformas con oligosacáridos que no han completado su procesamiento, FR, fue más marcado respecto del ejercido por las glicoformas NR (FR vs NR,  $p < 0,001$ ).



**Figura 47:** Efecto de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre la expresión génica de *CYP19A1* y *HSD17B8*. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con las variantes glicosiladas de FSHrh, AC: análogos de carga con mayor grado de sialilación, BA: análogos de carga con menor grado de sialilación, NR: variantes glicosiladas con oligosacáridos complejos, y FR: variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes; expresados como media  $\pm$  EEM (cuadruplicados de cada condición). Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (entre análogos de carga, AC y BA, letras griegas; entre glicoformas NR y FR, letras latinas). *CYP19A1*: citocromo P450 aromatasa; *HSD17B8*: 17  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 8; *GAPDH*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.



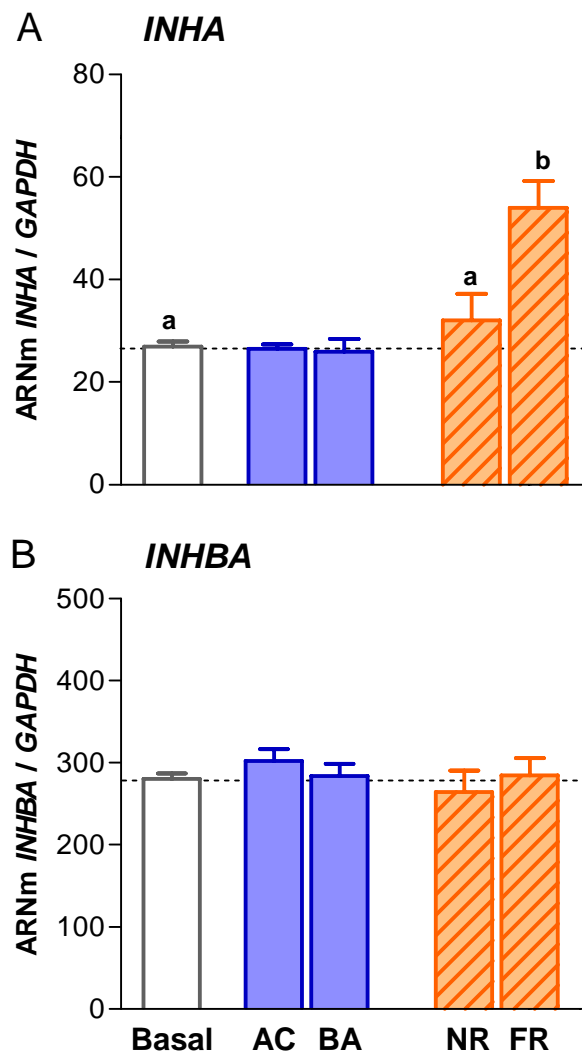
La expresión de la enzima 17 $\beta$ HSD8 fue afectada significativamente solo por el grado de sialilación de la hormona. El nivel de expresión fue incrementado, exclusivamente, por la acción de análogos de carga con mayor grado de sialilación, AC (AC vs BA y basal,  $p < 0,01$ ). Tanto los análogos de carga con menor grado de sialilación, BA, como las glicofomas con oligosacáridos de tipo híbrido, FR, tienden a disminuir los niveles del transcrito de este gen así como las glicofomas con oligosacáridos complejos (NR) tienden a aumentarlos; sin embargo, estos resultados no alcanzaron significancia estadística (Fig. 47, panel B).

### **5.1.3 Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la regulación de la expresión de subunidades de inhibina/activina en la línea celular esteroideogénica de granulosa humana KGN**

Con el objeto de evaluar si el efecto, demostrado en el capítulo III, de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre la producción de Pro- $\alpha$ C e inhibina A es inducido a nivel de la expresión génica se decidió estudiar los niveles del ARNm del gen *INHA*, que codifica para la subunidad  $\alpha$ , e *INHBA*, que codifica para la subunidad  $\beta$ A de inhibinas (Fig. 48). Cabe recordar que la inhibina A es un heterodímero formado por la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$ A.

El grado de sialilación de la FSHrh no afectó la expresión de la subunidad  $\alpha$  de inhibina (*INHA*). En cuanto al efecto inducido por el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh se pudo observar que solo las variantes con oligosacáridos de tipo híbrido, FR, ejercieron un efecto estimulador sobre la expresión de este gen (FR vs NR y basal,  $p < 0.05$ ).

Por el contrario, no se observó efecto de ninguna de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre los niveles de ARNm de la subunidad  $\beta$ A de inhibina.



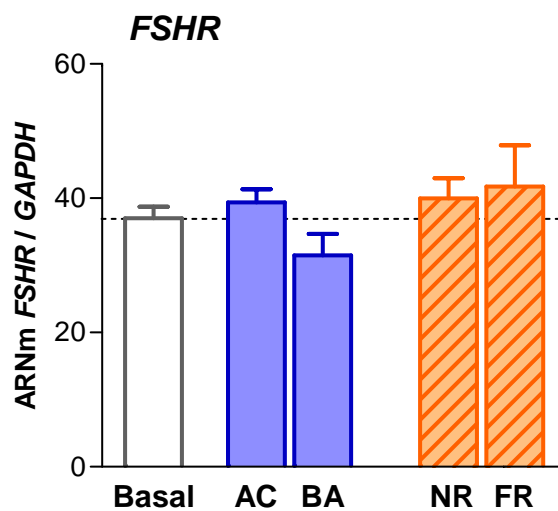
**Figura 48:** Efecto de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre la expresión génica de *INHA* y *INHBA*. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con las variantes glicosiladas de FSHrh, AC: análogos de carga con mayor grado de sialilación, BA: análogos de carga con menor grado de sialilación, NR: variantes de glicosilación con oligosacáridos complejos, y FR: variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes; expresados como media  $\pm$  EEM (cuadruplicados de cada condición). Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (entre análogos de carga, AC y BA, letras griegas; entre glicofomas NR y FR, letras latinas). *INHA*: subunidad  $\alpha$  de inhibinas; *INHBA*: subunidad  $\beta$ A de inhibinas; *GAPDH*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Los resultados obtenidos muestran que las variantes moleculares de FSHrh tienen la capacidad de modular en forma diferencial la producción de esteroides y péptidos producidos por la línea celular de granulosa humana; este efecto podría ser

ejercido a nivel de la expresión de diferentes enzimas esteroideogénicas como así también de la subunidad  $\alpha$  de inhibinas.

#### 5.1.4 Efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la regulación de la expresión del receptor de FSH en la línea celular esteroideogénica de granulosa humana KGN

También se evaluó la expresión del receptor de FSH por PCR en tiempo real, y la Figura 49 muestra que ninguna de las variantes glicosiladas de la FSHrh afectó la expresión génica de su receptor.



**Figura 49:** Efecto de las variantes de glicosilación de la FSHrh sobre la expresión génica de *FSHR*. La línea celular de granulosa humana fue cultivada en condiciones basales y bajo estímulo con las variantes glicosiladas de FSHrh, AC: análogos de carga con mayor grado de sialilación, BA: análogos de carga con menor grado de sialilación, NR: variantes de glicosilación con oligosacáridos complejos, y FR: variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido. Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de tres experimentos independientes; expresados como media  $\pm$  EEM (cuadruplicados de cada condición). *FSHR*: receptor de FSH.

## CAPITULO VI

### 6. Características de las variantes glicosiladas de FSH sérica en ovodonantes y en pacientes con trastornos reproductivos

En trabajos previos realizados en el laboratorio se observó que las características de la microheterogeneidad molecular de la FSH circulante se modifican en las diferentes situaciones fisiológicas de la mujer, tales como la fase folicular de ciclos ovulatorios espontáneos, amenorrea de la lactancia (Velásquez y col., 2006), perimenopausia (Loreti y col., 2009) y post-menopausia (Creus y col., 1996). Estas modificaciones evidenciadas en los oligosacáridos presentes en la FSH se asociaron con cambios en la actividad ovárica. En base a estas evidencias se propone explorar en este capítulo la posible existencia de alteraciones tempranas a nivel de la abundancia relativa y el grado de sialilación de los oligosacáridos de la FSH sérica en mujeres jóvenes que recurren a técnicas de reproducción asistida (TRA) para lograr un embarazo.

Como se mencionó en el capítulo de *Materiales y Métodos* se estudiaron tres grupos de mujeres, pacientes con trastornos reproductivos (PTR), mujeres ovodonantes (Ov) y mujeres jóvenes de fertilidad comprobada como grupo control (C).

Todas las pacientes con trastornos reproductivos incluidas en este estudio presentaron problemas de infertilidad de varios años de evolución, de causa ovárica (baja reserva ovárica) a pesar de ser menores de 40 años de edad.

Originalmente este trabajo incluía los dos primeros grupos, PTR y Ov pero al comenzar a evaluar a las mujeres ovodonantes se observó que las mismas no presentaban las características esperadas, tanto a nivel hormonal como en el perfil de análogos de carga de FSH, tal como se había descrito anteriormente para este grupo etéreo (Velásquez y col., 2006; Loreti y col., 2009). Por esta razón se decidió incluir un nuevo grupo control formado por mujeres jóvenes, las cuales habían logrado embarazos naturalmente y nunca habían recibido tratamientos de inducción de la ovulación.

Cabe recordar que las muestras de sangre para efectuar el análisis hormonal y el estudio de la microheterogeneidad molecular de FSH fueron tomadas en el ciclo previo a la estimulación con gonadotrofinas, en el caso de PTR y Ov.

### 6.1. Perfil hormonal sérico

En la tabla 3 se muestran los niveles séricos de los parámetros hormonales determinados en la fase folicular media (día  $9 \pm 1$ ) del ciclo menstrual en las pacientes con trastornos reproductivos (PTR), mujeres ovodonantes (Ov) y mujeres control (C). En todas las mujeres fue corroborada la ovulación, ya sea por ecografía ovárica (grupo Ov y PTR) o por la determinación de los niveles de progesterona el día  $21 \pm 1$  del ciclo menstrual. Niveles séricos de progesterona mayores a 6 pg/mL se corresponden con ciclos ovulatorios (Hohmann y col., 2005).

**Tabla 3:** Perfil hormonal sérico

Grupos de estudio	n	Edad (años)	FSH (mUI/mL)	LH (mUI/mL)	Estradiol (pmol/L)	Pro- $\alpha$ C (pg/mL)	Inhibina B (pg/mL)
Control (C)	8	$27,8 \pm 0,8$	$4,8 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,2$	$160,5 \pm 9,1$	$185,1 \pm 20,6$	$122,1 \pm 8,1^c$
Ovodonantes (Ov)	7	$25,7 \pm 1,3$	$10,4 \pm 0,5^a$	$8,0 \pm 1,1$	$200,3 \pm 21,4$	$202,1 \pm 28,9$	$83,5 \pm 7,8$
Pacientes con trastornos reproductivos (PTR)	6	$36,4 \pm 1,5$	$6,5 \pm 1,4$	$5,5 \pm 1,1$	$382,6 \pm 99,9^b$	$157,0 \pm 27,4$	$71,7 \pm 4,8$

Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. n: número de sujetos incluidos en cada grupo.

<sup>a</sup>:  $p < 0.05$  Ov vs PTR y C; <sup>b</sup>:  $p < 0.05$ , PTR vs C; <sup>c</sup>:  $p < 0.01$ , C vs PTR y Ov.

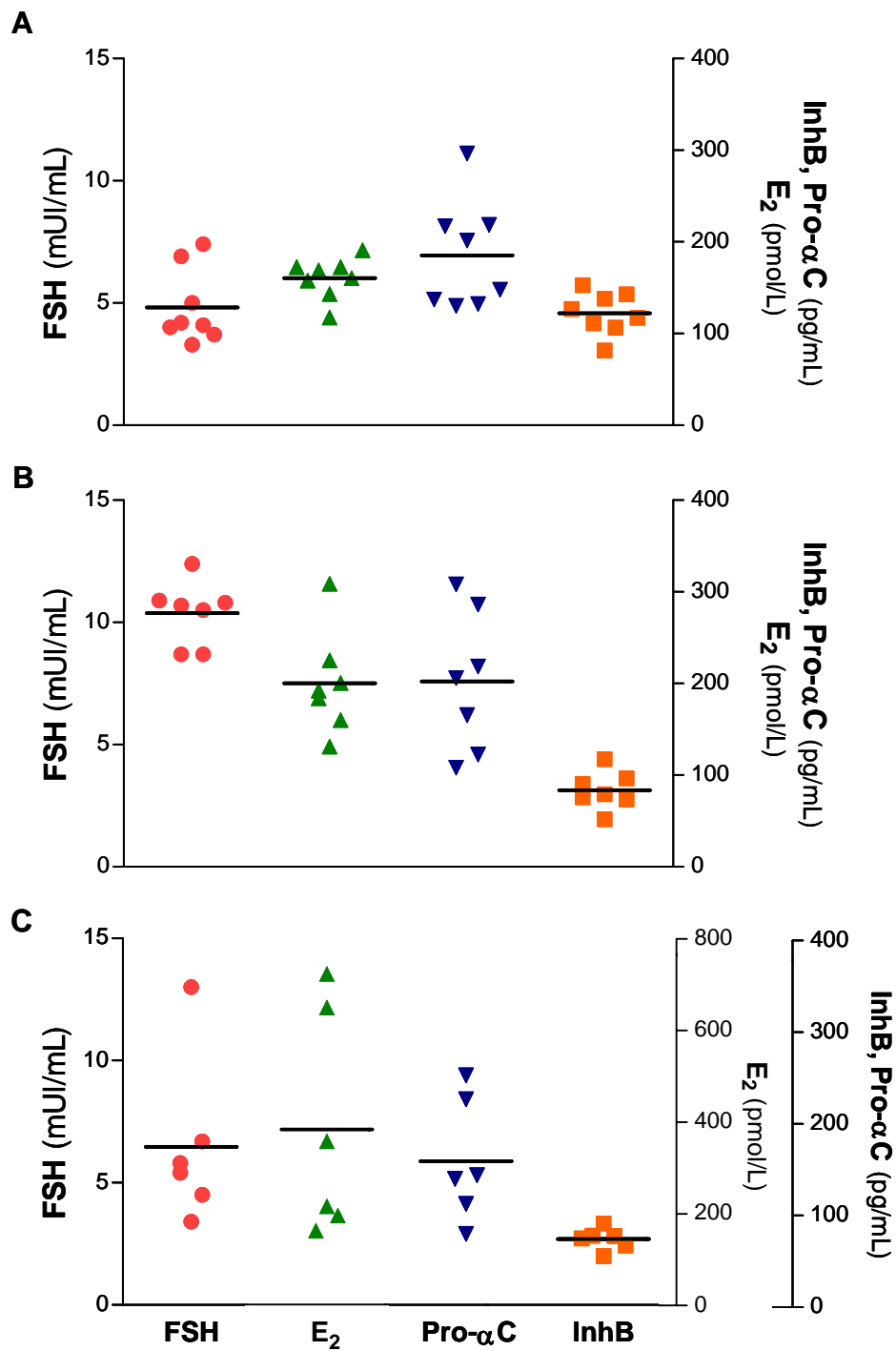
El perfil hormonal mostró características diferentes en los tres grupos de mujeres estudiados.

Los niveles circulantes de FSH fueron significativamente más altos en las mujeres ovodonantes respecto de los observados en el grupo de pacientes con trastornos reproductivos y en el grupo control ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente).

Los niveles de estradiol presentaron una marcada dispersión en el grupo de las pacientes con trastornos reproductivos, y aún así se observó un incremento significativo en este grupo respecto de los hallados en el grupo control ( $p < 0.05$ ).

Los niveles circulantes de la subunidad  $\alpha$  de inhibinas, Pro- $\alpha$ C, en los tres grupos de estudio fueron similares.

Los niveles de inhibina B se encontraron significativamente disminuidos en los grupos de pacientes con trastornos reproductivos y en las ovodonantes ( $p < 0.01$ ) respecto de los observados en las mujeres jóvenes control.



**Figura 50:** Niveles séricos individuales y medias de los distintos parámetros hormonales determinados en mujeres jóvenes control (Panel A), mujeres ovodonantes (Panel B) y en pacientes con trastornos reproductivos (Panel C).

En la Figura 50 se muestran los valores individuales y sus medias de los diferentes parámetros hormonales evaluados en los grupos de mujeres control (panel A), mujeres ovodonantes (panel B) y pacientes con trastornos reproductivos (panel C).

## 6.2. Respuesta al tratamiento de estimulación ovárica

Las mujeres ovodonantes y las pacientes con trastornos reproductivos se sometieron a tratamientos de estimulación de la ovulación en el Instituto de Fertilidad *Fecunditas*. El tratamiento recibido fue descrito en la sección de *Materiales y Métodos*.

Luego de completar el tratamiento hormonal, se realizó la aspiración de los folículos, se recuperaron los ovocitos de los fluidos foliculares y se clasificaron según la calidad de los mismos: A-C. Luego se seleccionaron los ovocitos y se registró el número de ovocitos fecundados y el número de embriones viables a las 48 y 72 h de evolución.

**Tabla 4:** Resultados del tratamiento de estimulación ovárica en mujeres ovodonantes y pacientes con trastornos reproductivos.

Mujeres estimuladas	Ovocitos recuperados	Calidad de ovocitos			Ovocitos		Clivaje	
		A	B	C	seleccionados	fecundados	48 h	72 h
<b>Ov 1</b>	33	22	4	7	14	14	4	3
<b>Ov 2</b>	14	12	2	-	12	6	6	4
<b>Ov 3</b>	9	2	2	5	5	2	2	-
<b>Ov 4</b>	20	16	3	1	19	15	15	7
<b>Ov 5</b>	11	7	2	2	11	5	3	-
<b>Ov 6</b>	5	4	1	-	3	3	3	-
<b>Ov 7</b>	20	7	3	10	17	8	8	7
<b>PTR 1</b>	13	10	3	-	13	9	-	-
<b>PTR 2</b>	4	4	-	-	4	3	3	-
<b>PTR 3</b>	4	2	2	-	4	4	4	3
<b>PTR 4</b>	4	2	2	-	4	1	1	-
<b>PTR 5</b>	2	1	1	-	2	2	2	-
<b>PTR 6</b>	7	7	-	-	7	-	-	-

Ov: ovodonantes; PTR: pacientes con trastornos reproductivos

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos luego de recibir el tratamiento de estimulación hormonal con análogo de GnRH y gonadotrofinas (FSHrh y hCG).



La estimulación hormonal en la mayoría de los casos fue considerada exitosa ya que se obtuvieron embriones viables a las 48 y 72 h post-fecundación. Sin embargo, 4 de las 6 pacientes fueron consideradas pobres respondedoras al tratamiento ya que desarrollaron un número menor a 5 folículos (Kolibianakis y col., 2002).

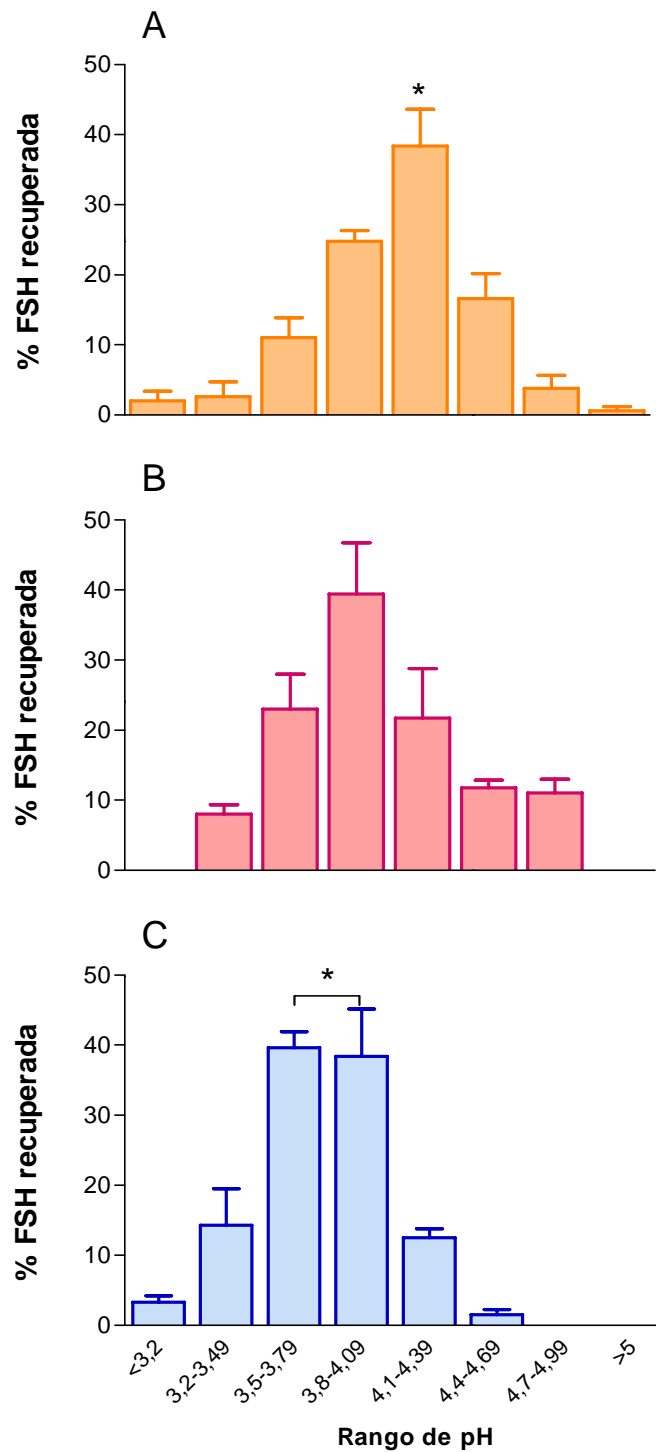
### **6.3. Análisis de la microheterogeneidad molecular de FSH**

#### **6.3.1. Perfil de distribución de los análogos de carga**

El perfil de distribución de los análogos de carga de la FSH sérica se obtuvo mediante la técnica de isoelectroenfoque preparativo, tal como se describió en *Materiales y Métodos*. El mismo se representa con la proporción de FSH aislada en intervalos de 0.29 unidades de pH, considerando como 100% el total de hormona recuperada luego de realizar el isoelectroenfoque preparativo.

En la Figura 51, panel A, B y C, se muestran los perfiles de distribución de análogos de carga de FSH determinados en la fase folicular de mujeres jóvenes control, mujeres ovodonantes y pacientes con trastornos reproductivos, respectivamente. El total de hormona fue aislada en un rango de pH de 2.60-5.10 en el caso del grupo control y en el rango de 3.19-4.82 en el grupo de PTR y Ov.

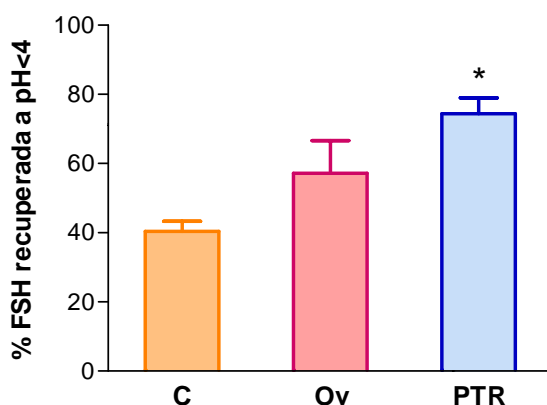
El perfil de distribución de los análogos de carga presentó características diferentes en los grupos analizados.



**Figura 51:** Perfil de distribución de análogos de carga. Proporción de FSH recuperada en intervalos de 0.3 unidades de pH. Panel A: grupo control (C); Panel B: ovodonantes (Ov); Panel C: pacientes con trastornos reproductivos (PTR). Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM. \*  $p < 0.05$ , Panel A: proporción predominante de FSH (intervalo 4.1-4.39), Panel C: proporción predominante de FSH (intervalo 3.5-4.09).

En el grupo de mujeres control (panel A), se observó una proporción predominante de FSH ( $38.4 \pm 5.2\%$ ,  $p < 0.05$ ) aislada en un intervalo acotado de pH (4.1-4.39). En los restantes grupos de estudio la FSH mostró mayor heterogeneidad. Esta característica fue más acentuada en el grupo de ovodonantes, en las cuales la diferencia más notoria observada en este grupo de mujeres jóvenes respecto del grupo control es la ausencia de proporción predominante de hormona aislada en el intervalo 4.1-4.39, aunque se observa una tendencia hacia una mayor proporción de hormona recuperada en un intervalo acotado pero este intervalo de pH es más bajo: 3.8-4.09.

En el grupo de pacientes con trastornos reproductivos el perfil de distribución de los análogos de carga mostró que más del 70% de la hormona ( $78.0 \pm 12.7\%$ ) fue aislada en el intervalo de pH 3.5-4.09 ( $p < 0.05$ ), y este porcentaje se distribuyó en proporciones similares,  $39.6 \pm 2.3\%$ ;  $38.4 \pm 6.8\%$ , entre los dos intervalos que abarca (3.5-3.79 y 3.8-4.09, respectivamente). Es importante destacar que esta alta proporción de hormona fue recuperada a pH más bajos que el grupo control.



**Figura 52:** Proporción de análogos de carga de FSH recuperados a pH < 4. C: grupo control; Ov ovodonantes; PTR: pacientes con trastornos reproductivos. \* $p < 0.05$ : PTR vs C.

Cuando se comparó la proporción de FSH aislada por debajo de pH: 4 entre los tres grupos de mujeres analizadas se observó que las pacientes con trastornos

reproductivos presentaron una mayor proporción respecto de las jóvenes control ( $74.4 \pm 4.6$  vs  $40.4 \pm 2.9$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 52).

Los resultados obtenidos muestran que el grupo de pacientes con trastornos reproductivos presentan cambios en el grado de sialilación de la FSH circulante respecto del grupo control, manteniendo los niveles de esta gonadotropina dentro del rango normal en la mayoría de las pacientes; y estas características se asociaron a una baja capacidad de respuesta al tratamiento de estimulación.

# *Discusión*

La presencia de dos cadenas de oligosacáridos en cada una de las subunidades de la molécula de FSH es esencial para conferirle potencia biológica a la gonadotropina (Sairam & Manjunath, 1982). El significado fisiológico de la existencia de múltiples variantes de glicosilación de la FSH no ha sido aclarado aún; sin embargo, la regulación hormonal del grado de procesamiento de los oligosacáridos y la asociación de diferentes tipos de variantes glicosiladas circulantes con estadios específicos de la maduración gonadal y del desarrollo folicular, sugieren que los procesos regulatorios involucrados en estas etapas requieren de estímulos de glicofomas de FSH con biopotencia variable.

El objetivo de este trabajo de Tesis fue dilucidar nuevos mecanismos moleculares involucrados en la regulación diferencial, determinada por el grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH, de la función de las células de la granulosa.

Para alcanzar el objetivo planteado fue necesario aislar las diferentes variantes glicosiladas de FSH humana de una preparación altamente pura.

A partir de la implementación de las técnicas de fertilización asistida se han utilizado diferentes preparaciones hormonales para inducir la ovulación múltiple. Hacia el final de la década de los '80 los avances en la biotecnología permitieron el desarrollo de proteínas recombinantes para uso terapéutico; entre las cuales se encuentra la FSH. La línea celular proveniente de ovario de hamster, las células CHO (Chinese hamster ovary), han sido utilizadas para sintetizar estas proteínas (Keene y col., 1989). La tecnología del ADN recombinante ofreció numerosas ventajas respecto de las gonadotropinas de origen urinario disponibles hasta ese momento; particularmente, aseguró la producción de una hormona extremadamente pura, sin contaminación con LH u otros principios activos remanentes en las preparaciones provenientes de la orina de mujeres post menopáusicas (Loumaye y col., 1995). Por esta razón, se seleccionó como fuente de hormona la gonadotropina de origen recombinante.

El perfil de distribución de los análogos de carga de la FSHrh obtenido por la técnica de isoelectroenfoque preparativo, manteniendo en solución la proteína y

preservando su actividad biológica, confirmó hallazgos previos reportados en la literatura. El rango de pH en el cual fueron aislados los análogos de carga en el presente trabajo coincide con el descrito previamente utilizando dos metodologías diferentes: el cromatoenfoco y el isoelectroenfoco en gel. La proporción predominante de gonadotropina fue aislada en todos los casos en un intervalo de pH entre 4.2-4.6 y porcentajes similares de hormona fueron hallados por debajo de pH 4.1 (Cerpa-Poljak y col., 1993; Lambert y col., 1995; de Leeuw y col., 1996; Timossi y col., 1998; Horsman y col., 2000). Estos resultados sugieren que la producción de FSH a través del sistema recombinante mantiene sus características a través de los diferentes lotes producidos, considerando particularmente que las tres metodologías utilizadas para su análisis se fundamentan en el aislamiento de los componentes microheterogéneos de la proteína de acuerdo a sus puntos isoeléctricos.

Ahora bien, cuando se compara el perfil de distribución de análogos de carga de la FSHrh con el observado en diferentes condiciones fisiológicas de la mujer surgen algunas diferencias. En trabajos previos se había demostrado que durante la fase folicular media de ciclos ovulatorios, aproximadamente el 40 % de la hormona que se encuentra en circulación, se aísla a pH por debajo de 4.1 (Velásquez y col., 2006; Loreti y col., 2009). Por el contrario, la FSHrh aislada en este intervalo solo representó el 23% de la hormona aplicada a la celda del isoelectroenfoco, lo cual sugiere que la proporción del azúcar terminal, el ácido siálico, agregado a las cadenas de carbohidratos de la gonadotropina recombinante, es menor.

Las diferencias asociadas con el grado de sialilación de la hormona recombinante respecto del que presenta la gonadotropina producida por el gonadotropo, podrían deberse a que las células CHO carecen de la enzima responsable de la adición del ácido siálico mediante un enlace  $\alpha$ 2,6 a Gal $\beta$ 1-4GlcNAc; específicamente, en esta línea celular no-humana no se expresa la enzima  $\beta$ -galactósido  $\alpha$ 2,6- sialiltransferasa (Xu y col., 2011). Por esta razón, estas células solo pueden adicionar residuos de ácido siálico en la unión  $\alpha$ 2,3 sobre la secuencia Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R como ha sido descrito previamente (Lee y col., 1989; Hård y col., 1990). Green & Baenziger (1988) han demostrado,

utilizando diferentes neuroaminidasas específicas, que la hormona producida fisiológicamente presenta residuos de ácido siálico unido a la galactosa en enlace tanto  $\alpha 2,3$  como  $\alpha 2,6$  en proporciones similares.

En base a la correlación negativa entre la proporción de ácido siálico y el punto isoeléctrico de las diferentes fracciones en las cuales se aísla la hormona que ha sido descrita por de Leeuw y col. (1996), en el presente trabajo se obtuvieron dos preparaciones combinando las fracciones obtenidas a pH menor a 4 y mayor a 5 para estudiar el efecto de los análogos de carga de la FSHrh con una diferencia muy marcada en el grado de sialilación.

Estas preparaciones fueron elegidas pues análogos de carga con estas características han sido reportados en diferentes condiciones fisiológicas de la mujer y también considerando las diferencias en la relación Bio/Inmunoactividad *in vitro* de las mismas que se manifiestan en términos de producción de AMPc y  $17\beta$ -estradiol. Zambrano y col. (1996) han demostrado que las variantes glicosiladas de FSH de origen hipofisario humano, aisladas a un pH inferior a 4.10, inducen una respuesta significativamente menor en término de la producción de AMPc en una línea celular transfectada con el receptor de FSH humano, respecto de la respuesta de análogos de carga aislados en intervalos de pH más elevados. En este sentido, si las variantes analizadas hubieran sido obtenidas a un pH por encima de 5, la respuesta biológica sería aún más marcada. Cambios similares en la biopotencia *in vitro* de estos mismos grupos de análogos de carga de la FSH hipofisaria han sido también descritos por Timossi y col. (2000), quienes estudiaron el efecto de estas preparaciones de FSH sobre la producción de  $17\beta$ -estradiol en células de la granulosa de rata.

Trabajos realizados por otros autores han descrito cambios en el grado de sialilación de la FSH asociada a las diferentes etapas del ciclo menstrual. Durante la fase folicular media, alrededor del 37 % de la FSH circulante corresponde a análogos de carga de FSH aislados a pH menor a 4; esta proporción disminuye marcadamente durante el período preovulatorio a expensas de un aumento en los análogos aislados a pH mayor a 5. Estos autores demostraron que este perfil se revierte durante la fase



lútea (Padmanabhan y col., 1988). Los estudios posteriores realizados por Wide y col. (1993) y Zambrano y col. (1995) confirmaron las características de estos perfiles en las diferentes fases del ciclo menstrual de la mujer.

Para analizar la implicancia del grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH humana sobre la función de las células de la granulosa se realizó el aislamiento de las diferentes glicoformas en columnas de Concanavalina A. Esta lectina permite el aislamiento de tres grupos de variantes de glicosilación en base a las diferentes afinidades que presentan las estructuras de carbohidratos por la lectina. Los residuos galactosa expuestos, presentes en las glicoproteínas con oligosacáridos complejos, con alto grado de ramificación o bisectados no interactúan con la Concanavalina A. Por este motivo, estas glicoformas son fácilmente eluidas de la columna con solución amortiguadora, son las llamadas fracciones no retenidas, NR (Goldstein y col., 1965). Por el contrario, las cadenas de carbohidratos que contienen al menos dos residuos  $\alpha$ -manopiranosos expuestos, ya sea terminales o sustituidos en posición 2, son fuertemente retenidas por la columna, FR (Ogata y col., 1975). Estas estructuras están presentes frecuentemente en los oligosacáridos de tipo híbrido y de alta manosa y es necesario utilizar altas concentraciones de azúcar para recuperarlas en los eluidos de la columna. Los residuos de N-acetilglucosamina, presentes en glicoproteínas con oligosacáridos de tipo biantenarios y truncados, disminuyen la interacción con la lectina, razón por la cual este tipo de glicoformas eluye con concentraciones bajas de azúcar, son las fracciones llamadas débilmente retenidas, DR (Goldstein y col., 1965).

La hormona de origen recombinante presentó un claro predominio de glicoformas que no completaron el procesamiento de sus cadenas carbohidratadas, es decir que la mayor proporción correspondió a variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido y de alta manosa.

Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que las células CHO no contienen toda la maquinaria enzimática necesaria para completar la glicosilación de las proteínas; por esta razón se espera que entre las variantes glicosiladas de FSHrh no

haya cadenas de carbohidratos bisectadas ya que las células CHO no tienen la capacidad de agregar un residuo NAcGlc por unión  $\beta$ 1,4 al residuo interno  $\alpha$ -manosa, pues en ellas no se expresa la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III requerida para la síntesis de este tipo de oligosacáridos (Hård y col., 1990; Xu y col., 2011).

Con respecto a la proporción relativa de glicoformas con cadenas de carbohidratos de tipo biantenarias y truncadas (DR) y glicoformas con oligosacáridos que no han completado el procesamiento de sus oligosacáridos, de tipo híbrido y alta manosa (FR) en la preparación de FSHrh, los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis difieren de aquellos previamente reportados por Harris y col. (1996), quienes describen la predominancia de glicoformas DR en la preparación. Esta discrepancia podría deberse a las diferencias metodológicas en el protocolo de elución de la cromatografía en lectina, el cual utiliza volúmenes muy elevados de solución amortiguadora conteniendo 10 mM de  $\alpha$ -D-metilglucopiranosido y como consecuencia arrastra las glicoformas que contienen estructuras de tipo híbrido y de alta manosa, de máxima afinidad por la lectina.

Es necesario señalar que la hormona de origen recombinante difiere de la gonadotropina que se encuentra en circulación en la fase folicular de mujeres con ciclos ovulatorios normales, tanto en el grado de sialilación, como se ha descrito anteriormente, como en el grado de complejidad de sus oligosacáridos. Trabajos previos realizados en el laboratorio han demostrado que las glicoformas de FSH con oligosacáridos complejos son las únicas que se encuentran en circulación en la fase folicular media de ciclos menstruales ovulatorios (Creus y col., 1996; Velásquez y col., 2006; Loreti y col., 2009).

En consecuencia, las diferencias en las características de los carbohidratos presentes en la molécula de FSHrh que es utilizada para estimular el desarrollo folicular y la ovulación múltiple en los tratamientos de reproducción asistida, podrían afectar particularmente la función de las células de la granulosa, aspecto que no ha sido considerado aún en este tipo de protocolos médicos.

Una vez obtenidas las fracciones de FSHrh con marcadas diferencias en el grado de sialilación y la complejidad de sus oligosacáridos se inició el estudio del efecto de estas características sobre la actividad endocrina de las células de la granulosa. En primer lugar se evaluó la regulación de la producción de inhibinas diméricas, inhibina A y B en un cultivo primario de células de la granulosa provenientes de ratas inmaduras, tratadas con DES. Ese modelo ya había sido utilizado satisfactoriamente para estudiar la regulación de la producción de inhibinas diméricas en estudios previos realizados en el laboratorio y por otros grupos interesados en este tema (Lanuza y col., 1999; Drummond y col., 2000).

En el ovario, la célula de la granulosa es la fuente principal de producción de inhibinas; numerosas evidencias han sido obtenidas sobre la importancia de estos péptidos en la regulación de la función reproductiva. Se ha demostrado que la inhibina ejerce una acción paracrina potenciando el efecto de la LH en la producción de andrógenos por las células de la teca; también ejerce su acción a nivel periférico regulando la secreción de FSH; estudios *in vitro* realizados en ovinos y en primates lograron demostrar que el efecto inhibitorio de la inhibina sobre la síntesis de FSH se ejerce a nivel del ARNm de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina (Findlay y col., 1993; Bilezikjian y col., 2012).

El perfil sérico de las inhibinas durante el ciclo menstrual ha sido claramente establecido y ha sido interpretado como el reflejo de diferentes momentos del desarrollo y maduración del folículo ovárico. La inhibina B comienza a producirse en la transición lúteo-folicular del ciclo menstrual, alcanzando niveles máximos en la fase folicular media; por el contrario, los niveles de inhibina A permanecen bajos durante la fase folicular temprana y media, luego ascienden durante el período pre-ovulatorio, alcanzando su máximo nivel en la fase lútea (Groome y col., 1994; 1996; Sehested y col., 2000; Muttukrishna y col., 2000). La inhibina B es predominantemente producida durante los estadios tempranos del desarrollo folicular, en correlación positiva con la FSH (Groome y col., 1996); la inhibina A es producida por folículos en estadios

avanzados del desarrollo, particularmente en el estadio pre-ovulatorio, y por el cuerpo amarillo (Muttukrishna y col., 1994).

En las ratas hembras, las dos formas de inhibinas diméricas se detectan en circulación a lo largo del ciclo estral debido a la corta longitud del ciclo y reflejan la simultaneidad de las diferentes cohortes de folículos en desarrollo. Los niveles de inhibina A alcanzan los valores máximos durante el proestro, coincidiendo con la estimulación gonadotrófica de los folículos maduros. Luego caen rápidamente hacia el final de esta etapa y se elevan nuevamente en la mañana del estro para continuar aumentando durante el metaestro, diestro y proestro. Si bien la inhibina B presenta un perfil similar, los niveles máximos se observan en la mañana del metaestro y diestro (Woodruff y col., 1996; Bernard y col., 2001; Arai y col., 2002; Kenny y col., 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran la acción diferencial de las variantes glicosiladas de FSH sobre la secreción de inhibinas diméricas A y B. El grado de sialilación de la FSHrh estaría involucrado en la regulación diferencial de un dímero específico de inhibina ya que la presencia del ácido siálico en las variantes glicosiladas de FSHrh favoreció claramente la producción de inhibina B. En forma inversa, las variantes glicosiladas con menor grado de sialilación ejercieron un efecto estimulador sobre la producción de inhibina A.

El grado de sialilación de los oligosacáridos de la FSH podría contribuir al perfil característico de secreción de inhibinas observado a lo largo del ciclo menstrual. Durante la transición luteo-folicular y la fase folicular temprana del ciclo menstrual se secreta una gonadotropina más sialilada; esta característica se asocia con una elevada producción de inhibina B. El predominio de variantes glicosiladas con menor grado de sialilación, presentes en circulación en la fase folicular tardía, coincide con niveles ya detectables de inhibina A (Padmanabhan y col., 1988; Wide & Bakos, 1993; Zambrano y col., 1995; Sehested y col., 2000).

La producción de los dímeros de inhibina en las células de la granulosa, no solamente fue afectada por el grado de sialilación sino también por el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en las variantes glicosiladas aisladas de

FSHrh. Las células de la granulosa mostraron una alta sensibilidad para producir predominantemente inhibina B en respuesta al estímulo con glicoformas con oligosacáridos complejos. Por el contrario, estas células mostraron una baja capacidad de respuesta a las moléculas de FSH con oligosacáridos menos procesados, de tipo híbridos y alta manosa. En estas condiciones experimentales el dímero producido fue la inhibina A.

Evidencias indirectas sobre la posible implicancia de la estructura de los oligosacáridos de la FSH sobre la producción de inhibina B habían sido obtenidas en estudios previos. Cambios en el grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos de la FSH circulante observados durante la amenorrea de la lactancia, en las usuarias de acetato de medroxiprogesterona de depósito (AMPD) como anticonceptivo y en la perimenopausia, se asociaron con una disminución de los niveles de inhibina B.

Durante la amenorrea de la lactancia, en presencia de niveles normales de FSH inmunológica, se observa una disminución del grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la gonadotropina circulante con una disminución concomitante de los niveles de inhibina B; en esta condición fisiológica de la mujer, se recuperan las características de los oligosacáridos de la FSH observadas en la fase folicular de ciclos normales cuando se suspende la lactancia absoluta y se recupera la actividad cíclica del ovario (Velásquez y col., 2006).

En la perimenopausia, definida solo por la edad de la mujer, cuando aún se conserva la longitud de los ciclos menstruales y los niveles inmunológicos de FSH en la fase folicular media se encuentran en el rango normal, el grado de complejidad de los oligosacáridos de la gonadotropina presenta cambios similares a los observados en la amenorrea de la lactancia y nuevamente se asocian con una disminución de los niveles circulantes de inhibina B (Loreti y col., 2009).

La implicancia de la complejidad de los oligosacáridos de FSH en la regulación de la producción de inhibinas diméricas demostrada en el presente estudio, permiten especular que la disminución de los niveles séricos de inhibina B observados en las

condiciones fisiológicas anteriormente descritas, podría deberse al descenso de la proporción relativa de las variantes glicosiladas de FSH con oligosacáridos complejos.

La regulación de la expresión de las subunidades y secreción de los dímeros de inhibina es un mecanismo complejo que aún no se ha dilucidado completamente. Como se mencionó anteriormente, la secreción diferencial estaría íntimamente relacionada con el estadio del desarrollo folicular (Laven & Fauser, 2004; Muttukrishna y col., 2005).

Numerosas evidencias han sido obtenidas sobre la importancia de la FSH en la regulación de la producción de estos dímeros en el ovario; sin embargo, también intervienen en este mecanismo los esteroides, factores de crecimiento tales como IGF-I, GDF-9 y miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  y activina) (Woodruff & Mather, 1995; Aloï y col., 1995; Lanuza y col., 1999; Drummond y col., 2000; Roh y col., 2003).

De acuerdo con estos resultados se puede concluir que las células de la granulosa requieren para la producción de inhibina B una molécula de FSH que presente dos características particulares en sus oligosacáridos; alto grado de sialilación y estructuras complejas. En cambio, un bajo grado de sialilación sería determinante para inducir la producción de inhibina A.

Se pueden concluir que la producción de inhibinas diméricas en la célula de la granulosa esta modulada por la estructura de los oligosacáridos presentes en la FSH sumado a la acción ya descrita de los reguladores intraováricos.

Una vez obtenidas las evidencias de la implicancia de los oligosacáridos de FSH sobre la regulación de la actividad endocrina en las células de granulosa de rata se planteo la posibilidad de la existencia de un mecanismo similar en células de la granulosa humana. En consecuencia, el siguiente objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta biológica inducida por las diferentes variantes glicosiladas de FSHrh en un modelo experimental adecuado para este fin. Evidencias reportadas en la literatura demostraban que la línea celular de granulosa humana, KGN, podía ser un modelo adecuado para realizar este estudio.

Nishi y col. (2001) demostraron que las células KGN mantienen la capacidad de producir esteroides. Estos autores han descrito la producción de progesterona y pregnenolona en estas células luego de la estimulación con AMPc y la incapacidad de sintetizar esteroides  $17\alpha$ -hidroxilados u otros sustratos aromatizables. En coincidencia con lo planteado por la hipótesis de las dos células-dos gonadotrofinas, estas células poseen la capacidad de producir estrógenos si se les aporta el sustrato androgénico adecuado. La actividad aromatasa fue marcadamente estimulada por el tratamiento con FSH, con el concomitante aumento en los niveles intracelulares de AMPc. Ambas características demuestran la presencia de un receptor funcional de FSH en estas células.

Considerando que las líneas celulares, luego de sucesivos ciclos de replicación, pueden sufrir alteraciones que modifiquen sus características originales fue importante corroborar la utilidad de las células KGN como modelo experimental para realizar este estudio.

Los resultados obtenidos demostraron que las células KGN conservaban las características esteroideogénicas de una célula de la granulosa, ya que las mismas mantuvieron la capacidad de producir progesterona, aromatizar un sustrato androgénico, responder al estímulo con FSHrh en estado nativo, incrementando los niveles de AMPc y de esteroides como había sido previamente reportado por Nishi y col. (2001). Estos resultados nos permitieron confirmar la utilidad de este modelo para lograr los objetivos propuestos en la presente Tesis.

En relación a la capacidad de estas células para producir inhibinas/activinas, la literatura brinda escasa información al respecto (Wu y col., 2005). En el presente estudio, se pudo establecer claramente que las células KGN son capaces de producir subunidad  $\alpha$  de inhibina, inhibina A y el homodímero activina A en condiciones basales. Las evidencias obtenidas al estudiar el efecto de la FSH nativa sobre la producción de estos péptidos muestran que la gonadotrofina modula solamente la producción de subunidad  $\alpha$  de inhibina e inhibina A en este modelo experimental.

Habiendo corroborado la utilidad de la línea celular KGN y su capacidad de respuesta a la gonadotropina, se procedió al análisis del efecto de las variantes glicosiladas de FSHrh sobre la producción de los esteroides, estradiol y progesterona y sobre los péptidos, subunidad  $\alpha$  de inhibina e inhibina A.

Como se expresó anteriormente, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han limitado a determinar la importancia de la presencia del último azúcar que se adiciona a la cadena de carbohidratos de la FSH, el ácido siálico, en la regulación de la bioactividad *in vitro* de la gonadotropina. En relación con la esteroidogénesis, se ha demostrado que variantes glicosiladas de FSH con menor grado de sialilación, aisladas a partir de extractos hipofisarios, presentan una mayor capacidad de estimular la producción de estrógenos en las células de la granulosa que las variantes más sialiladas; existiendo una correlación positiva entre el pl de los análogos de carga y la relación Bio/Inmunoactividad de las mismas (Zambrano y col., 1996; Timossi y col., 2000). Una relación semejante entre el grado de sialilación de los oligosacáridos presentes en la FSH y su biopotencia *in vitro* fue descrita por Barrios-de-Tomassi y col. (2006); estos autores analizaron la capacidad de folículos de ratón en cultivo de secretar estradiol en respuesta a distintas preparaciones de análogos de carga aislados de FSH hipofisaria humana. Trabajos realizados por Cerpa-Poljak y col. (1993) y Vitt y col. (1998) habían obtenido previamente resultados similares utilizando hormona de origen recombinante a partir de la cual aislaron las diferentes variantes glicosiladas.

Es importante destacar que los trabajos mencionados anteriormente, se focalizaron en evaluar únicamente la respuesta a las variantes glicosiladas de FSH en relación con la producción de estradiol.

El presente trabajo de Tesis confirma los antecedentes previamente descritos y extiende el estudio del efecto de la FSHrh sobre otros parámetros endocrinos de la célula de la granulosa evaluando la producción de progesterona, subunidad  $\alpha$  de inhibina e inhibina A en respuesta a las variantes glicosiladas de FSHrh con diferente grado de sialilación y también con diferencias en la complejidad de sus oligosacáridos.



Los resultados obtenidos mostraron que, si bien la FSH *per se* posee la capacidad de estimular la producción de estradiol, moléculas de FSH menos sialiladas constituyen un estímulo más potente para la producción de este esteroide.

El aspecto más interesante que existe entre el grado de sialilación de FSH y la producción de estradiol es la capacidad que poseen los estrógenos de regular la incorporación del ácido siálico a las cadenas de carbohidratos de FSH en el gonadotropo. En un estudio clínico realizado por Padmanabhan y col., (1988) se demostró la disminución del grado de sialilación de la FSH circulante (en base a las variaciones en el punto isoeléctrico de la hormona aislada) luego de la administración de DES a pacientes con disgenesia gonadal. Posteriormente, Damian-Matsumura y col., (1999) obtuvieron la primera evidencia a nivel molecular del efecto de los estrógenos sobre la expresión génica de una de las enzimas responsables de la adición de ácido siálico a las cadenas carbohidratadas, la Gal $\beta$ 1,3[4]GlcNAc  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (ST3Gal III) que cataliza la incorporación de este azúcar en unión  $\alpha$ 2,3 a la galactosa terminal.

Teniendo en cuenta las evidencias obtenidas en el presente estudio y los trabajos mencionados anteriormente, es posible especular que la pérdida progresiva del ácido siálico de la molécula de FSH durante la fase folicular podría contribuir a estimular la producción de estradiol por parte de la célula de la granulosa y a su vez, estos esteroides regularían a nivel de la hipófisis el grado de sialilación de la FSH en determinadas etapas del ciclo menstrual.

El grado de sialilación de la hormona ejerce un efecto más acentuado sobre la producción de progesterona que el descrito anteriormente para la producción de estradiol, ya que las variantes glicosiladas menos sialiladas son las únicas que poseen la capacidad de ejercer un efecto estimulador sobre la producción de este esteroide.

Es importante mencionar que el principal estímulo para la síntesis de la progesterona es la LH, luego que la FSH ha capacitado a las células de la granulosa para que respondan a esa gonadotropina, induciendo la diferenciación celular y la expresión de los receptores de LH (Richards, 1994; McGee & Hsueh, 2000).

La relevancia del grado de sialilación de la hormona se pudo observar claramente en la producción de los péptidos. Si bien todos los análogos de carga tuvieron la capacidad de estimular la producción de subunidad  $\alpha$  de inhibina, moléculas de FSH menos sialiladas fueron un estímulo más potente para la producción de este péptido.

Una relación inversa entre el contenido de ácido siálico de las distintas preparaciones de análogos de carga de la FSHrh y el efecto estimulador sobre la producción de inhibina A fue observada en las células KGN. Es importante resaltar que estos resultados coinciden con los previamente descritos al utilizar como modelo experimental el cultivo primario de células de la granulosa de rata.

Los niveles circulantes de subunidad  $\alpha$  de inhibina e inhibina A fueron descritos a lo largo del ciclo menstrual de mujeres en edad reproductiva, luego del desarrollo de nuevas metodologías que permitieron identificar en forma específica las diferentes formas de inhibinas, subunidad  $\alpha$ , inhibina A e inhibina B (Groome y col., 1994; 1995; Sehested y col., 2000; Muttukrishna y col., 2000). El perfil sérico de la subunidad  $\alpha$  de inhibina y de inhibina A es similar; sin embargo, los niveles de la subunidad  $\alpha$  libre son muy superiores al de la forma dimérica. Los niveles de subunidad  $\alpha$  libre permanecen sin cambios en las primeras etapas de la fase folicular, siendo los de inhibina A no detectables. En la fase folicular tardía se observa un aumento de ambos péptidos hasta el período pre-ovulatorio. Tal como se describió previamente estos perfiles se asocian con cambios en el grado de sialilación de la FSH circulante, manifestados en un aumento del punto isoeléctrico de la gonadotropina (Padmanabhan y col., 1988; Wide y col., 1993; Zambrano y col., 1995).

Hasta el momento no hay datos reportados en la literatura que demuestren una correlación directa *in vivo* del grado de sialilación de la FSH y los niveles séricos de inhibinas; sin embargo, los resultados descritos en este trabajo de Tesis utilizando dos modelos experimentales diferentes permiten postular que el grado de sialilación de la FSH podría ser un factor adicional que contribuya a alcanzar el predominio de uno u

otro péptido en las diferentes etapas de la fase folicular de ciclos menstruales normales.

Como se mencionó anteriormente, tanto la producción de estradiol como la de subunidad  $\alpha$  de inhibina fue estimulada por todos los análogos de carga de la FSHrh. Estos resultados confirman la capacidad de la gonadotropina para asegurar la producción de estradiol y subunidad  $\alpha$  de inhibinas a lo largo de toda la fase folicular, independientemente del grado de sialilación de sus oligosacáridos, ya que el estradiol es esencial para el desarrollo folicular normal (Krege y col., 1998; Jamnongjit & Hammes, 2006) y el predominio de subunidad  $\alpha$  de inhibina es necesaria para la producción de la forma heterodimérica, inhibina B (Groome y col., 1996).

Cuando se estudió la actividad endocrina de las células KGN en respuesta a las glicofomas de FSHrh con diferente grado de complejidad en sus cadenas carbohidratadas, se pudo observar que aquellas variantes glicosiladas que no completaron el procesamiento de sus oligosacáridos representan un estímulo menos específico respecto de la regulación de la actividad endocrina de la célula de la granulosa. Las variantes glicosiladas de FSH con estas características tuvieron la capacidad de estimular el conjunto de parámetros determinados en este modelo experimental.

Por el contrario, las variantes glicosiladas de FSH que han completado la adición de todos los azúcares a sus cadenas carbohidratadas podría direccionar de manera más específica la acción sobre determinados parámetros de la célula. De esta manera este tipo de variantes glicosiladas podría ejercer su acción biológica a través de dos características de la estructura de sus oligosacáridos: el grado de complejidad y la incorporación variable y hormonalmente regulada de residuos de ácido siálico terminal.

Los resultados obtenidos sobre la implicancia de la estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH sobre la regulación de la actividad endocrina de las células de la granulosa, plantea un nuevo interrogante sobre el efecto

que podría tener la porción carbohidratada de la gonadotrofina a nivel de la expresión génica en estas células.

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular ha permitido, aplicando la técnica de Microarreglos de ADN, evaluar simultáneamente la expresión de un gran número de genes. Utilizando esta metodología varios autores han descrito el efecto de diferentes preparaciones de FSH sobre el perfil de expresión génica de las células de la granulosa provenientes de los aspirados foliculares de pacientes infértiles a las cuales se les administran estas gonadotrofinas para estimular el desarrollo folicular. Cuando se compararon los efectos de la administración de FSH de origen recombinante con la que proviene de orina de mujeres postmenopáusicas (Grøndahl y col., 2009; Brannian y col., 2010) se observó una expresión diferencial de varios genes que respondían a una u otra preparación. Se propuso entonces que estas diferencias podrían deberse a pequeñas contaminaciones con LH provenientes de la preparación de origen urinario o, alternativamente, se consideró también que la diferencia en los carbohidratos presentes en la FSH de estas preparaciones podría ser la causa de esta expresión génica diferencial. Esta hipótesis se apoya en las evidencias obtenidas por varios autores desde la década del '90, quienes encontraron diferencias en las características de los carbohidratos presentes en las preparaciones comerciales de gonadotrofina disponibles en ese momento para uso terapéutico (Hård y col., 1990; Harris y col., 1996; de Leeuw y col., 1996; Timossi y col., 1998).

El interés de realizar este tipo de análisis surge al considerar las diferentes respuestas que se observan en los tratamientos de reproducción asistida en función de la gonadotrofina utilizada para inducir el desarrollo folicular (Selman y col., 2002). La literatura ilustra sobre las discrepancias en los resultados obtenidos al respecto cuando reporta estudios clínicos; algunos autores no han encontrado diferencias en los parámetros analizados, tales como número total de oocitos recuperados y embriones obtenidos; por el contrario, otros estudios demuestran diferencias en los porcentajes de oocitos maduros, de embriones de mayor calidad y tasa de embarazo, etc. Es interesante mencionar que Selman y col. (2010) han evaluado el efecto de un protocolo

que combina, de forma secuencial, la utilización de la FSH de origen recombinante con la urinaria, basándose en la diferencia del grado de sialilación que existe entre estas dos preparaciones, con el fin de reproducir los cambios observados en esta característica de la hormona a lo largo del ciclo menstrual. Los resultados obtenidos son promisorios: la proporción de oocitos maduros, embriones grado 1 y la tasa de embarazo fue mayor bajo el tratamiento secuencial respecto del protocolo clásico en el cual únicamente se administró FSHrh.

Hasta el momento no se había investigado directamente el impacto de las diferentes variantes glicosiladas de FSH sobre la expresión génica de la célula blanco. El objetivo de la siguiente etapa de este trabajo de Tesis fue evaluar el perfil de expresión génica global inducido por las diferentes variantes glicosiladas, aisladas a partir de la FSHrh, en la línea celular de granulosa humana, KGN.

Mediante el análisis de los microarreglos de ADN se pudo observar que las variantes glicosiladas de la FSHrh afectaron de manera diferencial la expresión de un gran número de genes, entre los cuales se encontraban los clásicamente descritos como genes blanco de FSH involucrados en la biosíntesis de esteroides; por ejemplo, el gen que codifica para la Proteína Reguladora de la Esteroidogénesis Aguda, *STAR* y la aromatasas, *CYP19A1*, entre otros (Fitzpatrick & Richards, 1991; Minegishi y col., 2000). Esta observación nos permite validar el diseño experimental utilizado en estos experimentos.

Respecto de la implicancia del grado de sialilación de la hormona, se pudo observar que del número total de genes que fueron afectados por los análogos de carga de la FSHrh la expresión de, aproximadamente, un 40% de ellos fue modificada específicamente por uno u otro tipo de preparación (con mayor o menor grado de sialilación). La expresión de una proporción marcadamente menor de genes fue afectada por ambos tipos de variantes glicosiladas de la FSHrh. Sin embargo, es importante señalar que varios de los genes que integran este subgrupo presentaron diferencias en los niveles de expresión, cuando se comparó la respuesta inducida por

una u otra variante, entre los cuales se puede citar el gen de la  $3\beta$ HSDII, que se discutirá más adelante en esta sección.

Resultados similares se obtuvieron al evaluar la expresión de genes afectados por el grado de complejidad de los oligosacáridos de la FSHrh.

Para poder interpretar estos resultados, en relación con la función conocida de las proteínas que estos genes codifican, se llevó a cabo el análisis de ontologías el cual permitió relacionar los cambios en el perfil de expresión con procesos biológicos y funciones moleculares asociados a patrones de expresión. Estudios más específicos serán necesarios para evaluar la importancia que podría tener la modificación de los genes agrupados en estas categorías.

Varios de los genes cuya expresión fue modificada por las diferentes variantes glicosiladas de FSH aún no han sido descritos como genes blanco de esta gonadotropina; sin embargo, la literatura provee información que relaciona estas proteínas con la función ovárica.

Se discuten a continuación algunos de estos genes.

La proteína codificada por el gen *GJA10* (CX62) pertenece a una familia de conexinas que forman las uniones comunicantes entre células o “gap junctions”. Varias de estas proteínas han sido descritas en el tejido ovárico y más específicamente, se las ha localizado entre células de la granulosa y entre células del cumulus y el oocito (Grazul-Bilska y col., 1997; Wright y col., 2001). Estas uniones permiten el intercambio de nutrientes, iones y moléculas regulatorias, y la importancia de las mismas ha sido estudiada en modelos de ratón, donde se observó que la ausencia de ciertas conexinas se relaciona con la falta de folículos maduros, fallas en la ovulación, en la maduración meiótica de los oocitos y desarrollo anormal de cuerpos lúteos (Ackert y col., 2001; Gittens y col., 2003). Un estudio realizado en folículos de ratón ha sido el único, hasta el momento, en establecer una relación entre el patrón de expresión de la conexina 43 (Cx43) en las células de la granulosa y el tratamiento con diferentes variantes glicosiladas de FSH de origen hipofisario humano (Barrios-de-Tomassi y col., 2006). Nuestros resultados aportan nuevas evidencias a las descritas previamente, sugiriendo

que la conexina 62 sería un integrante más de esta familia de proteínas, cuya expresión estaría regulada por FSH y favorecida por los análogos de carga con menor grado de sialilación. La implicancia de esta proteína en el funcionamiento adecuado del ovario y su relación con la FSH requerirá estudios destinados a aclarar estos aspectos de la regulación de la función ovárica.

Una hormona con menor grado de sialilación afectaría la expresión de genes relacionados con la regulación de la diferenciación celular, entre los cuales se encuentran algunos factores de crecimiento. Entre los genes cuya expresión fue modificada por los análogos de carga de menor grado de sialilación podemos citar el TGF- $\beta$ 3. En estudios previos, Nilsson y col. (2003) habían demostrado que este factor de crecimiento es la isoforma más abundante en células de la granulosa y de la teca durante el desarrollo de folículos antrales en bovinos. Además, en un modelo de ratón se demostró que el TGF- $\beta$ 3 es un importante regulador de la esteroidogénesis en células de la granulosa, ya que se observó un aumento en la síntesis de estradiol y expresión de la enzima aromatasa por efecto del mismo (Liang y col., 2011). Sin embargo, hasta el momento no se lo había relacionado con las gonadotrofinas como factores reguladores de su expresión.

Otro factor que resultó ser afectado por las variantes glicosiladas menos sialiladas de la FSHrh fue el HSF2. Este péptido fue descrito como un factor de transcripción que regula la expresión de las proteínas de shock térmico, entre otras. En un modelo de ratón knockout se observó que la ausencia de este factor se relacionaba con hembras subfértiles con diversas alteraciones a nivel gonadal, por ejemplo, elevados niveles de expresión del receptor de LH, etc. (Kallio y col., 2002). A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis y los antecedentes aportados por otros autores se podría especular que la FSH, a través de sus variantes con menor grado de sialilación, estaría aumentando la expresión de este factor de transcripción, aparentemente implicado en la fertilidad de las hembras.

Al analizar los genes cuya expresión fue modificada por el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSHrh, se observó que la expresión del gen de la IL-

6 se encontraba disminuida por acción de las variantes glicosiladas de FSHrh con oligosacáridos complejos. Estudios realizados en folículos de ratón demostraron que esta citoquina, regulada principalmente por la LH, modula la expansión de las células del cumulus y la expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios y de respuesta inmune (Liu y col., 2009). También se ha visto que pacientes infértiles con endometriosis presentan altos niveles de IL-6 y otras citoquinas en suero y fluidos foliculares (Pellicer y col., 2000; Martínez y col., 2007). Varios autores han sugerido que la LH y otros factores regularían el proceso de ovulación y la IL-6 sería uno de los componentes de este complejo mecanismo; en consecuencia, una adecuada expresión de este gen podría ser relevante para lograr un correcto desarrollo folicular. En función de los resultados obtenidos en este trabajo se podría especular que la FSH sería un modulador negativo de la expresión de este factor, probablemente en etapas tempranas del desarrollo de los folículos ováricos.

Todos estos genes, si bien se han expuesto solo algunos de los identificados por la técnica de microarreglos, parecerían ser de gran importancia en el mecanismo de acción de la FSH y la respuesta diferencial inducida por sus diferentes variantes glicosiladas. Si se analizan en conjunto los resultados obtenidos al estudiar el efecto de las variantes glicosiladas de la FSHrh sobre la respuesta endocrina y el perfil de expresión génica, las evidencias obtenidas en este trabajo de Tesis sugieren que la gonadotropina, a través de la regulación de las características de sus oligosacáridos modularía diferentes funciones de la célula de la granulosa y en consecuencia, del folículo. Estudios más específicos deberán ser realizados para determinar la relevancia funcional de la modulación de estos genes y su implicancia en el ovario.

Entre los Procesos Biológicos relacionados con los genes cuya expresión fue modificada por las variantes glicosiladas de FSHrh con oligosacáridos que no han completado su procesamiento (FR) se identificó la biosíntesis de esteroides. La expresión génica de las enzimas que participan en este importante proceso biológico fue considerada de particular interés teniendo en cuenta los hallazgos obtenidos al



evaluarse el efecto de las diferentes variantes glicosiladas de FSHrh sobre la producción de esteroides.

La relevancia de los carbohidratos presentes en la FSHrh sobre la regulación de la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis fue confirmada por la técnica de PCR en tiempo real.

Numerosas evidencias reportadas en la literatura han demostrado la acción de la FSH sobre la expresión de las proteínas implicadas en la síntesis de progesterona por parte de las células de granulosa (Goldring y col., 1987; Silverman y col., 1999; Eirmerl & Orly, 2002; LaVoie & King, 2009). Sin embargo, hasta el momento no se había investigado directamente el impacto de las diferentes variantes glicosiladas de FSH sobre la expresión génica de estas proteínas. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que el grado de sialilación y complejidad de los oligosacáridos presentes en la gonadotrofina afectan la expresión de los genes involucrados en la esteroidogénesis desde sus primeras etapas. La presencia de ácido siálico en las cadenas de carbohidratos de la FSH no contribuiría al inicio de la biosíntesis de esteroides. Tanto la expresión de la proteína implicada en el transporte de colesterol hacia la mitocondria, *STAR*, como la de la enzima responsable de su conversión a pregnenolona, *CYP11A1*, fueron estimuladas por variantes glicosiladas de FSHrh con bajo grado de sialilación. La conversión de pregnenolona a progesterona no parecería estar significativamente afectada por la estructura de oligosacáridos presentes en la molécula de FSH ya que el mayor estímulo de la expresión de la enzima sería una FSH con mayor grado de sialilación que no favorece las primeras etapas de la biosíntesis.

Cuando se analizó el efecto de los oligosacáridos de la FSH sobre la expresión de la enzima responsable de la aromatización de sustratos androgénicos, *CYP19A1*, se observó que todas las variantes glicosiladas de la FSHrh tenían la capacidad de estimular la expresión de este gen. Sin embargo, aquellas con menor grado de sialilación ejercen un efecto estimulador más marcado.

Las variantes glicosiladas que no completaron el procesamiento de sus oligosacáridos mostraron un efecto estimulador sobre la expresión de todos los genes

evaluados hasta el momento. Una observación similar se describió anteriormente al considerar los resultados obtenidos tanto al estudiar la regulación de la producción de los esteroides como de inhibinas en este modelo experimental.

La primera evidencia de la regulación del gen *CYP19A1* por las variantes glicosiladas de FSH fue obtenida por Timossi y col. (2000), quienes observaron que la expresión del gen de la enzima P450aromatasa fue estimulada por FSH humana de origen hipofisario con bajo grado de sialilación.

Del análisis de microarreglos de ADN surgió el interés de estudiar la regulación de la expresión del gen *HSD17B8* por variantes glicosiladas de FSHrh. El mismo formaba parte del grupo de genes vinculados a la esteroidogénesis cuya expresión fue afectada por glicofomas de FSHrh que no han completado el procesamiento de sus oligosacáridos. Se ha demostrado que la enzima codificada por este gen pertenece a la familia de las hidroxisteroide deshidrogenasas que catalizan la reacción de oxidoreducción del carbono 17 de estrógenos y andrógenos (Fomitcheva y col., 1998; Labrie y col., 2000). En particular, se ha demostrado que la isoenzima tipo 8 de la 17 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa, la cual tiene la capacidad de metabolizar testosterona y dihidrotestosterona, posee máxima actividad y afinidad por el estradiol. Esta característica resalta su función de inactivación del estrógeno biológicamente activo, convirtiéndolo en estrona. La enzima había sido descrita inicialmente en riñón e hígado de ratón, pero luego se la ha localizado en tejido ovárico y más específicamente, en las células del cumulus (Aziz y col., 1993; Fomitcheva y col., 1998). Años más tarde Pelletier y col. (2005), utilizando técnicas de hibridización in situ han reportado su localización en células de la granulosa en todos los estadios del desarrollo folicular. En base a estos hallazgos, se ha propuesto que esta enzima tendría un papel muy importante en la regulación del tenor estrogénico al cual podría estar expuesto el oocito. Es interesante señalar que utilizando como modelo experimental la línea celular de cáncer de mama, MCF-7, y una línea derivada de un hepatocarcinoma, HepG2, se demostró que la expresión del gen *HSD17B8* es regulada por estrógenos a través del receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$  (Rotinen y col., 2009).

En este trabajo de Tesis se demuestra por primera vez la estimulación de la expresión del gen *HSD17B8* por acción de la FSH y en particular, la presencia de ácido siálico en la gonadotrofina sería determinante para ejercer este efecto.

Este estudio incluyó el análisis del efecto de las distintas variantes glicosiladas de FSHrh sobre la expresión génica de las subunidades de inhibina/activina. Los resultados obtenidos eran esperables; la ausencia de regulación de la FSHrh sobre el gen de la subunidad  $\beta$ A de inhibina/activina podría deberse a que esta línea celular produce constitutivamente activina A.

Por el contrario, la expresión de la subunidad  $\alpha$  de inhibina solo se vio afectada por el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSHrh ya que el mayor estímulo fue observado cuando las células fueron expuestas a variantes glicosiladas con oligosacáridos que no completaron su procesamiento. Sin embargo, cuando se evaluó la producción de la proteína, si bien estas glicofomas ejercieron el efecto mas marcado, todas las variantes glicosiladas estudiadas fueron capaces de estimular su producción. Es importante mencionar que el estudio de la expresión génica se realizó luego de 24 h de estímulo, mientras que la producción de los péptidos de interés fue evaluada a las 72 h de cultivo. En consecuencia, se podría especular que la activación transcripcional de este gen requeriría un tiempo mas prolongado de exposición para poner de manifiesto el efecto estimulador de la gonadotrofina sobre el gen.

El único antecedente reportado en la literatura de la acción de los oligosacáridos de FSH humana sobre la expresión del gen de la subunidad  $\alpha$  de inhibina, fue descrito por Timossi y col., (2000). Los resultados obtenidos por estos autores, quienes muestran que la expresión de esta subunidad se incrementa por acción de análogos de carga de FSHh con alto grado de sialilación, no concuerdan con los obtenidos en el presente estudio; estas diferencias podrían deberse a que estos autores han utilizado otro diseño experimental y una preparación hormonal que no es pura.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la porción carbohidratada de la molécula de FSH humana influencia selectivamente la expresión

de genes necesarios para lograr un crecimiento adecuado y la maduración del folículo ovárico.

Teniendo en cuenta los hallazgos obtenidos en los estudios realizados con los modelos experimentales, los cuales mostraron claramente que la porción carbohidratada de la molécula de FSH humana juega un papel relevante en la regulación de la función de las células de la granulosa, se planteó la posibilidad de la existencia de disfunciones gonadales que estuvieran asociadas a cambios en la estructura de los carbohidratos de la FSH circulante.

Estudios previos realizados en el laboratorio determinaron las características de las estructuras de los oligosacáridos presentes en la FSH sérica en diferentes condiciones fisiológicas de la mujer. En mujeres perimenopáusicas, con niveles de FSH en la fase folicular media en el rango normal y longitud de ciclos menstruales conservada, se observó un mayor grado de sialilación de la FSH circulante. Una proporción mayor al 60% de la hormona que se encuentra en circulación en este grupo de mujeres de 45 años de edad, se aisló a  $\text{pH} < 4$ , mientras que esta misma proporción fue del 40% en la fase folicular de ciclos ovulatorios de mujeres jóvenes. Esta característica de los oligosacáridos de la gonadotropina en presencia de niveles de estradiol por encima del rango normal, como ocurre frecuentemente en este período de la vida, sugiere alteraciones en la regulación de la actividad de las sialiltransferasas en los gonadotropos de estas mujeres (Loreti y col., 2009).

Asimismo, se hallaron diferencias en el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH. Si bien la presencia de proporciones similares de glicofomas con oligosacáridos de tipo complejo se mantiene como característica común con el perfil observado en la fase folicular media de ciclos ovulatorios, la diferencia más importante la constituye la presencia en circulación de glicofomas de FSH con oligosacáridos de tipo híbrido, las cuales no han completado su procesamiento en la cisterna media del aparato de Golgi del gonadotropo (Loreti y col., 2009).

El aspecto más interesante de esta condición fisiológica, es que estas variaciones se producen sin alterar la actividad cíclica del ovario, como se mencionó anteriormente. En estas mujeres no existe ninguna señal patognomónica que indique la proximidad del final del período reproductivo, siendo este estudio el primero en demostrar la existencia de cambios en la microheterogeneidad molecular de la FSH como marcador de la disminución de la actividad gonadal. Es importante destacar que una disminución de los niveles séricos de inhibina B acompañan estos cambios moleculares de la FSH circulante.

La última parte de esta Tesis Doctoral fue orientada a explorar las características de la FSH circulante en mujeres menores de 40 años que se sometieron a protocolos clásicos de estimulación ovárica sin éxito. El grupo control, originalmente incluido en el estudio, incluyó a mujeres jóvenes fértiles que se sometieron a estimulación de ovulación múltiple con el objetivo de donar gametas embriogénicas.

La hipótesis de este estudio fue la posible existencia de alteraciones preexistentes de la microheterogeneidad molecular de la FSH en las pacientes con trastornos reproductivos que pudieran comprometer la respuesta posterior a la estimulación con gonadotrofinas exógenas.

El perfil de distribución de los análogos de carga de la FSH sérica determinado en los dos grupos de mujeres antes mencionados, mostró diferencias respecto del que caracteriza la fase folicular media de ciclos ovulatorios en mujeres jóvenes, históricamente descrito en estudios previos (Velásquez y col., 2006; Loreti y col., 2009). Por esta razón fue necesario incluir un nuevo grupo control, integrado por mujeres que habían logrado embarazos espontáneos y presentaban ciclos ovulatorios.

En las pacientes con trastornos reproductivos los análogos de carga de la FSH mostraron un mayor grado de sialilación respecto del observado en la misma fase del ciclo menstrual en el grupo control de mujeres fértiles. Esta característica surge de evaluar el rango de pH en el cual se aisló la hormona y la proporción de FSH aislada a  $\text{pH} < 4$ . Es interesante destacar que el perfil de distribución de los análogos de carga de la FSH sérica en las pacientes con trastornos reproductivos fue similar al observado

durante la perimenopausia, sin embargo la edad de las pacientes fue menor y no tuvieron éxito con los tratamientos administrados.

En este grupo de estudio, la disminución de los niveles circulantes de inhibina B y el aumento en los de estradiol reflejaron un cambio en la actividad de los folículos ováricos. Como se describió previamente, estas alteraciones a nivel endocrino también fueron descritas en mujeres perimenopáusicas (Welt y col., 1999; Welt y col., 2006; Loreti y col., 2009). Se ha propuesto que la caída de los niveles de inhibina B reflejaría precozmente una disminución fisiológica de la reserva ovárica, ya que los folículos antrales pequeños son los principales productores de este péptido (Kenny y col., 2006). Resulta difícil de explicar el aumento en los niveles circulantes de estradiol frente a una supuesta disminución de la reserva ovárica. Welt y col. (2006) han propuesto que niveles normales o aumentados de estradiol podrían deberse a una mayor actividad de la aromatasa debido a un aumento en los niveles de FSH en la fase folicular temprana, no evidenciable aún en la fase folicular media, tal como fue descrito en algunos grupos de mujeres mayores de 35 años (Welt y col., 1999; Prior, 2005).

Si bien en el presente trabajo no se realizó un análisis del grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH sérica de las pacientes, en función de la similitud con los resultados previamente descritos en las mujeres perimenopáusicas se esperaría que las mismas tuvieran alteraciones en la abundancia relativa y en el grado de complejidad de los carbohidratos de la FSH. Probablemente, la aparición de glicofomas de FSH con oligosacáridos incompletos, de tipo híbrido y de alta manosa, muy bioactivos, podrían contribuir a la mayor producción del esteroide.

Aunque la disminución de la reserva ovárica acompaña al avance de la edad cronológica de la mujer, varios autores han descrito que ciertos grupos de mujeres jóvenes, aún con niveles inmunológicos normales de FSH, presentan una aceleración en este proceso y aquellas con bajo número de oocitos recuperados luego de los tratamientos de inducción de la ovulación tendrían una mayor probabilidad de alcanzar la menopausia en edades tempranas que aquellas mujeres que responden mejor al tratamiento (de Boer y col., 2002; Lawson y col., 2003).

Un resultado inesperado fue el obtenido al estudiar las jóvenes ovodonantes ya que presentaron un aumento en los niveles inmunológicos de FSH y el perfil de distribución de los análogos de carga mostró alteraciones respecto del observado en el grupo de mujeres control de igual edad. La FSH circulante en este grupo de mujeres se caracterizó por un aumento en el grado de sialilación y en la pérdida del predominio de hormona aislada en un intervalo acotado de pH. Sin embargo, la respuesta al tratamiento de inducción de la ovulación fue exitosa y los ovocitos liberados progresaron a estadios adecuados para ser implantados y lograr embarazos.

Si bien las jóvenes ovodonantes presentaban un período sin tratamiento hormonal previo al estudio, mayor a tres meses, constaba en sus historias clínicas que todas ellas ya se habían sometido anteriormente a tratamientos de estimulación ovárica. Las diferencias encontradas en el perfil de distribución de análogos de carga de la FSH circulante en fase folicular de las jóvenes ovodonantes y las mujeres que integraron el grupo control, abren un interrogante sobre el efecto que sucesivos tratamientos de inducción de la ovulación podrían tener sobre la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal de estas jóvenes.

La inhibición total de la glándula hipofisaria inducida por la administración del análogo de GnRH y el progestágeno en sucesivos tratamientos podría estar afectando la funcionalidad del gonadotropo y por ende, la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, razón por la cual podrían estar alterados el grado de sialilación de la hormona y los niveles de FSH.

Otra característica a destacar fueron los niveles circulantes de inhibina B, los cuales estaban levemente afectados; esto podría explicarse por una disminución de la reserva ovárica ya que estas mujeres responden a la gonadotropina exógena en cada tratamiento produciendo un promedio de 16 folículos, aunque algunas de ellas llegan a reclutar más de 30.

La importancia de los resultados obtenidos en este estudio surge de las alteraciones halladas en el eje hipófiso-gonadal no solo en las pacientes jóvenes que recurren a técnicas de reproducción asistida para lograr embarazo, sino también en

aquellas que se someten repetidamente a tratamientos farmacológicos que incluyen la administración de dosis altas de FSH recombinante con una estructura molecular diferente a la producida fisiológicamente.

Estos nuevos aspectos de la fisiopatología del eje reproductivo deberían explorarse en profundidad para mejorar tanto el diagnóstico de fallas gonadales como los tratamientos que se implementan en estas patologías.



*La glándula hipofisaria posee la capacidad de modular la funcionalidad del ovario modificando, no solo la cantidad de FSH entregada en la gónada, sino también las características de los oligosacáridos adicionados a la molécula, lo cual implica la secreción de diferentes variantes glicosiladas de FSH.*

*Este trabajo de Tesis demuestra la implicancia de los carbohidratos presentes en la gonadotropina en los mecanismos regulatorios de la funcionalidad de la célula de la granulosa. Se ha demostrado la regulación diferencial que la FSH ejerce sobre la actividad endocrina de la célula de la granulosa a través de las características de los oligosacáridos adicionados a la molécula. Esta acción involucra la regulación de la expresión de genes asociados a funciones celulares muy diversas que abarcan desde procesos básicos como la homeostasis celular y el transporte de glucosa hasta procesos más específicos como la respuesta inflamatoria, la diferenciación celular y la producción de esteroides.*

*Los cambios en la microheterogeneidad molecular de la FSH que podrían producirse en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas en la mujer impactarían en la célula blanco alterando la señal hormonal y en consecuencia, la respuesta biológica inducida. Asimismo, los resultados obtenidos abren un interrogante sobre los efectos de las preparaciones hormonales utilizadas en los tratamientos de inducción de la ovulación y plantean la necesidad de disponer de gonadotropinas recombinantes con estructuras de oligosacáridos variables que reproduzcan las condiciones fisiológicas de estimulación ovárica.*

Lic. Rosana Nazareth Loreti  
Doctorando

Dra. Stella Maris Campo  
Directora

# *Bibliografía*

- Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. (2000) The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinol.* 141(5): 1795-803.
- Ackert CL, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. (2001) Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol.* 233(2):258-70.
- Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehvälaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I, de la Chapelle A. (1995) Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell.* 82(6):959-68.
- Aloi JA, Dalkin AC, Schwartz NB, Yasin M, Mann B, Haisenleder DJ, Marshall JC. (1995) Ovarian inhibin subunit gene expression: regulation by gonadotropins and estradiol. *Endocrinol.* 136(3):1227-32.
- Armstrong DT, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciarelli E, Hernandez ER, Roberts CT, Leroith D, Rosenfeld R. (1979) in *Ovarian Follicular Development and Function* (Midgley AR and Sadler WA, eds) pp. 169-182, Raven Press, New York.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 25(1):25-9.
- Ashwell G, Harford J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem.* 51:531-54.
- Aziz N, Maxwell MM, Brenner BM. (1994) Coordinate regulation of 11 beta-HSD and Ke 6 genes in cpk mouse: implications for steroid metabolic defect in PKD. *Am J Physiol.* 267(5 Pt 2):F791-7.
- Baenziger JU, Green ED. (1988) Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta.* 947(2):287-306.
- Baker SJ, Spears N. (1999) The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Hum Reprod Update.* 5(2):153-65.
- Barrios-de-Tomasi J, Nayudu PL, Brehm R, Heistermann M, Zariñán T, Ulloa-Aguirre A. (2006) Effects of human pituitary FSH isoforms on mouse follicles in vitro. *Reprod Biomed Online.* 12(4):428-41.

- Bedecarrás P, Gryngarten M, Ayuso S, Escobar ME, Bergadá C, Campo S. (1998) Characterization of serum SHBG isoforms in prepubertal and pubertal girls. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 49(5):603-8.
- Bernard DJ, Fortin J, Wang Y, Lamba P. (2010) Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil Steril*. 93(8):2465-85.
- Bilezikjian, L.M., Corrigan, A.Z. and Vale, W.W. (1994) Activin-B, inhibin-B and follistatin as autocrine/paracrine factors of the rat anterior pituitary. In Burger, H.G., Findlay, J., Robertson, D. et al. (eds), *Inhibin and Inhibin-related Peptides. Ares-Serono Symposia Publications*, Rome, pp. 81–99.
- Bilezikjian LM, Blount AL, Corrigan AZ, Leal A, Chen Y, Vale WW. (2001) Actions of activins, inhibins and follistatins: implications in anterior pituitary function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 28(3):244-8.
- Bilezikjian LM, Leal AM, Blount AL, Corrigan AZ, Turnbull AV, Vale WW. (2003) Rat anterior pituitary folliculostellate cells are targets of interleukin-1beta and a major source of intrapituitary follistatin. *Endocrinol*. 144(2):732-40.
- Bilezikjian LM, Vale WW. (2011) The Local Control of the Pituitary by Activin Signaling and Modulation. *Open Neuroendocrinol J*. 4:90-101.
- Bilezikjian LM, Justice NJ, Blackler AN, Wiater E, Vale WW. (2012) Cell-type specific modulation of pituitary cells by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol*. 359(1-2):43-52.
- Bley MA, Simón JC, Saragüeta PE, Barañao JL. (1991) Hormonal regulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis: effects of estrogens. *Biol Reprod*. 44(5):880-8.
- Bley MA, Simón JC, Estévez AG, de Asúa LJ, Barañao JL. (1992) Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinol*. 131(3):1223-9.
- Blithe DL (1990) Carbohydrate composition of the  $\alpha$ -subunit of human choriogonadotropin (hCG $\alpha$ ) and the free  $\alpha$  molecules produced in pregnancy: most free  $\alpha$  and some combined hCG molecules are fucosylated. *Endocrinol* 126: 2788-2799.
- Boothby M, Ruddon RW, Anderson C, McWilliams D, Boime I. (1981) A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J Biol Chem*. 256(10):5121-7.
- Bousfield GR, Butnev VY, Walton WJ, Nguyen VT, Huneidi J, Singh V, Kolli VS, Harvey DJ, Rance NE. (2007) All-or-none N-glycosylation in primate follicle-stimulating hormone beta-subunits. *Mol Cell Endocrinol*. 2:260-262:40-8.

- Brannian J, Eyster K, Mueller BA, Bietz MG, Hansen K. (2010) Differential gene expression in human granulosa cells from recombinant FSH versus human menopausal gonadotropin ovarian stimulation protocols. *Reprod Biol Endocrinol.* 12;8:25.
- Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CK, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC, Schofield PR. (1993) Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinol.* 132(1):351-6.
- Chappel SC (1981) The presence of two species of follicle-stimulating hormone within hamster anterior pituitary glands as disclosed by concanavalin A chromatography. *Endocrinol.* 109: 935-942.
- Chappel SC. (1995) Heterogeneity of follicle stimulating hormone: control and physiological function. *Hum Reprod Update.* 1(5):479-87.
- Cheng C, Frick J, Gunsalus G, Musto N, Bardin C (1984) Human testicular androgen-binding protein shares immunodeterminants with serum testosterone-estradiol-binding globulin. *Endocrinol.* 114 (4):1395-1401.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.
- Clayton RN (1982) GnRH modulation of its own pituitary receptors: evidence for biphasic regulation. *Endocrinology* 111:152-157
- Creus S, Pellizzari E, Cigorruga S, Campo S (1996) Human FSH isoforms: bio and immunoactivity in post-menopausal and normal menstruating women. *Clinical Endocrinol.* 44:2, 181-189.
- Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Ulloa-Aguirre A, Campo S. (2001) Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol Cell Endocrinol.* 174(1-2):41-9.
- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. (1989) The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinol.* 125(2):917-24.
- Damian-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sanchez-Hernandez C, Timossi C, Ulloa-Aguirre A. (1999) Oestrogens regulate pituitary alpha2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol.* 23(2):153-65.
- Danzo BJ, Black JH (1990) Structure of asparagine-linked oligosaccharides on human and rabbit testosterone-binding globulin. *Biol Reprod,* 42: 472-482.

- de Boer EJ, den Tonkelaar I, te Velde ER, Burger CW, Klip H, van Leeuwen FE; OMEGA-project group. (2002) A low number of retrieved oocytes at in vitro fertilization treatment is predictive of early menopause. *Fertil Steril*. 77(5):978-85.
- de Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL, Phillips DJ. (2002) Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update*. 2002 8(6):529-41.
- de Leeuw R, Mulders J, Voortman G, Rombout F, Damm J, Kloosterboer L. (1996) Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol Hum Reprod*. 2(5):361-9.
- Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. (1996) Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinol*. 137(12):5337-43.
- Dias JA, Lindau-Shepard B, Hauer C, Auger I (1998) Human follicle-stimulating hormone structure-activity relationships. *Biol Reprod*. 58(6):1331-6.
- Dias JA, Nechamen CA, Atari R. (2005) Identifying protein interactors in gonadotropin action. *Endocrine*. 26(3):241-7.
- Drummond AE, Dyson M, Thean E, Groome NP, Robertson DM, Findlay JK. (2000) Temporal and hormonal regulation of inhibin protein and subunit mRNA expression by post-natal and immature rat ovaries. *J Endocrinol*. 166(2):339-54.
- Dufau ML, Tsuruhara T, Catt KJ (1972) Interaction of glycoprotein hormones with agarose-Concanavalin A. *Biochim Biophys Acta* 278: 281-292.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. (2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 30(6):624-712.
- Eimerl S, Orly J. (2002) Regulation of steroidogenic genes by insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone: differential responses of cytochrome P450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in rat granulosa cells. *Biol Reprod*. 67(3):900-10.
- El-Hefnawy T, Zeleznik AJ. (2001) Synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin D2 expression in rat granulosa cells. *Endocrinol*. 142(10):4357-62.
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. (1999) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol*. 13(6):1035-48.
- Erickson GF, Hsueh AJ. (1978) Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinol*. 102(4):1275-82.

- Escobar ME, Rivarola MA, Bergadá C. (1976) Plasma concentration of oestradiol-17beta in premature thelarche and in different types of sexual precocity. *Acta Endocrinol* (Copenh). 81(2):351-61
- Fahy PA, Wilson CA, Beard AJ, Groome NP, Knight PG. (1995) Changes in inhibin-A (alpha-beta A dimer) and total alpha inhibin in the peripheral circulation and ovaries of rats after gonadotrophin-induced follicular development and during the normal oestrous cycle. *J Endocrinol*. 147(2):271-83.
- Fan QR, Hendrickson WA. (2005) Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*. 433(7023):269-77.
- Fernández-Vázquez G, Kaiser UB, Albarracin CT, Chin WW. (1996) Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin A. *Mol Endocrinol*. 10(4):356-66.
- Findlay JK. (1993) An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod*. 48(1):15-23.
- Findlay JK, Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Wreford NG, Robertson DM, Groome NP, Jones ME, Simpson ER. (2000) The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Mol Cell Endocrinol*. 163(1-2):81-7.
- Fitzpatrick SL, Richards JS. (1991) Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinol*. 129(3):1452-62.
- Fomitcheva J, Baker ME, Anderson E, Lee GY, Aziz N. (1998) Characterization of Ke 6, a new 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. *J Biol Chem*. 273(35):22664-71.
- Foulds LM, Robertson DM (1983) Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone for male and female rats. *Mol Cell Endocrinol* 31: 117-130.
- Fox KM, Dias JA, Van Roey P. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol*. 15(3):378-89.
- Fresno C, Llera AS, Girotti MR, Valacco MP, López JA, Podhajcer OL, Balzarini MG, Prada F, Fernández EA. (2012) The multi-reference contrast method: facilitating set enrichment analysis. *Comput Biol Med*. 42(2):188-94.
- Gittens JE, Mhawi AA, Lidington D, Ouellette Y, Kidder GM. (2003) Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284(4):C880-7.

- Gloaguen P, Crépieux P, Heitzler D, Poupon A, Reiter E. (2011) Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks. *Front Endocrinol (Lausanne)*.2:45.
- Goldring NB, Durica JM, Lifka J, Hedin L, Ratoosh SL, Miller WL, Orly J, Richards JS. (1987) Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinol*. 120(5):1942-50.
- Goldstein IJ, Hollerman CE, Merrick JM. (1965) Protein-carbohydrate interaction. I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A. *Biochim Biophys Acta*. 97:68-76.
- Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA. (1997) Gap junctions in the ovaries. *Biol Reprod*. 57(5):947-57.
- Greenwood FC, Hunter WM & Glover JS (1963) The preparation of I-131-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochemical Journal* 89, 114–123.
- Griswold MD. (1993) Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. En: The Sertoli cell. Ed: L.D. Russell, MD Griswold; Cache River Press, Clearwater, Fl. pág. 494-508
- Gromoll J, Simoni M. (2005) Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab*. 16(8):368-73.
- Grøndahl ML, Borup R, Lee YB, Myrhøj V, Meinertz H, Sørensen S. (2009) Differences in gene expression of granulosa cells from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with either recombinant follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril*. 91(5):1820-30.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT, McNeilly AS. (1994) Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 40(6):717-23.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Priddle J, Weaver K, McNeilly AS. (1995) Quantification of inhibin pro-alpha C-containing forms in human serum by a new ultrasensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 80(10):2926-32.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS (1996) Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1401-1405.
- Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA. (1991) A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinol*. 128(1):509-17.



- Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Dalkin AC, Marshall JC. (1993) Regulation of gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression by gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude in vitro. *Endocrinol.* 132(3):1292-6.
- Hård K, Mekking A, Damm JB, Kamerling JP, de Boer W, Wijnands RA, Vliegenthart JF. (1990) Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem.* 193(1):263-71.
- Harris SD, Anobile CJ, McLoughlin JD, Mitchell R, Lambert A, Robertson WR. (1996) Internal carbohydrate complexity of the oligosaccharide chains of recombinant human follicle stimulating hormone (Puregon, Org 32489): a comparison with Metrodin and Metrodin-HP. *Mol Hum Reprod.* 2(10):807-11.
- Hashimoto O, Tsuchida K, Ushiro Y, Hosoi Y, Hoshi N, Sugino H, Hasegawa Y. (2002) cDNA cloning and expression of human activin betaE subunit. *Mol Cell Endocrinol.* 194(1-2):117-122.
- Heckert LL, Daley IJ, Griswold MD. (1992) Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Endocrinol.* 6(1):70-80.
- Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. (1994) Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 100(1-2):51-4.
- Hohmann FP, Laven JS, de Jong FH, Fauser BC (2005) Relationship between inhibin A and B, estradiol and follicle growth dynamics during ovarian stimulation in normo-ovulatory women. *Eur J Endocrinol.* 152(3):395-401.
- Horsman G, Talbot JA, McLoughlin JD, Lambert A, Robertson WR. (2000) A biological, immunological and physico-chemical comparison of the current clinical batches of the recombinant FSH preparations Gonal-F and Puregon. *Hum Reprod.* 15(9):1898-902.
- Hoshina H, Boime I. (1982) Combination of rat lutropin subunits occurs early in the secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(24):7649-53.
- Hötten G, Neidhardt H, Schneider C, Pohl J. (1995) Cloning of a new member of the TGF-beta family: a putative new activin beta C chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 206(2):608-613.
- Huang da W, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, Bryant D, Guo Y, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA. (2007) DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 35:W169-75.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 4(1):44-57.

- Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. (2006) FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal*. 18(9):1351-9.
- Irusta G, Parborell F, Peluffo M, Manna PR, Gonzalez-Calvar SI, Calandra R, Stocco DM, Tesone M. (2003) Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod*. 68(5):1577-83.
- Jamnongjit M, Hammes SR. (2006) Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle*. 5(11):1178-83.
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Bilski JJ, Grazul-Bilska AT. (2002) Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrine*. 18(3):261-70.
- Kaivo-Oja N, Bondestam J, Kämäräinen M, Koskimies J, Vitt U, Cranfield M, Vuojolainen K, Kallio JP, Olkkonen VM, Hayashi M, Moustakas A, Groome NP, ten Dijke P, Hsueh AJ, Ritvos O. (2003) Growth differentiation factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(2):755-62.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. (1993) Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinol*. 133(2):931-4.
- Kalra B, Kumar A, Patel K, Patel A, Khosravi MJ. (2010) Development of a second generation Inhibin B ELISA. *J Immunol Methods*. 362(1-2):22-31.
- Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo TP, Rallu M, Gitton Y, Pirkkala L, Loones MT, Paslaru L, Larney S, Hiard S, Morange M, Sistonen L, Mezger V. (2002) Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J*. 21(11):2591-601.
- Kamel F, Balz JA, Kubajak CL, Schneider VA. (1987) Gonadal steroids modulate pulsatile luteinizing hormone secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinol*. 120(4):1651-7.
- Kanasaki H, Bedecarrats GY, Kam KY, Xu S, Kaiser UB. (2005) Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase pathways in perfused Lbeta2 cells. *Endocrinol*. 146(12):5503-13.
- Karakji EG, Tsang BK. (1995) Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. *Biol Reprod*. 53(6):1302-10.

- Katt JA, Duncan JA, Herbon L, Barkan A, Marshall JC. (1985) The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology*. 116(5):2113-5.
- Keene JL, Matzuk MM, Otani T, Fauser BC, Galway AB, Hsueh AJ, Boime I. (1989) Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 264(9):4769-75.
- Khatri P, Drăghici S. (2005) Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics*. 15;21(18):3587-95.
- Knight PG, Satchell L, Glister C. (2012) Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol Cell Endocrinol*. 359(1-2):53-65.
- Kolibianakis E, Osmanagaoglu K, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem A, Devroey P. (2002) Effect of repeated assisted reproductive technology cycles on ovarian response. *Fertil Steril*. 77(5):967-70.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(26):15677-82 .
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*. 15(2):201-4.
- Labarca C, Paigen K. (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem*. 102(2):344-52.
- Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, Pelletier G, Bélanger A. (2000) Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol*. 25(1):1-16.
- Lambert A, Rodgers M, Mitchell R, Wood AM, Wardle C, Hilton B, Robertson WR. (1995) In-vitro biopotency and glycoform distribution of recombinant human follicle stimulating hormone (Org 32489), Metrodin and Metrodin-HP. *Hum Reprod*. 10(7):1928-35.
- Lanuza GM, Groome NP, Baranao JL, Campo S. (1999) Dimeric inhibin A and B production are differentially regulated by hormones and local factors in rat granulosa cells. *Endocrinology* 140(6):2549-54.
- Lapointe E, Boerboom D. (2011) WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 3:276-85.

- LaPolt PS, Piquette GN, Soto D, Sincich C, Hsueh AJ. (1990) Regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinol.* 127(2):823-31.
- Laven JS, Fauser BC. (2004) Inhibins and adult ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 225(1-2):37-44.
- LaVoie HA, Garmey JC, Veldhuis JD. (1999) Mechanisms of insulin-like growth factor I augmentation of follicle-stimulating hormone-induced porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity in granulosa cells. *Endocrinol.* 140(1):146-53.
- Lawson R, El-Toukhy T, Kassab A, Taylor A, Braude P, Parsons J, Seed P. (2003) Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum Reprod.* 18(3):527-33.
- Leadem CA, Kalra SP. (1984) Stimulation with estrogen and progesterone of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone release from perfused adult female rat hypothalami: correlation with the LH surge. *Endocrinol.* 1984 Jan;114(1):51-6.
- Levine JE, Bethea CL, Spies HG. (1985) In vitro gonadotropin-releasing hormone release from hypothalamic tissues of ovariectomized estrogen-treated cynomolgus macaques. *Endocrinol.* 116(1):431-8.
- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W. (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature.* 404(6776):411-4.
- Liang N, Xu Y, Yin Y, Yao G, Tian H, Wang G, Lian J, Wang Y, Sun F. (2011) Steroidogenic factor-1 is required for TGF-beta3-mediated 17beta-estradiol synthesis in mouse ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 152(8):3213-25.
- Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. (1999) A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinol.* 140(6):2480-5.
- Liu Z, de Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JS. (2009) Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinol.* 150(7):3360-8.
- Longmore GD, Schachter H (1982) Product-identification and substrate-specificity studies of the GDP-L-fucose:2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucoside (FUC goes to Asn-linked GlcNAc) 6-alpha-L-fucosyltransferase in a Golgi-rich fraction from porcine liver. *Carbohydr Res.*;100:365-92.

- Loreti N, Ambao V, Juliato CT, Machado C, Bahamondes L, Campo S. (2009) Carbohydrate complexity and proportion of serum FSH isoforms reflect pituitary-ovarian activity in perimenopausal women and depot medroxyprogesterone acetate users. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 71(4):558-65.
- Loumaye E, Catt KJ. (1983) Agonist-induced regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone. Dissociation of receptor recruitment from hormone release in cultured gonadotrophs. *J Biol Chem*. 258(19):12002-9.
- Loumaye E, Campbell R, Salat-Baroux J. (1995) Human follicle-stimulating hormone produced by recombinant DNA technology: a review for clinicians. *Hum Reprod Update*. 1(2):188-99.
- Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. (2011) Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res*. 39:D52-7.
- Manjunath P, Sairam MR, Sairam J. (1982) Studies on pituitary follitropin. X. Biochemical, receptor binding and immunological properties of deglycosylated ovine hormone. *Mol Cell Endocrinol*. 28(2):125-38.
- Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. (1991) Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res*;47:155-89.
- Matzuk MM, Boime I. (1988) The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the alpha subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotrophin. *J Cell Biol*. 106(4):1049-59.
- Matzuk MM, Boime I. (1989) Mutagenesis and gene transfer define site-specific roles of the gonadotropin oligosaccharides. *Biol Reprod*. 40(1):48-53.
- McGee EA, Hsueh AJ. (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 21(2):200-14.
- Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W. (1988) Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(1):247-51.
- Midgley Jr. AR. (1973) Autoradiographic analysis of gonadotropin binding to rat ovarian tissue sections. *Adv Exp Med Biol* 36, 365-378.
- Minegishi T, Tsuchiya M, Hirakawa T, Abe K, Inoue K, Mizutani T, Miyamoto K. (2000) Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in rat granulosa cells. *Life Sci*. 67(9):1015-24.

- Mistry DS, Tsutsumi R, Fernandez M, Sharma S, Cardenas SA, Lawson MA, Webster NJ. (2011) Gonadotropin-releasing hormone pulse sensitivity of follicle-stimulating hormone-beta gene is mediated by differential expression of positive regulatory activator protein 1 factors and corepressors SKIL and TGIF1. *Mol Endocrinol.* 25(8):1387-403.
- Miyake T, Irahara M, Shitukawa K, Yasui T, Aono T. (1993) Interaction of activin A and gonadal steroids on FSH secretion from primary cultured rat anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 194(1):413-9.
- Monget P, Bondy C.(2000) Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 163(1-2):89-93.
- Muttukrishna S, Fowler PA, Groome NP, Mitchell GG, Robertson WR, Knight PG. (1994) Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Hum Reprod.* 9(9):1634-42.
- Muttukrishna S, Child T, Lockwood GM, Groome NP, Barlow DH, Ledger WL. (2000) Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, gonadotrophins and ovarian steroids during the menstrual cycle in older women. *Hum Reprod.* 15(3):549-56
- Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. (2005) Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG.* 112(10):1384-90.
- Nakai Y, Plant TM, Hess DL, Keogh EJ, Knobil E. (1978) On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinol.* 102: 1008-1014.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science.* 247(4944):836-8.
- Narasimhan S, Wilson JR, Martin E, Schachter H (1979) A structure basis for four distinct elution profiles on concanavalin A-sepharose affinity chromatography of glycopeptides. *Can J Biochem* 57: 83-96.
- Naylor SL, Chin WW, Goodman HM, Lalley PA, Grzeschik KH, Sakaguchi AY. (1983) Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic Cell Genet.* 9(6):757-70.
- Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. (2003) Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev.* 66(3):237-46.
- Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H. (2001) Establishment and characterization

- of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinol.* 142(1):437-45.
- Norwitz ER, Xu S, Jeong KH, Bédécarrats GY, Winebrenner LD, Chin WW, Kaiser UB. (2002) Activin A augments GnRH-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene. *Endocrinol.* 143(3):985-97.
- Ogata S, Muramatsu T, Kobata A (1975) Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography of Concanavalin-A Sepharose. *J Biochem* 78: 687-696.
- Ohno K, Araki N, Yanase T, Nawata H, Iida M. (2004) A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA. *Toxicol Sci.* 82(2):443-50.
- Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ. (1988) Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 67(3):465-73.
- Papandreou MJ, Asteria C, Pettersson K., Ronin C, Beck-Peccoz P (1993) Concanavalin A affinity chromatography of human serum gonadotropins: evidence for changes of carbohydrate structure in different clinical conditions. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1008-1013.
- Papavasiliou SS, Zmeili S, Khoury S, Landefeld TD, Chin WW, Marshall JC. (1986) Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone alpha and beta subunits in male rats. *Proc Natl Acad Sci USA.*;83(11):4026-9.
- Pelletier G, Luu-The V, Li S, Labrie F. (2005) Localization of type 8 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in mouse tissues as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* 53(10):1257-71.
- Peters BP, Krzesicki RF, Hartle RJ, Perini F, Ruddon RW. (1984) A kinetic comparison of the processing and secretion of the alpha beta dimer and the uncombined alpha and beta subunits of chorionic gonadotropin synthesized by human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem.* 259(24):15123-30.
- Pierce J.G and Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 465-495
- Piquette GN, LaPolt PS, Oikawa M, Hsueh AJ. (1991) Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinol.* 128(5):2449-56.



- Prior JC. (2005) Ovarian aging and the perimenopausal transition: the paradox of endogenous ovarian hyperstimulation. *Endocrine*. 26(3):297-300.
- Renwick AG, Mizuochi T, Kochibe N, Kobata A. (1987) The asparagine-linked sugar chains of human follicle-stimulating hormone. *J Biochem*. 101(5):1209-21.
- Richards JS. (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*. 15(6):725-51.
- Richards JS. (2001) Perspective: the ovarian follicle--a perspective in 2001. *Endocrinol*. 142(6):2184-93.
- Roberts V, Meunier H, Sawchenko PE, Vale W. (1989) Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinol*. 125(5):2350-9.
- Roberts R, Stark J, Iatropoulou A, Becker DL, Franks S, Hardy K. (2004) Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation. *Biol Reprod*. 71(1):199-209.
- Robker RL, Richards JS. (1998) Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol*. 12(7):924-40.
- Roh JS, Bondestam J, Mazerbourg S, Kaivo-Oja N, Groome N, Ritvos O, Hsueh AJ. (2003) Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates Smad2 in cultured rat granulosa cells. *Endocrinol*. 144(1):172-8.
- Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR. (2002) Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinol*. 143(4):1485-94.
- Rotinen M, Celay J, Alonso MM, Arrazola A, Encio I, Villar J. (2009) Estradiol induces type 8 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression: crosstalk between estrogen receptor alpha and C/EBPbeta. *J Endocrinol*. 200(1):85-92.
- Roy SK, Terada DM. (1999) Activities of glucose metabolic enzymes in human preantral follicles: in vitro modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and transforming growth factor beta1. *Biol Reprod*. 60(3):763-8.
- Sairam MR, Manjunath P. (1982) Studies on pituitary follitropin. XII. Enhanced thermal stability induced by chemical deglycosylation. *Mol Cell Endocrinol*. 28(2):151-9.



- Schwall RH, Mason AJ, Wilcox JN, Bassett SG, Zeleznik AJ. (1990) Localization of inhibin/activin subunit mRNAs within the primate ovary. *Mol Endocrinol.* 4(1):75-9.
- Sehested A, Juul AA, Andersson AM, Petersen JH, Jensen TK, Muller J, Skakkebaek NE. (2000) Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(4):1634-40.
- Selman HA, De Santo M, Sterzik K, Coccia E, El-Danasouri I. (2002) Effect of highly purified urinary follicle-stimulating hormone on oocyte and embryo quality. *Fertil Steril.* 78(5):1061-7.
- Selman H, Pacchiarotti A, El-Danasouri I. (2010) Ovarian stimulation protocols based on follicle-stimulating hormone glycosylation pattern: impact on oocyte quality and clinical outcome. *Fertil Steril.* 94(5):1782-6.
- Selvaraj N, Israeli D, Amsterdam A. (1996) Partial sequencing of the rat steroidogenic acute regulatory protein message from immortalized granulosa cells: regulation by gonadotropins and isoproterenol. *Mol Cell Endocrinol.* 123(2):171-7.
- Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. (1996) Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature.* 384(6608):470-4.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev.* 18(6):739-73.
- Smyth GK. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3:Article3.
- Timossi C, Damián-Matsumura P, Dominguez-González A, Ulloa-Aguirre A. (1998) A less acidic human follicle-stimulating hormone preparation induces tissue-type plasminogen activator enzyme activity earlier than a predominantly acidic analogue in phenobarbital-blocked pro-oestrous rats. *Mol Hum Reprod.* 4(11):1032-8.
- Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, Gonzalez-Suarez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, Ulloa-Aguirre A (2000) Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol.* 165(2):193-205.
- Toaff ME, Schleyer H, Strauss JF 3rd. (1982) Metabolism of 25-hydroxycholesterol by rat luteal mitochondria and dispersed cells. *Endocrinol.* 111(6):1785-90.

- Ulloa-Aguirre A & Chappel SC (1982) Multiple especies of follicle-stimulating hormona exist within the anterior pituitary ganad of male goldem hamsters. *J Endocrinol* 95: 257-266.
- Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Diaz-Sanchez V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod.* 7(1):23-30.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ, Padmanabhan V. (1995) Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev.* 16(6):765-87.
- Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Pasapera AM, Casas-González P, Dias JA. (2007) Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine.* 32(3):251-63.
- Velasquez EV, Creus S, Trigo RV, Cigorruga SB, Pellizzari EH, Croxatto HB, Campo S. (2006) Pituitary-ovarian axis during lactational amenorrhoea. II. Longitudinal assessment of serum FSH polymorphism before and after recovery of menstrual cycles. *Hum Reprod.* 21(4):916-23.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL. (1998) Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development in vitro. *Biol Reprod.* 59(4):854-61.
- Walton WJ, Nguyen VT, Butnev VY, Singh V, Moore WT, Bousfield GR. (2001) Characterization of human FSH isoforms reveals a nonglycosylated beta-subunit in addition to the conventional glycosylated beta-subunit. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(8):3675-85.
- Watkins PC, Eddy R, Beck AK, Vellucci V, Leverone B, Tanzi RE, Gusella JF, Shows TB. (1987) DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene to the short arm of human chromosome 11. *DNA.* 6(3):205-12.
- Weiss J, Guendner MJ, Halvorson LM, Jameson JL. (1995) Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. *Endocrinol.* 136(5):1885-91.
- Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE. (1999) Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(1):105-11.
- Welt CK, Jimenez Y, Sluss PM, Smith PC, Hall JE. (2006) Control of estradiol secretion in reproductive ageing. *Hum Reprod.* 21(8):2189-93.
- Wiater E, Lewis KA, Donaldson C, Vaughan J, Bilezikjian L, Vale W. (2009) Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Mol Endocrinol.* 23(7):1033-42.

- Wide L, Albertsson-Wikland K. (1990) Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 70(1):271-6.
- Wide L, Bakos O. (1993) More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab.* 76(4):885-9.
- Wide L, Naessén T. (1994) 17 beta-oestradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994 Jun;40(6):783-9.
- Woodruff TK, Meunier H, Jones PB, Hsueh AJ, Mayo KE. (1987) Rat inhibin: molecular cloning of alpha- and beta-subunit complementary deoxyribonucleic acids and expression in the ovary. *Mol Endocrinol.* 1(8):561-8.
- Woodruff TK, Mather JP. (1995) Inhibin, activin and the female reproductive axis. *Annu Rev Physiol.* 57:219-44.
- Woodruff TK, Besecke LM, Groome N, Draper LB, Schwartz NB, Weiss J (1996) Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinol* 137:5463–5467.
- Wright CS, Becker DL, Lin JS, Warner AE, Hardy K. (2001) Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reprod.* 121(1):77-88.
- Wu Y, Ghosh S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Hu Y. (2005) The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFI-B modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: a possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge. *Endocrinol.* 146(1):237-46.
- Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, Chen W, Xie M, Wang W, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang J, Gui Y, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J. (2011) The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol.* 29(8):735-41.
- Yang W, Lu CL, Yu FQ, Liu T, Hu ZY, Liu YX. (2008) Mitogen-activated protein kinase regulates FSH-induced expression of tissue-type plasminogen activator through an activator protein 1 response element. *Endocrine.* 34(1-3):101-7.
- Ying SY. (1988) Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev.* 9(2):267-93.

Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Diaz-Cueto L, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A. (1995) Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 80(5):1647-56.

Zambrano E, Barrios-de-Tomasi J, Cárdenas M, Ulloa-Aguirre A. (1996) Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol Hum Reprod.* 2(8):563-71.

Zeleznik AJ, Midgley AR Jr, Reichert LE Jr. (1974) Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinol.* 95(3):818-25.

***Anexos***

Tabla 1: Genes estimulados por análogos de carga AC en células KGN

AffyID	EntrezID	Gen	Descripción	p
8165672	5981	<i>RFC1</i>	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	0,024
8086538	644714	<i>LOC644714</i>	hypothetical protein LOC644714	0,042
8027354	388524	<i>RPSAP58</i>	ribosomal protein SA pseudogene 58	0,003
8074364	23617	<i>DGCR14</i>	DiGeorge syndrome critical region gene 14	0,026
8006602	6351	<i>CCL4</i>	chemokine (C-C motif) ligand 4	0,004
7968052	338872	<i>C1QTNF9</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 9	0,002
7927280	5540	<i>PPYR1</i>	pancreatic polypeptide receptor 1	0,003
7982094	100033818	<i>SNORD115-44</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-44	0,004
8108713	56128	<i>PCDHB8</i>	protocadherin beta 8	0,019
7965508	400061	<i>LOC400061</i>	hypothetical gene supported by NM_014886	0,001
7904408	3284	<i>HSD3B2</i>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2	0,003
8171427	2277	<i>FIGF</i>	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	0,001
7922472	646891	<i>LOC646891</i>	similar to Serologically defined colon cancer antigen 3	0,042
8026381	100129118	<i>LOC100129118</i>	similar to transmembrane protein 167A	0,002
8093053	7037	<i>TFRC</i>	transferrin receptor (p90, CD71)	0,001
7910381	574029	<i>DUSP5P</i>	dual specificity phosphatase 5 pseudogene	0,019
8119525	387535	<i>HCRP1</i>	hepatocellular carcinoma-related HCRP1	0,001
7949327	283129	<i>C11orf85</i>	chromosome 11 open reading frame 85	0,008
7982084	6638	<i>SNORD115-11</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-11	0,006
8121132	84694	<i>GJA10</i>	gap junction protein, alpha 10, 62kDa	0,007
8023910	284241	<i>FLJ25715</i>	hypothetical protein FLJ25715	0,001
8128890	442245	<i>LOC442245</i>	glutathione S-transferase mu 2 pseudogene	0,014
7911278	26696	<i>OR2T1</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 1	0,004
8049957	285097	<i>FLJ38379</i>	hypothetical FLJ38379	0,03
7976858	1735	<i>DIO3</i>	deiodinase, iodothyronine, type III	0,003
7957433	84125	<i>LRR1Q1</i>	leucine-rich repeats and IQ motif containing 1	0,001
7936798	50624	<i>CUZD1</i>	CUB and zona pellucida-like domains 1	0,019
7948127	219469	<i>OR8H1</i>	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 1	0,013
8010901	8447	<i>DOC2B</i>	double C2-like domains, beta	0,004
8090509	7879	<i>RAB7A</i>	RAB7A, member RAS oncogene family	0,022
7986536	100272148	<i>GPCRLTM7</i>	putative olfactory receptor GPCRLTM7	0,037
8103483	56884	<i>FSTL5</i>	follistatin-like 5	0,006
8133976	10926	<i>DBF4</i>	DBF4 homolog (S. cerevisiae)	0,001
7981990	692236	<i>SNORD116-21</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-21	0,004
8151730	793	<i>CALB1</i>	calbindin 1, 28kDa	0,014
7933484	474354	<i>LRRC18</i>	leucine rich repeat containing 18	0,015
8013319	10750	<i>GRAP</i>	GRB2-related adaptor protein	0,015
7932864	119180	<i>LYZL2</i>	lysozyme-like 2	0,006
8123388	54346	<i>UNC93A</i>	unc-93 homolog A (C. elegans)	0,011
8035782	91120	<i>ZNF682</i>	zinc finger protein 682	0,002
7991542	388182	<i>FLJ42289</i>	hypothetical LOC388182	0,036
8037947	284355	<i>TPRX1</i>	tetra-peptide repeat homeobox 1	0,019
8178897	1302	<i>COL11A2</i>	collagen, type XI, alpha 2	0,039
8180105	1302	<i>COL11A2</i>	collagen, type XI, alpha 2	0,039
8031213	11024	<i>LILRA1</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1	0,04
8166730	1536	<i>CYBB</i>	cytochrome b-245, beta polypeptide	0,001
8063174	100130863	<i>ZNF840P</i>	zinc finger protein 840 (pseudogene)	0,031
7937016	119467	<i>CLRN3</i>	clarin 3	0,001
8008716	55545	<i>MSX2P1</i>	msh homeobox 2 pseudogene 1	0,017
8026468	66002	<i>CYP4F12</i>	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 12	0,021
8172387	6758	<i>SSX5</i>	synovial sarcoma, X breakpoint 5	0,002
8134051	79846	<i>C7orf63</i>	chromosome 7 open reading frame 63	0,002
8091887	79740	<i>ZBBX</i>	zinc finger, B-box domain containing	0,006
7988644	79895	<i>ATP8B4</i>	ATPase, class I, type 8B, member 4	0,016
8016473	3218	<i>HOXB8</i>	homeobox B8	0,014
8173179	442454	<i>RP11-278E11.2</i>	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein pseudogene	0,008

8136654	54429	<i>TAS2R5</i>	taste receptor, type 2, member 5	0,02
8054766	49	<i>ACR</i>	acrosin	0,03
7899124	378807	<i>CATSPER4</i>	cation channel, sperm associated 4	0,011
8170644	139735	<i>ZFP92</i> <i>RP11-</i>	zinc finger protein 92 homolog (mouse)	0,015
8167690	401589	<i>114H20.1</i> <i>RP11-</i>	hypothetical LOC401589	0,018
8172719	401589	<i>114H20.1</i>	hypothetical LOC401589	0,018
8161945	158158	<i>RASEF</i>	RAS and EF-hand domain containing	0,006
8016438	3212	<i>HOXB2</i>	homeobox B2	0,017
8065410	1472	<i>CST4</i>	cystatin S	0,041
7963575	1975	<i>EIF4B</i>	eukaryotic translation initiation factor 4B	0,01
7924058	3664	<i>IRF6</i>	interferon regulatory factor 6	0,009
8133038	2551	<i>GABPA</i>	GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa	0,017
8075635	7078	<i>TIMP3</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	0,009
8143499	55503	<i>TRPV6</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6	0,015
7951589	120364	<i>LOC120364</i>	similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like	0,004
8015301	3886	<i>KRT35</i>	keratin 35	0,026
7911237	284521	<i>OR2L13</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily L, member 13	0,025
7958425	1610	<i>DAO</i>	D-amino-acid oxidase	0,019
7930533	143188	<i>LOC143188</i>	hypothetical LOC143188	0,023
8169056	203562	<i>TMEM31</i>	transmembrane protein 31	0,001
8163273	26248	<i>OR2K2</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily K, member 2	0,019
8071179	8214	<i>DGCR6</i>	DiGeorge syndrome critical region gene 6	0,04
7949410	378938	<i>MALAT1</i>	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	0,033
8124492	85236	<i>HIST1H2BK</i>	histone cluster 1, H2bk	0,014
8132347	353345	<i>GPR141</i>	G protein-coupled receptor 141	0,018
7961440	79887	<i>PLBD1</i>	phospholipase B domain containing 1	0,015
7980213	283571	<i>PROX2</i>	prospero homeobox 2	0,003
8033414	126006	<i>PCP2</i>	Purkinje cell protein 2	0,006
7960764	83758	<i>RBP5</i>	retinol binding protein 5, cellular	0,012
8045974	57282	<i>SLC4A10</i>	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10	0,002
8030871	79898	<i>ZNF613</i>	zinc finger protein 613	0,045
7971345	79024	<i>MGC5590</i>	hypothetical protein MGC5590	0,026
8144213	7434	<i>VIPR2</i>	vasoactive intestinal peptide receptor 2	0,004
7905949	648822	<i>LOC648822</i>	similar to hCG2040565	0,024
8120269	26268	<i>FBXO9</i>	F-box protein 9	0,024
7927606	5592	<i>PRKG1</i>	protein kinase, cGMP-dependent, type I	0,015
8148982	389607	<i>LOC389607</i>	hypothetical LOC389607	0,031
8073062	9582	<i>APOBEC3B</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	0,049
8092083	6514	<i>SLC2A2</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2	0,022
7961142	4973	<i>OLR1</i>	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	0,021
7996241	79918	<i>SETD6</i>	SET domain containing 6	0,004
8124547	81697	<i>OR2B2</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 2	0,005
8076734	100289775	<i>WNT7B</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 7B	0,028
8167721	280659	<i>SSX8</i>	synovial sarcoma, X breakpoint 8	0,048
8042978	130120	<i>REG3G</i>	regenerating islet-derived 3 gamma serpin peptidase inhibitor, clade A (a-1 antiproteinase, antitrypsin), member 13 (pseudogene)	0,015
7976506	388007	<i>SERPINA13</i>		0,006
7952065	84796	<i>MGC13053</i>	hypothetical MGC13053	0,015
8001329	869	<i>CBLN1</i>	cerebellin 1 precursor	0,024
8069511	391267	<i>C21orf81</i>	ankyrin repeat domain 20 family, member A3 pseudogene	0,017
8067157	140689	<i>CBLN4</i>	cerebellin 4 precursor	0,001
8126436	5961	<i>PRPH2</i>	peripherin 2 (retinal degeneration, slow)	0,015
8160321	25769	<i>SLC24A2</i>	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2	0,044
7952373	390260	<i>OR6X1</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily X, member 1	0,008
7921356	391107	<i>OR10K2</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily K, member 2	0,015
7988410	645263	<i>hCG_1793639</i>	hCG1793639	0,027
8063209	100131496	<i>LOC100131496</i>	hypothetical LOC100131496	0,036
7909624	149647	<i>FAM71A</i>	family with sequence similarity 71, member A	0,002
7965245	400058	<i>MKRNP6</i>	makorin ring finger protein pseudogene 6	0,004
8159211	2220	<i>FCN2</i>	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing lectin) 2 (hucolin)	0,018



8084035	51193	<i>ZNF639</i>	zinc finger protein 639	0,029
8166059	51284	<i>TLR7</i>	toll-like receptor 7	0,004
8163341	652972	<i>C9orf29</i>	chromosome 9 open reading frame 29	0,028
8165658	7434	<i>VIPR2</i>	vasoactive intestinal peptide receptor 2	0,015
7991283	51458	<i>RHCG</i>	Rh family, C glycoprotein	0,003
8116247	6940	<i>ZNF354A</i>	zinc finger protein 354A	0,004
8103904	391722	<i>LOC391722</i>	similar to myosin regulatory light chain MRCL2	0,005
8127180	54511	<i>HMGCLL1</i>	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase-like 1	0,019
7915896	163720	<i>CYP4Z2P</i>	cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 2 pseudogene	0,01
8109981	8817	<i>FGF18</i>	fibroblast growth factor 18	0,044
8113658	100132014	<i>LVRN</i>	laeverin	0,021
7917904	100293439	<i>LOC100293439</i>	similar to NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	0,038
8162777	9568	<i>GABBR2</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	0,045
8068006	54143	<i>C21orf74</i>	chromosome 21 open reading frame 74	0,017
8124527	3009	<i>HIST1H1B</i>	histone cluster 1, H1b	0,002
7937944	119772	<i>OR52M1</i>	olfactory receptor, family 52, subfamily M, member 1	0,011
8069146	386675	<i>KRTAP10-7</i>	keratin associated protein 10-7	0,03
7940189	390199	<i>OR4D9</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 9	0,008
8148671	286076	<i>BREA2</i>	breast cancer estrogen-induced apoptosis 2	0,021
7924712	286826	<i>LIN9</i>	lin-9 homolog (C. elegans)	0,018
8140367	6369	<i>CCL24</i>	chemokine (C-C motif) ligand 24	0,016
8026587	284434	<i>NWD1</i>	NACHT and WD repeat domain containing 1	0,024
7946853	3767	<i>KCNJ11</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	0,005
8117426	8345	<i>HIST1H2BH</i>	histone cluster 1, H2bh	0,006
8040522	388931	<i>MFSD2B</i>	major facilitator superfamily domain-containing protein 2b	0,013
7947093	259249	<i>MRGPRX1</i>	MAS-related GPR, member X1	0,045
8169792	4068	<i>SH2D1A</i>	SH2 domain protein 1A	0,009
7975113	2342	<i>CHURC1</i>	churchill domain containing 1	0,012
7985248	23251	<i>KIAA1024</i>	KIAA1024	0,016
8056995	150737	<i>TTC30B</i>	tetratricopeptide repeat domain 30B	0,043
8118794	3159	<i>HMGA1</i>	high mobility group AT-hook 1	0,014
8108706	54661	<i>PCDHB17</i>	protocadherin beta 17 pseudogene	0,015
8036055	163175	<i>LG14</i>	leucine-rich repeat LGI family, member 4	0,014
8028924	8190	<i>MIA</i>	melanoma inhibitory activity	0,006
7897280	390992	<i>HES3</i>	hairly and enhancer of split 3 (Drosophila)	0,01
7957510	338809	<i>C12orf74</i>	chromosome 12 open reading frame 74	0,016
7991772	3049	<i>HBQ1</i>	hemoglobin, theta 1	0,023
8175288	56180	<i>MOSPD1</i>	motile sperm domain containing 1	0,01
7916785	10022	<i>INSL5</i>	insulin-like 5	0,007
7899753	3932	<i>LCK</i>	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	0,013
7946107	79473	<i>OR52N1</i>	olfactory receptor, family 52, subfamily N, member 1	0,001
7922414	60674	<i>SNORD76</i>	small nucleolar RNA, C/D box 76	0,022
7997491	3294	<i>HSD17B2</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	0,021
7927173	220992	<i>ZNF485</i>	zinc finger protein 485	0,004
7956648	91419	<i>XRCC6BP1</i>	XRCC6 binding protein 1	0,003
8031344	3803	<i>KIR2DL2</i>	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 2	0,004
7927827	84665	<i>MYPN</i>	myopalladin	0,034
8029301	284346	<i>ZNF575</i>	zinc finger protein 575	0,048
7988672	3067	<i>HDC</i>	histidine decarboxylase	0,004
8071997	1415	<i>CRYBB2</i>	crystallin, beta B2	0,008
7920337	65123	<i>INTS3</i>	integrator complex subunit 3	0,012
7966749	54997	<i>TESC</i>	tescalcin	0,038
8024728	27231	<i>ITGB1BP3</i>	integrin beta 1 binding protein 3	0,014
7933933	56521	<i>DNAJC12</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	0,009
8123819	9521	<i>EEF1E1</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1	0,032
8161478	387628	<i>KGFLP2</i>	keratinocyte growth factor-like protein 2	0,005
8144121	5799	<i>PTPRN2</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	0,039
8004309	6517	<i>SLC2A4</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	0,026
7926117	389936	<i>LOC389936</i>	similar to proline-rich proteoglycan 2	0,012
8029988	64100	<i>ELSPBP1</i>	epididymal sperm binding protein 1	0,015
8054834	165257	<i>C1QL2</i>	complement component 1, q subcomponent-like 2	0,006



7964142	319	<i>APOF</i>	apolipoprotein F	0,035
8005739	284123	<i>FAM27L</i>	family with sequence similarity 27-like	0,027
8032375	255193	<i>C19orf34</i>	chromosome 19 open reading frame 34	0,008
8057480	4760	<i>NEUROD1</i>	neurogenic differentiation 1	0,009
8147123	761	<i>CA3</i>	carbonic anhydrase III, muscle specific	0,007
8004545	482	<i>ATP1B2</i>	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 2 polypeptide	0,026
8108182	347732	<i>CATSPER3</i>	cation channel, sperm associated 3	0,006
7970597	400110	<i>FLJ46358</i>	FLJ46358 protein	0,04
8027272	7639	<i>ZNF85</i>	zinc finger protein 85	0,05
8091656	196074	<i>METT5D1</i>	methyltransferase 5 domain containing 1	0,024
8125980	389384	<i>C6orf222</i>	chromosome 6 open reading frame 222	0,036
8173493	2833	<i>CXCR3</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	0,021
8109157	728264	<i>LOC728264</i>	hypothetical LOC728264	0,021
7968892	387923	<i>SERP2</i>	stress-associated endoplasmic reticulum protein family member 2	0,028
8030974	646508	<i>LOC646508</i>	hypothetical LOC646508	0,04
8091715	56925	<i>LXN</i>	latexin	0,005
7927169	642819	<i>ZNF487</i>	zinc finger protein 487	0,049
8113278	167410	<i>LIX1</i>	Lix1 homolog (chicken)	0,031
8147566	3788	<i>KCNS2</i>	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 2	0,008
7911276	254879	<i>OR2T6</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 6	0,041
7921420	81448	<i>OR6K2</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily K, member 2	0,026
7969830	7546	<i>ZIC2</i>	Zic family member 2 (odd-paired homolog, Drosophila)	0,013
8009343	786	<i>CACNG1</i>	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 1	0,045
8030733	2854	<i>GPR32</i>	G protein-coupled receptor 32	0,039
8030964	388560	<i>FLJ45949</i>	FLJ45949 protein	0,019
7938078	160298	<i>C11orf42</i>	chromosome 11 open reading frame 42	0,006
8171917	53940	<i>FTHL17</i>	ferritin, heavy polypeptide-like 17	0,032
7985030	100128285	<i>DNM1P35</i>	DNM1 pseudogene 35	0,033
7988350	50506	<i>DUOX2</i>	dual oxidase 2	0,049
8149685	203190	<i>LG13</i>	leucine-rich repeat LGI family, member 3	0,044
8091037	389151	<i>PRR23A</i>	proline rich 23A	0,008
7946041	3043	<i>HBD</i>	hemoglobin, delta	0,014
8171879	389842	<i>LOC389842</i>	similar to RAN binding protein 1	0,028
7913850	646471	<i>FAM54B</i>	family with sequence similarity 54, member B	0,039
7949882	222	<i>ALDH3B2</i>	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	0,021
8032972	257000	<i>PLAC2</i>	placenta-specific 2 (non-protein coding)	0,034
8168470	1349	<i>COX7B</i>	cytochrome c oxidase subunit VIIb	0,022
7918533	140	<i>ADORA3</i>	adenosine A3 receptor	0,046
7963410	3853	<i>KRT6C</i>	keratin 6C	0,022
8101174	339965	<i>CCDC158</i>	coiled-coil domain containing 158	0,014
8117389	8344	<i>HIST1H2BE</i>	histone cluster 1, H2be	0,042
7998538	390667	<i>C16orf38</i>	chromosome 16 open reading frame 38	0,008
8078619	3680	<i>ITGA9</i>	integrin, alpha 9	0,026
8104492	83853	<i>ROPN1L</i>	ropporin 1-like	0,012
7935296	7093	<i>TLL2</i>	tolloid-like 2	0,023
8110618	10776	<i>ARPP19</i>	cAMP-regulated phosphoprotein, 19kDa	0,035
7981157	79686	<i>C14orf139</i>	chromosome 14 open reading frame 139	0,031
8175311	54967	<i>CXorf48</i>	chromosome X open reading frame 48	0,02

Tabla 2: Genes inhibidos por análogos de carga AC en células KGN

AffyID	EntrezID	Gen	Descripción	p
7999588	8399	<i>PLA2G10</i>	phospholipase A2, group X	0,008
8067836	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,013
8022436	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,001
7922351	646870	<i>LOC646870</i>	hypothetical protein LOC646870	0,014
7991598	6627	<i>SNRPA1</i>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	0,019
7982006	100033821	<i>SNORD116-29</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-29	0,019
7943240	143689	<i>PIWIL4</i>	piwi-like 4 (Drosophila)	0,002
8021756	55628	<i>ZNF407</i>	zinc finger protein 407	0,009
8160274	158295	<i>MGC24103</i>	hypothetical MGC24103	0,046
8130578	677806	<i>SNORA20</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 20	0,003
8075310	91370	<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	0,012
7901052	94163	<i>SNORD38B</i>	small nucleolar RNA, C/D box 38B	0,007
7961249	50839	<i>TAS2R10</i>	taste receptor, type 2, member 10	0,002
8001918	6236	<i>RRAD</i>	Ras-related associated with diabetes	0,002
7976810	767563	<i>SNORD113-3</i>	small nucleolar RNA, C/D box 113-3	0
8037231	5671	<i>PSG3</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3	0,045
7904429	128102	<i>HSD3B1</i>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	0,023
8086607	4057	<i>LTF</i>	lactotransferrin	0,001
7993339	100129038	<i>LOC100129038</i>	PRO2812	0,001
7930413	1847	<i>DUSP5</i>	dual specificity phosphatase 5	0,009
8091385	1356	<i>CP</i>	ceruloplasmin (ferroxidase)	0,002
8171105	64109	<i>CRLF2</i>	cytokine receptor-like factor 2	0,02
7952810	22997	<i>IGSF9B</i>	immunoglobulin superfamily, member 9B	0,024
8013131	140771	<i>SMCR5</i>	Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 5 (non-protein coding)	0,008
8069859	337977	<i>KRTAP21-1</i>	keratin associated protein 21-1	0,012
7948894	6066	<i>RNU2-1</i>	RNA, U2 small nuclear 1	0,01
7980742	283588	<i>LOC283588</i>	hypothetical LOC283588	0,048
8175442	158696	<i>LOC158696</i>	hypothetical LOC158696	0,002
7912552	343069	<i>HNRNPCL1</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	0,007
7939969	390152	<i>OR8H3</i>	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 3	0,031
8028652	7538	<i>ZFP36</i>	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	0,03
8031566	100132178	<i>LOC100132178</i>	similar to hCG2008275	0,032
8116086	79930	<i>DOK3</i>	docking protein 3	0,023
7976148	29018	<i>PRO1768</i>	PRO1768	0,008
7916566	1600	<i>DAB1</i>	disabled homolog 1 (Drosophila)	0,004
8038505	114132	<i>SIGLEC11</i>	sialic acid binding Ig-like lectin 11	0,01
8178435	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0
8135224	58160	<i>NF-E4</i>	transcription factor NF-E4	0,003
8077441	8553	<i>BHLHE40</i>	basic helix-loop-helix family, member e40	0,011
8055139	151121	<i>LOC151121</i>	hypothetical LOC151121	0,021
7900146	80149	<i>ZC3H12A</i>	zinc finger CCCH-type containing 12A	0,03
8038326	28968	<i>SLC6A16</i>	solute carrier family 6, member 16	0,003
8034334	7568	<i>ZNF20</i>	zinc finger protein 20	0,008
8150099	619373	<i>MBOAT4</i>	membrane bound O-acyltransferase domain containing 4	0,003
7977270	388022	<i>LOC388022</i>	hypothetical gene supported by AK131040	0,009
7964665	283417	<i>DPY19L2</i>	dpy-19-like 2 (C. elegans)	0,006
8156601	375748	<i>C9orf102</i>	chromosome 9 open reading frame 102	0,013
8106411	170591	<i>S100Z</i>	S100 calcium binding protein Z	0,003
8047784	57683	<i>ZDBF2</i>	zinc finger, DBF-type containing 2	0,008
8150698	6591	<i>SNAI2</i>	snail homolog 2 (Drosophila)	0,033
8162639	158431	<i>ZNF782</i>	zinc finger protein 782	0,013
8117614	8348	<i>HIST1H2BO</i>	histone cluster 1, H2bo	0,008
7912582	400735	<i>PRAMEF5</i>	PRAME family member 5	0,002
7964548	4234	<i>METTL1</i>	methyltransferase like 1	0,002
7982062	100036565	<i>HBII-52-28</i>	HBII-52-28 snoRNA	0,049
8030813	284369	<i>C19orf75</i>	chromosome 19 open reading frame 75	0,008
8146527	387335	<i>T1560</i>	T1560 protein	0,005
7990636	81698	<i>C15orf5</i>	chromosome 15 open reading frame 5	0,009
7939940	390142	<i>OR5D13</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily D, member 13	0,025

8153819	50626	<i>CYHR1</i>	cysteine/histidine-rich 1	0,002
7967636	114130	<i>MGC16384</i>	hypothetical LOC114130	0,025
8096027	118425	<i>GDEP</i>	gene differentially expressed in prostate	0,006
8156573	84909	<i>C9orf3</i>	chromosome 9 open reading frame 3	0,04
8139935	441250	<i>TYW1B</i>	tRNA-yW synthesizing protein 1 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,011
8079740	474171	<i>STGC3</i>	hypothetical STGC3	0,029
7939973	390154	<i>OR5T3</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily T, member 3	0,031
8148304	10221	<i>TRIB1</i>	tribbles homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	0,021
8154953	23349	<i>KIAA1045</i>	KIAA1045	0,015
8144656	606553	<i>C8orf49</i>	chromosome 8 open reading frame 49	0,037
8068052	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,004
8027876	10430	<i>TMEM147</i>	transmembrane protein 147	0,038
8036908	29946	<i>SERTAD3</i>	SERTA domain containing 3	0,02
8004905	124739	<i>USP43</i>	ubiquitin specific peptidase 43	0,009
8124897	100130889	<i>PSORS1C3</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (non-protein coding)	0,012
8179727	100130889	<i>PSORS1C3</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (non-protein coding)	0,012
8030366	23521	<i>SNORD35A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 35A	0,008
8103094	4306	<i>NR3C2</i>	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	0,001
8035318	23025	<i>UNC13A</i>	unc-13 homolog A ( <i>C. elegans</i> )	0,002
8089596	55779	<i>WDR52</i>	WD repeat domain 52	0,039
8101031	8999	<i>CDKL2</i>	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)	0,048
7957023	4069	<i>LYZ</i>	lysozyme (renal amyloidosis)	0,036
7917612	164045	<i>HFM1</i>	HFM1, ATP-dependent DNA helicase homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,015
7912211	155184	<i>SLC2A7</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 7	0,01
8047403	843	<i>CASP10</i>	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	0,007
8030999	55422	<i>ZNF331</i>	zinc finger protein 331	0,047
8124848	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,003
8179704	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,003
8161371	100292301	<i>LOC100292301</i>	similar to hCG1993567	0,005
7977592	100131227	<i>GAFA1</i>	FGF2-associated protein GAFA1	0,024
7977452	642477	<i>FLJ39632</i>	hypothetical LOC642477	0,029
8114468	26785	<i>SNORD63</i>	small nucleolar RNA, C/D box 63	0,032
8126066	23787	<i>MTCH1</i>	mitochondrial carrier homolog 1 ( <i>C. elegans</i> )	0,002
8151592	759	<i>CA1</i>	carbonic anhydrase I	0,049
8030969	390963	<i>ZNF818P</i>	zinc finger protein 818 pseudogene	0,005
8145361	4741	<i>NEFM</i>	neurofilament, medium polypeptide	0,009
8083569	25976	<i>TIPARP</i>	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	0,045
7950235	10809	<i>STARD10</i>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10	0,005
7912349	148345	<i>C1orf127</i>	chromosome 1 open reading frame 127	0,028
8082643	79858	<i>NEK11</i>	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 11	0,019
8116532	619570	<i>SNORD95</i>	small nucleolar RNA, C/D box 95	0,002
7938072	196335	<i>OR56B4</i>	olfactory receptor, family 56, subfamily B, member 4	0,042
8030128	23645	<i>PPP1R15A</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	0,013
7957835	9971	<i>NR1H4</i>	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	0,003
8114896	134391	<i>GPR151</i>	G protein-coupled receptor 151	0,021
7908841	4660	<i>PPP1R12B</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	0,003
7966150	54434	<i>SSH1</i>	slingshot homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	0,009
8122843	2099	<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1	0,05
8056983	100130691	<i>hCG_1817306</i>	hypothetical LOC100130691	0,038
8138381	10551	<i>AGR2</i>	anterior gradient homolog 2 ( <i>Xenopus laevis</i> )	0,028
7910190	339500	<i>ZNF678</i>	zinc finger protein 678	0,031
8144044	346547	<i>FLJ42291</i>	hypothetical LOC346547	0,002
7985016	257364	<i>SNX33</i>	sorting nexin 33	0,013
8122756	57480	<i>PLEKHG1</i>	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1	0,021
7956826	23329	<i>TBC1D30</i>	TBC1 domain family, member 30	0,035
8173148	90736	<i>FAM104B</i>	family with sequence similarity 104, member B	0,01
8074237	51816	<i>CECR1</i>	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1	0,03
7933204	11067	<i>C10orf10</i>	chromosome 10 open reading frame 10	0,019
8101501	100131077	<i>OK/SW-CL.36</i>	OK/SW-CL.36	0,024
7939007	338645	<i>LUZP2</i>	leucine zipper protein 2	0,004
8166571	158809	<i>MAGEB6</i>	melanoma antigen family B, 6	0,028
7907286	2326	<i>FMO1</i>	flavin containing monooxygenase 1	0,006
8141127	401388	<i>FLJ42280</i>	hypothetical LOC401388	0,002
8157681	26737	<i>OR1L1</i>	olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 1	0,006
8052524	100124537	<i>SNORA70B</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 70B (retrotransposed)	0,026

8074168	642477	<i>FLJ39632</i>	hypothetical LOC642477	0,016
7970737	2322	<i>FLT3</i>	fms-related tyrosine kinase 3	0,005
7977933	23428	<i>SLC7A8</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	0,004
7919139	375010	<i>LOC375010</i>	ankyrin repeat domain 20 family, member A pseudogene	0,014
8005785	8844	<i>KSR1</i>	kinase suppressor of ras 1	0,013
7905801	126668	<i>TDRD10</i>	tudor domain containing 10	0,003
7898375	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,037
7898411	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,037
7912800	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,037
7912850	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,037
7919576	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,037
8036373	199704	<i>ZNF585A</i>	zinc finger protein 585A	0,027
7937938	119774	<i>OR52K2</i>	olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 2	0,01
7961540	85004	<i>RERG</i>	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	0,01
8040802	3795	<i>KHK</i>	ketoheksokinase (fructokinase)	0,012
8081826	7348	<i>UPK1B</i>	uroplakin 1B	0,026
8137334	11194	<i>ABCB8</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8	0,004
7972902	113622	<i>ADPRHL1</i>	ADP-ribosylhydrolase like 1	0,048
8100202	280665	<i>CNGA1</i>	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	0,018
7921014	4209	<i>MEF2D</i>	myocyte enhancer factor 2D	0,006
8058591	33	<i>ACADL</i>	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain	0,048
7953469	2784	<i>GNB3</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3	0,022
8044149	5340	<i>PLGLA</i>	plasminogen-like A	0,022
8089402	9626	<i>GUCA1C</i>	guanylate cyclase activator 1C	0,019
7952249	9099	<i>USP2</i>	ubiquitin specific peptidase 2	0,003
8105585	285671	<i>RNF180</i>	ring finger protein 180	0,02
8005877	6201	<i>RPS7</i>	ribosomal protein S7	0,015
7900857	6487	<i>ST3GAL3</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	0,004
7913768	58985	<i>IL22RA1</i>	interleukin 22 receptor, alpha 1	0,027
8063590	5105	<i>PCK1</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	0,009
8164896	6834	<i>SURF1</i>	surfeit 1	0,012
7902687	3491	<i>CYR61</i>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	0,03
7913249	65018	<i>PINK1</i>	PTEN induced putative kinase 1	0,022
7943715	85463	<i>ZC3H12C</i>	zinc finger CCCH-type containing 12C	0,041
8072355	284904	<i>SEC14L4</i>	SEC14-like 4 (S. cerevisiae)	0,025
8002547	7571	<i>ZNF19</i>	zinc finger protein 19	0,004
8029423	353355	<i>ZNF233</i>	zinc finger protein 233	0,004
7958677	144715	<i>RAD9B</i>	RAD9 homolog B (S. pombe)	0,034
7946933	26297	<i>SERGEF</i>	secretion regulating guanine nucleotide exchange factor	0,004
8165752	3563	<i>IL3RA</i>	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	0,007
8176323	3563	<i>IL3RA</i>	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	0,007
8023220	4092	<i>SMAD7</i>	SMAD family member 7	0,023
8036341	92283	<i>ZNF461</i>	zinc finger protein 461	0,027
8144315	9639	<i>ARHGEF10</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	0,049
8164215	26783	<i>SNORA65</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 65	0,015
8132725	7378	<i>UPP1</i>	uridine phosphorylase 1	0,005
7901054	1263	<i>PLK3</i>	polo-like kinase 3 (Drosophila)	0,022
7919269	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,035
7919349	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,035
8036902	29950	<i>SERTAD1</i>	SERTA domain containing 1	0,023
8065541	149934	<i>C20orf191</i>	nuclear receptor co-repressor 1 pseudogene	0,023
8076355	5372	<i>PMM1</i>	phosphomannomutase 1	0,005
7948344	10249	<i>GLYAT</i>	glycine-N-acyltransferase	0,046
7952309	414899	<i>BLID</i>	BH3-like motif containing, cell death inducer	0,045
8117343	3077	<i>HFE</i>	hemochromatosis	0,012
8179814	80740	<i>LY6G6C</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C	0,033
7921652	6504	<i>SLAMF1</i>	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	0,009
7951521	160140	<i>C11orf65</i>	chromosome 11 open reading frame 65	0,01
8024444	100129831	<i>UNQ6493</i>	EPWW6493	0,015
7961295	259289	<i>TAS2R43</i>	taste receptor, type 2, member 43	0,012

Tabla 3: Genes estimulados por análogos de carga BA en células KGN

AffyID	EntrezID	Gen	Descripción	p
8027354	388524	<i>RPSAP58</i>	ribosomal protein SA pseudogene 58	0,003
8086538	644714	<i>LOC644714</i>	hypothetical protein LOC644714	0,049
7992865	26184	<i>OR1F2P</i>	olfactory receptor, family 1, subfamily F, member 2	0,004
8093053	7037	<i>TFRC</i>	transferrin receptor (p90, CD71)	0
8117696	1353	<i>COX11</i>	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	0,003
8030871	79898	<i>ZNF613</i>	zinc finger protein 613	0,003
8163273	26248	<i>OR2K2</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily K, member 2	0,001
7983638	56986	<i>DTWD1</i>	DTW domain containing 1	0,004
7967030	26836	<i>RNU4-1</i>	RNA, U4 small nuclear 1	0,028
7988767	1588	<i>CYP19A1</i>	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	0,015
7910381	574029	<i>DUSP5P</i>	dual specificity phosphatase 5 pseudogene	0
8074364	23617	<i>DGCR14</i>	DiGeorge syndrome critical region gene 14	0,001
8150217	728024	<i>hCG_1640171</i>	hCG1640171	0,009
8026381	100129118	<i>LOC100129118</i>	similar to transmembrane protein 167A	0,003
8139163	340286	<i>FAM183B</i>	acyloxyacyl hydrolase (neutrophil)	0,045
8120269	26268	<i>FBXO9</i>	F-box protein 9	0,004
7965508	400061	<i>LOC400061</i>	hypothetical gene supported by NM_014886	0,003
7949410	378938	<i>MALAT1</i>	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	0,009
8133976	10926	<i>DBF4</i>	DBF4 homolog (S. cerevisiae)	0,001
7948910	23642	<i>SNORD25</i>	small nucleolar RNA, C/D box 25	0,049
8031213	11024	<i>LILRA1</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1	0,024
8174448	2986	<i>GUCY2F</i>	guanylate cyclase 2F, retinal	0,024
8063174	100130863	<i>ZNF840P</i>	zinc finger protein 840 (pseudogene)	0,019
7924058	3664	<i>IRF6</i>	interferon regulatory factor 6	0,003
8006602	6351	<i>CCL4</i>	chemokine (C-C motif) ligand 4	0,049
8055194	112714	<i>TUBA3E</i>	tubulin, alpha 3e	0,006
8091656	196074	<i>METT5D1</i>	methyltransferase 5 domain containing 1	0,002
8123744	2162	<i>F13A1</i>	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	0,024
8121031	10559	<i>SLC35A1</i>	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1	0,002
8070097	54943	<i>DNAJC28</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 28	0,002
8175288	56180	<i>MOSPD1</i>	motile sperm domain containing 1	0,001
7965245	400058	<i>MKRNP6</i>	makorin ring finger protein pseudogene 6	0,001
7930170	57412	<i>C10orf32</i>	chromosome 10 open reading frame 32	0,004
7905500	353141	<i>LCE2D</i>	late cornified envelope 2D	0,027
8030978	91664	<i>ZNF845</i>	zinc finger protein 845	0,026
7912280	645010	<i>FLJ16126</i>	hypothetical LOC645010	0,019
8027260	81931	<i>ZNF486</i>	zinc finger protein 486	0,019
7964142	319	<i>APOF</i>	apolipoprotein F	0,007
8133106	677807	<i>SNORA22</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 22	0,013
7907970	730144	<i>LOC730144</i>	similar to eukaryotic translation initiation factor 1	0,009
8103483	56884	<i>FSTL5</i>	folliculin-like 5	0,009
7902541	10964	<i>IFI44L</i>	interferon-induced protein 44-like	0,001
7979260	2764	<i>GMFB</i>	glia maturation factor, beta	0,003
7897801	26829	<i>RNU5E</i>	RNA, U5E small nuclear	0,022
7963575	1975	<i>EIF4B</i>	eukaryotic translation initiation factor 4B	0,007
8075550	25775	<i>C22orf24</i>	chromosome 22 open reading frame 24	0,016
8128977	51175	<i>TUBE1</i>	tubulin, epsilon 1	0,015
8155265	647013	<i>LOC647013</i>	similar to potassium channel tetramerisation domain containing 9	0,002
7927062	7581	<i>ZNF33A</i>	zinc finger protein 33A	0,039
7983828	374618	<i>TEX9</i>	testis expressed 9	0,015
8155794	138241	<i>C9orf85</i>	chromosome 9 open reading frame 85	0,014
8030964	388560	<i>FLJ45949</i>	FLJ45949 protein	0,004
8117288	10590	<i>SCGN</i>	secretagogin, EF-hand calcium binding protein	0,002
8151730	793	<i>CALB1</i>	calbindin 1, 28kDa	0,024
7940002	219527	<i>LRRC55</i>	leucine rich repeat containing 55	0,007
7930299	119392	<i>C10orf78</i>	chromosome 10 open reading frame 78	0,005
8095500	58503	<i>PROL1</i>	proline rich, lacrimal 1	0,046
8116245	57396	<i>CLK4</i>	CDC-like kinase 4	0,024
8107194	90355	<i>C5orf30</i>	chromosome 5 open reading frame 30	0,007



8021297	284254	<i>C18orf26</i>	chromosome 18 open reading frame 26	0,04
8081335	100287852	<i>LOC100287852</i>	similar to CG5323	0,011
7923907	3586	<i>IL10</i>	interleukin 10	0,006
7978776	55320	<i>C14orf106</i>	chromosome 14 open reading frame 106	0,02
8163714	389787	<i>LOC389787</i>	similar to tumor protein, translationally-controlled 1	0,007
7927173	220992	<i>ZNF485</i>	zinc finger protein 485	0,001
8168345	93953	<i>ACRC</i>	acidic repeat containing	0,048
7961844	55259	<i>CASC1</i>	cancer susceptibility candidate 1	0,009
7922598	9068	<i>ANGPTL1</i>	angiopoietin-like 1	0,003
8128890	442245	<i>LOC442245</i>	glutathione S-transferase mu 2 pseudogene	0,043
8046792	142679	<i>DUSP19</i>	dual specificity phosphatase 19	0,049
7937944	119772	<i>OR52M1</i>	olfactory receptor, family 52, subfamily M, member 1	0,007
7947245	3324	<i>HSP90AA2</i>	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2	0,041
8121132	84694	<i>GJA10</i>	gap junction protein, alpha 10, 62kDa	0,032
8124423	8339	<i>HIST1H2BG</i>	histone cluster 1, H2bg	0,003
7938213	143425	<i>SYT9</i>	synaptotagmin IX	0,007
8116874	221711	<i>SYCP2L</i>	synaptonemal complex protein 2-like	0,002
8050113	100129581	<i>LOC100129581</i>	hypothetical LOC100129581	0,011
8014257	342615	<i>SLFN12L</i>	schlafen family member 12-like	0,037
8146633	643763	<i>LOC643763</i>	hypothetical LOC643763	0,014
8098150	55319	<i>C4orf43</i>	chromosome 4 open reading frame 43	0,007
8118242	58530	<i>LY6G6D</i>	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D	0,027
8096296	3327	<i>HSP90AB3P</i>	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 3 (pseudogene)	0,011
8175209	51270	<i>TFDP3</i>	transcription factor Dp family, member 3	0,015
8119595	285855	<i>RPL7L1</i>	ribosomal protein L7-like 1	0,049
8039075	317703	<i>VN1R4</i>	vomeroneasal 1 receptor 4	0,006
7909624	149647	<i>FAM71A</i>	family with sequence similarity 71, member A	0,001
8109819	345630	<i>FBLL1</i>	fibrillarin-like 1	0,004
8054995	2071	<i>ERCC3</i>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3	0,005
8030823	402665	<i>IGLON5</i>	IgLON family member 5	0,029
8169056	203562	<i>TMEM31</i>	transmembrane protein 31	0,002
7975113	2342	<i>CHURC1</i>	churchill domain containing 1	0,008
8097529	255520	<i>ELMOD2</i>	ELMO/CED-12 domain containing 2	0,03
7965956	4801	<i>NFYB</i>	nuclear transcription factor Y, beta	0,003
8084035	51193	<i>ZNF639</i>	zinc finger protein 639	0,027
8002667	83449	<i>PMFBP1</i>	polyamine modulated factor 1 binding protein 1	0,049
8154841	28552	<i>TRBV23OR9-2</i>	T cell receptor beta variable 23/OR9-2 (non-functional)	0,03
7986291	400454	<i>UNQ9370</i>	IFMQ9370	0,016
7961654	5965	<i>RECQL</i>	RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)	0,025
7960764	83758	<i>RBP5</i>	retinol binding protein 5, cellular	0,017
8056201	5937	<i>RBMS1</i>	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	0,015
8059712	25826	<i>SNORD82</i>	small nucleolar RNA, C/D box 82	0,002
8092321	54165	<i>DCUN1D1</i>	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,022
7974146	55015	<i>PRPF39</i>	PRP39 pre-mRNA processing factor 39 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,02
7916785	10022	<i>INSL5</i>	insulin-like 5	0,006
7955551	341405	<i>ANKRD33</i>	ankyrin repeat domain 33	0,014
7988644	79895	<i>ATP8B4</i>	ATPase, class I, type 8B, member 4	0,038
7943019	399940	<i>SPRYD5</i>	SPRY domain containing 5	0,023
7950977	399940	<i>SPRYD5</i>	SPRY domain containing 5	0,023
7961422	2904	<i>GRIN2B</i>	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B	0,007
7988410	645263	<i>hCG_1793639</i>	hCG1793639	0,032
8110666	84851	<i>TRIM52</i>	tripartite motif-containing 52 leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	0,023
8039196	100291689	<i>LILRB3</i>		0,023
8030974	646508	<i>LOC646508</i>	hypothetical LOC646508	0,024
8091715	56925	<i>LXN</i>	latexin	0,002
8096528	5161	<i>PDHA2</i>	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2	0,013
7977771	26534	<i>OR10G2</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily G, member 2	0,04
8100478	132949	<i>AASDH</i>	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase	0,016
8112198	345651	<i>ACTBL2</i>	actin, beta-like 2	0,026
7947093	259249	<i>MARGPRX1</i>	MAS-related GPR, member X1	0,044
7961757	6489	<i>ST8SIA1</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	0,032
7991469	283777	<i>FAM169B</i>	family with sequence similarity 169, member B	0,038
7942603	80168	<i>MOGAT2</i>	monoacylglycerol O-acyltransferase 2	0,005
7961440	79887	<i>PLBD1</i>	phospholipase B domain containing 1	0,029

7901867	7398	<i>USP1</i>	ubiquitin specific peptidase 1	0,01
8017133	348235	<i>SKA2</i>	spindle and kinetochore associated complex subunit 2	0,005
7980213	283571	<i>PROX2</i>	prospero homeobox 2	0,006
7940189	390199	<i>OR4D9</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 9	0,01
7981976	100033426	<i>SNORD116-14</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-14	0,007
7904408	3284	<i>HSD3B2</i>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2	0,007
8055672	27249	<i>MMADHC</i>	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblD type, with homocystinuria	0,006
7982094	100033818	<i>SNORD115-44</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-44	0,016
8169083	644353	<i>ZCCHC18</i>	zinc finger, CCHC domain containing 18	0,012
8135497	11179	<i>ZNF277</i>	zinc finger protein 277	0,029
8047217	80219	<i>COQ10B</i>	coenzyme Q10 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,005
7922414	60674	<i>SNORD76</i>	small nucleolar RNA, C/D box 76	0,022
8069499	374860	<i>ANKRD30B</i>	ankyrin repeat domain 30B	0,008
8172708	55190	<i>NUDT11</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 11	0,005
8123388	54346	<i>UNC93A</i>	unc-93 homolog A ( <i>C. elegans</i> )	0,047
8119237	100132005	<i>LOC100132005</i>	hypothetical LOC100132005	0,012
7985089	5955	<i>RCN2</i>	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	0,002
8035782	91120	<i>ZNF682</i>	zinc finger protein 682	0,012
8124547	81697	<i>OR2B2</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 2	0,011
8051993	5281	<i>PIGF</i>	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F	0,008
7981990	692236	<i>SNORD116-21</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-21	0,026
8046099	115677	<i>NOSTRIN</i>	nitric oxide synthase trafficker	0,003
7951589	120364	<i>LOC120364</i>	similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like	0,012
8091867	590	<i>BCHE</i>	butyrylcholinesterase	0,01
7939902	646813	<i>LOC646813</i>	hypothetical LOC646813	0,011
8108706	54661	<i>PCDHB17</i>	protocadherin beta 17 pseudogene	0,02
8037246	5675	<i>PSG6</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6	0,018
8133038	2551	<i>GABPA</i>	GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa	0,043
8113403	54826	<i>GIN1</i>	gypsy retrotransposon integrase 1	0,016
8150149	642513	<i>LOC642513</i>	similar to Potassium channel tetramerisation domain containing 9	0,05
8147019	51101	<i>FAM164A</i>	family with sequence similarity 164, member A	0,033
8112331	81689	<i>ISCA1</i>	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,029
7988605	9318	<i>COPS2</i>	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 2 ( <i>Arabidopsis</i> )	0,008
7910550	7257	<i>TSNAX</i>	translin-associated factor X	0,009
8121757	3298	<i>HSF2</i>	heat shock transcription factor 2	0,045
8088718	9039	<i>UBA3</i>	ubiquitin-like modifier activating enzyme 3	0,004
8122818	79624	<i>C6orf211</i>	chromosome 6 open reading frame 211	0,009
8171427	2277	<i>IGF</i>	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	0,046
7901336	55437	<i>STRADB</i>	STE20-related kinase adaptor beta	0,004
8124134	7172	<i>TPMT</i>	thiopurine S-methyltransferase	0,008
8177323	9081	<i>PRY</i>	PTPN13-like, Y-linked	0,041
8037032	374907	<i>B3GNT8</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8	0,042
8015095	162605	<i>KRT28</i>	keratin 28	0,014
8113658	100132014	<i>LVRN</i>	laeverin	0,037
8128001	1081	<i>CGA</i>	glycoprotein hormones, alpha polypeptide	0,005
8102877	1047	<i>CLGN</i>	calmegin	0,01
7980316	7043	<i>TGFB3</i>	transforming growth factor, beta 3	0,013
8152323	3646	<i>EIF3E</i>	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E	0,008
8012887	146822	<i>CDRT15</i>	CMT1A duplicated region transcript 15	0,048
8010901	8447	<i>DOC2B</i>	double C2-like domains, beta	0,032
8109712	3161	<i>HMMR</i>	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	0,024
8151561	79752	<i>ZFAND1</i>	zinc finger, AN1-type domain 1	0,006
8013567	201229	<i>LOC201229</i>	hypothetical protein LOC201229	0,043
8102730	256471	<i>MFSD8</i>	major facilitator superfamily domain containing 8	0,014
8151917	51001	<i>MTERFD1</i>	MTERF domain containing 1	0,028
8096905	55435	<i>C4orf16</i>	chromosome 4 open reading frame 16	0,007
7918755	163259	<i>DENND2C</i>	DENN/MADD domain containing 2C	0,023
8176806	9081	<i>PRY</i>	PTPN13-like, Y-linked	0,043
8174820	29071	<i>C1GALT1C1</i>	C1GALT1-specific chaperone 1	0,013
8057599	7035	<i>TFPI</i>	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	0,038
8086372	54986	<i>ULK4</i>	unc-51-like kinase 4 ( <i>C. elegans</i> )	0,016
8029779	374918	<i>IGFL1</i>	IGF-like family member 1	0,011
8023735	54495	<i>TMX3</i>	thioredoxin-related transmembrane protein 3	0,02
7899124	378807	<i>CATSPER4</i>	cation channel, sperm associated 4	0,049
8138912	23658	<i>LSM5</i>	LSM5 homolog, U6 small nuclear RNA associated ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,045

8031750	79744	<i>ZNF419</i>	zinc finger protein 419	0,015
8149955	55872	<i>PBK</i>	PDZ binding kinase	0,013
8016841	55273	<i>TMEM100</i>	transmembrane protein 100	0,014
7992396	81889	<i>FAHD1</i>	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	0,008
8168622	56062	<i>KLHL4</i>	kelch-like 4 (Drosophila)	0,011
8135218	10234	<i>LRRC17</i>	leucine rich repeat containing 17	0,011
8108287	7478	<i>WNT8A</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 8A	0,015
8141498	55063	<i>ZCWPW1</i>	zinc finger, CW type with PWWP domain 1	0,026
8104492	83853	<i>ROPN1L</i>	ropporin 1-like	0,011
7901931	84455	<i>EFCAB7</i>	EF-hand calcium binding domain 7	0,029
7957433	84125	<i>LRR1Q1</i>	leucine-rich repeats and IQ motif containing 1	0,018
7983191	161823	<i>ADAL</i>	adenosine deaminase-like	0,021
7978285	196883	<i>ADCY4</i>	adenylate cyclase 4	0,014
8174351	54830	<i>NUP62CL</i>	nucleoporin 62kDa C-terminal like	0,012
8042373	54465	<i>ETAA1</i>	Ewing tumor-associated antigen 1	0,045
8159211	2220	<i>FCN2</i>	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing lectin) 2 (hucolin)	0,044
8173613	51132	<i>RLIM</i>	ring finger protein, LIM domain interacting	0,006
8046560	3232	<i>HOXD3</i>	homeobox D3	0,036

**Tabla 4: Genes inhibidos por análogos de carga BA en células KGN**

AffyID	EntrezID	Gen	Descripción	p
7999588	8399	<i>PLA2G10</i>	phospholipase A2, group X	0,014
8001918	6236	<i>RRAD</i>	Ras-related associated with diabetes	0
8171105	64109	<i>CRLF2</i>	cytokine receptor-like factor 2	0,007
8157446	5004	<i>ORM1</i>	orosomuroid 1	0,002
7952810	22997	<i>IGSF9B</i>	immunoglobulin superfamily, member 9B	0,009
8160274	158295	<i>MGC24103</i>	hypothetical MGC24103	0,041
7929541	387707	<i>CC2D2B</i>	coiled-coil and C2 domain containing 2B	0,022
8027876	10430	<i>TMEM147</i>	transmembrane protein 147	0,005
8114896	134391	<i>GPR151</i>	G protein-coupled receptor 151	0,001
8152742	157376	<i>FER1L6</i>	fer-1-like 6 (C. elegans)	0,001
7940187	219986	<i>OR4D11</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 11	0,003
8014259	342618	<i>SLFN14</i>	schlafen family member 14	0,007
8108627	56664	<i>VTRNA1-1</i>	vault RNA 1-1	0,003
7901052	94163	<i>SNORD38B</i>	small nucleolar RNA, C/D box 38B	0,008
8166745	25763	<i>CXorf27</i>	chromosome X open reading frame 27	0,009
8022436	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,008
7927294	195977	<i>ANTXR1</i>	anthrax toxin receptor-like	0,011
7982062	100036565	<i>HBII-52-28</i>	HBII-52-28 snoRNA	0,018
8144457	503618	<i>DEFB104A</i>	defensin, beta 104A	0,002
8149192	503618	<i>DEFB104A</i>	defensin, beta 104A	0,002
8124897	100130889	<i>PSORS1C3</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (non-protein coding)	0,002
8179727	100130889	<i>PSORS1C3</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (non-protein coding)	0,002
8085407	6161	<i>RPL32</i>	ribosomal protein L32	0,048
8091385	1356	<i>CP</i>	ceruloplasmin (ferroxidase)	0,002
8125415	10665	<i>C6orf10</i>	chromosome 6 open reading frame 10	0,018
8115871	441116	<i>FLJ16171</i>	FLJ16171 protein	0,005
8170257	645188	<i>LOC645188</i>	hypothetical LOC645188	0,017
7930413	1847	<i>DUSP5</i>	dual specificity phosphatase 5	0,012
7980742	283588	<i>LOC283588</i>	hypothetical LOC283588	0,042
7900146	80149	<i>ZC3H12A</i>	zinc finger CCCH-type containing 12A	0,019
7982034	100033451	<i>SNORD115-14</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-14	0,005
8113666	57556	<i>SEMA6A</i>	sema domain, (semaphorin) 6A	0,001
8175638	642980	<i>FLJ16423</i>	hypothetical LOC642889	0,004
7939969	390152	<i>OR8H3</i>	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 3	0,031
8162936	392376	<i>OR13C2</i>	olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 2	0,01
8124500	439938	<i>LOC439938</i>	hypothetical gene supported by NM_178534	0,027
7977933	23428	<i>SLC7A8</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	0,001
7984631	80072	<i>C15orf34</i>	chromosome 15 open reading frame 34	0,007
7981322	388015	<i>RTL1</i>	retrotransposon-like 1	0,013
8121727	23629	<i>BRD7P3</i>	bromodomain containing 7 pseudogene 3	0,002



8154953	23349	<i>KIAA1045</i>	KIAA1045	0,009
7950933	50507	<i>NOX4</i>	NADPH oxidase 4	0,009
7924996	84886	<i>C1orf198</i>	chromosome 1 open reading frame 198	0,003
8075310	91370	<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	0,049
8142685	730130	<i>tcag7.977</i>	hypothetical protein LOC730130	0,018
7902721	1179	<i>CLCA1</i>	chloride channel accessory 1	0,008
8146500	4067	<i>LYN</i>	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	0,023
8174507	692226	<i>SNORD96B</i>	small nucleolar RNA, C/D box 96B	0,024
8070730	29947	<i>DNMT3L</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like	0,027
8055281	401010	<i>LOC100289181</i>	similar to cytochrome oxidase subunit II	0,039
7946006	401663	<i>OR51H1P</i>	olfactory receptor, family 51, subfamily H, member 1 pseudogene	0,011
7977270	388022	<i>LOC388022</i>	hypothetical gene supported by AK131040	0,011
8012931	374286	<i>CDRT1</i>	CMT1A duplicated region transcript 1	0,008
8142100	222255	<i>ATXN7L1</i>	ataxin 7-like 1	0,043
7950235	10809	<i>STARD10</i>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10	0,002
7957023	4069	<i>LYZ</i>	lysozyme (renal amyloidosis)	0,024
8134740	389541	<i>C7orf59</i>	chromosome 7 open reading frame 59	0,005
8027330	84108	<i>PCGF6</i>	polycomb group ring finger 6	0,021
7979721	161145	<i>C14orf83</i>	chromosome 14 open reading frame 83	0,004
8109039	408187	<i>SPINK5L2</i>	Kazal type serine protease inhibitor 5-like 2	0,021
7952986	378465	<i>HSN2</i>	hereditary sensory neuropathy, type II	0,023
8066590	7125	<i>TNNC2</i>	troponin C type 2 (fast)	0,003
8072355	284904	<i>SEC14L4</i>	SEC14-like 4 ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,007
8145361	4741	<i>NEFM</i>	neurofilament, medium polypeptide	0,005
8070782	386680	<i>KRTAP10-5</i>	keratin associated protein 10-5	0,016
7943025	340970	<i>TRIM48</i>	tripartite motif-containing 48	0,003
7950971	340970	<i>TRIM48</i>	tripartite motif-containing 48	0,003
8127087	2940	<i>GSTA3</i>	glutathione S-transferase alpha 3	0,01
7954794	283461	<i>C12orf40</i>	chromosome 12 open reading frame 40	0,04
7915277	4610	<i>MYCL1</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1,	0,017
8170400	642980	<i>FLJ16423</i>	hypothetical LOC642889	0,027
7921422	391114	<i>OR6K3</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily K, member 3	0,026
8063531	388799	<i>C20orf107</i>	chromosome 20 open reading frame 107	0,019
7925761	401994	<i>OR14I1</i>	olfactory receptor, family 14, subfamily I, member 1	0,046
7994813	197407	<i>ZNF48</i>	zinc finger protein 48	0,016
7939973	390154	<i>OR5T3</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily T, member 3	0,033
7981566	256281	<i>NUDT14</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14	0,034
8076815	100128818	<i>UNQ6126</i>	LPEQ6126	0,007
8161371	100292301	<i>LOC100292301</i>	similar to hCG1993567	0,004
8036908	29946	<i>SERTAD3</i>	SERTA domain containing 3	0,02
8082400	166348	<i>KLHDC6</i>	kelch domain containing 6	0,012
8153819	50626	<i>CYHR1</i>	cysteine/histidine-rich 1	0,004
7907286	2326	<i>FMO1</i>	flavin containing monooxygenase 1	0,003
8077441	8553	<i>BHLHE40</i>	basic helix-loop-helix family, member e40	0,023
8173181	169981	<i>SPIN3</i>	spindlin family, member 3	0,026
7976148	29018	<i>PRO1768</i>	PRO1768	0,02
7939131	51352	<i>WIT1</i>	Wilms tumor upstream neighbor 1	0,004
8171205	57502	<i>NLGN4X</i>	neuroligin 4, X-linked	0,007
7908841	4660	<i>PPP1R12B</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	0,002
7956826	23329	<i>TBC1D30</i>	TBC1 domain family, member 30	0,024
7990545	1464	<i>CSPG4</i>	chondroitin sulfate proteoglycan 4	0,026
8073612	706	<i>TSPO</i>	translocator protein (18kDa)	0,029
8167443	79917	<i>MAGIX</i>	MAGI family member, X-linked	0,013
7974461	3958	<i>LGALS3</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	0,009
8036430	163115	<i>ZNF781</i>	zinc finger protein 781	0,022
7982054	100036563	<i>HBII-52-24</i>	HBII-52-24 snoRNA	0,003
7939940	390142	<i>OR5D13</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily D, member 13	0,041
7924760	3707	<i>ITPKB</i>	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	0,026
8048889	130888	<i>FBXO36</i>	F-box protein 36	0,023
8173444	3561	<i>IL2RG</i>	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	0,005
8089185	50939	<i>IMPG2</i>	interphotoreceptor matrix proteoglycan 2	0,041
8046238	140469	<i>MYO3B</i>	myosin IIIB	0,045
8036902	29950	<i>SERTAD1</i>	SERTA domain containing 1	0,01
7909261	50604	<i>IL20</i>	interleukin 20	0,016
7973135	29986	<i>SLC39A2</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 2	0,008

8020211	1149	<i>CIDEA</i>	cell death-inducing DFFA-like effector a	0,009
8100827	3512	<i>IGJ</i>	immunoglobulin J polypeptide	0,02
8023995	10272	<i>FSTL3</i>	follistatin-like 3 (secreted glycoprotein)	0,002
7963965	84305	<i>WIBG</i>	within bgcn homolog (Drosophila)	0,017
7972239	84189	<i>SLITRK6</i>	SLIT and NTRK-like family, member 6	0,031
7901054	1263	<i>PLK3</i>	polo-like kinase 3 (Drosophila)	0,011
7940287	931	<i>MS4A1</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	0,025
8129837	53832	<i>IL20RA</i>	interleukin 20 receptor, alpha	0,008
8100202	280665	<i>CNGA1</i>	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	0,012
8033349	497049	<i>FLJ25758</i>	hypothetical locus FLJ25758	0,024
8156090	347127	<i>FLJ43950</i>	FAM75-like protein FLJ46321 pseudogene	0,026
8176234	1193	<i>CLIC2</i>	chloride intracellular channel 2	0,01
7943075	120114	<i>FAT3</i>	FAT tumor suppressor homolog 3 (Drosophila)	0,028
8037505	79090	<i>TRAPPC6A</i>	trafficking protein particle complex 6A	0,005
7960828	9573	<i>GDF3</i>	growth differentiation factor 3	0,008
8116532	619570	<i>SNORD95</i>	small nucleolar RNA, C/D box 95	0,002
7902645	64173	<i>SPATA1</i>	spermatogenesis associated 1	0,034
8040018	51112	<i>TTC15</i>	tetratricopeptide repeat domain 15	0,004
7981968	100033422	<i>SNORD116-10</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-10	0,015
7948150	390168	<i>OR5M1</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 1	0,007
8147830	81501	<i>TM7SF4</i>	transmembrane 7 superfamily member 4	0,018
7913768	58985	<i>IL22RA1</i>	interleukin 22 receptor, alpha 1	0,02
7987145	342184	<i>FMN1</i>	formin 1	0,049
8055085	55339	<i>WDR33</i>	WD repeat domain 33	0,019
8122756	57480	<i>PLEKHG1</i>	pleckstrin homology domain containing, family G member 1	0,022
8141843	100286937	<i>RASA4</i>	RAS p21 protein activator 4	0,029
7958989	196463	<i>PLBD2</i>	phospholipase B domain containing 2	0,003
8117900	780	<i>DDR1</i>	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	0,006
8031013	503834	<i>DPRX</i>	divergent-paired related homeobox	0,047
8085138	5021	<i>OXTR</i>	oxytocin receptor	0,01
7900957	128209	<i>KLF17</i>	Kruppel-like factor 17	0,02
7946280	8590	<i>OR6A2</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily A, member 2	0,013
7963203	121006	<i>FAM186A</i>	family with sequence similarity 186, member A	0,008
8003158	57707	<i>KIAA1609</i>	KIAA1609	0,004
7902687	3491	<i>CYR61</i>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	0,023
8052524	100124537	<i>SNORA70B</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 70B (retrotransposed)	0,027
7942896	220047	<i>CCDC83</i>	coiled-coil domain containing 83	0,006
8013622	124923	<i>FLJ25006</i>	uncharacterized serine/threonine-protein kinase Sgk494	0,02
7906085	4000	<i>LMNA</i>	lamin A/C	0,003
7969222	83446	<i>CCDC70</i>	coiled-coil domain containing 70	0,007
8115464	84868	<i>HAVCR2</i>	hepatitis A virus cellular receptor 2	0,005
8126066	23787	<i>MTCH1</i>	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)	0,004
7978312	11035	<i>RIPK3</i>	receptor-interacting serine-threonine kinase 3	0,023
7912582	400735	<i>PRAMEF5</i>	PRAME family member 5	0,007
8157014	138802	<i>OR13C8</i>	olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 8	0,009
8084679	3827	<i>KNG1</i>	kininogen 1	0,04
8110932	9037	<i>SEMA5A</i>	semaphorin 5A	0,012
8004905	124739	<i>USP43</i>	ubiquitin specific peptidase 43	0,019
8156770	79695	<i>GALNT12</i>	UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12	0,041
8029219	284339	<i>TMEM145</i>	transmembrane protein 145	0,012
8026300	976	<i>CD97</i>	CD97 molecule	0,007
8126729	53405	<i>CLIC5</i>	chloride intracellular channel 5	0,05
7924987	183	<i>AGT</i>	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	0,016
7967325	27198	<i>GPR81</i>	G protein-coupled receptor 81	0,048
8108822	89848	<i>RELL2</i>	RELT-like 2	0,02
7982938	7301	<i>TYRO3</i>	TYRO3 protein tyrosine kinase	0,004
8077042	6305	<i>SBF1</i>	SET binding factor 1	0,006
8178435	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,004
7976810	767563	<i>SNORD113-3</i>	small nucleolar RNA, C/D box 113-3	0,009
8143772	5919	<i>RARRES2</i>	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	0,014
8169659	4694	<i>NDUFA1</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa	0,005
7997192	3250	<i>HPR</i>	haptoglobin-related protein	0,025
8010550	79643	<i>CHMP6</i>	chromatin modifying protein 6	0,004
8148710	54512	<i>EXOSC4</i>	exosome component 4	0,008
8179184	780	<i>DDR1</i>	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	0,007

8006085	374786	<i>EFCAB5</i>	EF-hand calcium binding domain 5	0,014
8039257	3903	<i>LAIR1</i>	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	0,029
7959921	338797	<i>LOC338797</i>	hypothetical LOC338797	0,006
7981273	317762	<i>CCDC85C</i>	coiled-coil domain containing 85C	0,004
7972217	10253	<i>SPRY2</i>	sprouty homolog 2 (Drosophila)	0,02
8149979	389643	<i>C8orf80</i>	chromosome 8 open reading frame 80	0,05
8042346	440867	<i>FLJ16124</i>	FLJ16124 protein	0,007
7987650	4058	<i>LTK</i>	leukocyte receptor tyrosine kinase	0,022
7992255	84572	<i>GNPTG</i>	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, gamma subunit	0,019
7992789	51330	<i>TNFRSF12A</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	0,009
8124848	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,008
8177867	780	<i>DDR1</i>	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	0,009
8179704	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,008
8059387	79843	<i>FAM124B</i>	family with sequence similarity 124B	0,014
8071737	4282	<i>MIF</i>	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	0,011
8130641	79992	<i>C6orf59</i>	chromosome 6 open reading frame 59	0,023
8024444	100129831	<i>UNQ6493</i>	EPWW6493	0,011
7982070	100033806	<i>SNORD115-32</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-32	0,014
7981098	145264	<i>SERPINA12</i>	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 12	0,036
8013135	6720	<i>SREBF1</i>	sterol regulatory element binding transcription factor 1	0,015
8130582	6582	<i>SLC22A2</i>	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	0,046
8038326	28968	<i>SLC6A16</i>	solute carrier family 6, member 16	0,017
8105487	115827	<i>RAB3C</i>	RAB3C, member RAS oncogene family	0,006
7926410	414308	<i>MRC1</i>	mannose receptor, C type 1	0,012
7926451	414308	<i>MRC1</i>	mannose receptor, C type 1	0,012
8115210	10318	<i>TNIP1</i>	TNFAIP3 interacting protein 1	0,018
7964548	4234	<i>METTL1</i>	methyltransferase like 1	0,011
8052143	51130	<i>GPR75</i>	G protein-coupled receptor 75	0,013
8076655	150379	<i>PNPLA5</i>	patatin-like phospholipase domain containing 5	0,033
8179313	80739	<i>C6orf25</i>	chromosome 6 open reading frame 25	0,049
8122131	319100	<i>TAAR6</i>	trace amine associated receptor 6	0,027
7999093	6345	<i>SRL</i>	sarcalumenin	0,015
8074307	100129113	<i>LOC100129113</i>	hypothetical protein LOC100129113	0,012
8125775	84300	<i>C6orf125</i>	chromosome 6 open reading frame 125	0,015
8157141	10881	<i>ACTL7A</i>	actin-like 7A	0,011
8067588	100144596	<i>NCRNA00029</i>	non-protein coding RNA 29	0,03
7905220	1893	<i>ECM1</i>	extracellular matrix protein 1	0,007
8032863	56005	<i>C19orf10</i>	chromosome 19 open reading frame 10	0,005
7917466	339524	<i>LOC339524</i>	hypothetical LOC339524	0,025
7950128	220074	<i>C11orf51</i>	chromosome 11 open reading frame 51	0,041
8117869	202658	<i>TRIM39</i>	tripartite motif-containing 39	0,026
8177770	202658	<i>TRIM39</i>	tripartite motif-containing 39	0,026
8179088	202658	<i>TRIM39</i>	tripartite motif-containing 39	0,026
7922018	387597	<i>ILDR2</i>	immunoglobulin-like domain containing receptor 2	0,023
8164215	26783	<i>SNORA65</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 65	0,016
8049670	2817	<i>GPC1</i>	glypican 1	0,003
7999909	51704	<i>GPRC5B</i>	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	0,019
8053690	3514	<i>IGK@</i>	immunoglobulin kappa locus	0,041
8094070	152992	<i>C4orf23</i>	chromosome 4 open reading frame 23	0,038
8110166	192286	<i>HIGD2A</i>	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A	0,046
7994939	9810	<i>RNF40</i>	ring finger protein 40	0,013
7909946	400823	<i>FAM177B</i>	family with sequence similarity 177, member B	0,041
7939699	79797	<i>ZNF408</i>	zinc finger protein 408	0,021
8009277	8787	<i>RGS9</i>	regulator of G-protein signaling 9	0,047
8067233	56937	<i>PMEPA1</i>	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	0,022
7948115	338674	<i>OR5F1</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily F, member 1	0,014
8007310	441795	<i>LOC441795</i>	high mobility group protein B3-like protein-like	0,037
8126452	5190	<i>PEX6</i>	peroxisomal biogenesis factor 6	0,028

Tabla 5: Genes estimulados por glicoformas NR en células KGN

AffyID	EntrezID	Gen	Descripción	p
8165672	5981	<i>RFC1</i>	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	0,005
8167560	729396	<i>GAGE12C</i>	G antigen 12C	0,019
7937990	3047	<i>HBG1</i>	hemoglobin, gamma A	0,002
7937993	3048	<i>HBG2</i>	hemoglobin, gamma G	0,002
8063174	100130863	<i>ZNF840P</i>	zinc finger protein 840 (pseudogene)	0,002
8026381	100129118	<i>LOC100129118</i>	similar to transmembrane protein 167A	0
7997188	3240	<i>HP</i>	haptoglobin	0,03
8027354	388524	<i>RPSAP58</i>	ribosomal protein SA pseudogene 58	0,007
8163273	26248	<i>OR2K2</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily K, member 2	0,001
8101357	728131	<i>RPS6P6</i>	ribosomal protein S6 pseudogene 6	0
7960365	84766	<i>EFCAB4B</i>	EF-hand calcium binding domain 4B	0,043
8160422	3440	<i>IFNA2</i>	interferon, alpha 2	0,001
8103483	56884	<i>FSTL5</i>	folliculin-like 5	0,001
8144405	503614	<i>DEFB107A</i>	defensin, beta 107A	0,001
8149230	503614	<i>DEFB107A</i>	defensin, beta 107A	0,001
7925031	149373	<i>FLJ30430</i>	hypothetical protein FLJ30430	0,011
8050115	339789	<i>C2orf46</i>	chromosome 2 open reading frame 46	0,003
8031213	11024	<i>LILRA1</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A, member 1	0,012
8136654	54429	<i>TAS2R5</i>	taste receptor, type 2, member 5	0,004
7922416	692195	<i>SNORD75</i>	small nucleolar RNA, C/D box 75	0,014
7911276	254879	<i>OR2T6</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 6	0,002
7982084	6638	<i>SNORD115-11</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-11	0,006
7981190	100130815	<i>LOC100130815</i>	hypothetical LOC100130815	0,002
7965245	400058	<i>MKRNP6</i>	makorin ring finger protein pseudogene 6	0
8126934	245928	<i>DEFB114</i>	defensin, beta 114	0,033
8074364	23617	<i>DGCR14</i>	DiGeorge syndrome critical region gene 14	0,002
7910047	127602	<i>DNAH14</i>	dynein, axonemal, heavy chain 14	0,015
8027348	100129543	<i>ZNF730</i>	zinc finger protein 730	0,001
8043687	652726	<i>ANKRD36</i>	ankyrin repeat domain 36	0,003
7925757	401992	<i>OR2T35</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 35	0,017
8035782	91120	<i>ZNF682</i>	zinc finger protein 682	0,001
7911283	127068	<i>OR2T3</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 3	0,016
7988767	1588	<i>CYP19A1</i>	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	0,034
8133038	2551	<i>GABPA</i>	GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa	0,005
7992865	26184	<i>OR1F2P</i>	olfactory receptor, family 1, subfamily F, member 2	0,045
7904408	3284	<i>HSD3B2</i>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2	0,001
7911281	401992	<i>OR2T2</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 2	0,027
8030974	646508	<i>LOC646508</i>	hypothetical LOC646508	0,005
8120269	26268	<i>FBXO9</i>	F-box protein 9	0,009
8116245	57396	<i>CLK4</i>	CDC-like kinase 4	0,012
7925749	343173	<i>OR2T34</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 34	0,026
8105935	100133280	<i>POM121L8P</i>	POM121 membrane glycoprotein-like 8 (rat) pseudogene	0,03
8052861	6637	<i>SNRPG</i>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	0,036
8034349	51710	<i>ZNF44</i>	zinc finger protein 44	0,01
8119595	285855	<i>RPL7L1</i>	ribosomal protein L7-like 1	0,024
7945232	170689	<i>ADAMTS15</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 15	0,034
8171352	6399	<i>TRAPPC2</i>	trafficking protein particle complex 2	0,014
8165658	7434	<i>VIPR2</i>	vasoactive intestinal peptide receptor 2	0,005
8008711	26689	<i>OR4D1</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 1	0,002
8030978	91664	<i>ZNF845</i>	zinc finger protein 845	0,031
7942274	8586	<i>OR7E87P</i>	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 87 pseudogene	0,005
7922414	60674	<i>SNORD76</i>	small nucleolar RNA, C/D box 76	0,006
7967318	338442	<i>NIACR1</i>	niacin receptor 1	0,01
8158995	3933	<i>LCN1</i>	lipocalin 1 (tear prealbumin)	0,037
8121132	84694	<i>GJA10</i>	gap junction protein, alpha 10, 62kDa	0,02
8006237	400590	<i>LOC400590</i>	hypothetical LOC400590	0,04
8168531	84636	<i>GPR174</i>	G protein-coupled receptor 174	0,007
7927173	220992	<i>ZNF485</i>	zinc finger protein 485	0,001
8146633	643763	<i>LOC643763</i>	hypothetical LOC643763	0,008



7982004	100033820	<i>SNORD116-28</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-28	0,026
8128977	51175	<i>TUBE1</i>	tubulin, epsilon 1	0,017
8167862	389860	<i>PAGE2B</i>	P antigen family, member 2B	0,003
8105989	100133280	<i>POM121L8P</i>	POM121 membrane glycoprotein-like 8 (rat) pseudogene	0,026
8171758	100158262	<i>SCARNA9L</i>	small Cajal body-specific RNA 9-like (retrotransposed)	0,042
7927095	642780	<i>PCMTD2</i>	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	0,025
8171427	2277	<i>FIGF</i>	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	0,016
7908347	10896	<i>OCLM</i>	oculomedin	0,015
8090509	7879	<i>RAB7A</i>	RAB7A, member RAS oncogene family	0,043
7930533	143188	<i>LOC143188</i>	hypothetical LOC143188	0,022
8122142	594839	<i>SNORD101</i>	small nucleolar RNA, C/D box 101	0,031
8006958	124626	<i>ZBP2</i>	zona pellucida binding protein 2	0,035
8002322	283970	<i>PDXDC2</i>	pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 2	0,042
8066074	79980	<i>DSN1</i>	DSN1, MIND kinetochore complex component, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,015
7992996	100129318	<i>UNQ3118</i>	GRTR3118	0,026
7940189	390199	<i>OR4D9</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 9	0,004
8169083	644353	<i>ZCCHC18</i>	zinc finger, CCHC domain containing 18	0,006
8119525	387535	<i>HCRP1</i>	hepatocellular carcinoma-related HCRP1	0,011
7947245	3324	<i>HSP90AA2</i>	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2	0,04
8002667	83449	<i>PMFBP1</i>	polyamine modulated factor 1 binding protein 1	0,039
7961097	400002	<i>FLJ46363</i>	hypothetical FLJ46363	0,03
7986639	388078	<i>VSIG6</i>	V-set and immunoglobulin domain containing 6	0,043
7940182	390197	<i>OR4D10</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 10	0,044
8108683	56133	<i>PCDHB2</i>	protocadherin beta 2	0,006
8014257	342615	<i>SLFN12L</i>	schlafen family member 12-like	0,04
8037947	284355	<i>TPRX1</i>	tetra-peptide repeat homeobox 1	0,045
8010080	677849	<i>SNORD1B</i>	small nucleolar RNA, C/D box 1B	0,029
7946211	23378	<i>RRP8</i>	ribosomal RNA processing 8, methyltransferase, homolog (yeast)	0,018
8041696	64241	<i>ABCG8</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	0,025
7961285	259295	<i>TAS2R20</i>	taste receptor, type 2, member 20	0,04
8179481	3122	<i>HLA-DRA</i>	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	0,038
8080980	55096	<i>FLJ10213</i>	hypothetical protein FLJ10213	0,04
8173506	54821	<i>ERCC6L</i>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency	0,022
7911278	26696	<i>OR2T1</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 1	0,025
7981783	727924	<i>OR4N4</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 4	0,025
7963865	283365	<i>OR6C6</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 6	0,003
8108182	347732	<i>CATSPER3</i>	cation channel, sperm associated 3	0,003
8150877	26795	<i>SNORD54</i>	small nucleolar RNA, C/D box 54	0,031
7907183	55732	<i>C1orf112</i>	chromosome 1 open reading frame 112	0,037
8175311	54967	<i>CXorf48</i>	chromosome X open reading frame 48	0,009
8103975	643036	<i>UNQ9368</i>	RTFV9368	0,007
8091656	196074	<i>METT5D1</i>	methyltransferase 5 domain containing 1	0,014
8157727	2844	<i>GPR21</i>	G protein-coupled receptor 21	0,011
8108287	7478	<i>WNT8A</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 8A	0,007
8110666	84851	<i>TRIM52</i>	tripartite motif-containing 52	0,024
7918936	79679	<i>VTCN1</i>	V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	0,006
8111569	202151	<i>RANBP3L</i>	RAN binding protein 3-like	0,043
8037246	5675	<i>PSG6</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6	0,014
7948898	23642	<i>SNORD31</i>	small nucleolar RNA, C/D box 31	0,036
8132347	353345	<i>GPR141</i>	G protein-coupled receptor 141	0,034
8117543	85235	<i>HIST1H2AH</i>	histone cluster 1, H2ah	0,03
7970513	221150	<i>SKA3</i>	spindle and kinetochore associated complex subunit 3	0,021
7910381	574029	<i>DUSP5P</i>	dual specificity phosphatase 5 pseudogene	0,012
8044563	84639	<i>IL1F10</i>	interleukin 1 family, member 10 (theta)	0,017
8124406	8347	<i>HIST1H2BC</i>	histone cluster 1, H2bc	0,001
7965431	574016	<i>CLLU1OS</i>	chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1 opposite strand	0,018
8104617	391764	<i>LOC391764</i>	similar to TBP-associated factor 11	0,032
8113120	10766	<i>TOB2</i>	transducer of ERBB2, 2	0,019
8143937	51667	<i>NUB1</i>	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	0,017
8132962	677803	<i>SNORA15</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 15	0,01
8165707	10766	<i>TOB2</i>	transducer of ERBB2, 2	0,019
8124423	8339	<i>HIST1H2BG</i>	histone cluster 1, H2bg	0,008
8114468	26785	<i>SNORD63</i>	small nucleolar RNA, C/D box 63	0,049
8121031	10559	<i>SLC35A1</i>	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1	0,018
8168291	26548	<i>ITGB1BP2</i>	integrin beta 1 binding protein (melusin) 2	0,005

8099233	100133131	<i>LOC100133131</i>	hypothetical protein LOC100133131	0,038
8127180	54511	<i>HMGCLL1</i>	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase-like 1	0,029
7938629	5140	<i>PDE3B</i>	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	0,025
7954310	100008588	<i>LOC100008588</i>	18S ribosomal RNA	0,015
8096147	404201	<i>C4orf12</i>	chromosome 4 open reading frame 12	0,01
8172654	158572	<i>LOC158572</i>	hypothetical LOC158572	0,036
7995379	10294	<i>DNAJA2</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	0,027
8033742	390885	<i>OR7D4</i>	olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 4	0,03
7981974	100033425	<i>SNORD116-13</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-13	0,021
8071877	29774	<i>POM121L9P</i>	POM121 membrane glycoprotein-like 9 (rat) pseudogene	0,032
7964687	115749	<i>C12orf56</i>	chromosome 12 open reading frame 56	0,034
7980316	7043	<i>TGFB3</i>	transforming growth factor, beta 3	0,012
7985130	646892	<i>SH2D7</i>	SH2 domain containing 7	0,024
7943019	399940	<i>SPRYD5</i>	SPRY domain containing 5	0,038
7950977	399940	<i>SPRYD5</i>	SPRY domain containing 5	0,038
8005547	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,043
8005553	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,043
8013323	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,043
8013325	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,043
8013329	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,043
7920252	6278	<i>S100A7</i>	S100 calcium binding protein A7	0,01
7930170	57412	<i>C10orf32</i>	chromosome 10 open reading frame 32	0,035
7950332	26005	<i>C2CD3</i>	C2 calcium-dependent domain containing 3	0,018
8039025	79986	<i>ZNF702P</i>	zinc finger protein 702 pseudogene	0,044
8076826	348645	<i>C22orf34</i>	chromosome 22 open reading frame 34	0,019
7956648	91419	<i>XRCC6BP1</i>	XRCC6 binding protein 1	0,006
8060320	140881	<i>DEFB129</i>	defensin, beta 129	0,039
7922598	9068	<i>ANGPTL1</i>	angiopoietin-like 1	0,013
7934779	340745	<i>LRIT2</i>	leucine-rich repeat, immunoglobulin-like and transmembrane domains 2	0,041
8084299	730211	<i>HSP90AA5P</i>	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 5 (pseudogene)	0,028
8146900	389668	<i>XKR9</i>	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 9	0,012
7908931	26254	<i>OPTC</i>	opticin	0,013
7932864	119180	<i>LYZL2</i>	lysozyme-like 2	0,045
7922418	619498	<i>SNORD74</i>	small nucleolar RNA, C/D box 74	0,03

Tabla 6: Genes inhibidos por glicofomas NR en células KGN

AffyID	EntrezID	Gen	Descripción	p
7999588	8399	<i>PLA2G10</i>	phospholipase A2, group X	0,005
8131803	3569	<i>IL6</i>	interleukin 6 (interferon, beta 2)	0,008
8082583	442092	<i>UNQ6125</i>	hypothetical LOC442092	0,003
7970404	93492	<i>TPTE2</i>	transmembrane phosphoinositide 3-phosphatase and tensin homolog 2	0,004
7939988	219482	<i>OR5M3</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 3	0,005
7984259	26832	<i>RNU5B-1</i>	RNA, U5B small nuclear 1	0,036
8001918	6236	<i>RRAD</i>	Ras-related associated with diabetes	0
8067836	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,018
8065630	284805	<i>LOC284805</i>	hypothetical LOC284805	0,006
8065242	29075	<i>HSPC072</i>	hypothetical LOC29075	0,013
7929541	387707	<i>CC2D2B</i>	coiled-coil and C2 domain containing 2B	0,011
7984631	80072	<i>C15orf34</i>	chromosome 15 open reading frame 34	0,001
8022436	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,003
8100734	7367	<i>UGT2B17</i>	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17	0,006
7922351	646870	<i>LOC646870</i>	hypothetical protein LOC646870	0,039
8071042	389832	<i>LOC100288884</i>	hypothetical protein LOC100288884	0,002
8116707	497048	<i>KU-MEL-3</i>	KU-MEL-3	0,003
8171105	64109	<i>CRLF2</i>	cytokine receptor-like factor 2	0,009
7939948	26338	<i>OR5L2</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily L, member 2	0
8095819	8987	<i>FAM47E</i>	family with sequence similarity 47, member E	0,048
8003804	8383	<i>OR1A1</i>	olfactory receptor, family 1, subfamily A, member 1	0
8054511	205251	<i>NCRNA00116</i>	non-protein coding RNA 116	0,012
7937104	100128830	<i>LOC100128830</i>	hypothetical protein LOC100128830	0,018
8122265	7128	<i>TNFAIP3</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	0,05

8154953	23349	<i>KIAA1045</i>	KIAA1045	0,002
8176574	652811	<i>LOC652811</i>	similar to adican	0,005
7952384	219873	<i>OR10S1</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily S, member 1	0,005
7945241	283171	<i>C11orf44</i>	chromosome 11 open reading frame 44	0,001
8113097	285600	<i>C5orf36</i>	chromosome 5 open reading frame 36	0,01
8065905	554250	<i>GDF5</i>	growth differentiation factor 5	0,001
8108627	56664	<i>VTRNA1-1</i>	vault RNA 1-1	0,006
7977609	341799	<i>OR6S1</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily S, member 1	0
8070730	29947	<i>DNMT3L</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like	0,012
7930413	1847	<i>DUSP5</i>	dual specificity phosphatase 5	0,01
7921362	128366	<i>OR6P1</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily P, member 1	0,003
8009277	8787	<i>RGS9</i>	regulator of G-protein signaling 9	0,004
8075310	91370	<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	0,028
8077441	8553	<i>BHLHE40</i>	basic helix-loop-helix family, member e40	0,006
8064866	643406	<i>RP5-1022P6.6</i>	hypothetical LOC149837	0,025
8097126	100192379	<i>TMEM155</i>	transmembrane protein 155	0,002
8114270	9597	<i>SMAD5OS</i>	SMAD family member 5 opposite strand	0,001
7957608	160313	<i>KRT19P2</i>	keratin 19 pseudogene 2	0,008
7943969	3359	<i>HTR3A</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A	0,001
8152742	157376	<i>FER1L6</i>	fer-1-like 6 (C. elegans)	0,003
7916384	606495	<i>CDCP2</i>	CUB domain containing protein 2	0,011
7977782	79549	<i>OR6J1</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily J, member 1	0,019
7961249	50839	<i>TAS2R10</i>	taste receptor, type 2, member 10	0,005
7977445	9834	<i>KIAA0125</i>	KIAA0125	0,006
7976080	8477	<i>GPR65</i>	G protein-coupled receptor 65	0
8027330	84108	<i>PCGF6</i>	polycomb group ring finger 6	0,011
8006836	342666	<i>FLJ43826</i>	FLJ43826 protein	0,005
8139943	441251	<i>SPDYE7P</i>	speedy homolog E7 ( <i>Xenopus laevis</i> ), pseudogene	0,009
7999427	7142	<i>TNP2</i>	transition protein 2 (during histone to protamine replacement)	0,003
7948150	390168	<i>OR5M1</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 1	0,001
7898799	714	<i>C1QC</i>	complement component 1, q subcomponent, C chain	0,018
7916566	1600	<i>DAB1</i>	disabled homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	0,004
8009602	350383	<i>KIF19</i>	kinesin family member 19	0,011
7900146	80149	<i>ZC3H12A</i>	zinc finger CCCH-type containing 12A	0,027
7964183	27165	<i>GLS2</i>	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)	0,015
8103503	84076	<i>TKTL2</i>	transketolase-like 2	0,046
8086503	51304	<i>ZDHHC3</i>	zinc finger, DHHC-type containing 3	0,03
7940187	219986	<i>OR4D11</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 11	0,012
7939969	390152	<i>OR8H3</i>	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 3	0,038
8093453	401114	<i>FLJ35816</i>	FLJ35816 protein	0,016
8170302	494118	<i>SPANXN1</i>	SPANX family, member N1	0,031
7982034	100033451	<i>SNORD115-14</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-14	0,009
8124848	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,001
8179704	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,001
7937709	440023	<i>KRTAP5-6</i>	keratin associated protein 5-6	0,04
8157446	5004	<i>ORM1</i>	orosomuroid 1	0,017
7915500	149466	<i>C1orf210</i>	chromosome 1 open reading frame 210	0,017
7945368	387733	<i>IFITM5</i>	interferon induced transmembrane protein 5	0,003
7936925	399821	<i>FLJ37035</i>	FLJ37035 protein	0,004
8108679	29930	<i>PCDHB1</i>	protocadherin beta 1	0,013
8167742	170627	<i>XAGE5</i>	X antigen family, member 5	0,037
7943240	143689	<i>PIWIL4</i>	piwi-like 4 ( <i>Drosophila</i> )	0,015
8114896	134391	<i>GPR151</i>	G protein-coupled receptor 151	0,008
8147830	81501	<i>TM7SF4</i>	transmembrane 7 superfamily member 4	0,006
8025450	284383	<i>OR2Z1</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily Z, member 1	0,044
8045776	114805	<i>GALNT13</i>	UDP-NacetylDgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13	0,006
8116086	79930	<i>DOK3</i>	docking protein 3	0,032
7900603	79078	<i>C1orf50</i>	chromosome 1 open reading frame 50	0,02
7946006	401663	<i>OR51H1P</i>	olfactory receptor, family 51, subfamily H, member 1 pseudogene	0,01
8178435	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,001
8018761	10610	<i>ST6GALNAC2</i>	ST6-N-acetylgalactosaminide $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 2	0,004
8086600	1230	<i>CCR1</i>	chemokine (C-C motif) receptor 1	0,005
7898030	391001	<i>PRAMEF20</i>	PRAME family member 20	0,028
8161371	100292301	<i>LOC100292301</i>	similar to hCG1993567	0,003
7985233	5923	<i>RASGRF1</i>	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	0,01

8060805	1114	<i>CHGB</i>	chromogranin B (secretogranin 1)	0,008
7976567	623	<i>BDKRB1</i>	bradykinin receptor B1	0,048
8014230	146861	<i>AMAC1</i>	acyl-malonyl condensing enzyme 1	0,017
8139935	441250	<i>TYW1B</i>	tRNA-yW synthesizing protein 1 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,01
8104615	391742	<i>LOC391742</i>	TBP-associated factor 11 pseudogene	0,029
7982529	441722	<i>LOC441722</i>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 pseudogene	0,01
7908481	10878	<i>CFHR3</i>	complement factor H-related 3	0,036
7963203	121006	<i>FAM186A</i>	family with sequence similarity 186, member A	0,003
8177282	83868	<i>TTY13</i>	testis-specific transcript, Y-linked 13 (non-protein coding)	0,027
7960362	100128816	<i>UNQ3104</i>	ACAH3104	0,006
8152119	83988	<i>NCALD</i>	neurocalcin delta	0,003
7951297	4321	<i>MMP12</i>	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	0,013
8162187	494127	<i>LOC494127</i>	NFYC pseudogene	0,022
8063869	400850	<i>FLJ44790</i>	hypothetical FLJ44790	0,028
7902038	205	<i>AK3L1</i>	adenylate kinase 3-like 1	0,016
8149825	6781	<i>STC1</i>	stanniocalcin 1	0,027
7993726	54988	<i>ACSM5</i>	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5	0,016
7909214	83593	<i>RASSF5</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5	0,004
7974461	3958	<i>LGALS3</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	0,007
8095826	8987	<i>STBD1</i>	starch binding domain 1	0,005
8072226	5988	<i>RFPL1</i>	ret finger protein-like 1	0,018
7971950	1602	<i>DACH1</i>	dachshund homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	0,006
8121727	23629	<i>BRD7P3</i>	bromodomain containing 7 pseudogene 3	0,004
7916024	22996	<i>TTC39A</i>	tetratricopeptide repeat domain 39A	0,042
8110018	51121	<i>RPL26L1</i>	ribosomal protein L26-like 1	0,038
8144917	4023	<i>LPL</i>	lipoprotein lipase	0,02
8166669	139604	<i>MAGEB16</i>	melanoma antigen family B, 16	0,005
8150698	6591	<i>SNAI2</i>	snail homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )	0,048
7905503	353140	<i>LCE2C</i>	late cornified envelope 2C	0,005
8033734	390882	<i>OR7G2</i>	olfactory receptor, family 7, subfamily G, member 2	0,004
7925759	403239	<i>OR2T27</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 27	0,048
8092769	344905	<i>ATP13A5</i>	ATPase type 13A5	0,034
8013660	230	<i>ALDOC</i>	aldolase C, fructose-bisphosphate	0,024
8130582	6582	<i>SLC22A2</i>	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	0,022
7921354	128360	<i>OR10T2</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily T, member 2	0,006
8035318	23025	<i>UNC13A</i>	unc-13 homolog A ( <i>C. elegans</i> )	0,002
8031768	284307	<i>ZIK1</i>	zinc finger protein interacting with K protein 1 homolog (mouse)	0,005
8170407	728269	<i>MAGEA9</i>	melanoma antigen family A, 9	0,007
8175611	728269	<i>MAGEA9</i>	melanoma antigen family A, 9	0,007
7945742	29850	<i>TRPM5</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5	0,004
8068052	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,005
8142814	611	<i>OPN1SW</i>	opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive	0,033
7902235	57554	<i>LRRC7</i>	leucine rich repeat containing 7	0,022
7934898	118932	<i>ANKRD22</i>	ankyrin repeat domain 22	0,003
8007548	23591	<i>C17orf88</i>	chromosome 17 open reading frame 88	0,007
8115732	100133106	<i>UNQ9374</i>	VCEW9374	0,015
7916248	6512	<i>SLC1A7</i>	solute carrier family 1 (glutamate transporter), member 7	0,029
8161270	253650	<i>ANKRD18A</i>	ankyrin repeat domain 18A	0,025
8171338	171484	<i>FAM9C</i>	family with sequence similarity 9, member C	0,017
8044149	5340	<i>PLGLA</i>	plasminogen-like A	0,012
8122717	100288743	<i>LRP11</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 11	0,002
7978756	84075	<i>FSCB</i>	fibrous sheath CABYR binding protein	0,046
7993339	100129038	<i>LOC100129038</i>	PRO2812	0,008
8063590	5105	<i>PCK1</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	0,004
8152642	100131726	<i>LOC100131726</i>	HCC-related HCC-C11_v3	0,013
7974900	646113	<i>FLJ43390</i>	hypothetical LOC646113	0,002
8031344	3803	<i>KIR2DL2</i>	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 2	0,002
8153430	93100	<i>NAPRT1</i>	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	0,025
8000117	1428	<i>CRYM</i>	crystallin, mu	0,002
7957023	4069	<i>LYZ</i>	lysozyme (renal amyloidosis)	0,041
8013131	140771	<i>SMCR5</i>	Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 5 (non-protein coding)	0,038
7953094	775	<i>CACNA1C</i>	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	0,028
7958565	4598	<i>MVK</i>	mevalonate kinase	0,033
7951259	4319	<i>MMP10</i>	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	0,021
8103877	80014	<i>CLDN22</i>	claudin 22	0,009



7948144	390168	<i>OR5M11</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 11	0,027
8113879	3094	<i>HINT1</i>	histidine triad nucleotide binding protein 1	0,025
8174507	692226	<i>SNORD96B</i>	small nucleolar RNA, C/D box 96B	0,05
7978360	2999	<i>GZMH</i>	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	0,005
8123080	94120	<i>SYTL3</i>	synaptotagmin-like 3	0,009
8101904	131	<i>ADH7</i>	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	0,013
7989750	8483	<i>CILP</i>	cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase	0,011
8154124	169522	<i>KCNV2</i>	potassium channel, subfamily V, member 2	0,014
7964907	5801	<i>PTPRR</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	0,003
8116445	2324	<i>FLT4</i>	fms-related tyrosine kinase 4	0,012
7977933	23428	<i>SLC7A8</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	0,003
7934993	119369	<i>NUDT9P1</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 9 pseudogene 1	0,046
8109629	2172	<i>FABP6</i>	fatty acid binding protein 6, ileal	0,042
7952249	9099	<i>USP2</i>	ubiquitin specific peptidase 2	0,002
7912211	155184	<i>SLC2A7</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 7	0,014
8151824	25788	<i>RAD54B</i>	RAD54 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,002
8170794	554	<i>AVPR2</i>	arginine vasopressin receptor 2	0,026
7986561	390531	<i>VSIG7</i>	V-set and immunoglobulin domain containing 7	0,012
8167360	2623	<i>GATA1</i>	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)	0,019
8017843	9120	<i>SLC16A6</i>	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)	0,009
8019751	644767	<i>FLJ44838</i>	hypothetical protein LOC644767	0,05
7912582	400735	<i>PRAMEF5</i>	PRAME family member 5	0,005
7946326	120066	<i>OR5P3</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 3	0,042
7975876	2103	<i>ESRRB</i>	estrogen-related receptor beta	0,02
7921099	1382	<i>CRABP2</i>	cellular retinoic acid binding protein 2	0,028
8031057	5582	<i>PRKCG</i>	protein kinase C, gamma	0,018
7968789	28984	<i>C13orf15</i>	chromosome 13 open reading frame 15	0,033
8125470	3112	<i>HLA-DOB</i>	major histocompatibility complex, class II, DO beta	0,027
8124897	100130889	<i>PSORS1C3</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (non-protein coding)	0,02
8179727	100130889	<i>PSORS1C3</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (non-protein coding)	0,02
7923164	127124	<i>ATP6V1G3</i>	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G3	0,031
7976810	767563	<i>SNORD113-3</i>	small nucleolar RNA, C/D box 113-3	0,007
8136963	26211	<i>OR2F1</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily F, member 1	0,01
8083599	152078	<i>C3orf55</i>	chromosome 3 open reading frame 55	0,024
8035880	7386	<i>UQCRCF1</i>	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	0,024
7997735	2300	<i>FOXL1</i>	forkhead box L1	0,006
7967322	8843	<i>NIACR2</i>	niacin receptor 2	0,026
8005576	5598	<i>MAPK7</i>	mitogen-activated protein kinase 7	0,004
8166213	795	<i>S100G</i>	S100 calcium binding protein G	0,021
8058591	33	<i>ACADL</i>	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain	0,043
8114572	1839	<i>HBEGF</i>	heparin-binding EGF-like growth factor	0,023
8159984	55848	<i>C9orf46</i>	chromosome 9 open reading frame 46	0,007
8053231	84695	<i>LOXL3</i>	lysyl oxidase-like 3	0,024
8167912	11279	<i>KLF8</i>	Kruppel-like factor 8	0,008
7905544	6698	<i>SPRR1A</i>	small proline-rich protein 1A	0,009
8022653	728606	<i>LOC728606</i>	hypothetical LOC728606	0,004
8034320	163059	<i>ZNF433</i>	zinc finger protein 433	0,014
8062444	671	<i>BPI</i>	bactericidal/permeability-increasing protein	0,041
8144457	503618	<i>DEFB104A</i>	defensin, beta 104A	0,028
8149192	503618	<i>DEFB104A</i>	defensin, beta 104A	0,028
7901311	2306	<i>FOXD2</i>	forkhead box D2	0,016
7946972	6290	<i>SAA3P</i>	serum amyloid A3 pseudogene	0,016
8151659	54714	<i>CNGB3</i>	cyclic nucleotide gated channel beta 3	0,014
7972672	643677	<i>hCG_2011852</i>	hypothetical protein LOC643677	0,035
8128620	57673	<i>BEND3</i>	BEN domain containing 3	0,028
7953835	10219	<i>KLRG1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	0,002
8139121	445347	<i>TRGV3</i>	T cell receptor gamma variable 3	0,008
8101501	100131077	<i>OK/SW-CL.36</i>	OK/SW-CL.36	0,029
8136844	259285	<i>TAS2R39</i>	taste receptor, type 2, member 39	0,039
8142618	168433	<i>RNF133</i>	ring finger protein 133	0,006
8076584	150378	<i>FLJ30901</i>	hypothetical protein FLJ30901	0,017
7942647	387790	<i>LOC387790</i>	hypothetical LOC387790	0,024
7972217	10253	<i>SPRY2</i>	sprouty homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )	0,019
8071559	23753	<i>SDF2L1</i>	stromal cell-derived factor 2-like 1	0,012
8102998	2994	<i>GYPA</i>	glycophorin A (MNS blood group)	0,025

8148304	10221	<i>TRIB1</i>	tribbles homolog 1 (Drosophila)	0,049
8166714	347404	<i>LANCL3</i>	LanC lantibiotic synthetase component C-like 3 (bacterial)	0,033
7997192	3250	<i>HPR</i>	haptoglobin-related protein	0,026
8083260	1359	<i>CPA3</i>	carboxypeptidase A3 (mast cell)	0,04
8113666	57556	<i>SEMA6A</i>	sema domain, (semaphorin) 6A	0,008
8068891	400870	<i>FLJ41733</i>	FLJ41733 protein	0,042
8108697	26167	<i>PCDHB5</i>	protocadherin beta 5	0,036
8083652	100287290	<i>LOC100287290</i>	cytokine receptor CRL2	0,022
7976292	79890	<i>RIN3</i>	Ras and Rab interactor 3	0,004
7913896	7780	<i>SLC30A2</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2	0,021
7939865	119765	<i>OR4B1</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily B, member 1	0,01
8168855	158947	<i>ARMCX4</i>	armadillo repeat containing, X-linked 4	0,014
8119390	57497	<i>LRFN2</i>	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 2	0,013
7918757	163259	<i>DENND2C</i>	DENN/MADD domain containing 2C	0,026
8160511	54586	<i>C9orf11</i>	chromosome 9 open reading frame 11	0,014
8127087	2940	<i>GSTA3</i>	glutathione S-transferase alpha 3	0,033
7911229	343171	<i>OR2W3</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3	0,027
7911231	343171	<i>OR2W3</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3	0,027
7988050	9333	<i>TGM5</i>	transglutaminase 5	0,029
7897960	126767	<i>AADA3L3</i>	arylacetamide deacetylase-like 3	0,049
7989937	197021	<i>LCTL</i>	lactase-like	0,026
7987439	11245	<i>GPR176</i>	G protein-coupled receptor 176	0,027
7998666	6187	<i>SNORA64</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 64	0,019
8017671	146880	<i>LOC146880</i>	hypothetical LOC146880	0,014
7941610	246330	<i>PELI3</i>	pellino homolog 3 (Drosophila)	0,023
8041886	440863	<i>LOC440863</i>	hypothetical gene supported by AK026773	0,033
8085138	5021	<i>OXTR</i>	oxytocin receptor	0,016
8106411	170591	<i>S100Z</i>	S100 calcium binding protein Z	0,019
8155627	100133036	<i>FAM95B1</i>	family with sequence similarity 95, member B1	0,011
8161381	100133036	<i>FAM95B1</i>	family with sequence similarity 95, member B1	0,011
8129837	53832	<i>IL20RA</i>	interleukin 20 receptor, alpha	0,016
7985767	64782	<i>AEN</i>	apoptosis enhancing nuclease	0,007
8066559	259240	<i>WFDC9</i>	WAP four-disulfide core domain 9	0,022
8146527	387335	<i>T1560</i>	T1560 protein	0,024
8126066	23787	<i>MTCH1</i>	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)	0,006
8030768	3817	<i>KLK2</i>	kallikrein-related peptidase 2	0,036
8174670	57481	<i>KIAA1210</i>	KIAA1210	0,023
8010897	284207	<i>METRNL</i>	meteorin, glial cell differentiation regulator-like	0,047
8043902	79031	<i>PDCL3</i>	phosducin-like 3	0,025
8171624	10149	<i>GPR64</i>	G protein-coupled receptor 64	0,025
8035078	26539	<i>OR10H1</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 1	0,015
8159838	157983	<i>C9orf66</i>	chromosome 9 open reading frame 66	0,015

Tabla 7: Genes estimulados por glicoformas FR en células KGN

AffyID	EntrezID	Gen	Descripción	p
7988767	1588	<i>CYP19A1</i>	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	0
7981974	100033425	<i>SNORD116-13</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-13	0
8023910	284241	<i>FLJ25715</i>	hypothetical protein FLJ25715	0
8165672	5981	<i>RFC1</i>	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	0,05
8074364	23617	<i>DGCR14</i>	DiGeorge syndrome critical region gene 14	0
8035782	91120	<i>ZNF682</i>	zinc finger protein 682	0
8108713	56128	<i>PCDHB8</i>	protocadherin beta 8	0,019
8006602	6351	<i>CCL4</i>	chemokine (C-C motif) ligand 4	0,016
8102247	285456	<i>LOC285456</i>	hypothetical LOC285456	0,003
7992865	26184	<i>OR1F2P</i>	olfactory receptor, family 1, subfamily F, member 2	0,029
7937990	3047	<i>HBG1</i>	hemoglobin, gamma A	0,016
7937993	3048	<i>HBG2</i>	hemoglobin, gamma G	0,016
8010901	8447	<i>DOC2B</i>	double C2-like domains, beta	0,002
8116245	57396	<i>CLK4</i>	CDC-like kinase 4	0,006
7983638	56986	<i>DTWD1</i>	DTW domain containing 1	0,01
8171427	2277	<i>FIGF</i>	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	0,004
8162179	2619	<i>GAS1</i>	growth arrest-specific 1	0
8163273	26248	<i>OR2K2</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily K, member 2	0,005
8169083	644353	<i>ZCCHC18</i>	zinc finger, CCHC domain containing 18	0,001
8081657	4345	<i>CD200</i>	CD200 molecule	0,008
7960764	83758	<i>RBP5</i>	retinol binding protein 5, cellular	0,002
8150253	6770	<i>STAR</i>	steroidogenic acute regulatory protein	0,018
8103483	56884	<i>FSTL5</i>	follicle-stimulating-like 5	0,004
8027354	388524	<i>RPSAP58</i>	ribosomal protein SA pseudogene 58	0,04
7971126	161003	<i>STOML3</i>	stomatin (EPB72)-like 3	0,017
8113073	57561	<i>ARRDC3</i>	arrestin domain containing 3	0,014
8030871	79898	<i>ZNF613</i>	zinc finger protein 613	0,018
8070279	3763	<i>KCNJ6</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6	0,006
8113003	55338	<i>FLJ11292</i>	hypothetical protein FLJ11292	0,021
8122222	27115	<i>PDE7B</i>	phosphodiesterase 7B	0,003
8021081	6563	<i>SLC14A1</i>	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	0,011
7911271	127066	<i>OR14C36</i>	olfactory receptor, family 14, subfamily C, member 36	0,019
7945232	170689	<i>ADAMTS15</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 15	0,029
7925757	401992	<i>OR2T35</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 35	0,029
8005547	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,006
8005553	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,006
8013323	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,006
8013325	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,006
8013329	780854	<i>SNORD3A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 3A	0,006
7965403	4060	<i>LUM</i>	lumican	0,04
7920205	6700	<i>SPRR2A</i>	small proline-rich protein 2A	0,02
7951309	4322	<i>MMP13</i>	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	0,001
7999547	608	<i>TNFRSF17</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	0,003
7977771	26534	<i>OR10G2</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily G, member 2	0,013
7965245	400058	<i>MKRNP6</i>	makorin ring finger protein pseudogene 6	0,001
8178193	3122	<i>HLA-DRA</i>	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	0,029
7962489	84725	<i>PLEKHA9</i>	pleckstrin homology domain containing, family A member 9	0,007
7902810	8543	<i>LMO4</i>	LIM domain only 4	0,011
7982294	161725	<i>OTUD7A</i>	OTU domain containing 7A	0,047
8179481	3122	<i>HLA-DRA</i>	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	0,018
7908529	56956	<i>LHX9</i>	LIM homeobox 9	0,035
7968052	338872	<i>C1QTNF9</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 9	0,029
7909624	149647	<i>FAM71A</i>	family with sequence similarity 71, member A	0,001
8175432	26787	<i>SNORD61</i>	small nucleolar RNA, C/D box 61	0,049
7925751	127069	<i>OR2T10</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 10	0,019
7964142	319	<i>APOF</i>	apolipoprotein F	0,011
8038874	100132800	<i>FLJ30403</i>	hypothetical protein LOC729975	0,003
8077366	57633	<i>LRRN1</i>	leucine rich repeat neuronal 1	0,007
8047174	57181	<i>SLC39A10</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	0,029

8016540	162466	<i>PHOSPHO1</i>	phosphatase, orphan 1	0,016
7982010	100033437	<i>SNORD115-2</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-2	0,008
7949327	283129	<i>C11orf85</i>	chromosome 11 open reading frame 85	0,002
8043687	652726	<i>ANKRD36</i>	ankyrin repeat domain 36	0,013
7930205	729020	<i>hCG_2024410</i>	rcRPE	0,027
7947332	196294	<i>IMMP1L</i>	IMP1 inner mitochondrial membrane peptidase-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,036
8084895	200958	<i>MUC20</i>	mucin 20, cell surface associated	0,009
8120269	26268	<i>FBX09</i>	F-box protein 9	0,021
7991120	388165	<i>FLJ43276</i>	similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2Q 2	0,025
7904408	3284	<i>HSD3B2</i>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2	0,003
8071063	387590	<i>psiTPTE22</i>	TPTE pseudogene	0,004
8109995	401217	<i>FLJ40453</i>	hypothetical LOC401217	0,033
8065427	92086	<i>GGTLC1</i>	gamma-glutamyltransferase light chain 1	0,015
8054766	49	<i>ACR</i>	acrosin	0,044
8113071	729040	<i>LOC729040</i>	hypothetical LOC729040	0,003
8008716	55545	<i>MSX2P1</i>	msh homeobox 2 pseudogene 1	0,034
8071274	2812	<i>GP1BB</i>	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	0,002
7933933	56521	<i>DNAJC12</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	0,004
7940189	390199	<i>OR4D9</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 9	0,006
8170531	4103	<i>MAGEA4</i>	melanoma antigen family A, 4	0,013
8104617	391764	<i>LOC391764</i>	similar to TBP-associated factor 11	0,021
7969256	220115	<i>LOC220115</i>	TPTE and PTEN homologous inositol lipid phosphatase pseudogene	0,031
7949410	378938	<i>MALAT1</i>	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	0,045
8069150	386676	<i>KRTAP10-9</i>	keratin associated protein 10-9	0,005
8136654	54429	<i>TAS2R5</i>	taste receptor, type 2, member 5	0,04
8075164	11200	<i>CHEK2</i>	CHK2 checkpoint homolog ( <i>S. pombe</i> )	0,022
8169231	100293553	<i>LOC100293553</i>	similar to L-myc-2 protein	0,013
8076221	116937	<i>SNORD83A</i>	small nucleolar RNA, C/D box 83A	0,02
8146900	389668	<i>XKR9</i>	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 9	0,004
8011320	8385	<i>OR1D5</i>	olfactory receptor, family 1, subfamily D, member 5	0,03
7897280	390992	<i>HES3</i>	hairy and enhancer of split 3 ( <i>Drosophila</i> )	0,007
7982084	6638	<i>SNORD115-11</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-11	0,04
7919269	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,017
7919349	2946	<i>RNU1A</i>	RNA, U1A small nuclear	0,017
8030733	2854	<i>GPR32</i>	G protein-coupled receptor 32	0,02
8094789	22998	<i>LIMCH1</i>	LIM and calponin homology domains 1	0,007
7967318	338442	<i>NIACR1</i>	niacin receptor 1	0,028
8020844	80816	<i>ASXL3</i>	additional sex combs like 3 ( <i>Drosophila</i> )	0,016
7911276	254879	<i>OR2T6</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 6	0,023
7932864	119180	<i>LYZL2</i>	lysozyme-like 2	0,023
7953967	5554	<i>PRH2</i>	proline-rich protein HaeIII subfamily 2	0,022
7961285	259295	<i>TAS2R20</i>	taste receptor, type 2, member 20	0,045
7920252	6278	<i>S100A7</i>	S100 calcium binding protein A7	0,005
8018774	55808	<i>ST6GALNAC1</i>	ST6-N-acetylgalactosaminide $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1	0,034
8111417	51151	<i>SLC45A2</i>	solute carrier family 45, member 2	0,049
8064859	128674	<i>PROKR2</i>	prokineticin receptor 2	0,02
7948898	23642	<i>SNORD31</i>	small nucleolar RNA, C/D box 31	0,034
8069505	54094	<i>C21orf15</i>	chromosome 21 open reading frame 15	0,048
7928308	54541	<i>DDIT4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	0,015
8105084	730	<i>C7</i>	complement component 7	0,017
8069511	391267	<i>C21orf81</i>	ankyrin repeat domain 20 family, member A3 pseudogene	0,025
8091715	56925	<i>LXN</i>	latexin	0,003
7924863	84033	<i>OBSCN</i>	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	0,021
8149551	23362	<i>PSD3</i>	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	0,008
8026381	100129118	<i>LOC100129118</i>	similar to transmembrane protein 167A	0,036
8119525	387535	<i>HCRP1</i>	hepatocellular carcinoma-related HCRP1	0,021
7991469	283777	<i>FAM169B</i>	family with sequence similarity 169, member B	0,041
8111569	202151	<i>RANBP3L</i>	RAN binding protein 3-like	0,045
8133038	2551	<i>GABPA</i>	GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa	0,036
7950471	341152	<i>OR2AT4</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily AT, member 4	0,017
7963375	3890	<i>KRT84</i>	keratin 84	0,025
7930170	57412	<i>C10orf32</i>	chromosome 10 open reading frame 32	0,023
8131263	6077	<i>RNU13P2</i>	RNA, U13 small nuclear pseudogene 2	0,003
8134777	10734	<i>PVRIG</i>	poliovirus receptor related immunoglobulin domain containing	0,027
8146633	643763	<i>LOC643763</i>	hypothetical LOC643763	0,026

8005106	7577	<i>ZNF29</i>	zinc finger protein 29 pseudogene	0,049
7921821	9507	<i>ADAMTS4</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4	0,007
7961440	79887	<i>PLBD1</i>	phospholipase B domain containing 1	0,032
7982012	100033440	<i>SNORD115-3</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-3	0,018
7981732	100289944	<i>VSIG6</i>	V-set and immunoglobulin domain containing 6	0,008
8054209	129530	<i>LYG1</i>	lysozyme G-like 1	0,005
7982094	100033818	<i>SNORD115-44</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-44	0,017
7924712	286826	<i>LIN9</i>	lin-9 homolog (C. elegans)	0,024
8066493	6590	<i>SLPI</i>	secretory leukocyte peptidase inhibitor	0,022
8013567	201229	<i>LOC201229</i>	hypothetical protein LOC201229	0,034
8050844	100131510	<i>LOC100131510</i>	hypothetical LOC100131510	0,042
8069146	386675	<i>KRTAP10-7</i>	keratin associated protein 10-7	0,04
7991546	204219	<i>LASS3</i>	LAG1 homolog, ceramide synthase 3	0,004
8106597	84654	<i>SPZ1</i>	spermatogenic leucine zipper 1	0,002
7915204	728448	<i>LOC728448</i>	peptidylprolyl isomerase E pseudogene	0,015
8003566	750	<i>C16orf3</i>	chromosome 16 open reading frame 3	0,03
8124547	81697	<i>OR2B2</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 2	0,012
8108287	7478	<i>WNT8A</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 8A	0,01
7970676	387914	<i>SHISA2</i>	shisa homolog 2 (Xenopus laevis)	0,008
8161945	158158	<i>RASEF</i>	RAS and EF-hand domain containing	0,02
8003619	100131454	<i>ELP2P</i>	endozepine-like peptide 2 pseudogene	0,04
7927173	220992	<i>ZNF485</i>	zinc finger protein 485	0,005
7960984	5858	<i>PZP</i>	pregnancy-zone protein	0,009
8159732	643210	<i>FLJ40292</i>	hypothetical LOC643210	0,01
7946853	3767	<i>KCNJ11</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	0,009
7937007	642938	<i>C10orf141</i>	chromosome 10 open reading frame 141	0,008
7908347	10896	<i>OCLM</i>	oculomedin	0,046
8159017	169436	<i>C9orf96</i>	chromosome 9 open reading frame 96	0,049
7922414	60674	<i>SNORD76</i>	small nucleolar RNA, C/D box 76	0,029
7970806	728437	<i>hCG_2020170</i>	hCG2020170	0,037
8012753	4620	<i>MYH2</i>	myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult	0,044
8122982	79683	<i>ZDHC14</i>	zinc finger, DHC-type containing 14	0,014
8061272	26074	<i>C20orf26</i>	chromosome 20 open reading frame 26	0,005
8134026	442523	<i>DPY19L2P4</i>	dpy-19-like 2 pseudogene 4 (C. elegans)	0,007
8055194	112714	<i>TUBA3E</i>	tubulin, alpha 3e	0,047
8057480	4760	<i>NEUROD1</i>	neurogenic differentiation 1	0,01
8076223	6122	<i>SNORD43</i>	small nucleolar RNA, C/D box 43	0,022
8120124	222611	<i>GPR111</i>	G protein-coupled receptor 111	0,01
8141661	100134674	<i>LOC100134674</i>	similar to Mucin-3A precursor (Intestinal mucin-3A)	0,02
7924058	3664	<i>IRF6</i>	interferon regulatory factor 6	0,03
8049471	57007	<i>CXCR7</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 7	0,036
7942603	80168	<i>MOGAT2</i>	monoacylglycerol O-acyltransferase 2	0,009
7946142	112464	<i>PRKCDBP</i>	protein kinase C, delta binding protein	0,014
8030974	646508	<i>LOC646508</i>	hypothetical LOC646508	0,041
7916785	10022	<i>INSL5</i>	insulin-like 5	0,012
7946330	390093	<i>OR10A6</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily A, member 6	0,006
7963471	319101	<i>KRT73</i>	keratin 73	0,006
8116494	643836	<i>ZFP62</i>	zinc finger protein 62 homolog (mouse)	0,044
8022412	4158	<i>MC2R</i>	melanocortin 2 receptor (adrenocorticotrophic hormone)	0,013
7977450	79334	<i>OR11H1</i>	olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 1	0,029
8126244	57497	<i>LRFN2</i>	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 2	0,035
8176644	9087	<i>TMSB4Y</i>	thymosin beta 4, Y-linked	0,017
7970597	400110	<i>FLJ46358</i>	FLJ46358 protein	0,048
7978343	1215	<i>CMA1</i>	chymase 1, mast cell	0,029
8091922	151790	<i>WDR49</i>	WD repeat domain 49	0,024

Tabla 8: Genes inhibidos por glicofomas FR en células KGN

AffyID	EntrezID	Gen	Descripción	p
7999588	8399	<i>PLA2G10</i>	phospholipase A2, group X	0
8137526	3638	<i>INSIG1</i>	insulin induced gene 1	0,042
8067836	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,005



7903358	7412	<i>VCAM1</i>	vascular cell adhesion molecule 1	0,047
8075310	91370	<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	0,003
8001918	6236	<i>RRAD</i>	Ras-related associated with diabetes	0
8131803	3569	<i>IL6</i>	interleukin 6 (interferon, beta 2)	0,034
8022436	246705	<i>C21orf94</i>	chromosome 21 open reading frame 94	0,001
7912582	400735	<i>PRAMEF5</i>	PRAME family member 5	0
8156571	84909	<i>C9orf3</i>	chromosome 9 open reading frame 3	0,045
8164848	286310	<i>LCN1L1</i>	lipocalin 1-like 1	0,02
8065242	29075	<i>HSPC072</i>	hypothetical LOC29075	0,025
7976812	767564	<i>SNORD113-4</i>	small nucleolar RNA, C/D box 113-4	0,029
7977782	79549	<i>OR6J1</i>	olfactory receptor, family 6, subfamily J, member 1	0,005
8077441	8553	<i>BHLHE40</i>	basic helix-loop-helix family, member e40	0,002
8150698	6591	<i>SNAI2</i>	snail homolog 2 (Drosophila)	0,007
8082583	442092	<i>UNQ6125</i>	hypothetical LOC442092	0,028
8065630	284805	<i>LOC284805</i>	hypothetical LOC284805	0,023
8110018	51121	<i>RPL26L1</i>	ribosomal protein L26-like 1	0,008
8156573	84909	<i>C9orf3</i>	chromosome 9 open reading frame 3	0,011
8116174	64396	<i>GMCL1L</i>	germ cell-less homolog 1 (Drosophila)-like	0,013
8027330	84108	<i>PCGF6</i>	polycomb group ring finger 6	0,006
7905581	6271	<i>S100A1</i>	S100 calcium binding protein A1	0,029
7900146	80149	<i>ZC3H12A</i>	zinc finger CCCH-type containing 12A	0,015
7945801	677833	<i>SNORA54</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 54	0,044
8128837	728464	<i>C6orf186</i>	chromosome 6 open reading frame 186	0,014
8149320	157740	<i>LOC157740</i>	hypothetical protein C8orf9	0,02
8142814	611	<i>OPN1SW</i>	opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive	0,009
7946006	401663	<i>OR51H1P</i>	olfactory receptor, family 51, subfamily H, member 1 pseudogene	0,005
7930413	1847	<i>DUSP5</i>	dual specificity phosphatase 5	0,014
7924996	84886	<i>C1orf198</i>	chromosome 1 open reading frame 198	0,001
8157446	5004	<i>ORM1</i>	orosomucoid 1	0,01
7999909	51704	<i>GPRC5B</i>	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	0,002
8054511	205251	<i>NCRNA00116</i>	non-protein coding RNA 116	0,03
8074734	284861	<i>LOC284861</i>	hypothetical LOC284861	0,038
7952810	22997	<i>IGSF9B</i>	immunoglobulin superfamily, member 9B	0,034
7960828	9573	<i>GDF3</i>	growth differentiation factor 3	0,001
8104901	3575	<i>IL7R</i>	interleukin 7 receptor	0,012
8103094	4306	<i>NR3C2</i>	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	0
7981951	100033414	<i>SNORD116-2</i>	small nucleolar RNA, C/D box 116-2	0,033
7998898	9074	<i>CLDN6</i>	claudin 6	0,047
7958565	4598	<i>MVK</i>	mevalonate kinase	0,011
8031566	100132178	<i>LOC100132178</i>	similar to hCG2008275	0,034
7925759	403239	<i>OR2T27</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 27	0,024
7963203	121006	<i>FAM186A</i>	family with sequence similarity 186, member A	0,001
8025828	3949	<i>LDLR</i>	low density lipoprotein receptor	0,046
7934993	119369	<i>NUDT9P1</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 9 pseudogene 1	0,016
8122756	57480	<i>PLEKHG1</i>	pleckstrin homology domain containing, family G member 1	0,005
8058591	33	<i>ACADL</i>	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain	0,011
7943240	143689	<i>PIWIL4</i>	piwi-like 4 (Drosophila)	0,012
7979904	145241	<i>ADAM21</i>	ADAM metallopeptidase domain 21	0,023
8082643	79858	<i>NEK11</i>	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 11	0,006
7964665	283417	<i>DPY19L2</i>	dpy-19-like 2 (C. elegans)	0,006
7977270	388022	<i>LOC388022</i>	hypothetical gene supported by AK131040	0,008
7993339	100129038	<i>LOC100129038</i>	PRO2812	0,003
7971922	5101	<i>PCDH9</i>	protocadherin 9	0,012
7979483	317761	<i>C14orf39</i>	chromosome 14 open reading frame 39	0,042
7966150	54434	<i>SSH1</i>	slingshot homolog 1 (Drosophila)	0,002
7950030	2249	<i>FGF4</i>	fibroblast growth factor 4	0,021
7960900	26253	<i>CLEC4E</i>	C-type lectin domain family 4, member E	0,001
8121727	23629	<i>BRD7P3</i>	bromodomain containing 7 pseudogene 3	0,002
8138718	3199	<i>HOXA2</i>	homeobox A2	0,019
7951662	1410	<i>CRYAB</i>	crystallin, alpha B	0,033
7982034	100033451	<i>SNORD115-14</i>	small nucleolar RNA, C/D box 115-14	0,01
8115210	10318	<i>TNIP1</i>	TNFAIP3 interacting protein 1	0,003
8116086	79930	<i>DOK3</i>	docking protein 3	0,031
8051573	10602	<i>CDC42EP3</i>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	0,002
8065278	643659	<i>hCG_2019139</i>	hCG2019139	0,045

7973016	79544	<i>OR4K1</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily K, member 1	0,028
7993726	54988	<i>ACSM5</i>	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5	0,011
8028652	7538	<i>ZFP36</i>	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	0,044
7942896	220047	<i>CCDC83</i>	coiled-coil domain containing 83	0,001
7961249	50839	<i>TAS2R10</i>	taste receptor, type 2, member 10	0,01
8002992	123775	<i>C16orf46</i>	chromosome 16 open reading frame 46	0,008
8035078	26539	<i>OR10H1</i>	olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 1	0,002
8053266	6869	<i>TACR1</i>	tachykinin receptor 1	0,02
7939928	81300	<i>OR4P4</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily P, member 4	0,009
7964548	4234	<i>METTL1</i>	methyltransferase like 1	0,002
8031646	386759	<i>LOC100288114</i>	hypothetical protein LOC100288114	0,042
8141342	1551	<i>CYP3A7</i>	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	0,024
8146500	4067	<i>LYN</i>	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	0,03
8039574	342933	<i>ZSCAN5B</i>	zinc finger and SCAN domain containing 5B	0,035
8101031	8999	<i>CDKL2</i>	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)	0,036
7918379	2947	<i>GSTM3</i>	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	0,003
8152759	83940	<i>TATDN1</i>	TatD DNase domain containing 1	0,011
8074853	129025	<i>ZNF280A</i>	zinc finger protein 280A	0,002
8003056	100130322	<i>GFA2</i>	FGF-2 activity-associated protein 2	0,032
8151824	25788	<i>RAD54B</i>	RAD54 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,001
7940187	219986	<i>OR4D11</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 11	0,021
8027876	10430	<i>TMEM147</i>	transmembrane protein 147	0,033
7947490	51074	<i>APIP</i>	APAF1 interacting protein	0,015
8085138	5021	<i>OXTR</i>	oxytocin receptor	0,004
7976810	767563	<i>SNORD113-3</i>	small nucleolar RNA, C/D box 113-3	0,003
7933855	219790	<i>RTKN2</i>	rhotekin 2	0,016
8017344	100129112	<i>LOC100129112</i>	hypothetical protein LOC100129112	0,011
7901212	7388	<i>UQCRH</i>	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	0,019
8043902	79031	<i>PDCL3</i>	phosducin-like 3	0,007
7955135	255411	<i>LOC255411</i>	hypothetical LOC255411	0,043
8117718	442186	<i>OR2J3</i>	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 3	0,044
8121768	5570	<i>PKIB</i>	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	0,034
8146527	387335	<i>T1560</i>	T1560 protein	0,008
7961532	397	<i>ARHGDI3</i>	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	0,029
7987145	342184	<i>FMN1</i>	formin 1	0,03
7976073	23768	<i>FLRT2</i>	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	0,004
8048112	402117	<i>VWC2L</i>	von Willebrand factor C domain-containing protein 2-like	0,043
7977933	23428	<i>SLC7A8</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	0,002
7973298	28683	<i>TRAV8-3</i>	T cell receptor alpha variable 8-3	0,046
8083569	25976	<i>TIPARP</i>	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	0,038
8017057	284083	<i>C17orf47</i>	chromosome 17 open reading frame 47	0,006
8126853	442213	<i>C6orf138</i>	chromosome 6 open reading frame 138	0,005
8015268	3885	<i>KRT34</i>	keratin 34	0,003
7974461	3958	<i>LGALS3</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	0,01
8053417	822	<i>CAPG</i>	capping protein (actin filament), gelsolin-like	0,006
8083887	5010	<i>CLDN11</i>	claudin 11	0,036
8088106	7086	<i>TKT</i>	transketolase	0,009
8178435	8870	<i>IER3</i>	immediate early response 3	0,002
8100994	2920	<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	0,015
7957673	643619	<i>C12orf55</i>	chromosome 12 open reading frame 55	0,006
7966026	9891	<i>NUAK1</i>	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	0,005
8113050	1070	<i>CETN3</i>	centrin, EF-hand protein, 3 (CDC31 homolog, yeast)	0,035
8149825	6781	<i>STC1</i>	stanniocalcin 1	0,039
8027402	898	<i>CCNE1</i>	cyclin E1	0,003
7971813	55901	<i>THSD1</i>	thrombospondin, type I, domain containing 1	0,017
8046020	6326	<i>SCN2A</i>	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit	0,044
8099965	344967	<i>ACOT7</i>	acyl-CoA thioesterase 7	0,042
7961239	50837	<i>TAS2R7</i>	taste receptor, type 2, member 7	0,011
8109039	408187	<i>SPINK5L2</i>	Kazal type serine protease inhibitor 5-like 2	0,039
7939900	283092	<i>OR4C13</i>	olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 13	0,035
7902721	1179	<i>CLCA1</i>	chloride channel accessory 1	0,024
8118622	7923	<i>HSD17B8</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	0,007
8178234	7923	<i>HSD17B8</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	0,007
8179534	7923	<i>HSD17B8</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	0,007
7973306	63874	<i>ABHD4</i>	abhydrolase domain containing 4	0,002

8080138	389123	<i>IQCF2</i>	IQ motif containing F2	0,041
7901054	1263	<i>PLK3</i>	polo-like kinase 3 (Drosophila)	0,013
7946326	120066	<i>OR5P3</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 3	0,042
7939007	338645	<i>LUZP2</i>	leucine zipper protein 2	0,003
8003922	400569	<i>MED11</i>	mediator complex subunit 11	0,013
7939977	219473	<i>OR8K3</i>	olfactory receptor, family 8, subfamily K, member 3	0,003
7983630	2252	<i>FGF7</i>	fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)	0,008
8156610	22927	<i>HABP4</i>	hyaluronan binding protein 4	0,011
8066559	259240	<i>WFDC9</i>	WAP four-disulfide core domain 9	0,012
8130582	6582	<i>SLC22A2</i>	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	0,034
8052058	3973	<i>LHCGR</i>	luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor	0,024
8017547	3384	<i>ICAM2</i>	intercellular adhesion molecule 2	0,016
8054192	129531	<i>MITD1</i>	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1	0,027
8003804	8383	<i>OR1A1</i>	olfactory receptor, family 1, subfamily A, member 1	0,007
8127854	4199	<i>ME1</i>	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	0,044
7990971	64506	<i>CPEB1</i>	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1	0,016
8121225	2898	<i>GRIK2</i>	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	0,008
8176234	1193	<i>CLIC2</i>	chloride intracellular channel 2	0,012
8122457	8676	<i>STX11</i>	syntaxin 11	0,011
7971296	94240	<i>EPSTI1</i>	epithelial stromal interaction 1 (breast)	0,003
8123080	94120	<i>SYTL3</i>	synaptotagmin-like 3	0,013
8125134	3305	<i>HSPA1L</i>	heat shock 70kDa protein 1-like	0,009
8178650	3305	<i>HSPA1L</i>	heat shock 70kDa protein 1-like	0,009
8179848	3305	<i>HSPA1L</i>	heat shock 70kDa protein 1-like	0,009
8173176	139629	<i>RP11-167P23.2</i>	XAGE-4 protein	0,033
8026388	26658	<i>OR7C2</i>	olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 2	0,01
7921434	9447	<i>AIM2</i>	absent in melanoma 2	0,037
8105456	133383	<i>C5orf35</i>	chromosome 5 open reading frame 35	0,042
8151334	9242	<i>MSC</i>	musculin (activated B-cell factor-1)	0,002
7936925	399821	<i>FLJ37035</i>	FLJ37035 protein	0,015
7950235	10809	<i>STARD10</i>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10	0,008
8166714	347404	<i>LANCL3</i>	LanC lantibiotic synthetase component C-like 3 (bacterial)	0,029
8143221	50617	<i>ATP6V0A4</i>	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a4	0,019
8052524	100124537	<i>SNORA70B</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 70B (retrotransposed)	0,028
8100827	3512	<i>IGJ</i>	immunoglobulin J polypeptide	0,03
8008172	124872	<i>B4GALNT2</i>	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2	0,041
8128553	11149	<i>BVES</i>	blood vessel epicardial substance	0,006
8021245	1630	<i>DCC</i>	deleted in colorectal carcinoma	0,023
8161739	138240	<i>C9orf57</i>	chromosome 9 open reading frame 57	0,039
7909214	83593	<i>RASSF5</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5	0,013
8050591	91942	<i>NDUFAF2</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 2	0,004
8121729	5350	<i>PLN</i>	phospholamban	0,013
8004266	201232	<i>SLC16A13</i>	solute carrier family 16, member 13 (monocarboxylic acid transporter 13)	0,044
7921916	8490	<i>RGS5</i>	regulator of G-protein signaling 5	0,027
7937946	143502	<i>OR52I2</i>	olfactory receptor, family 52, subfamily I, member 2	0,036
7908841	4660	<i>PPP1R12B</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	0,005
8017843	9120	<i>SLC16A6</i>	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)	0,014
8060395	9751	<i>RAD21L1</i>	RAD21-like 1 (S. pombe)	0,033
8005707	5606	<i>MAP2K3</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 3	0,006
7902687	3491	<i>CYR61</i>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	0,029
8065569	598	<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1	0,028
7957508	574028	<i>CLLU1</i>	chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1	0,008
7964907	5801	<i>PTPRR</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	0,006
8146756	79848	<i>CSPP1</i>	centrosome and spindle pole associated protein 1	0,021
7945033	160065	<i>PATE1</i>	prostate and testis expressed 1	0,049
7987439	11245	<i>GPR176</i>	G protein-coupled receptor 176	0,024
8020973	80206	<i>FHOD3</i>	formin homology 2 domain containing 3	0,005
7902227	1647	<i>GADD45A</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	0,027
8135697	56311	<i>ANKRD7</i>	ankyrin repeat domain 7	0,014
7965343	8693	<i>WDR51B</i>	WD repeat domain 51B	0,025
7993776	81691	<i>LOC81691</i>	exonuclease NEF-sp	0,02
8033349	497049	<i>FLJ25758</i>	hypothetical locus FLJ25758	0,039
8051241	238	<i>ALK</i>	anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase	0,011
7920244	6279	<i>S100A8</i>	S100 calcium binding protein A8	0,018
8124897	100130889	<i>PSORS1C3</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (non-protein coding)	0,029



7938702	374383	<i>DKFZp686O24166</i>	hypothetical protein DKFZp686O24166	0,008
8179727	100130889	<i>PSORS1C3</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (non-protein coding)	0,029
7906919	5999	<i>RGS4</i>	regulator of G-protein signaling 4	0,023
8103728	3148	<i>HMGB2</i>	high-mobility group box 2	0,008
7899627	64129	<i>TINAGL1</i>	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	0,012
8097753	166614	<i>DCLK2</i>	doublecortin-like kinase 2	0,014
8166571	158809	<i>MAGEB6</i>	melanoma antigen family B, 6	0,039
8047784	57683	<i>ZDBF2</i>	zinc finger, DBF-type containing 2	0,035
8114572	1839	<i>HBEGF</i>	heparin-binding EGF-like growth factor	0,031
8015179	81851	<i>KRTAP1-5</i>	keratin associated protein 1-5	0,006
8019588	81851	<i>KRTAP1-5</i>	keratin associated protein 1-5	0,006
8099476	8842	<i>PROM1</i>	prominin 1	0,016
7909478	27042	<i>C1orf107</i>	chromosome 1 open reading frame 107	0,019
8173444	3561	<i>IL2RG</i>	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	0,013
8040456	343930	<i>MSGN1</i>	mesogenin 1	0,016
8151471	7163	<i>MRPS28</i>	mitochondrial ribosomal protein S28	0,019
7913667	2582	<i>GALE</i>	UDP-galactose-4-epimerase	0,007
8151898	157657	<i>C8orf37</i>	chromosome 8 open reading frame 37	0,029
7921014	4209	<i>MEF2D</i>	myocyte enhancer factor 2D	0,009
8134552	653888	<i>ARPC1B</i>	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	0,015
7936637	641451	<i>SNORA19</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 19	0,046
7978360	2999	<i>GZMH</i>	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	0,011
7989915	54962	<i>TIPIN</i>	TIMELESS interacting protein	0,018
7913566	3352	<i>HTR1D</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D	0,039
7955562	94	<i>ACVRL1</i>	activin A receptor type II-like 1	0,016
7979444	729665	<i>C14orf38</i>	chromosome 14 open reading frame 38	0,033
7976292	79890	<i>RIN3</i>	Ras and Rab interactor 3	0,005
7918751	163259	<i>DENND2C</i>	DENN/MADD domain containing 2C	0,023



# HOSPITAL GENERAL DE NIÑOS

**Dr. RICARDO GUTIERREZ** FUNDADO EN 1875.

ASOCIADO A LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
**COMITÉ DE DOCENCIA E INVESTIGACION**

---

Buenos Aires, 14 de abril de 2008

Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez  
Endocrinología  
Dra. Stella Campo  
S/D

El Comité de Docencia e Investigación ha evaluado el protocolo “¿Alteración prematura de la microheterogeneidad molecular de la FSH: otra posible causa de infertilidad de la mujer?” y considera que es un protocolo bien diseñado y de gran utilidad en función de los objetivos que plantea. El protocolo cumple con las condiciones técnicas y éticas para desarrollarse en este hospital y se enmarca dentro de las normas de Buenas Prácticas Clínicas (GCP'S).

Quedamos a su disposición y la saludamos atentamente

Dra. Noemí A. Rivas  
Secretaria a cargo  
Comité de Docencia e Investigación

**HOSPITAL DE NIÑOS RICARDO GUTIÉRREZ  
COMITÉ DE BIOÉTICA  
Subcomité de Investigación**

Gallo 1330 – CABA- CP 1425 - Buenos Aires- Argentina  
Tel. directo 4962- 2946



Buenos Aire 12 de marzo de 2008

**Resolución del Comité de Bioética, Subcomité de Investigación, sobre: proyecto nuevo; información y consentimiento informado y/o aviso de reclutamiento.**

**Título Protocolo: " Alteración prematura de la microheterogeneidad molecular de la FSH: otra posible causa de infertilidad en la mujer?"**

**# Protocolo CB : 08-009**

**Investigador Principal: Dra.Stella Campo.**

**Patrocinador: -----**

**Documentos revisados.**

Proyecto de investigación. No datado.

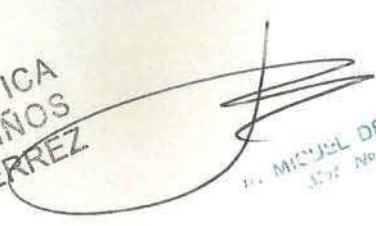
Consentimiento informado para las participantes. No datado.

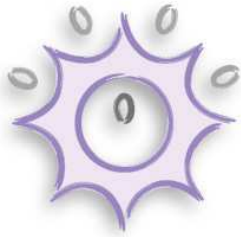
Dra. Stella Campo.  
CEDEI HNRG

De nuestra consideración:

Luego de haber revisado los documentos arriba mencionados, en la reunión del día de la fecha, nos dirigimos a UD en su carácter de presentadora del proyecto, para informarle que el Comité ha evaluado y aprobado el mismo para que sea realizado en nuestra Institución. Saludamos a UD atte.

COMITE de BIOETICA  
HOSPITAL de NIÑOS  
RICARDO GUTIERREZ

  
Dr. MIGUEL DEL VALLE  
C.E.I. No 41877



En Buenos Aires, a los .....días del mes de .....del año 20...,  
.....DNI.....estoy en total  
acuerdo en participar en el proyecto de investigación titulado: ***“Alteraciones  
preexistentes en la biopotencia de la FSH podrían condicionar el éxito de los  
procedimientos de reproducción asistida”*** ya que mi voluntad es acceder a un  
procedimiento de Fecundación “in vitro” en el Instituto Fecunditas.

Se me ha explicado que este proyecto tiene la finalidad de analizar las  
características de la hormona Folículo Estimulante (FSH) que está presente  
en suero durante la primera fase del ciclo menstrual y, como su nombre lo  
indica, está directamente involucrada en el desarrollo y maduración de los  
folículos ováricos en los cuales se formará un óvulo en condiciones de ser  
fertilizado y formará, posteriormente, un embrión.

Para participar en el proyecto, tendré que colaborar con dos extracciones de  
sangre, las cuales se efectuarán en los días +2 y +9 de mi ciclo menstrual. En  
las muestras se medirán las concentraciones de diferentes hormonas (FSH,  
LH y Estradiol) y se determinarán las características de la hormona Folículo  
Estimulante. Los resultados de las mediciones serán comparados con los  
resultados del procedimiento de Fecundación in vitro. Por lo tanto, entiendo  
que participaré voluntariamente en el proyecto, sin recibir beneficio alguno,  
comprendiendo que los adelantos en medicina en parte se deben a este tipo de  
investigaciones.

Se me ha explicado la posibilidad de retirarme del estudio en cualquiera de  
las etapas y que ello no afectará en nada la relación con la Institución.

Firma:  
DNI