



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 06 de Octubre de 2020

No. Oficio CICUAL – 121-2020

DR. ALFREDO ULLOA AGUIRRE
RED DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E

Estimado Dr. Ulloa

Este comité ha dictaminado que se RECIBE Y ACEPTA el cierre de su proyecto intitulado “Agonismo selectivo de las isoformas y recombinantes de la folitropina humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas *in vivo* e *in vitro* homólogos y heterólogos” con clave CINVA-RAI-1864-16/19-1. En caso de tener alguna duda o comentario, se lo haremos saber.

Sin más por el momento quedo de usted para cualquier duda o comentario

ATENTAMENTE

DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN
COORDINADOR DEL COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO
DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Ccp. MVZ. Mariela G. Contreras Escamilla- Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

JABP/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 www.incmnsz.mx



2020
LEONORA VICARIO
PRESIDENTE ELECTA DE LA ESCUELA





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México., a 17 de Agosto del 2020

DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN
COORDINADOR DEL CICUAL
PRESENTE

Estimado Dr. Barrios:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo "___AGONISMO SELECTIVO DE LAS ISOFORMAS Y RECOMBINANTES DE LA FOLITROPINA HUMANA. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y TRANSCRIPTÓMICOS EN SISTEMAS IN VIVO E IN VITRO HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS._" con registro CINVA o CICUAL: INVA-RAI-1864-16/19-1, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE,

Nombre, Firma y Área del (a) Investigador (a)



In Vitro Impact of FSH Glycosylation Variants on FSH Receptor-stimulated Signal Transduction and Functional Selectivity

Teresa Zariñán,¹ Viktor Y. Butnev,² Rubén Gutiérrez-Sagal,¹
 José Luis Maravillas-Montero,¹ Iván Martínez-Luis,¹ Nancy R. Mejía-Domínguez,¹
 Guillermo Juárez-Vega,¹ George R. Bousfield,² and Alfredo Ulloa-Aguirre,¹

¹Red de Apoyo a la Investigación (RAI), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)-Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City 14000, Mexico; and ²Department of Biological Sciences, Wichita State University, Wichita, Kansas 67260, USA

ORCID numbers: 0000-0002-9532-3886 (A. Ulloa-Aguirre).

FSH exists as different glycoforms that differ in glycosylation of the hormone-specific β -subunit. Tetra-glycosylated FSH (FSH²⁴) and hypo-glycosylated FSH (FSH^{18/21}) are the most abundant glycoforms found in humans. Employing distinct readouts in HEK293 cells expressing the FSH receptor, we compared signaling triggered by human pituitary FSH preparations (FSH^{18/21} and FSH²⁴) as well as by equine FSH (eFSH), and human recombinant FSH (recFSH), each exhibiting distinct glycosylation patterns. The potency in eliciting cAMP production was greater for eFSH than for FSH^{18/21}, FSH²⁴, and recFSH, whereas in the ERK1/2 activation readout, potency was highest for FSH^{18/21} followed by eFSH, recFSH, and FSH²⁴. In β -arrestin1/2 CRISPR/Cas9 HEK293-KO cells, FSH^{18/21} exhibited a preference toward β -arrestin-mediated ERK1/2 activation as revealed by a drastic decrease in pERK during the first 15-minute exposure to this glycoform. Exposure of β -arrestin1/2 KO cells to H89 additionally decreased pERK1/2, albeit to a significantly lower extent in response to FSH^{18/21}. Concurrent silencing of β -arrestin and PKA signaling, incompletely suppressed pERK response to FSH glycoforms, suggesting that pathways other than those dependent on Gs-protein and β -arrestins also contribute to FSH-stimulated pERK1/2. All FSH glycoforms stimulated intracellular Ca²⁺ (iCa²⁺) accumulation through both influx from Ca²⁺ channels and release from intracellular stores; however, iCa²⁺ in response to FSH^{18/21} depended more on the latter, suggesting differences in mechanisms through which glycoforms promote iCa²⁺ accumulation. These data indicate that FSH glycosylation plays an important role in defining not only the intensity but also the functional selectivity for the mechanisms leading to activation of distinct signaling cascades.

© Endocrine Society 2020.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com.

Key Words: follicle-stimulating hormone, follicle-stimulating hormone receptor, macroheterogeneity, glycosylation, signal transduction, functional selectivity, biased agonism

FSH, or follitropin, is synthesized and secreted by the anterior pituitary gland in multiple molecular forms that vary in oligosaccharide number and type of carbohydrate moieties attached to the protein core [1, 2]. This gonadotropin is composed of 2 subunits associated through noncovalent interactions: an α -subunit, which is common to all glycoprotein

Abbreviations: AUC, area under the curve; eFSH, equine FSH; Emax, dose necessary to reach maximal cAMP production; FSHR, FSH receptor; hFSH, human FSH; hFSHR, human FSH receptor; IBMX, 3-isobutyl-methyl-xantine; iCa²⁺, intracellular Ca²⁺; KD, equilibrium dissociation constant; MAb, monoclonal antibody; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; recFSH, recombinant FSH; WB, Western blot

Received 27 November 2019
 Accepted 14 February 2020
 First Published Online 18 February 2020
 Corrected and Typeset 21 April 2020

May 2020 | Vol. 4, Iss. 5
 doi: 10.1210/endo/bvaa019 | Journal of the Endocrine Society | 1–23

hormones (LH, chorionic gonadotropin, and TSH) and a FSH β -subunit, which confers specificity to the gonadotropin [3]. In the human FSH (hFSH) heterodimer, 4 Asn residues, α N52, α N78, β N7, and β N24 are targets for N-linked glycosylation (Fig. 1) [4]. Oligosaccharide heterogeneity in glycoprotein hormones comes in 2 forms, macroheterogeneity, which results from the absence of 1 or more oligosaccharide chains from a hormone variant [5–8], and microheterogeneity resulting from variations in the type of carbohydrates comprising the oligosaccharide populations attached to the protein core of the hormone [9–14]. In general, oligosaccharides on the β -subunit play a major role in determining the circulatory half-life

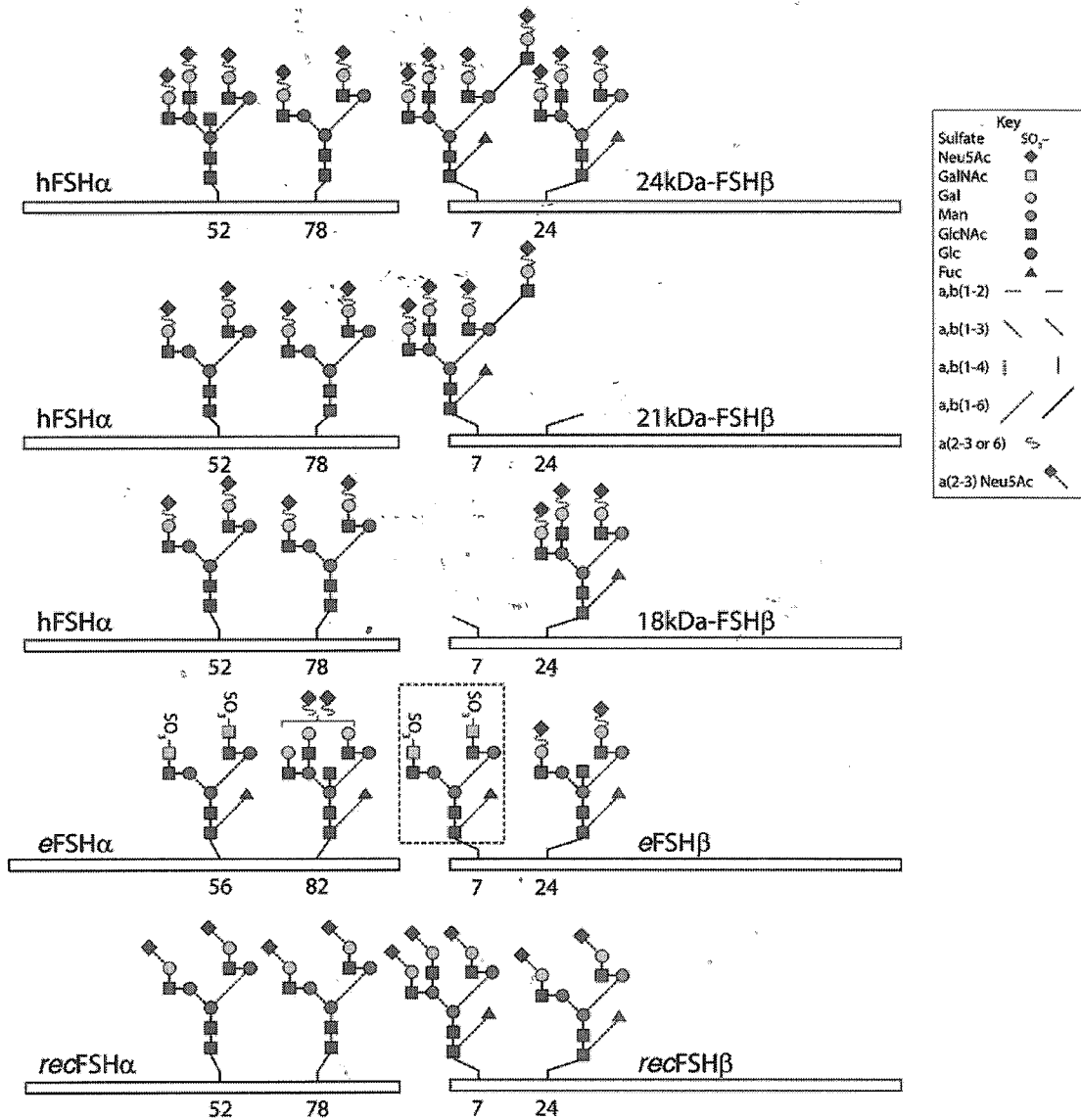


Figure 1. Typical glycans attached to human pituitary FSH, human recombinant FSH produced by Chinese hamster ovary cells (*recFSH*) glycoforms, and equine FSH (*eFSH*). The bars indicate the common- α and hormone-specific FSH β subunits. N-glycosylation sites are indicated by the numbers below the bars. The *eFSH* α subunit has 4 additional residues at the N-terminus, accounting for the difference in numbering. The glycan at position β 7 in *eFSH* (dotted area) is absent from 90% of the molecules present in highly purified preparations [34]. Glycans attached to *recFSH* were taken from the report by Mastrangeli et al [104]. Note that glycans at the α subunit of FSH^{18/21} are in fact smaller (*i.e.* biantennary) than those present in FSH²⁴, which account for the different migration profiles of FSH^{18/21} shown in Fig. 2D.

glucose levels & HbA1c in the stressed were significantly higher compared to control ($p < 0.001$). Serum lipids were found insignificantly higher in stressed mice compared to control. Body weights of the stressed mice and feed efficiency ratio were found significant ($p < 0.001$). Plasma corticosterone, plasma epinephrine, HOMA-IR was found to be significantly higher in the stressed group ($p < 0.001$). Plasma insulin level was found to be significantly lower in the stressed group ($p < 0.001$). Significant changes were observed in antioxidants level, carbohydrate metabolizing enzymes activity, peripheral tissues and DNA integrity. Expression of IL-4, IL-6 was found significantly higher in the stressed group. **Conclusions:** CUES initiates pathogenesis of diabetes.

Neuroendocrinology and Pituitary CASE REPORTS IN UNUSUAL PATHOLOGIES IN THE PITUITARY

A Rare Case of Atypical Rhabdoid Teratoid Tumour with Germinoma Differentiation in a 59 Year Old Woman

Melissa-Rosina Pasqua, BSc, MD¹, Huda Altoukhi, MD¹, Valerie Panet-Raymond, MD¹, Denis Sirhan, MD¹, Jason Karamchandani, MD¹, Natasha Garfield, MD, FRCP², Marie-Christine Guiot, MD³.

¹McGill University, Montreal, QC, Canada, ²McGill Univ Hlth Ctr, Montreal, QC, Canada, ³Montreal Neurological Institute, Montreal, QC, Canada.

SUN-279

Atypical teratoid/rhabdoid tumours (ATRT) are a rare class of central nervous system malignant tumours which are comprised of elements of ectoderm and mesoderm germ-cell layers, but exhibit microscopic similarity to skeletal muscle. These tumours are more commonly seen in pediatric patients, with few case reports recently describing adult patients with this condition, in particular middle-aged women.¹⁻³ We present the case of a previously healthy 59-year-old woman who was found incidentally to have a pituitary mass on CT head, with retrospective symptoms of headaches, polyuria, polydipsia, diplopia, and low blood pressure. At presentation, she was found biochemically to have pan-hypopituitarism with a left cranial nerve six deficit, with an MRI depicting a 19.5 x 22 x 11 mm suprasellar mass extending into the infundibulum and hypothalamus, with displacement of the optic chiasm; repeat imaging ruled out apoplexy. She was started on supplemental levothyroxine and hydrocortisone replacement therapy, and sent for urgent transsphenoidal resection, which was complicated afterwards by hypernatremia from diabetes insipidus. Preliminary reports were suggestive of germinoma given the diffuse presence of Oct 3/4 and C-kit, with a proliferation index of 99%; further cytology of lumbar puncture revealed no malignant cells. However, upon further pathological analysis, her tumour demonstrated loss of INI-1 expression, which is diagnostic of ATRT. Given the mixed features on immunohistochemistry, the final diagnosis was concluded as an atypical teratoid/rhabdoid tumour of the sella turcica with germinoma differentiation. A multidisciplinary approach consisted of initial radiotherapy, with chemotherapy targeted towards a germinoma-type tumour,

and pituitary hormone replacement including treatment for central diabetes insipidus. This represents a unique case of a rare tumour with germinoma differentiation in an older patient that has not been previously reported.

References

1. Journal of Clinical Neuroscience 49 (2018) 16–21
2. Acta Neurochir (Wien) (2008) 150: 491–496
3. Surgical Neurology International 2014, 5:75

Reproductive Endocrinology

FEMALE REPRODUCTION: BASIC MECHANISMS

Dynamics of the Transcriptome in Rat Granulosa Cells Exposed to Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Glycosylation Variants as Revealed by RNA-Seq/New Generation Sequencing (NGS).

Jesús Espinal-Enriquez, Ph.D.¹, Guillermo De-Anda-Jáuregui, Ph.D.¹, Georgina Hernández-Montes, Ph.D.², Saúl Lira-Albarrán, M.D., D.Sc.³, Teresa Zariñán, M.Sc.², Rubén Gutiérrez-Sagal, Ph.D.², Rosa G. Rebollar-Vega, Ph.D.², George Russell Bousfield, Ph.D.⁴, Viktor Y. Butnev, Ph.D.⁴, Enrique Hernández-Lemus, Ph.D.¹, Alfredo Ulloa-Aguirre, M.D., D.Sc.².

¹Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico,

²National University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico,

³Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ, Mexico City, Mexico, ⁴Wichita State University, Wichita, KS, USA.

MON-023

Follicle-stimulating hormone exists as different major glycoforms defined by distinct glycosylation patterns of the hormone-specific β -subunit. It has been documented that variations in glycosylation confer differential biological effects to the glycoforms when multiple *in vitro* biochemical readings are analyzed. We here applied Next Generation Sequencing (NGS) to explore changes in the transcriptome of rat granulosa cells exposed for 0, 6, and 12 h to 100 ng/ml of four highly purified FSH glycoforms, each exhibiting distinctly different glycosylation patterns: human pituitary FSH²¹ and equine FSH (eFSH) (hypoglycosylated), and human FSH²⁴ and CHO cell-derived human recombinant FSH (recFSH) (fully-glycosylated). Total RNA from triplicate incubations was prepared from FSH glycoform-exposed cultured granulosa cells obtained from DES-pretreated immature female rats, and total RNA libraries were sequenced in a HighSeq 2500 sequencer (2 x 125 bp paired-end format, 10–15 x 10⁶ reads/sample). The computational workflow was focused on investigating differences among the four FSH glycoforms at three levels: gene expression (Salmon and DESeq2 bioinformatic tools), enriched biological processes (DAVID tool), and perturbed pathways (GAGE tool). Among the top 200 differentially expressed genes, only 4 (0.6%) were shared by all 4 glycoforms at 6 h, whereas 118 genes (40%) were shared at 12 h. At 6 h, up-regulated genes in recFSH were associated with cell response, angiogenesis, extracellular matrix organization, and mitosis; eFSH with sex hormones (shared with FSH²¹); FSH²¹ with cellular response and response to drugs (shared with recFSH); and FSH²⁴ with cAMP-related processes. There were more shared biological processes at

12 h, with fewer treatment-specific ones, except for *rec*FSH, which exhibited stronger responses with more specifically associated processes. Similar results were found for down-regulated cell processes, with a greater number of processes at 6 h or 12 h, depending on the particular glycoform. In general, there were fewer down-regulated than up-regulated processes at both 6 h and 12 h, with FSH²¹ exhibiting the largest number of down-regulated associated processes at 6 h (10 vs 3 processes for *e*FSH, one process for FSH²⁴, and one for *rec*FSH), while *e*FSH exhibited the greatest number at 12 h (19 processes vs 4 for FSH²¹, 13 for FSH²⁴, and 7 for *rec*FSH). Two signaling cascades, largely linked to Rap-1 and cAMP pathways, were differentially activated by the glycoforms, with each glycoform exhibiting its own molecular signature. These transcriptomic data support previous biochemical observations demonstrating glycosylation-dependent differential regulation of intracellular signaling pathways triggered by FSH in granulosa cells.

Bone and Mineral Metabolism

BONE AND MINERAL CASE REPORTS I

Hypercalcemia Due to Castleman's Disease

Sarah Adil Khan, MD¹, Neel L. Shah, MD².

¹University of Texas at Houston, Houston, TX, USA, ²University of Texas Medical School - Houston, Houston, TX, USA.

SAT-366

Castleman's disease is a group of poorly understood lymphoproliferative disorders in which pro-inflammatory cytokines are hyper-produced, causing a constellation of symptoms. This patient was diagnosed with a rare subtype of idiopathic multicentric Castleman's called TAFRO, which is a subclass characterized by thrombocytopenia (T), anasarca (A), fever (F), reticulinn fibrosis (R), and organomegaly (O). This is a case of hypercalcemia likely secondary to Castleman's disease. To our knowledge, only two such cases have been reported, and none with this rare subtype of the disease. The mechanism of hypercalcemia in Castleman's disease is thought due to lymph node macrophages expressing vitamin D activating enzyme 25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase, and possibly due to increased bone-turnover from osteoclasts production by IL-6. The treatment is managing the primary cause of the disorder: high doses of systemic steroids, immunosuppressants and IL6-inhibitors. We present a case of a 53 year old Hispanic female with a PMH of type 2 diabetes mellitus. She had hypercalcemia with a corrected calcium 12 mg/dl and a normal PTH 16.2pg/ml, with low levels of 1,25-OH vitamin D 8.3pg/ml, and 25-OH vitamin D 16.6ng/ml. PTHrP was undetectable. Phosphorous was normal at 3.3 mg/dl. Given that the iPTH was low normal, and with low 25-OH and 1,25-OH vitamin D levels, primary hyperparathyroidism was thought unlikely. SPEP showed a chronic disease pattern. TSH was also noted to be normal. Quantiferon tuberculin test, HHV6, HHV8 and HIV were negative. IgG, IgA, IgM levels were normal. She also had elevated alkaline phosphatase at 108 U/L. No other bone markers were checked. After steroid therapy, her corrected calcium came down to 10.1. Her Castleman's disease was diagnosed via histopathology of lymph node biopsy showing follicular hyperplasia with atretic germinal

centers, penetrating blood vessels, expanded mantle zones, hypervascular interfollicular regions and intense interfollicular plasmacytosis consistent with Castleman's disease. Initial CT Chest with contrast showed diffuse lymphadenopathy in the retropectoral, axillary, prevascular, pretracheal, paratracheal, and retroperitoneal regions. She had anasarca with ascites, requiring paracentesis with ascites fluid that was negative for malignancy. She was also diagnosed with acute thrombotic microangiopathy via kidney biopsy for workup of thrombocytopenia and acute renal injury. She was initially treated with PLEX and dexamethasone 40mg, then switched to methylprednisolone, was also tried on rituximab and cyclosporine. She failed therapy with an IL-6 inhibitor, Siltuximab, due to pulmonary edema requiring hospitalization. Currently, she is on a drug holiday and will resume lower doses of cyclosporine. Clinicians should consider an underlying lymphoproliferative disorder in the differential for a patient with hypercalcemia.

Bone and Mineral Metabolism

BONE DISEASE FROM BENCH TO BEDSIDE

Burosumab Resulted in Greater Clinical Improvements Compared with Higher-dose Conventional Therapy in Children with X-linked Hypophosphatemia (XLH)

Erik A. Imel, MD¹, Angel Chen, MS², Ting Chang, PhD², Mary Scott Roberts, MD², Leanne Marie Ward, MD³.

¹Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA, ²Ultragenyx Pharmaceutical Inc., Novato, CA, USA, ³University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada.

SUN-356

In XLH, excess circulating FGF23 causes hypophosphatemia, rickets, lower limb deformity, and impaired growth and mobility. An active-controlled, phase 3 trial (CL301; NCT02915705) showed treatment with burosumab, a fully human monoclonal antibody against FGF23, resulted in significantly greater improvements in all of these outcomes in children with XLH, compared with continuing oral phosphate and active vitamin D as conventional therapy (Pi/D) per established guidelines. In a post-hoc analysis, we compared children who received burosumab vs those who received an average 64-week oral phosphate daily dose >40 mg/kg (higher-dose Pi) vs ≤40 mg/kg (lower-dose Pi). Sixty-one children with XLH (1–12 years-old) were randomized 1:1 after a 7-day Pi/D washout to receive burosumab (n=29) starting at 0.8 mg/kg subcutaneously Q2W or to resume Pi/D (n=32) titrated by their investigator, for 64 weeks. Eligibility criteria included Rickets Severity Score (RSS) ≥2.0 despite prior Pi/D treatment. Of the 32 subjects randomized to Pi/D, 12 received average higher-dose Pi and 20 received average lower-dose Pi (as specified above). The primary endpoint was rickets healing, using the Radiographic Global Impression of Change (RGI-C) Scale. At week 64, the improvement in the least square (LS) mean (LS mean [±SE; 95%CI]) RGI-C Global Score for rickets was greater on burosumab (+2.06 [0.072; 1.92, 2.20]) compared with either higher-dose (+1.02 [0.241; 0.55, 1.50]) or lower-dose (+1.04 [0.162; 0.73, 1.36]) Pi. The mean decrease in the total RSS from baseline was also

[Print this Page for Your Records](#)[Close Window](#)**Control/Tracking Number:** 2018-A-6603-ENDO**Activity:** Abstract**Current Date/Time:** 11/8/2017 8:54:44 AM**Glycosylation Effects Of Follicle-stimulating Hormone (FSH) Variants On FSHR-stimulated Signal Transduction And Biased Agonism.**

Author Block: Alfredo Ulloa-Aguirre, M.D., D.Sc.¹, Teresa Zariñán, M.Sc.¹, Rubén Gutiérrez-Sagal, Ph.D.¹, Iván Martínez-Luis, B.Sc.¹, José Luis Maravillas-Montero, Ph.D.¹, Guillermo Juárez-Vega, Ph.D.¹, Viktor Y. Butnev, PHD², George Russell Bousfield, PHD².
¹National University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico, ²Wichita State University, Wichita, KS, USA.

Abstract:

Human Follicle-stimulating hormone (FSH) exists as different major glycoforms that differ in glycosylation of the hormone-specific β -subunit. Fully, (tetra) glycosylated FSH (FSH²⁴) and hypo, (tri)-glycosylated FSH (FSH^{21/18}) are the most abundant forms found in human pituitaries. In the present study we analyzed distinct readouts in HEK293 cells stably expressing the hFSHR to compare intracellular signaling triggered by several different highly purified FSH preparations [FSH²¹, FSH²⁴, equine FSH (eFSH, 90% hypoglycosylated), and CHO cell-manufactured recombinant FSH (*rec*FSH, mainly tetraglycosylated)] exhibiting distinct glycosylation patterns. The potency measured by ability to stimulate cAMP production was highest for eFSH, followed by FSH²¹>FSH²⁴>*rec*FSH; the kinetics of cAMP production was very similar for glycoform preparations FSH²¹, FSH²⁴, and eFSH, reaching maximal cAMP following 45 min FSH exposure, whereas *rec*FSH required longer time (60 min) and higher doses. Stimulation of ERK phosphorylation revealed a different pattern: ERK phosphorylation by FSH²¹ was the highest, followed by eFSH>*rec*FSH>FSH²⁴. Employing β -arrestin 1 and 2 CRISP-Cas9- silenced HEK293 cells, we found that compared to FSH²⁴, eFSH, and *rec*FSH, FSH²¹ exhibited functional selectivity towards the β -arrestin mediated ERK phosphorylation signaling pathway as revealed by a drastic decrease in both G_s- and β -arrestin-stimulated ERK phosphorylation during 120 min exposure of β arrestins-silenced cells to this particular glycoform. Further, although both FSH²⁴ and FSH²¹ stimulated Ca²⁺ influx from plasma membrane ion channels and intracellular stores, the effect of FSH²⁴ to stimulate Ca²⁺ influx through ion channels was higher than that shown by FSH²¹. These effects on FSHR-mediated signal transduction were not related to the KDs of the FSH preparations as determined by surface plasmon resonance analysis. Taken together, these data indicate that glycosylation in FSH plays an important role in preferentially stimulating distinct signaling pathways probably by provoking stabilization of distinct FSHR conformations. Differential effects of FSH glycoforms on the target tissue (*e.g.* granulosa cells) may be important for personalizing gonadotropin treatment in assisted reproduction. (Supported by grants 240619 from CONACyT, Mexico, to

A.U-A., and NIH P01AG029531 to G.R.B.).

:

Author Disclosure Information:

A. Ulloa-Aguirre: None. **T. Zariñán:** None. **R. Gutiérrez-Sagal:** None. **I. Martínez-Luis:** None. **J. Maravillas-Montero:** None. **G. Juárez-Vega:** None. **V.Y. Butnev:** None. **G.R. Bousfield:** None.

Presentation Preference (Complete): Oral Presentation

Topic (Complete): Scientific Abstract Categories -> Reproductive Endocrinology -> Female Reproductive Health and Biology (including pregnancy and menopause)

Keywords (Complete): Follicle-Stimulating Hormone ; Reproduction ; Gonadotrophin

Submission Questions (Complete):

Abstract Science Type : Translational Research

Name of the Primary Investigator of your research: : Alfredo Ulloa-Aguirre

Please make appropriate selection to indicate if a religious conflict exists.: I do not have any Conflicts.

Awards (Complete):

Payment (Complete): Your credit card order has been processed on Wednesday 8 November 2017 at 8:52 AM.

Status: Complete

Endocrine Society
2055 L Street NW, Suite 600
Washington, DC 20036

P: 202.971.3646

F: 202.736.9706

info@endocrine.org

[Leave cOASIS Feedback](#)

Powered by [cOASIS](#), The Online Abstract Submission and Invitation System SM

© 1996 - 2017 [CTI Meeting Technology](#) All rights reserved.

Proyecto:

“AGONISMO SELECTIVO DE LAS ISOFORMAS Y RECOMBINANTES DE LA FOLITROPINA HUMANA. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y TRANSCRIPTÓMICOS EN SISTEMAS IN VIVO E IN VITRO HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS”

Registro: INVA-RAI-1864-16/19-1

Informe de actividades

En relación a este proyecto, durante el 2019 se concluyeron todos los estudios *in vitro*, encontrándose potencias y efectos diferenciales entre las 4 preparaciones estudiadas. Los resultados de esta fase del proyecto, fueron presentados en el Congreso ENDO2018, de la Endocrine Society, EUA:

Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Gutiérrez-Sagal R, Martínez-Luis I, Maravillas-Montero, JL, Juárez-Vega G, Butnev VY, Bousfield, GR. Glycosylation Effects Of Follicle-stimulating Hormone (FSH) Variants On FSHR-stimulated Signal Transduction And Biased Agonism. 2018-A-6603-ENDO. (Adjunto PDF)

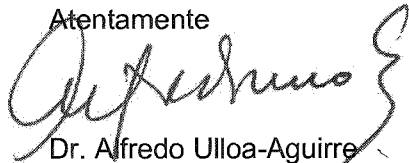
Y publicados en la revista **Journal of the Endocrine Society, 2020; Vol. 5 (5) 1–23.** (adjunto PDF):

Zariñán T, Butnev VY, Gutiérrez-Sagal R, Maravillas-Montero JL, Martínez-Luis I, Mejía-Domínguez NR, Juárez-Vega, G, BousfieldGR, Ulloa-Aguirre A. In Vitro Impact of FSH Glycosylation variants on FSH receptor-stimulated signal transduction and functional selectivity. J Endocr. Soc., 2020; Vol. 5 (5) 1–23.

En lo relacionado a los estudios *in vivo*, éstos se concluyeron exitosamente. Se llevaron al cabo los estudios en ratas inmaduras y se llevaron al cabo los estudios de transcriptómica aplicando secuenciación masiva de nueva generación. Los resultados correspondientes fueron presentados en el Congreso ENDO2018, de la misma Endocrine Society, EUA:

Espinal-Enriquez J, De-Anda-Jáuregui G, Hernández-Montes G, Lira-Albarrán S, Zariñán T, Gutiérrez-Sagal R, Rebollar-Vega R, Bousfield, GR, Butnev VY, Hernández-Lemu E, Ulloa-Aguirre, A. Dynamics of the Transcriptome in Rat Granulosa Cells Exposed to Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Glycosylation Variants as Revealed by RNA-Seq/New Generation Sequencing (NGS). JESOCI, Volume 4, Abstract Supplement, 2020, MON-023. (Adjunto PDF). El manuscrito correspondiente se encuentra en preparación.

Atentamente



Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre
Investigador Titular C de TC
UNAM-INCMNSZ



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd., Mx a 12 de agosto de 2020.

No. Oficio CICAL/067/20

DR. ALFREDO ULLOA AGUIRRE
RED DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN
Presente.

Estimado Dr. Ulloa:

En alcance al Oficio **CICAL-244-19**, que le fue enviado el 25 de noviembre de 2019, en el cual se le consultó si requería prorroga del proyecto intitulado **AGONISMO SELECTIVO DE LAS ISOFORMAS Y RECOMBINANTES DE LA FOLITROPINA HUMANA. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y TRANSCRIPTÓMICOS EN SISTEMAS IN VIVO E IN VITRO HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS**; con registro CINVA: RAI-1864-16/19-1 por lo que, al no recibir respuesta de su parte le solicito de la manera más atenta llenar el formato de cierre (en formato institucional y con firma) y adjunte los documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

ATENTAMENTE

DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN
COORDINADOR DEL COMITÉ INTERNO DE CUIDADO Y
USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

JABP/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 www.incmnsz.mx

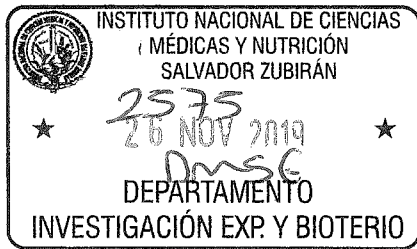


2020
LEONORA VICARIO
MOMENTO GLORIOSO DE LA PATRIA



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"



México Cd., Mx a 25 de noviembre de 2019.



2019
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA

No. Oficio CICUAL-244-19

DR. ALFREDO ULLOA AGUIRRE
Red de Apoyo a la Investigación
Presente.



ACUSE

Estimado Dra. Bautista:

Por este conducto le informo que su proyecto intitulado: **"AGONISMO SELECTIVO DE LAS ISOFORMAS Y RECOMBINANTES DE LA FOLITROPINA HUMANA. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y TRANSCRIPTÓMICOS EN SISTEMAS IN VIVO E IN VITRO HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS"**, con registro RAI-1864-16/19-1 terminará la vigencia en diciembre de 2019. Por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar al CICUAL el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. En caso de no requerir prórroga se necesita que entregue el: Formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán
Coordinador de la Comité de Interno para el Cuidado y
Uso de Animales de Laboratorio



c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB
JABP/bdr

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

ACUSE

México, D. F., a 16 de diciembre de 2016.

Dr. Alfredo Antonio Ulloa y Aguirre
Depto. Patología y Anatomía Patológica
Presente.

REF: GINVA-1864 RAI-1864-16/19-1

Estimado Dr. Ulloa:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Agonismo selectivo de las isoformas y recombinantes de la folitropina humana.
Estudio bioquímicos y transcriptómicos en sistemas in vivo homólogos y
heterólogos.”

Este comité ha dictaminado **APROBARLO** se autorizará el uso de 300 ratas hembra de la
cepa Wistar.

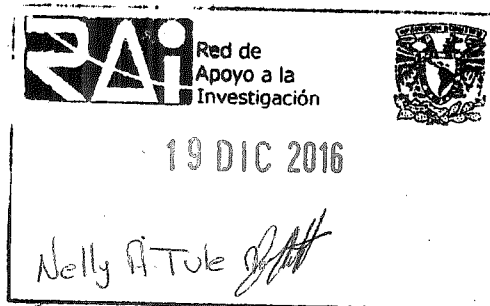
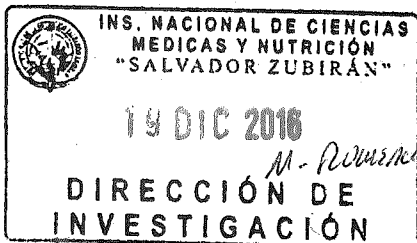
Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

1158 BDE
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO
20 DIC 2016

INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom

RAI.UNAM.MX

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Director Científico
aulloa@unam.mx

Ciudad de México, diciembre 15, 2016

Dra. Norma Bobadilla
Coordinadora de la Comisión de Investigación
en Animales
INCMNSZ
P R E S E N T E

Estimada Dra. Bobadilla:

En relación con el dictámen con fecha del día 14 del presente sobre el proyecto **"Agonismo selectivo de las isoformas naturales y recombinantes de la follitropina humana..."** con clave de protocolo RAI-1864-16/19, le informo que no será necesario someter el protocolo en cuestión a los comités de ética de investigación del Hospital Ángeles y del INCMNSZ, ya que el desarrollo de los estudios ex-vivo en humanos han cancelados por fondos insuficientes. Espero que esta comunicación sea suficiente para obtener la aprobación final del comité bajo su coordinación.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la presente para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dr. Alfredo Antonio Ulloa y Aguirre
Investigador Titular C de TC
Coordinador Científico de la RAI
CIC-UNAM

ACUSE

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



INVEST. EXPERIMENTAL Y BIOTERIO

15 DIC 2016
1745

INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
INVESTIGADOR(A) PRINCIPAL
RED DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN

Ciudad de México, a 14 de Diciembre de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
AV. VASCO DE QUIROGA NO. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI
MÉXICO, D.F., C.P. 14080
PRESENTE

Por este medio, nos permitimos informarle que La Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha revisado y dictaminado como **PENDIENTE** el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

Agonismo Selectivo de las Isoformas Naturales y Recombinantes de la Folitropina Humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas in vivo e in vitro homólogos y heterólogos

Con clave de protocolo **RAI-1864-16/19-1**

La Comisión decidió dejar pendiente la aprobación del proyecto hasta que se resuelvan los cuestionamientos siguientes:

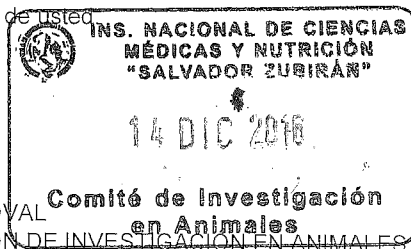
Las respuestas fueron claras y las dudas planteadas fueron esclarecidas adecuadamente, pero a una vez que el Investigador responsable cuente con la autorización del Comité de Ética de Investigación en Humanos, tanto del Hospital Ángeles, como del INCMNSZ se deberán entregar ambos documento para que esta Comisión pueda expedir la Carta de Aprobación.

Así mismo le recordamos que las modificaciones deben ser sobre este protocolo, no debe crear uno nuevo. Este lo encontrará como pendiente y podrá agregar los nuevos archivos en la sección Ver Detalles y volver a generar la forma única.

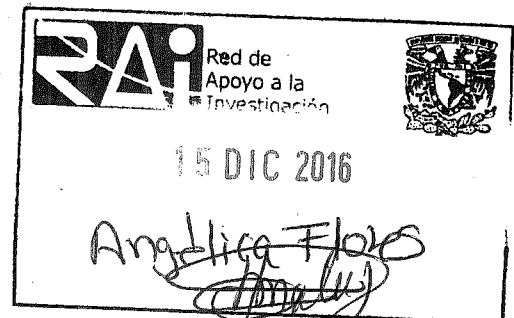
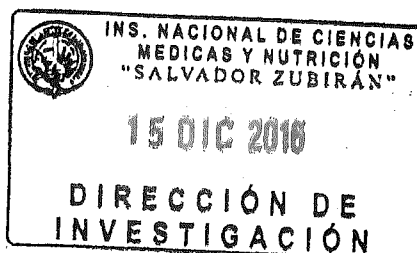
Sin más por el momento quedamos de usted

ATENTAMENTE,

DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL
COORDINADORA DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

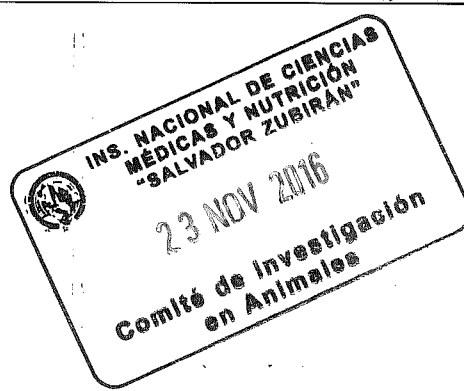


c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
c.c.p. MVZ. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB.





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



México, D.F. a 23 de Noviembre de 2016

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales
P r e s e n t e

REF: CINVA-1864-RAI-1864-16/19-1

Estimada Dra Bobadilla:

En respuesta a las observaciones al Protocolo de Investigación Experimental titulado "Agonismo selectivo de las isoformas naturales y recombinantes de la folitropina humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas in vivo e in vitro homólogos y heterólogos" puntualizo lo siguiente:

- a) En el proyecto en extenso (páginas 21-22) se describen las actividades que realizarán cada uno de los participantes del proyecto.
- b) La información sobre participantes del proyecto se ha uniformizado entre el FAEP y el proyecto en extenso.
- c) El encargado de la extracción de células de la granulosa de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica será el Dr. Héctor Salvador Godoy Morales (señalado en la página 16 del proyecto en extenso).
- d) El grado de invasividad del implante de la cápsula de dietil etilbestrol fue modificado de "B" a "C" en el FAEP.
- e) El llenado de la tabla 9 del FAEP fue aclarado.
- f) Se incluyó en el FAEP (punto 7, página 5) una tabla que ejemplifica mejor la distribución de los animales solicitados al DIEB.
- g) Se añadió la sugerencia de incluir la leyenda "Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos" en la bolsas amarillas que serán utilizadas para guardar los cadáveres.
- h) Se anexa la solicitud para la revisión, evaluación y dictamen del presente proyecto al Comité de Ética e Investigación del Hospital Ángeles.

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Dominguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre

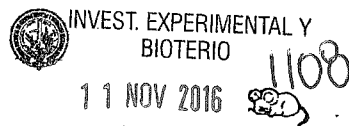
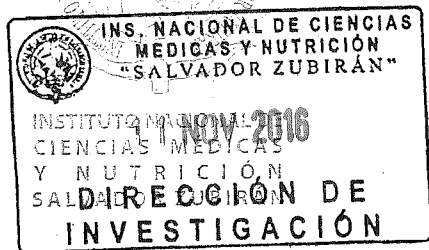
Investigador C de TC

Coordinación de la Investigación Científica, UNAM

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

Sajl Lira Albarran

22-22-26

ACUSEINST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."

México, D. F., a 10 de noviembre de 2016.

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
 Depto. Red de Apoyo a la Investigación
 Presente.

REF: CINVA-1864 RA1-1864-16/19-1

Estimado Dr. Ulloa:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Agonismo selectivo de las isoformas naturales y recombinantes de la folitropina humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas in vivo e in vitro homólogos y heterólogos"

La Comisión decidió dejar **Pendiente la Aprobación** del proyecto hasta que se resuelvan los cuestionamientos siguientes:

- Se solicita se describan las actividades que realizara cada uno de los participantes, e incluir a todos los estudiantes, técnicos e investigadores que participarán en el proyecto.
- En el FAEP viene el Dr. Ulloa como titular, el Dr. Larrea y el médico Lira como coautores, sin embargo en el extenso, no viene el nombre del Dr. Larrea. Favor de uniformar la información.
- No se describe quién será el encargado de la extracción de células de la granulosa de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada.
- Se describe el protocolo como invasividad grado "B", esto es inadecuado. Para el implante de la cápsula con dietil etilbestrol se requiere de anestesia y muy probablemente se generará malestar o incomodidad en el animal mientras tiene el implante. El grado debería ser "C".
- El llenado de la tabla 9 del FAEP no es claro, no se marca la casilla del SI ni del NO, únicamente del NO en dos procedimientos (cuando debería ser SI).
- Se solicita una tabla que ejemplifique mejor la distribución de los animales.
- En cuanto a los cadáveres: Agregar que las bolsas amarillas llevan la leyenda "Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos".
- Una vez que se cubran los puntos previamente señalados y poder emitir la carta de aceptación es necesario presentar a esta Comisión la aprobación de la Comisión de Ética e Investigación.

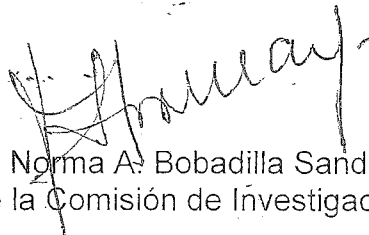
Avenida Vasco de
 Quiroga No. 15
 Colonia Esfuerzo
 Dominguillo, CDMX
 Delegación Tlalpan
 Código Postal 14080
 México, Distrito Federal
 Tel. (52) 54870900
 www.incmnsz.mx

Es importante señalar que las correcciones se deben realizar en el FAEP y en el protocolo en extenso, así como, enviar una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado. La

respuesta al comité, el FAEP y el protocolo modificado deberán subirse al SERPI y deberá entregarse en forma impresa. Así mismo le recordamos que las modificaciones deben ser sobre este protocolo, no debe crear uno nuevo.

Sin más por el momento quedo de usted.

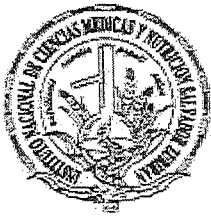
Atentamente,



Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS

Fecha de recepción: 2016-10-26

Clave: RAI-1864-16/19-1

Título: Agonismo Selectivo de las Isoformas Naturales y Recombinantes de la Folitropina Humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas in vivo e in vitro homólogos y heterólogos

Investigador responsable: Alfredo Ulloa Aguirre

Departamento o servicio: RED DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN

Tipo de investigación: Inv. Biomédica

Patrocinadores

Patrocinador: Conacyt	Cantidad: 2000000
Patrocinador:	Cantidad: 0
Patrocinador:	Cantidad: 0

Vigencia del proyecto: Del 2016-11-01 al 2019-11-01.

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

Costo totales de la investigación

Personal (sueldos y sobresueldos al personal)	0
Equipos (de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)	0
Materiales (reactivos, consumibles, desechables, etc.)	2000000
Animales (adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)	0
Estudios (de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)	0
Viáticos (reuniones científicas y trabajo de campo)	0
Publicaciones (costos directos de publicación, sobregiro)	0
Suscripciones (libros, revistas, software, periódicos, etc)	0
Varios (teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)	0
Administración de gastos pacientes	0
Fondo de apoyo (15% de la cantidad total del proyecto)	0
Total	2000000

Instituciones participantes

Institución: UNAM

Institución: INCMNSZ

Institución:

Institución:

[Yellow box signature]

[Yellow box signature]

Firmas

Investigador responsable

Jefe de Departamento

[Yellow box signature]

Comité de Investigación en Humanos

Comité de Investigación en Animales

[Yellow box signature]

[Yellow box signature]

Director de

General

Fecha de resolución

21-Dic-2016



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:
FOLIO DE REGISTRO: RAI-1864-16/19-1

Fecha de registro del Protocolo: 26 de Octubre de 2016

Título del Protocolo:
Agonismo Selectivo de las Isoformas Naturales y Recombinantes de la Folitropina Humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas *in vivo* e *in vitro* homólogos y heterólogos.

Propuesta: a) Nueva b) Renovación X c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Institución de Adscripción	Universidad Nacional Autónoma de México
Departamento de Adscripción	Red de Apoyo a la Investigación (RAI)
Teléfono	55 5487-6080 Extensión 6350
Correo electrónico	aulloaa@unam.mx

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Dr. Fernando Larrea Gallo	Biología de la Reproducción	Médico Especialista	54870900 Ext. 2412	fernando.larreag@incmnsz.mx
Saúl Lira Albarrán	Biología de la Reproducción	Maestría Médico Especialista	54870900 Ext. 2418	saul.lira@incmnsz.mx
Dr. Héctor Salvador Godoy Morales	Hospital Ángeles Pedregal	Médico Especialista	54495500 Ext. 3129	Ô
Inti Alberto De la Rosa Velázquez	Laboratorio de Genómica; RAI	Doctorado	54876080 Ext. 6357	inti.delarosav@incmnsz.mx
Rosa Gloria Rebollar Vega	Laboratorio de Genómica; RAI	Maestría	54876080 Ext. 6357	rebollar@cic.unam.mx
Georgina Hernández Montes	Unidad de Bioinformática, Bioestadística y Biología Computacional; RAI	Doctorado	54876080 Ext. 6353	yinna@cic.unam.mx
Teresa Zariñán García	Laboratorio de Biología Molecular; RAI	Maestría	54876080 Ext. 6354	Ô
Enrique Hernández Lemus	Genómica Computacional; INMEGEN	Doctorado	53501900 Ext. 1970	ehernandez@inmegem.gob.mx
Leticia González Ibarra	Biología de la Reproducción	Maestría	54870900 Ext. 2418	Ô



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACION DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	Red de Apoyo a la Investigación	Licenciatura en Q.F.B.	54876080 Ext. 6354	

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	01	11	2016
Fecha tentativa de finalización.	01	11	2019

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán / Red de Apoyo a la Investigación

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

Objetivo general.

Analizar los efectos agonistas selectivos de análogos naturales (tri- y tetraglicosilados, de origen hipofisario y urinario) y recombinantes (tetra- y pentaglicosilados) de la FSH, así como de moduladores alostéricos del FSHR (ADX61623 y ADX68692), mediante estudios bioquímicos y de secuenciación de ARNm de alto rendimiento, en diferentes contextos celulares y sistemas: a) sistemas *in vitro* homólogos (células de la granulosa humanas inmortalizadas –células KGN- y células de riñón de embrión humano –HEK293-); b) dos sistemas heterólogos (células de Sertoli de ratón inmortalizadas –línea MSC-1- y células de la granulosa de rata en cultivo); y c) un sistema *in vivo* (células de la granulosa humanas proveniente de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada), así como proponer modelos de activación selectiva de las diferentes cascadas de señalización reguladas por cada uno de los análogos estudiados.

Objetivos específicos.

1. Estudiar el o los efectos selectivos de diferentes análogos de la FSH (FSH urinaria pura, FSH recombinante y coriofolitropina alfa) disponibles en el mercado y con variaciones en su glicación, en la activación de las vías de señalización mediadas por las proteínas Gs, Gi y Gq/11, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de Gs y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.

2. Estudiar el o los efectos selectivos de diferentes análogos naturales de la FSH hipofisaria (FSH tri- y tetraglicosilada) en la activación de las vías de señalización mediadas por las proteínas Gs, Gi y Gq/11, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de Gs y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.

3. Estudiar el efecto de los moduladores alostéricos ADX61623 y ADX68692 en el agonismo selectivo de las diferentes preparaciones naturales y recombinantes de la FSH sobre las vías de señalización mediadas por las proteínas Gs, Gi y Gq/11, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de Gs y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

reciclamiento del FSHR en las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.

4. Analizar el transcriptoma global de células de la granulosa humanas obtenidas de mujeres estimuladas con FSH recombinante, FSH urinaria o coriogonadotropina alfa, durante su maduración folicular final, mediante secuenciación de alto rendimiento (NGS) y validar los resultados mediante RT-PCR cuantitativo.

5. Analizar el transcriptoma global de células HEK-293, KGN y MSC-1, y de células de la granulosa de rata en cultivo estimuladas con diferentes preparaciones naturales y recombinantes de la FSH, en presencia o ausencia de moduladores alostéricos, mediante NGS y validar los resultados de los genes identificados expresados de forma diferencial mediante RT-PCR cuantitativo.

6. Caracterizar la activación selectiva de las diferentes vías de señalización intracelular provocadas por las preparaciones naturales y recombinantes de la FSH estudiadas empleando análisis computacional y modelado probabilístico, con base en los resultados obtenidos de los estudios bioquímicos y transcriptómicos.

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Para identificar con precisión agonistas selectivos del FSHR (y de otros GPCRs) y moléculas alostéricas para este y otros receptores, que den lugar al diseño de nuevas estrategias terapéuticas, patentables y potencialmente aplicables en el tratamiento de enfermedades reproductivas y en anticoncepción, es necesario contar con un modelo experimental como lo es el cultivo primario de células de la granulosa de rata, que complemente las observaciones en el modelo humano y líneas celulares. Para tal efecto, ratas hembra de 19 a 21 días de edad necesitan ser implantadas de manera subcutánea con una cápsula de Silastic que contenga 10 mg de dietilestilbestrol para inducir la proliferación de células de la granulosa y así obtener suficiente RNA para poder evaluar la expresión génica inducida por diferentes análogos de la FSH en presencia o ausencia de moduladores alostéricos del FSHR, mediante secuenciación de nueva generación.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACION DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:	C: X	D:	E:
------------	----	----	------	----	----

- 5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

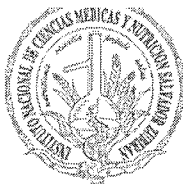
Con la experiencia acumulada en el proyecto "Efectos del levonorgestrel sobre la función hormonal del ovario" (REF: CINVA 34, Clave: BRE-34-10-13-1) que correspondió a la tesis doctoral del investigador Saúl Lira Albarrán (datos publicados recientemente en *Molecular and Cellular Endocrinology*, doi: 10.1016/j.mce.2016.09.020) se estableció que cada cultivo primario de células de la granulosa requiere de 10 ratas de la estirpe Wistar de 19 a 21 días de edad (estimuladas por 4 días con un implante de silastic que contiene dietilstilbestrol) para obtener aproximadamente 20,000,000 de células por cultivo. Con esta cantidad de células se pueden sembrar 1,000,000 de células por pozo para obtener en promedio 5,000 ng de RNA/pozo.

Como primer punto, es necesario establecer en un estudio piloto las concentraciones efectivas al 50% (CE_{50%}) de cada una de las 5 preparaciones a ser estudiadas (FSH urinaria pura, FSH recombinante, coriofolitropina alfa, FSH tri- y tetraglicosilada) en términos de expresión génica de *Cyp19a1* (aromatasa) y acumulación de estradiol en el medio de cultivo. Para tal efecto, se solicitan 50 animales para realizar cinco cultivos primarios independientes (estudiaremos cada preparación en un solo cultivo para reducir el número de animales solicitados).

Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar el efecto de la CE_{50%} de distintas isoformas de la FSH en presencia o ausencia de moduladores selectivos del FSHR sobre la expresión génica global de células de la granulosa de rata, mediante secuenciación de RNA y la posterior confirmación de los genes diferencialmente expresados a través de RT-PCR cuantitativo. Para tales experimentos se requiere de una cantidad importante de RNA de alta pureza y calidad. Por lo anterior, es indispensable realizar al menos 5 cultivos primarios independientes con cada una de las 5 preparaciones de FSH (en presencia o ausencia de moduladores selectivos de FSHR) para obtener la cantidad suficiente de RNA para su análisis. De esta manera, se necesitarían 25 cultivos primarios, lo que representa 250 ratas para poder evaluar los 10 grupos experimentales.

En resumen, se solicitan 300 ratas de la estirpe Wistar de 19 a 21 días de edad.

- 6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

NO APLICA

7) Mencione el número y las especies animales, así como el genero que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas de la estirpe Wistar	300		19-21 días	Hembra
Estudio piloto para determinar la CE _{50%} de cada una de las 5 preparaciones a ser evaluadas (un cultivo por preparación)	5 cultivos utilizando 10 ratas por cultivo. TOTAL: 5 X 10 = 50 ratas			
25 cultivos primarios para evaluar cada una de las 5 preparaciones en 5 cultivos independientes.	25 cultivos utilizando 10 ratas por cultivo. TOTAL: 25 X 10 = 250 ratas			
No. TOTAL DE ANIMALES: 300 RATAS				

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.
Los animales permanecerán 4 días a partir de que se implanten de manera subcutánea con una cápsula de Silastic, y posteriormente serán sacrificados.

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.	X		
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.	X		
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.		X	Una sola vez se realizará una incisión subcutánea en la región dorsal
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos		X	Un solo implante subcutáneo con una cápsula de Silastic que contiene 10 mg de dietilestilbestrol



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACION DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

Se emplearán ratas hembras inmaduras de la estirpe Wistar, de 19 a 21 días de edad, mantenidas bajo un régimen de luz/oscuridad de 12/12 h y con alimento y agua a libre demanda. Con la finalidad de estimular la proliferación de las células ováricas, las ratas se implantarán subcutáneamente bajo anestesia en la región dorsal con cápsulas de silástic conteniendo aproximadamente 10 mg de dietilestilbestrol y se mantendrán con el implante durante 4 días. Posteriormente, los animales serán sacrificados con pentobarbital 120 mg /kg IP y las células de la granulosa se obtendrán por punción folicular con aguja fina.

La rata será anestesiada con ketamina/xilacina, a dosis de 90 mg/kg + 10 mg/kg, por vía intraperitoneal. Posteriormente se rasurará el dorso de la rata para realizar antisepsia con alcohol isopropílico al 70%. Después se llevará a cabo una incisión de 15 mm de largo y 10 mm de ancho en la región dorsal para implantar subcutáneamente una cápsula de silástic de 10 mm de largo y 1.5 mm de diámetro interno conteniendo aproximadamente 10 mg de dietilestilbestrol. Para suturar piel se utilizará nailon 3/0. Posteriormente, se vigilará al animal hasta su completa recuperación.

Bibliografía: Waynforth H.B. y Flecknell P.A. Experimental and Surgical Technique in the Rat. 2a ed. Ed. Academic Press. 1992. Londres, UK. Capítulos 1, 3 y 4.

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Anestésico	Ketamina	90 mg/kg	Intraperitoneal	Una sola vez
Sedante y analgésico no narcótico	Xilacina	10 mg/kg	Intraperitoneal	Una sola vez

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Patrón respiratorio: número de respiraciones por minuto y profundidad de la respiración.

Color de las mucosas, tiempo de llenado capilar, temperatura corporal, ojos.

Reflejos podal y anal.

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

NO APLICA



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erECCIÓN, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

El tiempo que permanecerán los animales en el bioterio es muy corto (tan solo 4 días posteriores al implante), por lo que se espera que no-presenten complicaciones por el procedimiento. No obstante, al menos una vez al día el investigador Saúl Lira Albarrán acudirá al bioterio a evaluar a los animales.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal	X			
b) Apariencia		X		
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)		X		
d) Conducta espontánea.		X		
e) Conducta provocada.	X			

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerECCIÓN, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 1. 0 si es normal.
 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 3. 2 si está afectado
 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

De acuerdo a la experiencia del protocolo previo (REF: CINVA 34, Clave: BRE-34-10-13-1), no observamos deterioro en el bienestar en los animales secundario al procedimiento de un implante subcutáneo. Sin embargo, consideramos que una pérdida del 10% del peso corporal es un criterio para establecer el "punto final humanitario".

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACION DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Pentobarbital 120 mg /kg IP

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

17) El protocolo representa riesgo biológico?

a) No b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_V.pdf

De acuerdo a la clasificación ABSL, el proyecto no representa riesgo biológico dado que no trabajaremos con agentes que potencialmente puedan ocasionar enfermedad en humanos adultos inmunocompetentes.

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?

Los animales serán eutanizados y los cadáveres colocados en bolsa amarilla, la cual será etiquetada con los datos que identifiquen al Investigador, Departamento al que pertenece, número de animales (incluyendo edad), fecha del evento y tipo de eutanasia utilizada, además de la leyenda "Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos". Posteriormente, serán transportados en contenedor para residuos biológico infecciosos hasta el DIÉB donde serán registrados en la bitácora correspondiente y entregados al personal para su incineración.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Nombre y firma del Investigador Responsable

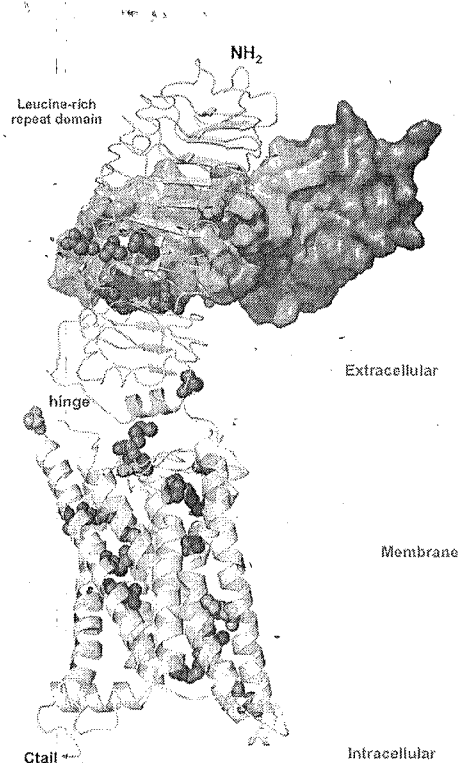


FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalóbos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Agonismo Selectivo de las Isoformas Naturales y Recombinantes de la Folitropina Humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas *in vivo* e *in vitro* homólogos y heterólogos



Investigador Responsable:

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre,
Director Científico, Red de Apoyo a la Investigación (RAI), Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Investigador Asociado:

Dr. Saúl Lira-Albarrán
Depto. de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ,
Ciudad de México, México.

Resumen

Las gonadotropinas son hormonas estructuralmente complejas que contienen cadenas de oligosacáridos que regulan su tráfico intracelular, eficiencia de secreción, vida media plasmática e interacción con su receptor en la célula blanco. La hormona estimulante del folículo (FSH) posee 4 oligosacáridos, dos en su subunidad β y dos en la α . Sin embargo, existen variantes que poseen únicamente 3 oligosacáridos (FSH21/18 -variante triglicosilada-) y que presentan particularidades en su mecanismo de acción y efectos biológicos. En este proyecto, se estudiará la selectividad funcional de las variantes tetra- y tri-glicosiladas de la FSH, empleando diferentes estrategias bioquímicas, genómicas y computacionales. Se retarán diferentes líneas celulares así como células de la granulosa de rata en cultivo, con diversas concentraciones de las isoformas de FSH y se analizarán sus efectos sobre la cinética de la activación de segundos mensajeros y sus cascadas de señalización, incluyendo fosforilación de efectores, así como la desensibilización e internalización del complejo FSH/receptor y la producción de los diferentes ARNm inducidos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados serán integrados para su análisis computacional y modelado probabilístico para determinar si los análogos estudiados presentan agonismo selectivo.

I. Antecedentes y marco teórico

Las gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo o folitropina (FSH), son fundamentales en la regulación endocrina de la función gonadal. Ambas gonadotropinas son sintetizadas y secretadas por los gonadotropos de la hipófisis anterior en respuesta a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo medio basal. Las células blanco de la LH son las células de Leydig del testículo y las células de la teca y del cuerpo lúteo del ovario, en tanto que para la FSH son las células de Sertoli del testículo y las de la granulosa del ovario. En el testículo, la LH estimula la síntesis de esteroides sexuales, principalmente de testosterona, siendo este andrógeno indispensable para la gametogénesis; en el ovario esta gonadotropina regula la síntesis de andrógenos en las células de la teca y de progesterona y estradiol en las células lúteas, siendo además indispensable para la ruptura del folículo maduro y la liberación del ovocito. En las células de la granulosa del ovario, la FSH regula la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos sintetizados en la célula de la teca, así como la maduración folicular, esto es, el crecimiento del folículo secundario a folículo antral. Ambas gonadotropinas controlan también la síntesis de otros factores de crecimiento y hormonas de naturaleza peptídica que a su vez regulan de forma autocrina y/o paracrina la función testicular y folicular. Los esteroides sexuales y algunas de las hormonas producidas localmente por el estímulo gonadotrópico (por ejemplo, activinas e inhibinas) ejercen un efecto de retrocontrol negativo o positivo, tanto a nivel hipotalámico como hipofisario, en la síntesis y secreción de ambas gonadotropinas, configurándose así el circuito primario del eje regulador de la función gonadal [1, 2].

Las gonadotropinas pertenecen a la familia de las hormonas glicoproteicas, de la que son miembros también la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina (TSH) y la coriogonadotropina producida por la placenta (hCG). Estas hormonas son glicoproteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad- α , que es común a todos los miembros de la familia, asociada mediante uniones no covalentes con una subunidad- β , que es específica para cada hormona y que le confiere a cada una sus propiedades biológicas particulares. Cada subunidad contiene 1 ó 2 cadenas de oligosacáridos unidos a residuos de asparagina (*N*-glicosilación); la hCG posee además una extensión en el extremo carboxilo terminal de su subunidad- β , con 4 residuos de

serina glicosilados (*O*-glicosilación) cuyos oligosacáridos terminan en ácido siálico, lo que le confiere una vida media plasmática más prolongada y sustancialmente mayor a la del resto de las hormonas glicoproteicas [3, 4, 1, 5]. Los residuos de oligosacáridos de todas las gonadotropinas son altamente heterogéneos lo que da lugar a múltiples formas moleculares o isoformas de cada hormona [6-11]. Los oligosacáridos en las moléculas de las hormonas glicoproteicas juegan un papel importante en diversas funciones de cada hormona, incluyendo su plegamiento, heterodimerización, control de calidad, transporte y maduración conformacional intracelulares, eficiencia de su secreción y determinación de su vida media y destino metabólico en la circulación, así como en su interacción con su receptor en la célula blanco. Además su glicosilación terminal diferencial permite que la proteína regule de manera fina cada una de sus propiedades, sin necesidad de un cambio en la secuencia primaria [6, 8, 12, 10, 13, 14, 11]. Por último, las estructuras de los oligosacáridos en estas hormonas juegan también un papel importante en algunas de sus propiedades fisicoquímicas, tales como la disociación entre sus subunidades, su estabilidad térmica y las propiedades antigénicas que se han observado cuando estas estructuras son modificadas [15-18].

Los receptores para las hormonas glicoproteicas pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G (GPCR), que son los principales blancos terapéuticos en la actualidad. De hecho, los beneficios de ~50% de todos los medicamentos aprobados tienen como blanco estos receptores. Específicamente, los receptores de las hormonas glicoproteicas pertenecen a la familia o grupo A de los GPCRs, que corresponde a los receptores semejantes a la rodopsina y al receptor β -adrenérgico [19]. Todos estos receptores tienen en común el estar compuestos por una larga cadena polipeptídica que cruza 7 veces la membrana celular formando dominios transmembranales (TMs) con estructura secundaria de hélices- α , unidas por 3 lazos extracelulares (EL) y 3 intracelulares (IL) y con un dominio NH_2 -terminal extracelular de longitud variable y un extremo COOH -terminal intracelular [19]. En el caso de los receptores para las gonadotropinas (los FSHR y LH/hCGR), el dominio NH_2 -terminal es extenso (300 a 400 aminoácidos) y posee una región rica en leucinas (e isoleucinas) que es en donde ocurre la unión específica de sus agonistas o ligantes, en tanto que el dominio o cola COOH -terminal está palmitoilado en 2 ó 3 residuos de cisteína, lo que permite su óptimo transporte intracelular del aparato de Golgi a la membrana plasmática, así como su reciclamiento a la membrana después de su internalización mediada por la activación del receptor [20, 21]; esta modificación permite también la formación de un lazo intracelular adicional a través del anclaje de los residuos de palmítico a la cara interna de la membrana celular (Fig. 1). En el FSHR, este dominio también posee residuos de serina y de treonina que son blanco de fosforilación y del subsecuente reclutamiento de arrestinas, que son moléculas que intervienen en el desacoplamiento del receptor a su(s) proteína(s) G, previo a su internalización estimulada por el ligante y a la activación de la vía de las MAPKs (por **mitogen activated protein kinases**), específicamente de las ERK1/2 (por **extracellular signal-regulated kinases**) independiente de las cinasas A (PKA) y C (PKC) de proteínas [4, 20, 22]. Las arrestinas juegan un papel importante en el agonismo selectivo del FSHR y de otros GPCRs, como se describirá más adelante [22].

Al igual que los receptores para las otras hormonas glicoproteicas, el FSHR se caracteriza por presentar un dominio extracelular NH_2 -terminal (o ectodominio) muy extenso (Fig. 1) el cual interactúa con su agonista respectivo (la FSH). El ectodominio posee a su vez 2 subdominios, el subdominio de unión de alta afinidad para el agonista, localizado en el centro del ectodominio y el subdominio involucrado en la especificidad de la señal. Ambos forman una estructura integral compuesta por repetidos ricos en leucina.

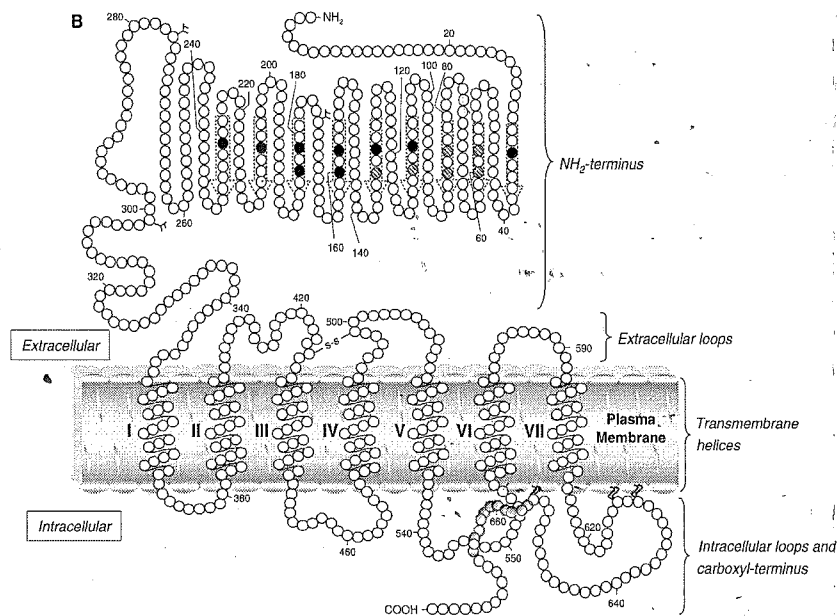


Figura 1. Representación esquemática del FSHR, con sus aminoácidos en círculos claros o grises y negros (residuos de leucina e isoleucina). La figura muestra sus diferentes dominios, así como el anclaje a la membrana en su porción COOH-terminal a través de su palmitoilación en las cisteínas 627, 629 y 655 (ref. 20).

En ausencia del agonista, el ectodominio del FSHR *inhibe* la activación (esto es, los cambios conformacionales, de forma semejante a la ocupación de un receptor por agonistas inversos) del dominio transmembranal a través de su anclaje en los lazos extracelulares del receptor que son parte integral del dominio transmembranal (Fig. 1) [23, 24]. La unión de alta afinidad de la FSH en el subdominio correspondiente, provoca un cambio conformacional en la hormona formándose *de novo* un "paquete de unión" en la interfase de las 2 subunidades que es específico para un residuo sulfatado de tirosina, presente en la posición 335 (extremo COOH-terminal) del subdominio de la especificidad de la señal (en la región "hinge" o *bisagra*), ubicado en una estructura semejante a una asa u horquilla. Este residuo de tirosina se impulsa y coloca en el paquete de unión de la hormona elevando así la horquilla y provocando un cambio conformacional que "libera" de la inhibición a la región transmembranal del receptor, iniciándose así su activación [24]. En este contexto, el ectodominio del FSHR libre (y de los otros receptores relacionados -LHR, TSHR-) actúa como un agonista inverso [25]. Finalmente, los cambios conformacionales en la región transmembranal son transmitidos a los dominios intracelulares, a los que se asocian diferentes moléculas efectoras [26].

La activación del FSHR ocurre después de la unión del agonista. La vía de señalización intracelular clásica o canónica mediada por el módulo $G\alpha s$ /AMPc/PKA (cinasa A de proteínas) ha sido reconocida durante los últimos 20 años como el mecanismo efector básico de la acción biológica de las gonadotropinas. Se ha demostrado, sin embargo, que el FSHR también se acopla a múltiples proteínas G activando así una amplia serie de cinasas de proteínas, con o sin la intervención de andamios específicos (*vide infra*) [27, 28, 20, 29, 30, 22] (Figs. 2 y 3). Esta compleja red de señalización, que induce finalmente la transcripción de diferentes genes, indica que la señal de transducción mediada por el complejo FSH/FSHR no es lineal y que su activación involucra varias conformaciones del receptor que pueden ser diferencialmente estabilizadas por agonistas. Como se describirá más adelante, en el caso de las variantes de glicosilación de la FSH (variantes por carga, que son las primeras que se caracterizaron), los primeros conceptos sobre sus efectos agonistas diferenciales o selectivos, fueron sugeridos por nuestro grupo años antes de que el

concepto de agonismo selectivo [31-33] emergiera en la farmacología contemporánea como un concepto plenamente establecido (proyectos 28589-N y 0004P-N9505 financiados por el CONACyT)[34, 35]. El estudio a nivel bioquímico y genómico del agonismo selectivo de diferentes análogos naturales y recombinantes de la FSH y el efecto de moduladores alostéricos del FSHR, empleando tecnología de punta, es precisamente el objetivo fundamental de esta propuesta.

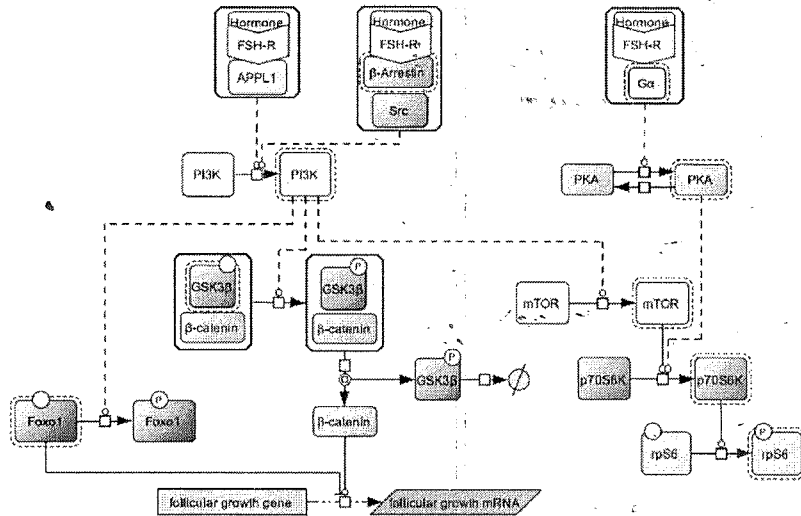


Figura 2. Vías de señalización activadas por el FSHR y esquematizadas utilizando el Cell Designer (Nat. Biotechnol. 2005; 23:961) (ref. 22).

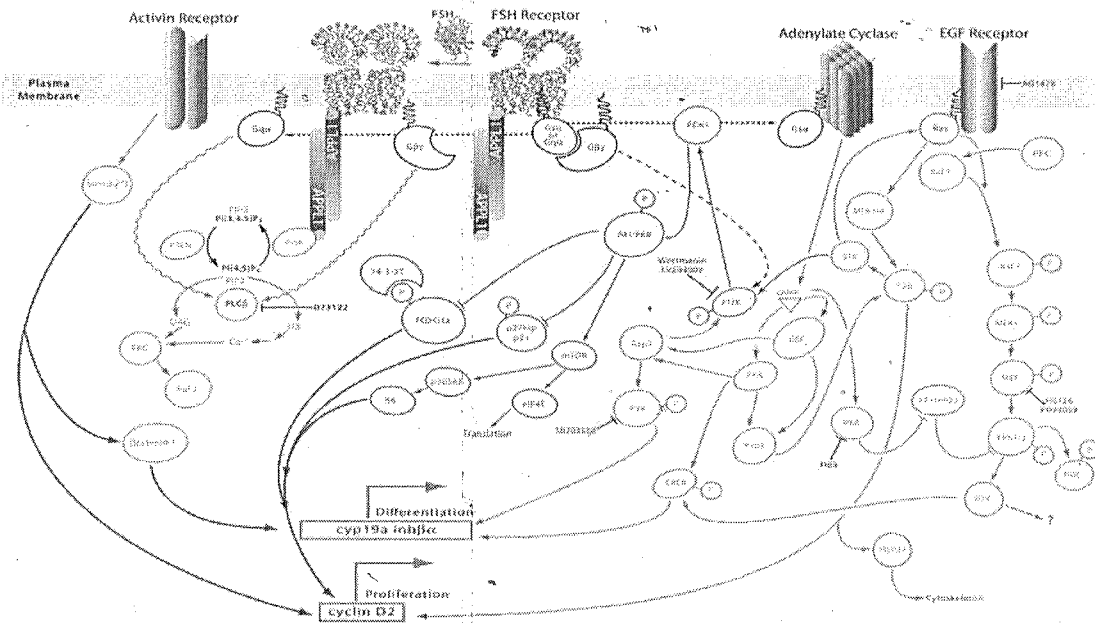


Figura 3. Las vías de señalización del FSHR y su relación con efectores y acopladores (sin incluir las β-arrestinas) y otros receptores membranales. Nótese como APPL1 acopla la señalización del receptor a la PI3K provocando el incremento en la producción de IP3. (refs. 20 y 75).

I.1 Aspectos estructurales y funcionales de la FSH

La FSH humana tiene un peso molecular de 32 KDa y está compuesta por 203 residuos de aminoácidos; de éstos, 92 corresponden a la subunidad- α común y 111 a la subunidad- β [36]. Posee 4 sitios de glicación en asparagina, dos en cada subunidad; en la subunidad- α los sitios de glicación se localizan en Asn52 y Asn78, en tanto que en la subunidad- β se encuentran en las asparaginas 7 y 24 [4, 5, 36]. La glicosilación de la subunidad subunidad- β en estas asparaginas es, sin embargo, variable (*macroheterogeneidad* de la FSH) pudiendo glicosilarse únicamente en posición 7 ó 24 (FSH triglicosilada), en ambas (FSH tetraglicosilada) o en ninguna (diglicosilada) [37], dependiendo de la etapa reproductiva de la donadora [38, 11] (Fig. 4). Los carbohidratos de la molécula de FSH comprenden aproximadamente el 30% de la masa total de la hormona [36]. Por otro lado, durante su síntesis, los oligosacáridos de cada antena de oligosacáridos son sujetos a un extenso procesamiento, produciéndose así una gran cantidad de variantes de cada molécula (di-, tri- o tetraglicosilada) de FSH con estructuras intermedias de oligosacáridos, que se secretan a la circulación y que se excretan en la orina después de la degradación de las formas poco sializadas o desializadas en el hígado [6]. Estas variaciones estructurales en la estructura de los oligosacáridos son la base química de su *microheterogeneidad* molecular. Como sucede con otras glicoproteínas, las estructuras de los oligosacáridos de la folitropina (y de otras hormonas glicoproteicas) son extremadamente variables y juegan un papel importante determinando diferentes propiedades de las hormonas incluyendo su vida media plasmática y su capacidad para unirse al receptor, activarlo y desencadenar una o varias señales de transducción intracelular [6, 10]. Por ejemplo, en las folitropinas humana y equina se han identificado al menos 35 diferentes tipos de oligosacáridos; en la FSH humana ~90% del total de oligosacáridos están sializados o sulfatados, lo cual les confiere

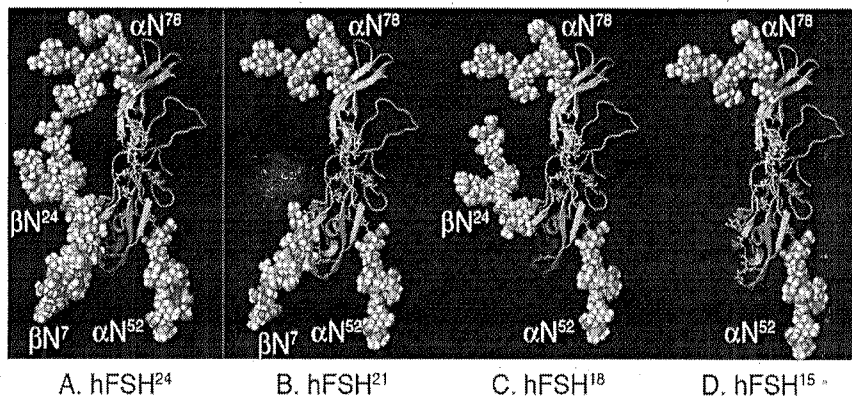


Figura 4. Modelos computacionales de las diferentes formas glicosiladas de la FSH: Tetraglicosilada (A), triglicosilada sin el oligosacárido en Asn24 (B) o Asn7 (C) y diglicosilada (sin oligosacáridos en la subunidad- β) (D).

características funcionales particulares tales como mayor o menor vida media plasmática y por lo tanto determinada actividad biológica neta en condiciones *in vivo*; el ácido siálico prolonga, en tanto que los residuos de sulfato acortan la vida media de la glicoproteína en la circulación [6, 10]. Por otro lado, se ha demostrado exhaustivamente que los residuos de carbohidratos internos al ácido siálico pueden influenciar la actividad biológica de la hormona a nivel de su célula blanco [10]. Estudios de mutagénesis dirigida y con isoformas naturales han demostrado que los oligosacáridos de la subunidad- β juegan un papel importante en la tasa de depuración plasmática de las gonadotropinas y de su potencia biológica, en tanto que el oligosacárido en posición α Asn52 es esencial para la activación del receptor y la transducción de señales intracelulares [39, 16, 17]. De hecho, la eliminación de este oligosacárido ya sea por métodos químicos o por mutagénesis sitio-dirigida, generan moléculas de gonadotropinas con una capacidad incrementada para unirse al

receptor, pero incapaces de inducir la transducción de señales intracelulares. Se desconoce con precisión porqué este sitio de glicación es crítico para la señalización intracelular pero no para la unión al receptor. Posiblemente, la deglicosilación en este sitio podría prevenir la agregación del receptor; de hecho, se ha informado que anticuerpos contra la hCG restauran el defecto en la inducción de señalización causado por la deglicosilación de la molécula en este sitio particular [36]. Una segunda posibilidad es que la longitud de la rama del oligosacárido Man(α 1-6)Man en el sitio α Asn52, pueda provocar interferencia estérica, disminuyendo la afinidad de la hormona para el receptor y permitiendo al mismo tiempo la flexibilidad necesaria para la transducción de la señal. Estudios recientes sobre la estructura tridimensional de la FSH complementamente glicosilada en complejo con el dominio extracelular del receptor (FSHR_{HB})/FSH, predicen contactos por puentes de hidrógeno entre el residuo GlcNAc proximal en α Asn52 y β Tyr58, lo cual posiblemente contribuye a la estabilización del dímero de la hormona [23]. En este escenario, un cambio conformacional (aún leve) podría repositionar los residuos críticos involucrados en la unión al receptor, los cuales se encuentran exactamente en la misma región del sitio de adherencia del oligosacárido. Ahora bien, el hecho de que las variantes deprivadas de α Asn52 presenten una elevada constante de afinidad, sugiere que la formación de un complejo fuertemente unido podría alterar la conformación final del complejo hormona-receptor productivo de una señal intracelular. Estudios más recientes indican, sin embargo, que el FSHR forma *trímeros* en la membrana celular y que cada complejo (ya sea monómero, dímero o trímero), puede unir únicamente una molécula del agonista [23]. Estos hallazgos, sugieren que las isoformas de la FSH pueden provocar *diferentes efectos* sobre la conformación del trímero, lo que podría potencialmente influir en la(s) señal(es) de transducción mediadas por el FSHR (*vide infra*):

La estructura de la FSH en complejo con el ectodominio del FSHR [40], muestra que los carbohidratos tienen poca influencia en la estructura general de la proteína y que en la interface de unión entre FSH y el FSHR_{HB} (el dominio de unión del receptor, *vide supra*) no hay carbohidratos; esto podría explicar porqué la deglicosilación de FSH no abroga la unión pero afecta profundamente la transducción de la señal. Sin embargo, el oligosacárido α Asn52 se encuentra cerca del sitio de unión del ligante con el receptor y se desconoce qué tipo de cambios o acomodamientos realiza la estructura FSHR₁₋₂₅₀ para unir a la FSH. El que las variantes de glicosilación de la FSH provoquen efectos diversos en la transducción de señales intracelulares y respuestas biológicas en sistemas *in vitro*, sugiere fuertemente que la unión de FSH a su receptor provoca rearrreglos (aún desconocidos) en la estructura transmembranal del receptor y que dependiendo del rearrreglo particular se definirá la intensidad o el tipo de respuesta biológica al estímulo con la gonadotropina.

La síntesis de las variantes naturales de glicación de la FSH está regulada hormonalmente, principalmente por los estrógenos producidos en el ovario [41]. La producción y secreción de las variantes poco sializadas aumenta durante la fase folicular tardía y preovulatoria del ciclo menstrual y su producción es marginal después de la menopausia, lo que indica que los estrógenos regulan positivamente su producción [42]. En modelos experimentales, las variantes poco sializadas desaparecen más rápido de la circulación pero presentan mayor actividad biológica en términos de producción de AMPc, aromatización de andrógenos y producción de activador del plasminógeno tisular, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* [12]. Estas observaciones, originales de nuestro laboratorio, son importantes porque indican que la actividad biológica de la FSH está finamente regulada por el tipo de carbohidratos presente en las cadenas de oligosacáridos. La evidencia parecería indicar que las variaciones estructurales de los oligosacáridos durante el ciclo estral y

menstrual representan un mecanismo regulatorio a través del cual la hipófisis anterior modula la intensidad de la señal gonadotrópica hacia el ovario.

Estudios recientes de Bousfield y cols. [37] en la Universidad de Wichita (KS, EUA) han aislado 4 grandes grupos de glicofomas de la FSH humana en la hipófisis y la orina de mujeres, de las cuales las formas tetraglicosilada y triglicosilada son las más importantes (Fig. 4), ya que su abundancia relativa varía con la etapa reproductiva de la mujer. La forma triglicosilada [FSH²¹-21 por su masa molecular o M_r - con un solo sitio glicosilado en la subunidad- β (Asn7) y los 2 sitios en la subunidad- α (Asn52 y Asn78)] es más abundante en la etapa reproductiva (representando el 53-72% del total de la FSH), en tanto que la tetraglicosilada (FSH²⁴) (esto es, con glicosilación completa) se incrementa progresivamente con la edad [38]. La FSH²¹ tiene una vida media plasmática menor, posee una afinidad mayor para el FSHR que la forma tetraglicosilada y es más activa biológicamente en sistemas *in vitro* (células de la granulosa de rata y células HEK-293), en tanto que la FSH²⁴ es más activa en osteoclastos, lo que sugiere que esta isoforma en particular podría estar involucrada en el desgaste óseo que se presenta durante la posmenopausia (Bousfield, G., comunicación personal). Las formas di-, tri- y tetraglicosiladas de la FSH natural definen la *macroheterogeneidad* de la FSH, en tanto que el tipo de carbohidratos terminales presentes en los oligosacáridos de cada una de estas variantes (principalmente la cantidad de ácido siálico y el número de antenas de los oligosacáridos) define la *microheterogeneidad* de una molécula particular de esta gonadotropina (a sea di-, tri-, o tetra-glicosilada) [6, 37]. Así, dos moléculas tetraglicosiladas de la FSH pueden diferir en su grado de microheterogeneidad [1].

La FSH recombinante (recFSH) producida en células CHO (células ováricas de hamster chino), es tetraglicosilada, contiene menos ácido siálico que la excretada en orina de mujeres postmenopáusicas (en la que predominan las formas ricamente sializadas), presenta mayor potencia biológica *in vitro* (e *in vivo*) pero menor vida media plasmática [1, 43] (Fig. 5). La FSH urinaria (uFSH) semeja más el perfil de formas moleculares presentes en la hipófisis que su homóloga recombinante (Fig. 5), su vida media plasmática es más corta y su potencia biológica es menor que la forma recombinante. Aquí es importante enfatizar que estas dos formas de la FSH difieren de forma importante en su *microheterogeneidad*, la cual es la responsable de las diferencias en respuestas biológicas *in vitro* e *in vivo* (Fig. 5). Recientemente se ha comercializado una nueva preparación recombinante de la FSH de larga acción y que corresponde a la recFSH tetraglicosilada a la que se le ha agregado mediante tecnología recombinante el carboxilo terminal de la hCG, el cual es rico en oligosacáridos ligados a serinas [44]. Hasta la fecha se desconoce si esta preparación en particular es más o menos potente que las otras dos en sistemas *in vitro*.

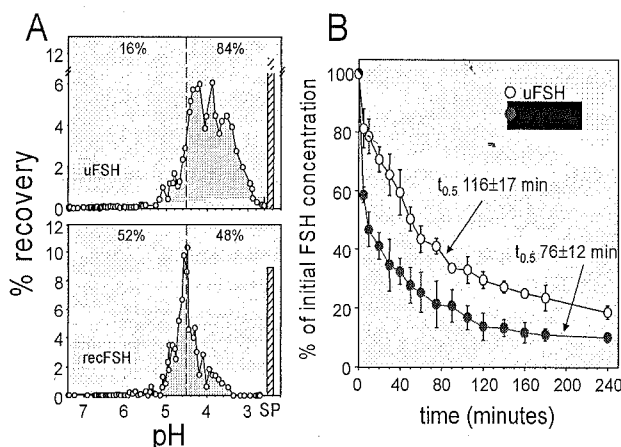


Figura 5. A: Patrón de distribución por carga (*microheterogeneidad*) de una preparación altamente purificada de FSH urinaria (uFSH) y de FSH recombinante (recFSH). La distribución de las isoformas mayores y menores a un pH de elución de 5.5 entre las 2 preparaciones difiere de forma importante. **B:** Vida media plasmática de los 2 análogos de la FSH mostrados en A; la vida media es más prolongada para la FSH urinaria, la cual tiene un mayor contenido de carbohidratos cargados negativamente -ácido siálico, principalmente- que la recFSH (ref. 1).

Las gonadotropinas humanas han sido utilizadas desde hace varias décadas para el tratamiento de la infertilidad en la mujer. En particular, la FSH exógena, ya sea recombinante o concentrada y purificada a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas, ha sido una herramienta fundamental en las tecnologías modernas de reproducción asistida (ART). Existen varias preparaciones recombinantes y naturales de la FSH que son ampliamente utilizadas en programas de fertilización asistida para la hiperestimulación controlada del crecimiento folicular. Básicamente existen en el mercado 3 preparaciones que contienen únicamente FSH: a) recFSH producida en células CHO; b) Preparaciones de FSH urinaria altamente purificada de orina de mujeres postmenopáusicas; c) Una quimera compuesta por recFSH a la cual se le ha fusionado la extensión COOH-terminal de la subunidad- β de la CG (recFSH de larga acción, bautizada por el fabricante como coriolfolitropina- α), la cual se encuentra ricamente sializada (ya que tiene cuatro sitios adicionales de O-glicosilación) [45-47]. Aunque la información al respecto es aún contradictoria, se ha informado que la preparación recombinante es más eficaz que la urinaria para inducir crecimiento folicular en mujeres tratadas con una u otra formulación; aparentemente se requiere de menos dosis total de recFSH y menor tiempo de administración para inducir desarrollo folicular múltiple [45-47]. Los resultados en términos de tasa de embarazo han sido contradictorios; un meta-análisis de 18 estudios publicados en el 2002 reveló que las preparaciones recombinantes dieron lugar a tasas de embarazo mayores que la preparación urinaria, en tanto que otro posterior (2004, 5 estudios)[45, 46], no reveló ninguna diferencia en este parámetro. A pesar de estos estudios, no existe todavía una respuesta a la pregunta de cuál preparación es la óptima para estimular el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria y si estas diferentes preparaciones (natural vs recombinante) presentan agonismo selectivo y/o estimulan o inhiben diferencialmente la transcripción de genes regulados por la FSH, ya que aunque básicamente son tetraglicosiladas, todas ellas difieren entre sí en su grado de *microheterogeneidad*. La información relacionada con la eficacia comparativa de la coriolfolitropina- α vs recFSH y uFSH, tanto *in vivo* como *in vitro* es muy escasa ya que esta preparación fue introducida en el mercado recientemente.

Dilucidar parcial o totalmente estas preguntas no es un aspecto trivial que pueda ser aplicado únicamente al tratamiento para la infertilidad. Estudios recientes han sugerido que la FSH puede ejercer efectos extraováricos (por ejemplo en hueso, regulando la actividad de los osteoclastos [48, 49], angiogénicos [50] y promotores del crecimiento e invasión del cáncer epitelial del ovario [51, 52]). El conocimiento de la relación estructura-actividad de las diferentes formulaciones de la FSH (incluyendo las formas naturales di-, tri- y tetraglicosiladas) y de pequeñas moléculas con actividad gonadotrópica o reguladoras del FSHR, y particularmente sus potenciales efectos selectivos en señales de transducción intracelular y en la expresión génica de sus células blanco, podría tener, por lo tanto, implicaciones importantes en la terapéutica medicamentosa.

1.2 Vías de señalización estimuladas por la FSH

Como se mencionó anteriormente, la vía de señalización intracelular clásica o canónica $G\alpha_s$ /AMPC/PKA (cinasa A de proteínas) ha sido reconocida durante los últimos 20 años como el mecanismo efector básico de la acción biológica de las gonadotropinas [27, 28, 20, 22]. Se ha demostrado, sin embargo, que el FSHR también se acopla a otras proteínas G, incluyendo la proteína G_i y a la vía mediada por el trifosfato de inositol, particularmente a dosis altas del agonista [22]. Además de la PKA, la FSH activa también a otras cinasas de proteínas, incluyendo la PI3K (a través del andamio APPL1, de β -arrestinas y de Src), la PKB (a través de mecanismos dependientes e independientes de $G\alpha_s$ /PKA como Epac –proteína de intercambio activada por AMPC-), ERK1/2

(a través de PKA y de β -arrestinas) y a otras vías que se muestran en las figuras 2 y 3 [22]. Esta compleja red de señalización, que conlleva a la transcripción de diferentes genes, indica que la señal de transducción mediada por el complejo FSH/FSHR no es lineal y que su activación involucra diferentes conformaciones del receptor que pueden ser diferencialmente estabilizadas por agonistas. En este escenario, el agonista natural activaría *todas* las vías de señalización dependientes del mismo, en tanto que análogos con actividad agonista (y aún antagonista para ciertos efectos), podrían preferentemente activar una (o varias) cascadas de señalización, lo que se conoce como *agonismo selectivo* (Fig. 6) [53, 54, 33, 55, 56, 22].

La activación del FSHR por su agonista (FSH) en la célula de la granulosa activa a su vez diversas cascadas de señalización, que eventualmente influyen en la transcripción de diferentes genes que regulan una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la proliferación y diferenciación, la inhibición de la apoptosis, la esteroidogénesis y la aromatización de los andrógenos producidos en la célula de la teca, la producción de diversas hormonas no esteroideas y de factores de crecimiento, etc. [57, 28]. En particular, diversos estudios han empleado secuenciación de alto rendimiento (next-generation sequencing –NGS–) en un intento por caracterizar los efectos de esta gonadotropina en la transcripción génica de células de la granulosa (murales) y del cumulus ooforus (que son las células de la granulosa que rodean al ovocito) de folículos preovulatorios en primates no humanos y en mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada [58-62]. El gran problema con prácticamente todos estos estudios es que los esquemas de inducción de la maduración folicular han incluido, además de FSH recombinante (o de la combinación FSH/LH de origen urinario); la administración de dosis elevadas de hCG para estimular la maduración final ovocitaria, lo que indudablemente ha influido de manera dramática en los perfiles de expresión génica de las células de la granulosa al provocar su diferenciación a células granulosa-luteínicas [58-62]. Aunque la información derivada de estos estudios ha sido, indudablemente, útil para conocer el perfil general de la transcripción de numerosos genes en células de la granulosa y del cumulus (las cuales no expresan el FSHR) de folículos preovulatorios estimulados con recFSH o la combinación uFSH/uLH, su diseño no ha permitido identificar si los diferentes análogos de la FSH empleados inducen de manera diferencial y selectiva la expresión de genes particulares regulados por esta hormona. El presente estudio pretende explorar este aspecto con mayor detalle, aplicando diferentes diseños experimentales en sistemas *in vitro* e *in vivo* que permitan identificar con precisión los genes que son expresados o reprimidos de forma selectiva y diferencial en respuesta al estímulo con distintas preparaciones de la FSH empleadas de forma rutinaria en programas de fertilización asistida y así poder caracterizar el agonismo selectivo de estos análogos.

1.3 Agonismo Selectivo

El *agonismo selectivo* (también conocido como selectividad funcional, tráfico dirigido por el agonista, eficacia colateral y agonismo sesgado –biased agonism–) es un concepto de gran importancia en la farmacología moderna, que describe la propiedad o capacidad de ciertos ligantes y análogos de activar de forma *diferencial* una o varias cascadas de señalización a través de un GPCR particular [53](Fig. 6). Este concepto ha retado al concepto clásico de eficacia intrínseca, en el que agonistas completos o parciales activan consistente y simultáneamente varias señales de transducción a través de la estabilización de una sola conformación activa del receptor (o de una conformación inactiva como en el caso de agonistas inversos), dependiendo de su afinidad por el mismo (es decir, por la intensidad de la interacción ligante-receptor) y de su eficacia intrínseca,

determinada por la capacidad del ligante unido para inducir una respuesta biológica [33, 56]. El concepto de *agonismo selectivo* implica, por lo tanto, que no existe una sola conformación activa del receptor y que ligantes diferentes (o mutaciones en la molécula del receptor) pueden estabilizar ciertas conformaciones activas del receptor de forma selectiva [32]. Estos ligantes incluyen aquellos que se comportan como antagonistas para una vía de señalización en particular y como agonistas para una vía diferente en la misma célula. Así, por ejemplo, ciertos agonistas (o una mutación particular del receptor) podrían preferencialmente reclutar o activar efectores no dependientes de las proteínas G, como son las β -arrestinas, es decir, modular un subconjunto de señales de transducción activadas habitualmente por un agonista completo, sin provocar efectos sobre otras señales (activadas por el agonista completo) (Fig. 6) [63, 64]. Se ha demostrado que en respuesta a ciertos compuestos, algunos GPCR pueden activar de forma diferencial y selectiva sus cascadas de señalización asociadas; estos receptores incluyen los receptores 5-HT₂ serotoninérgicos, los receptores opioides- μ , los receptores para angiotensina II, β_2 -adrenérgicos y D_{2L} y D₁ dopaminérgicos y el receptor V₂ de vasopresina, por citar algunos [54, 33, 55, 65]. Por ejemplo, en el caso de ligantes serotoninérgicos asociados a los receptores 5HT_{2A} y 5HT_{2B}, se ha observado que la eficacia relativa de ciertos agonistas para cada uno de los receptores difiere dependiendo del efecto que se evalúe (acumulación de fosfatos de inositol -IP- mediada por la activación de la

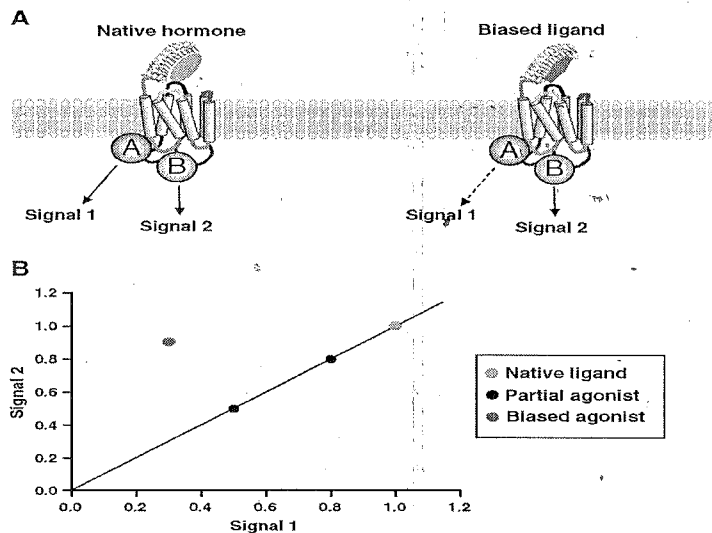


Figura 6: Agonismo selectivo en GPCRs. **A:** la hormona nativa activa 2 cascadas de señalización (señales 1 y 2 – efectores A y B), en tanto que un agonista selectivo activa preferencialmente la señal 2 a través del efector B; **B:** Relación entre las señales 1 y 2 mostradas en A con el estímulo del ligando nativo, 2 agonistas parciales y un agonista selectivo. La magnitud de la señal 2 para este último es aproximadamente 4 veces mayor que aquella de la señal 1 (ref. 22).

fosfolipasa C -PLC- o liberación de ácido araquidónico [33]. Igualmente, la eficacia de agonistas serotoninérgicos para activar los mecanismos de desensibilización de su receptor varía dependiendo del agonista [66, 33]. En el caso de receptores opioides- μ , se han encontrado diferencias en la capacidad de sus agonistas para inducir endocitosis del receptor en fibroblastos transfectados y en neuronas que expresan estos receptores *in vivo* [67, 68], la cual no correlaciona con su eficacia intrínseca para activar la adenilil ciclasa o canales GIRK (canales de potasio rectificadores hacia el interior activados por una proteína G). Para los receptores β_2 -adrenérgicos, se ha encontrado que determinados agonistas pueden inducir efectos diferenciales en sitios específicos de fosforilación del receptor y en su endocitosis [69], en tanto que para agonistas del receptor V₂ de vasopresina es posible separar los efectos en la inducción de transducción de señales de aquellos involucrados en la endocitosis [70]. La aplicación de este concepto relativamente reciente, ha abierto nuevos caminos

para el descubrimiento de estrategias terapéuticas innovadoras.

En el caso de la FSH, las variaciones en su glicosilación pueden potencialmente conferir a una variante determinada la capacidad de comportarse como agonista selectivo y de ejercer, por ejemplo, control sobre la expresión de diferentes ARNm. De hecho, en estudios recientes se ha encontrado que una isoforma parcialmente deglicosilada de la LH equina, con capacidad de unirse tanto al receptor de LH como al de FSH, ejerce agonismo preferencial hacia la señalización dependiente de β -arrestinas a juzgar por el patrón de fosforilación de la proteína ribosomal S6 (rpS6); esta misma variante también promovió de forma selectiva la fosforilación de MAPK-ERK1/2 a través de la vía de la β -arrestina, independientemente de la mediada por la proteína Gs [71]. En el caso de pequeñas moléculas, recientemente se ha encontrado que moduladores alostéricos del FSHR (ADX61623 y ADX68692; Addex Pharmaceuticals SA, Ginebra, Suiza) que bloquean la acción de FSH en el ovario, provocan antagonismo selectivo, ya que aunque bloquean la vía Gs-PKA-progesterona no lo hacen con aquella que regula la producción de estradiol, tanto *in vitro* como *in vivo* [72, 73]. A nivel del FSHR, se ha documentado que ciertas mutaciones pueden provocar efectos selectivos sobre efectores acoplados a este receptor al estimularse con el agonista, como es el caso de las mutaciones A189V y N431I. En el caso de la primera cuando el FSHR A189V se expresó en la membrana plasmática a densidades bajas, la señalización mediada por β -arrestinas predominó sobre aquella mediada por la proteína Gs [63]. En la segunda mutación, la expresión del FSHR N431I no afectó la señalización mediada por la FSH natural pero sí su eficacia colateral, ya que su desensibilización e internalización disminuyeron de forma notable [64, 26].

Como se mencionó anteriormente, los efectos diferenciales de las variantes por carga de la FSH natural (Fig. 5A) fueron demostrados por el grupo del investigador responsable de la presente propuesta, tiempo antes de que el concepto de agonismo selectivo emergiera en la farmacología de los GPCRs tal y como la conocemos en la actualidad [34, 35, 12]. Así, demostramos que a concentraciones equimolares, las variantes pobres en ácido siálico eran más potentes que las intensamente sializadas para provocar la producción de AMPc, la aromatización de andrógenos y la actividad del activador de plasminógeno tisular (incluyendo la producción de sus ARNm) en células de la granulosa en cultivo; por el contrario, las variantes fuertemente sializadas fueron más potentes que sus contrapartes menos sializadas para inducir la producción del ARNm de la inhibina- α [35]. Esta serie de estudios también encontró que una variante de FSH escasamente sializada y con antenas ricas en manosa y oligosacáridos híbridos, inhibió la aromatización de los andrógenos y la actividad del activador de plasminógeno tisular e indujo una curva dosis respuesta de tipo bifásica, con la disminución en producción de AMPc a concentraciones elevadas de la variante, lo que sugirió la activación simultánea de diferentes subtipos de proteínas G, en este caso en particular, de la proteína Gi/Go [34]. Aquí es importante subrayar que toda esta serie de estudios se realizó empleando variantes semipuras de extractos de hipófisis anterior humanas y que hasta la fecha no existen estudios con macrovariantes de glicosilación naturales ni recombinantes, ni con pequeñas moléculas con actividad agonista de FSH, que hayan documentado efectos selectivos de estos agonistas en la transducción de señales mediadas por el FSHR.

El estudio del agonismo selectivo a nivel del FSHR humano es de gran importancia, no sólo conceptualmente sino también para su aplicación en la terapéutica medicamentosa. La caracterización de los efectos selectivos de diversos agonistas de la FSH a través del estudio de la expresión de ARNm inducidos por estas variantes, de la activación de diversas señales de transducción y cascadas de señalización mediadas por el FSHR y de su eficacia colateral (evaluada

a través del estudio de su cinética de internalización), en diferentes contextos celulares, podría tener un gran impacto en el tratamiento de la infertilidad, la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica en los programas de ART, la osteoporosis en la posmenopausia y la anticoncepción, por ejemplo, en los que sus efectos diferenciales podrían ser explotados para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Resumiendo:

1. La FSH es una hormona glicoproteica indispensable para la función reproductiva. Su estructura molecular es compleja y existen diferentes formas o variantes moleculares de la misma. Su macroheterogeneidad está dada por el número de oligosacáridos incorporados en sus subunidades, en tanto que su microheterogeneidad la constituye su variabilidad en residuos de ácido siálico o sulfato terminales o el número y estructura de las antenas de sus oligosacáridos.
2. La unión de la FSH a su receptor va seguida de la activación de múltiples cascadas de señalización que conllevan en su célula blanco a la activación de diferentes genes que regulan la maduración folicular y ovocitaria.
3. Ciertos agonistas son capaces de activar y estabilizar a su receptor específico en una o varias conformaciones, lo que les permite activar o inhibir *selectivamente* algunas vías de señalización particulares. En el caso del FSHR, se ha encontrado que un agonista experimental activó selectivamente la cascada de señalización de las MAPKs mediada por β -arrestinas, sobre aquella mediada por la proteína Gs, lo cual indicó que la conformación de este receptor puede ser estabilizada preferencialmente por agonistas selectivos.
4. Se desconoce si análogos naturales de la FSH (FSH tri- y tetraglicosiladas) de origen hipofisario o urinario (fracción excretada), así como análogos recombinantes utilizados en la terapéutica medicamentosa de la infertilidad, provocan efectos selectivos sobre alguna cascada de señalización en particular. Para el caso de pequeñas moléculas con actividad alostérica en el FSHR se desconoce si además de regular ciertos efectos selectivos a nivel del receptor (progesterona vs estradiol) son capaces de regular de la misma forma la expresión de otros genes involucrados en la función de la célula de la granulosa. Caracterizar estos efectos selectivos podría servir de base para la generación de nuevas combinaciones de medicamentos o de estrategias terapéuticas innovadoras en diferentes enfermedades reproductivas o en otros sistemas en donde esté involucrado el FSHR.

1.2 Originalidad y relevancia científica básica del proyecto

Resulta claro que los mecanismos de control hormonal mediados por las gonadotropinas están relacionados a una diversidad de vías mucho más vasta de lo que antes se consideraba. Sin embargo, la actividad a nivel sistémico de muchas de las vías interrelacionadas y la posibilidad de comunicación entre éstas hace que su descubrimiento y análisis requiera de metodologías de investigación más sofisticadas. En fechas recientes, el análisis de datos masivos derivados de las tecnologías genómicas nos ha dotado de una capacidad sin precedente para avanzar en el conocimiento de los intrincados procesos implicados en la señalización y el control hormonal. Tecnologías como la secuenciación de cobertura amplia del genoma y transcriptoma nos proveen la oportunidad de estudiar los orígenes moleculares de los procesos metabólicos y de señalización que determinan tales fenotipos complejos. Mediante el análisis computacional y el modelado probabilístico de los datos generados, por ejemplo, en la secuenciación del transcriptoma y la experimentación en biología celular, es posible categorizar y priorizar las vías más activas y los

mecanismos biológicos implicados en los procesos de control hormonal mediante un enfoque sistemático e integrativo.

El estudio bioquímico de la diversidad y selectividad en la transducción de la señal intracelular inducido por diferentes análogos naturales y recombinantes de la FSH y modulado por moléculas alostéricas, así como el análisis del transcriptoma inducido por éstos, revelará patrones globales de expresión genética característicos bajo diferentes condiciones y vías de señalización preferentemente activadas por diferentes ligantes. Del estudio de tales patrones será posible determinar qué moléculas son clave en la inducción del fenotipo y la respuesta hormonal y a partir de éstas reconstruir las posibles vías implicadas, para posteriormente analizar los mecanismos bioquímicos de acción asociados a tales vías, con miras al perfilado diagnóstico y la posible implementación terapéutica. Hasta la actualidad no existen estudios que hayan empleado este enfoque bioquímico-transcriptómico para caracterizar vías de señalización particulares para variantes estructurales de un ligante determinado, como lo es en este caso la hormona estimulante del folículo, fundamental en la regulación de la función reproductora en el humano.

II. Hipótesis

Los análogos naturales y recombinantes de la FSH, así como moduladores alostéricos del FSHR provocan efectos selectivos en la expresión génica y en la activación de cascadas de señalización mediadas por el FSHR.

III. Objetivo general

Analizar los efectos agonistas selectivos de análogos naturales (tri- y tetraglicosilados, de origen hipofisario y urinario) y recombinantes (tetra- y pentaglicosilados) de la FSH, así como de moduladores alostéricos del FSHR (ADX61623 y ADX68692), mediante estudios bioquímicos y de secuenciación de ARNm de alto rendimiento, en diferentes contextos celulares y sistemas: *a*) sistemas *in vitro* homólogos (células de la granulosa humanas immortalizadas –células KGN- y células de riñón de embrión humano –HEK293-); *b*) dos sistemas heterólogos (células de Sertoli de ratón immortalizadas –línea MSC-1- y células de la granulosa de rata en cultivo); y *c*) un sistema *in vivo* (células de la granulosa humanas proveniente de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada), así como proponer modelos de activación selectiva de las diferentes cascadas de señalización reguladas por cada uno de los análogos estudiados.

III.1 Objetivos específicos

1. Estudiar el o los efectos selectivos de diferentes análogos de la FSH (FSH urinaria pura, FSH recombinante y coriofolitropina alfa) disponibles en el mercado y con variaciones en su glicosilación, en la activación de las vías de señalización mediadas por las proteínas G_s , G_i y $G_{q/11}$, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de G_s y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares immortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.
2. Estudiar el o los efectos selectivos de diferentes *análogos naturales* de la FSH hipofisaria (FSH tri- y tetraglicosilada) en la activación de las vías de señalización mediadas por las proteínas G_s , G_i y $G_{q/11}$, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de G_s y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en

las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.

3. Estudiar el efecto de los moduladores alostéricos ADX61623 y ADX68692 en el agonismo selectivo de las diferentes preparaciones naturales y recombinantes de la FSH sobre las vías de señalización mediadas por las proteínas G_s , G_i y $G_{q/11}$, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de G_s y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.
4. Analizar el transcriptoma global de células de la granulosa humanas obtenidas de mujeres estimuladas con FSH recombinante; FSH urinaria o coriogonadotropina alfa, durante su maduración folicular final, mediante secuenciación de alto rendimiento (NGS) y validar los resultados mediante RT-PCR cuantitativo.
5. Analizar el transcriptoma global de células HEK-293, KGN y MSC-1 estimuladas con diferentes preparaciones naturales y recombinantes de la FSH, en presencia o ausencia de moduladores alostéricos, mediante NGS y validar los resultados de los genes identificados expresados de forma diferencial mediante RT-PCR cuantitativo.
6. Caracterizar la activación selectiva de las diferentes vías de señalización intracelular provocadas por las preparaciones naturales y recombinantes de la FSH estudiadas empleando análisis computacional y modelado probabilístico, con base en los resultados obtenidos de los estudios bioquímicos y transcriptómicos.

IV. Metas

1. Validar a la secuenciación de nueva generación como una herramienta que permita identificar con alta sensibilidad y especificidad el agonismo selectivo de diferentes análogos de la FSH (y de otras hormonas con blancos en GPCRs), para que eventualmente pueda ser utilizada en el tamizaje a gran escala de nuevas moléculas agonistas o antagonistas con propiedades selectivas en la señalización intracelular de sus células blanco.
2. Identificar con precisión agonistas selectivos del FSHR (y de otros GPCRs) y moléculas alostéricas para este y otros receptores, que den lugar al diseño de nuevas estrategias terapéuticas, patentables y potencialmente aplicables en el tratamiento de enfermedades reproductivas, osteoporosis, cáncer epitelial del ovario y en anticoncepción.
3. Consolidar un grupo de trabajo multidisciplinario para el estudio y diseño de nuevos medicamentos entre los investigadores adscritos a la Red de Apoyo a la Investigación de los Institutos Nacionales de Salud (SSA)-Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM y aquellos que pertenezcan al Consorcio RAI (*vide infra*).

V. Material y Métodos

V.1 Material:

Análogos de la FSH y moduladores alostéricos:

Los diferentes análogos de la FSH que se estudiarán serán los siguientes:

- a. FSH recombinante –análogo tetraglicosilado- producida por células CHO (Gonal-F, Laboratorios Merck-Serono, México).

- b. FSH urinaria altamente purificada –tetraglicosilado- (Bravelle, Ferring Pharmaceutical, México).
- c. Coriofolitropina alfa –análogo pentaglicosilado con cuatro sitios glicosilados en *N* (aspargina) y uno en *O* (serina) (Lyrixim, Shering-Plough, México).
- d. FSH hipofisaria, triglicosilada (hFSH²¹) y tetraglicosilada (hFSH²⁴). Ambas serán provistas por el Dr. George Bousfield, Wichita State University, Wichita, KA, EUA. La obtención y purificación de ambas preparaciones son parte del macroproyecto “*Age-related changes in gonadotropin glycosylation and function*”, en desarrollo en esta universidad y en el que el investigador responsable de la presente propuesta forma parte del External Advisory Committee desde el año 2008.
- e. ADX61623 y ADX68692 -moduladores alostéricos- (Addex Pharma S.A, Plan-les-Ouates, Ginebra, Suiza). Ambos moduladores serán donados por el Dr. James A. Dias, Department of Biomedical Sciences, State University of New-York at Albany, Albany, Nueva York, EUA, con quien el investigador responsable de la presente propuesta ha colaborado estrechamente en el desarrollo de proyectos de investigación desde el año de 1999. Los Dres. George Bousfield (Wichita State University), James A. Dias y el investigador responsable forman parte del consorcio sCORTS (Studium Consortium for Research and Training in Reproductive Sciences, Tours, France), lo que garantizará la provisión de los reactivos descritos en *d* y *e*.

Líneas celulares y células de la granulosa humanas:

Líneas celulares:

- a. Células HEK-293 hFSHR⁺ que expresan de manera estable el FSHR humano: Esta línea celular está disponible en el laboratorio del investigador responsable y se tiene amplia experiencia en su manejo (ver listado de referencias).
- b. Células MSC-1 (Mouse Sertoli Cells): Esta línea celular está disponible en el laboratorio del investigador responsable y se tiene experiencia en su manejo [74].
- c. Células KGN (derivada de tumor de células de la granulosa humanas): Esta línea celular está disponible en el laboratorio del investigador responsable y se tiene experiencia en su manejo [75].

Las células humanas de la granulosa serán obtenidas de voluntarias sanas sometidas a hiperestimulación ovárica controlada en la Clínica de Fertilización Asistida del Hospital Ángeles del Pedregal de la Ciudad de México, a cargo del Dr. Héctor Salvador Godoy Morales. Las mujeres serán tratadas con las preparaciones comerciales descritas anteriormente, con esquemas de estimulación convencionales y las células de la granulosa de folículos preovulatorios serán obtenidas del material recuperado en la punción folicular para la captura del ovocito, que es un procedimiento de rutina previo a la fertilización *in vitro*.

El resto de los materiales que se utilizará se menciona en la descripción de los métodos (*vide infra*).

V.2 Métodos:

Cultivos Celulares:

Las células HEK-293, MSC-1 y KGN serán expandidas y cultivadas siguiendo las técnicas antes

descritas por el laboratorio del investigador responsable. Las células HEK-293 que expresan de forma permanente el FSHR, se cultivarán y mantendrán en medio Eagle modificado (Dulbecco; DMEM, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos; los cultivos subconfluentes se transfectarán con el gene reportero pSOMLuc tal y como se ha descrito previamente [63]. Las células MSC-1 se cultivarán en DMEM suplementado y se co-transfectarán con el cDNA del FSHR y el gene reportero pSOMLuc por medio de endocitosis por liposomas, en tanto que las células KGN se cultivarán en medio DMEN/F12 suplementado con SFB y antibióticos serán transformadas con adenovirus recombinante (1×10^5 partículas virales por célula) para expresar el FSHR. El cultivo de células de la granulosa de rata se realizará utilizando ratas Wistar de 21 días de edad, pretratadas con dietilelbestrol (DES) tal y como se describió previamente. Después de 4 días de la implantación de las cápsulas de DES, los animales serán eutanizados y se recuperarán de los folículos antrales las células de la granulosa por punción. Las células serán cultivadas en placas de 6 pozos de poliestireno e incubadas en presencia de medio de cultivo McCoy suplementado con glutamina, androstenediona y antibióticos a 37 C, en ambiente húmedo con 95% CO₂:5%O₂. Después de 24 horas de incubación, las células serán expuestas durante 48 a diferentes concentraciones de las 4 preparaciones de FSH (tetraglicosilada, triglicosilada, FSHc y FSH recombinante humana) y su efecto en la expresión de ARN mensajeros se analizará como se describe posteriormente.

Incubaciones:

Después de 48 horas de incubación a 37° C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂, las células HEK-293, MSC-1 y KGN serán estimuladas con los diferentes análogos de la FSH a dosis progresivas (curvas dosis-respuesta) o a las equivalentes a la DE₅₀ y V_{max} de cada preparación (estudios de RNAseq y pERK1/2), en ausencia o presencia de ADX61623 ó ADX68692, de toxina pertussis o del inhibidor de la cinasa A de proteínas (PKA), H89, durante tiempos variables, dependiendo de la lectura deseada: producción de AMPc (Gs y Gi), recambio de fosfoinosítidos con la producción de 1,4,5-tri-fosfato de inositol (IP3) (Gq/11), inducción de la fosforilación de ERK1/2 (pERK), y desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR provocados por el análogo. Los detalles de las incubaciones están ampliamente descritos en las referencias de estudios del investigador principal. En el caso de la determinación de IP3, las células serán inicialmente pre-expuestas a 4 µCi/ml de [³H]-myo-inositol y posteriormente al análogo de FSH [76]. Para los estudios de desensibilización inducida por el ligante, la primera incubación se realizará durante 2 horas en tanto que la segunda será de 30 minutos, en presencia de dosis máximas del análogo [64].

Medición de las respuestas:

Estudios de unión de análogos al FSHR: La unión de cada uno de los análogos en ausencia o presencia del modulador alostérico al FSHR en cada línea celular, será evaluado por radioreceptor, tal y como ha sido extensamente descrito por el laboratorio del investigador principal [21].

Producción de AMPc: La producción intra- y extracelular del AMPc inducido por la exposición a los análogos de FSH será medida y cuantificada mediante el radioinmunoanálisis (RIA) implementado en el laboratorio de investigador principal así como por quimioluminiscencia, después de procesar las células siguiendo las técnicas descritas previamente [63].

Recambio de fosfatos de inositol (producción de IP3): La separación de IP3 y su cuantificación en

respuesta a los análogos de FSH será realizada utilizando cromatografía de intercambio iónico en columnas de Dowex y por espectrometría de centelleo líquido, tal y como se ha descrito previamente [76].

Fosforilación de ERK1/2: La cantidad de ERK1/2 fosforilada en respuesta a la activación del efector PKA y/o del reclutamiento de β -arrestinas será detectada en precipitados de proteínas intracelulares mediante inmunoblots empleando como anticuerpo primario anti-fosfo-ERK1/2 p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, EUA) (dilución 1:3000) e IgG anti-ratón secundario conjugado con peroxidasa de rábano (horseradish). La señal se generará utilizando el estuche Pierce ECL EB. La carga equivalente de proteínas en el gel se confirmará mediante la incubación de las membranas con el anticuerpo primario anti-ERK2 total (dilución 1:10000) de Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, CA, EUA). Se realizarán experimentos coexpresando una forma dominante negativa de las β -arrestinas 1 y 2 (arr319-418) [63] para verificar el papel de estas moléculas en la fosforilación de ERK1/ERK2.

Desensibilización del FSHR: La cinética de desensibilización del FSH provocada por el ligante se medirá mediante la cuantificación de AMPc por RIA, después de una exposición inicial con dosis crecientes del ligante y una posterior con dosis máximas del mismo [64].

Internalización del FSHR: Dado que en el sistema FSH-FSHR el complejo ligante-receptor es internalizado y parcialmente reciclado, se realizarán experimentos para estudiar el papel de diferentes análogos de FSH en estos procesos inducidos por el estímulo del agonista. La cinética de internalización del FSHR inducida por el ligante se analizará por medio de citometría de flujo y microscopía confocal. Las células transfectadas con el FSHR se incubarán con el análogo de FSH por 0' y hasta 120'. A los 0', 60' y 120' se detendrá la incubación en 4 pozos mediante lavado con medio de cultivo y las células de un par se incubarán nuevamente en tubos de citometría en presencia del Ac Mab106.105 y posteriormente con el Ac secundario anti-Fc IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Becton Dickinson and Co. -BD- Nueva Jersey, EUA). Aquellas del par restante serán sometidas al mismo tratamiento pero después de su permeabilización con Cytotfix/cytoperm (BD). La cantidad de FSHR en la superficie de las células (no internalizado) y en su interior (internalizado) será medida por citometría de flujo empleando un citómetro LSR II Fortessa (BD). Para los estudios de microscopía confocal, las células transfectadas cultivadas sobre cubreobjetos redondos tratados con Histogrip (Life Technologies) y depositados en placas de 12 pozos, serán estimuladas con diferentes análogos en ausencia y presencia de los moduladores alostéricos durante 120'. Después de su lavado, las células se fijarán e incubarán con el anticuerpo primario anti-FSHR mAb106.105, seguido del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC a una dilución 1:200 (Millipore, Temecula CA, USA). Las laminillas serán visualizadas en un microscopio confocal ZEISS LSM 710-DUO (Fig. 7).

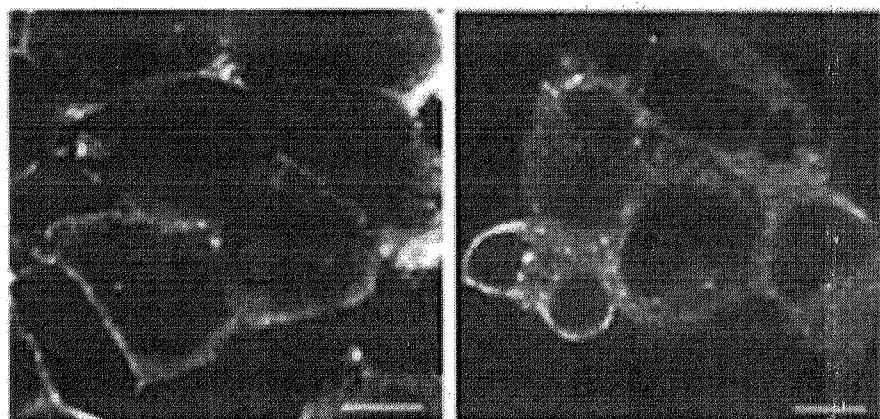


Figura 7. Internalización del FSHR sobreexpresado en células HEK-293, después de la exposición a 100 ng/ml de recFSH. Después de la incubación por 2 horas con el agonista y de su fijación, las células fueron expuestas al Ac anti-FSH Mab 106.105 y posteriormente al segundo

anticuerpo conjugado con FICT y visualizadas por microscopía confocal. **A:** FSHR antes de la exposición a FSH; **B:** FSHR 2 horas después del estímulo

Para los estudios de reciclamiento del FSHR a la membrana plasmática, las células serán expuestas durante 2 horas al análogo de la FSH y posteriormente se incubarán durante 4 horas adicionales en ausencia del análogo, al término de las cuales se cuantificará el FSHR presente en la membrana (internalizado-reciclado) y en el interior de la célula (degradado) por medio de citometría de flujo.

Caracterización del transcriptoma en líneas celulares y células de la granulosa humanas y de rata mediante secuenciación de nueva generación:

Generación de bibliotecas: La secuenciación del transcriptoma global se realizará en células HEK-293, MSC-1, KGN y de la granulosa de rata estimuladas y no estimuladas con diferentes análogos de la FSH, así como en células de la granulosa humanas obtenidas de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada. La preparación de las bibliotecas de ADNc será la recomendada para secuenciación a gran escala en el secuenciador HiSeq 2500 (plataforma Illumina). Después de la extracción del ARN total y de eliminar el ARN ribosomal, el ARNm se purificará utilizando perlas magnéticas prefabricadas (TruSeq Total RNA with Ribo-Zero Gold, Illumina, San Diego, CA, EUA). Posterior a la fragmentación, se sintetizará el ADNc empleando el estuche Transcriptasa Reversa SuperScript II, cebadores aleatorios, RNaseOUT, dNTPs y T4 Gene 32. Las bibliotecas serán preparadas siguiendo las recomendaciones para la secuenciación de ARNm de Illumina. Cada biblioteca tendrá un tamaño de inserto aproximado de 150-200 pares de bases y la calidad y tamaño de los mismos se verificará utilizando un Bioanalizador 2100 de Agilent Technologies. La generación de clusters y la secuenciación en ambos extremos de los fragmentos (paired-end) se realizarán empleando los procedimientos estándar recomendados para el HiSeq 2500 y los estuches TruSeq SNS v3-HS y TruSeq PE Cluster v3-cBot-HS (Illumina). La fidelidad de la secuenciación se verificará empleando el control Phix Control v3 (Illumina).

Análisis de expresión: Para el análisis bioinformático del transcriptoma se realizará un análisis de control de calidad en las secuencias usando la herramienta FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Una vez que se hayan eliminado los adaptadores y se cuente con secuencias de alta calidad, las lecturas de cada condición se mapearán al genoma humano de referencia (hg19) empleando el software TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu>) que utiliza la herramienta bowtie [77]. Los alineamientos generados por TopHat serán alimentados al software cufflink (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) para ensamblar los transcritos y generar el transcriptoma de cada condición. Los ensamblados serán procesados con la herramienta Cuffmerge (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>), que genera una base uniforme (normalización) para calcular la expresión génica y la transcripción en cada condición con base al conteo de lecturas y/o FPKM (fragmentos por Kilobase de exón por millón de lecturas) sobre los transcritos del genoma. Las lecturas y los archivos de salida de Cuffmerge se alimentarán a la herramienta Cuffdiff (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) para calcular los niveles de expresión, determinar la significancia estadística en cada condición e identificar los genes que son regulados diferencialmente a nivel transcripcional o post-transcripcional [78]. Para la visualización de los datos, se utilizarán los programas GenomeBrowser (<http://www.broad.mit.edu/annotation/argo/>) y Tasuke [79].

Validación de los resultados: El nivel de los transcritos diferencialmente expresados se medirá mediante PCR en tiempo real, empleando el sistema TaqMan y el equipo PCR SetpOnePlus, ambos

de Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). La preparación de las muestras se llevará al cabo empleando reactivos (sondas, cebadores y Mezcla Maestra Universal TaqMan para PCR) de esta misma compañía. Se utilizará el ARNm de β -actina como gen constitutivo para normalizar los datos. El número de ciclos, la temperatura y la duración de las amplificaciones serán optimizados para cada transcripto en el laboratorio del investigador responsable.

Análisis computacional y modelado probabilístico de los datos generados:

Una vez realizado el mapeo de las lecturas de secuenciación del transcriptoma y el ensamblado de los transcritos, se procederá a su consolidación contra un templatado para obtener un ensamblado final del transcriptoma (*vide supra*). A partir de las lecturas de profundidad de este ensamblado se realizará un análisis de expresión de transcritos para generar una matriz de expresión diferencial de genes. Con estos datos se procederá al modelado probabilístico, para el que se utilizarán métodos basados en teoría de redes y cálculos de información mutua (una medida no-lineal de correlación que toma en cuenta distribuciones no estacionarias de datos) mediante los algoritmos INFOTHEO y ARACNe [80, 81]. El estudio de enriquecimiento estadístico de patrones de expresión (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) [82], categorías biológicas de Gene Ontology [83] y vías canónicas (Pathway Commons) [84], se realizará mediante minado en las bases de datos correspondientes; la significancia estadística se determinará por una prueba hipergeométrica corregida mediante el método de Benjamini-Hochberg (False Discovery Rate, FDR) [85]. Posteriormente las vías y procesos biológicos enriquecidos estadísticamente serán validados mediante el módulo de diseño de vías de Ingenuity Pathway [86], un equivalente *in silico* de los ensayos funcionales previo a la validación *in vitro* e *in vivo*. El agonismo selectivo relativo de cada agonista, en ausencia y presencia de los moduladores alostéricos será cuantificada siguiendo estrategias computacionales generales validadas para otros GPCRs (v.gr. el receptor β_2 -adrenérgico)[87].

V.3 Obtención de células humanas de la granulosa murales y del cumulus:

Las células humanas de la granulosa se obtendrán de los líquidos de folículos maduros de mujeres normales (donadoras de ovocitos) sometidas a hiperestimulación ovárica controlada en el Programa de Donación de Óvulos para fertilización asistida del Hospital Ángeles del Pedregal. Habitualmente estas células son desechadas después de la identificación y separación mecánica del ovocito del líquido folicular y de las células del cumulus que lo rodean. Se utilizarán células de la granulosa y del cumulus de 12 donadoras (4 mujeres estimuladas con cada preparación comercial de FSH) a las cuales se les aplicarán protocolos rutinarios de hiperestimulación ovárica controlada con cada preparación. En breve: Cada voluntaria será estimulada a partir del 3er. día de su ciclo con recFSH (Gonal F), FSH urinaria altamente purificada (Bravelle) o coriofolitropina-alfa (Lyrixtim) y la asignación para cada tratamiento será al azar. Los 3 tratamientos han demostrado ser ampliamente efectivos para la hiperestimulación ovárica controlada. Cuando se identifiquen al menos 2 folículos >14 mm se iniciará la administración de un antagonista de la GnRH [Cetrorelix; (Cetrotide[®]), 0.25 mg al día, s.c.] para prevenir la secreción prematura de LH endógena y la luteinización del folículo. Las últimas fases de la maduración ovocitaria se inducirán mediante la administración del análogo del GnRH, triptorelina (Gonapeptyl[®]), 0.1 mg s.c. en dosis única. La administración de este agonista, permitirá minimizar el estímulo de la LH endógena sobre la expresión génica de las células de la granulosa de los folículos maduros. Treinta y dos a 34 horas

después de la inyección del agonista, se procederá a la captura de los ovocitos mediante la punción intravaginal de los folículos maduros. Después de la identificación de los ovocitos rodeados de células del cumulus se separarán mecánicamente y las células restantes del líquido (células de la granulosa murales) serán centrifugadas a 200 x g a temperatura ambiente y los precipitados serán sometidos a la extracción y purificación del ARN total el cual será congelado a -20 C en viales separados para cada folículo hasta su procesamiento para la preparación de las bibliotecas o los experimentos de identificación de mensajeros por RT-PCR. Cada voluntaria firmará una carta de consentimiento informado para la donación de las células de la granulosa. Cabe subrayar que todos los tratamientos descritos se aplican de forma rutinaria en los programas de fertilización asistida en México y otras partes del mundo, sin mayores riesgos o ventajas aparentes de un protocolo o medicamento sobre otro.

VI. Investigadores participantes

Investigador Responsable:

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, Investigador Titular C de TC, Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM, Director Científico de la RAI, Investigador Emérito SNI.

Investigadores Asociados:

Dr. Fernando Larrea Gallo, Investigador F de tiempo completo, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Ciudad de México, México. Miembro del SNI Nivel 3. Colaborará en el diseño, conducción, análisis y preparación del material sometido a publicación.

Dr. Saúl Lira Albarrán, Investigador B de tiempo completo, adscrito al Depto. de Biología de la Reproducción, INCMNSZ. Realizará los cultivos primarios de células de la granulosa de rata y colaborará en el análisis bioinformático.

Dr. Héctor Godoy Morales, Director de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Ángeles del Pedregal, Ciudad de México, México. Seleccionará a las donadoras que serán sometidas a hiperestimulación ovárica controlada y recuperará las células de la granulosa durante las punciones foliculares para obtener los ovocitos de folículos preovulatorios.

Dr. Inti Alberto de la Rosa Velázquez, Investigador Asociado C de la CIC-UNAM, SNI-1: Diseñará y coordinará los experimentos de secuenciación de nueva generación (caracterización del transcriptoma), integrará sus resultados, supervisará las actividades técnicas relacionadas con la caracterización de los transcriptomas y realizará la validación de los transcritos seleccionados por PCR en tiempo real.

Dra. Rosa Gloria Rebollar Vega, Técnica Académica Titular A de TC, Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM, adscrita al laboratorio de Genómica de la RAI: Realizará los experimentos de secuenciación de nueva generación (caracterización del transcriptoma), incluyendo la extracción del ARN y la construcción de las bibliotecas.

Dra. Georgina Hernández Montes, Técnica Académica Titular A de TC, Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM, adscrita a la Unidad de Bioinformática y Biología Computacional de la RAI, Candidata a Investigadora Nacional: Realizará el análisis de expresión de los resultados generados en los experimentos de secuenciación masiva.

M. en C. Teresa Zariñán García, Técnica Académica Titular A de TC, Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM, adscrita a los Laboratorios de Biología Molecular y de

Cultivo de la RAI, SNI I: Realizará todas las actividades relacionadas con los experimentos de bioquímica y biología celular así como los estudios de PCR en tiempo real.

Dr. Enrique Hernández Lemus, Investigador en Ciencias Médicas D, Depto. de Genómica Computacional del Instituto Nacional de Medicina Genómica, SNI II: Realizará el análisis matemático y computacional del enriquecimiento funcional e identificación de vías de señalización a partir de los resultados generados en los experimentos de bioquímica y de secuenciación masiva.

M. en C. Leticia González Ibarra, Candidata a obtener el grado de Doctor en Ciencias por parte del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM. Realiza su tesis doctoral en el Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ. Colaborará en la realización de los cultivos primarios de células de la granulosa de rata.

Pasante de Servicio Social, Bernardo Carlos Gutiérrez Cervantes, Colaborará en actividades relacionadas con los experimentos de bioquímica y biología celular.

VIII. Programa de actividades (por etapas anuales)

ACTIVIDAD	Año 1												Año 2												Año 3											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Estudios bioquímicos	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Establecimiento y crecimiento de las líneas celulares	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Calibración de las condiciones experimentales	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Estudios con análogos:	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
-Activación de cascadas de señalización, medición de parámetros y cálculo de la magnitud de activación	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
Desensibilización, internalización y reciclamiento del receptor	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Organización e integración de los datos:	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
Elaboración de esquemas de vías de señalización	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
Análisis computacional del agonismo selectivo y de sus interacciones	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
Estudios de ARNseq	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Obtención de células de la granulosa y extracción de ARN	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Experimentos con análogos en líneas celulares y extracción de ARN	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Preparación de bibliotecas de ADNc	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Análisis de expresión por secuenciación	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Análisis de expresión (bioinformático)	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Experimentos de validación por RT-PCR	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
• Análisis computacional y modelado probabilístico	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
Presentaciones en congresos	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			
Escritura de manuscritos	[Bar chart showing activity duration across 36 months]																																			

IX.

Presupuesto global

Gasto de inversión: \$644,000.00

Gasto corriente: \$1,484,000.00

TOTAL GASTO CORRIENTE + GASTO DE INVERSIÓN: \$2,000,000.00

X. Resultados entregables

Artículos originales: Debido a la complejidad del proyecto y a lo ambicioso de sus objetivos y metas, se contempla que los resultados generados por el desarrollo del proyecto den lugar a:

- a. Al menos 4 artículos originales publicables en revistas de alto impacto en las áreas respectivas: 2 relacionados con los datos bioquímicos y otros 2 con los del transcriptoma, correspondientes a los resultados obtenidos con las preparaciones naturales y las comerciales.
- b. Al menos 2 artículos de revisión, que describan el concepto de agonismo selectivo aplicado al receptor estudiado que integre globalmente los datos obtenidos con las diferentes preparaciones.
- c. Al menos 6 presentaciones en congresos, 3 nacionales (Sociedad Mexicana de Bioquímica, Ciencias Fisiológicas, Farmacología), y 3 internacionales (Endocrine Society, EUA, principalmente), a partir del 2º año del desarrollo del proyecto.

Formación de recursos humanos: Se contempla que el desarrollo del proyecto requerirá de la participación de alumnos de posgrado. Al menos 2 estudiantes de maestría y 2 de doctorado en Ciencias Biomédicas, cuyos proyectos de tesis estarían enfocados a los estudios bioquímicos (1 de maestría y 1 de doctorado) y a los de transcriptómica (distribuidos de igual forma). Se incorporará igualmente un alumno del Curso de Especialización en Biología de la Reproducción del HAP, para el rubro relacionado con la obtención de las células humanas de la granulosa.

XI. Multidisciplinariedad del proyecto

El carácter multidisciplinario del proyecto requerirá la participación de especialistas en diferentes áreas, incluyendo la endocrinología reproductiva clínica, la biología molecular, la genómica, la bioinformática y la biología de sistemas. Todos los co-investigadores que participarán en el proyecto son Técnicos Académicos o Investigadores adscritos a la Red de Apoyo a la Investigación, que es en donde se desarrollará el estudio. La tecnología que requiere el desarrollo del proyecto está actualmente desarrollada en el laboratorio del investigador responsable.

XII. Bibliografía

1. Ulloa-Aguirre A., Timossi C. *Reprod Biomed Online*, 2000; 1:48-62.
2. Ulloa-Aguirre A., Zarinan T., Dias J.A., Conn P.M. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:411-23.
3. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Gotschall R.R., Baker V.L., Moore W.T. *Mol Cell Endocrinol*, 1996; 125:3-19.
4. Ulloa-Aguirre A., Timossi C. *Hum Reprod Update*, 1998; 4:260-83.
5. Dias J.A., Cohen B.D., Lindau-Shepard B., Nechamen C.A., Peterson A.J., Schmidt A. *Vitam Horm*, 2002; 64:249-322.
6. Ulloa-Aguirre A., Midgley A.R., Jr., Beitins I.Z., Padmanabhan V. *Endocr Rev*, 1995; 16:765-87.
7. Ulloa-Aguirre A., Stanislaus D., Janovick J.A., Conn P.M. *Arch Med Res*, 1999; 30:420-35.
8. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Damian-Matsumura P., Dias J.A. *Endocrine*, 1999; 11:205-15.
9. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Mendez J.P. *Hum Reprod*, 2001; 16:599-604.
10. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Barrios-de-Tomasi J., Maldonado A., Nayudu P. *Biol Reprod*, 2003; 69:379-89.

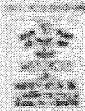
11. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Walton W.J., Nguyen V.T., Huneidi J., Singh V., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2007; 260-262:40-8.
12. Barrios-De-Tomasi J., Timossi C., Merchant H., Quintana A., Avalos J.M., Andersen C.Y., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2002; 186:189-98.
13. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Butnev V.Y., Nguyen V.T., Gray C.M., Dias J.A., et al. *Biochemistry*, 2004; 43:10817-33.
14. Barrios-de-Tomasi J., Nayudu P.L., Brehm R., Heistermann M., Zarinan T., Ulloa-Aguirre A. *Reprod Biomed Online*, 2006; 12:428-41.
15. Blithe D.L. *J Biol Chem*, 1990; 265:21951-6.
16. Bishop L.A., Robertson D.M., Cahir N., Schofield P.R. *Mol Endocrinol*, 1994; 8:722-31.
17. Bishop L.A., Nguyen T.V., Schofield P.R. *Endocrinology*, 1995; 136:2635-40.
18. Blithe D.L., Iles R.K. *Endocrinology*, 1995; 136:903-10.
19. Ulloa-Aguirre A., Conn P.M., *G protein-coupled receptors and the G protein family*, in *Handbook of Physiology-Endocrinology: Section 7, Cellular Endocrinology*, P.M. Conn, Editor 1998, Oxford University Press: New York, USA. p. 87-141.
20. Ulloa-Aguirre A., Zarinan T., Pasapera A.M., Casas-Gonzalez P., Dias J.A. *Endocrine*, 2008; 32:251-63.
21. Uribe A., Zarinan T., Perez-Solis M.A., Gutierrez-Sagal R., Jardon-Valadez E., Pineiro A., et al. *Biol. Reprod.*, 2008; 78:869-82.
22. Ulloa-Aguirre A., Crepieux P., Poupon A., Maurel M.C., Reiter E. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011; 12:259-74.
23. Jiang X., Liu H., Chen X., Chen P.H., Fischer D., Sriraman V., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109:12491-6.
24. Jiang X., Dias J.A., He X. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:424-51.
25. Vassart G., Pardo L., Costagliola S. *Trends Biochem Sci*, 2004; 29:119-26.
26. Ulloa-Aguirre A., Reiter E., Bousfield G., Dias J.A., Huhtaniemi I. *Adv Pharmacol*, 2014; 70:37-80.
27. Gonzalez-Robayna I.J., Falender A.E., Ochsner S., Firestone G.L., Richards J.S. *Mol Endocrinol*, 2000; 14:1283-300.
28. Richards J.S., Russell D.L., Ochsner S., Hsieh M., Doyle K.H., Falender A.E., et al. *Recent Prog Horm Res*, 2002; 57:195-220.
29. Musnier A., Heitzler D., Boulo T., Tesseraud S., Durand G., Lecureuil C., et al. *Cell Mol Life Sci*, 2009; 66:3487-503.
30. Musnier A., Blanchot B., Reiter E., Crepieux P. *Cell Signal*, 2010; 22:707-16.
31. Kobilka B.K. *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1768:794-807.
32. Kobilka B.K., Deupi X. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:397-406.
33. Urban J.D., Clarke W.P., von Zastrow M., Nichols D.E., Kobilka B., Weinstein H., et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007; 320:1-13.
34. Timossi C.M., Barrios de Tomasi J., Zambrano E., Gonzalez R., Ulloa-Aguirre A. *Neuroendocrinology*, 1998; 67:153-63.
35. Timossi C.M., Barrios-de-Tomasi J., Gonzalez-Suarez R., Arranz M.C., Padmanabhan V., Conn P.M., et al. *J Endocrinol*, 2000; 165:193-205.
36. Bousfield G.R., Dias J.A. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011; 12:289-302.
37. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Butnev V.Y., Hiromasa Y., Harvey D.J., May J.V. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:989-97.
38. Walton W.J., Nguyen V.T., Butnev V.Y., Singh V., Moore W.T., Bousfield G.R. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86:3675-85.

39. Sairam M.R. *Faseb J*, 1989; 3:1915-26.
40. Fan Q.R. , Hendrickson W.A. *Nature*, 2005; 433:269-77.
41. Damian-Matsumura P., Zaga V., Maldonado A., Sanchez-Hernandez C., Timossi C. , Ulloa-Aguirre A. *J Mol Endocrinol*, 1999; 23:153-65.
42. Zambrano E., Olivares A., Mendez J.P., Guerrero L., Diaz-Cueto L., Veldhuis J.D., et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 80:1647-56.
43. Timossi C., Damian-Matsumura P., Dominguez-Gonzalez A. , Ulloa-Aguirre A. *Mol Hum Reprod*, 1998; 4:1032-8.
44. Verboost P., Sloot W.N., Rose U.M., de Leeuw R., Hanssen R.G. , Verheijden G.F. *Eur J Pharmacol*, 2011; 651:227-33.
45. Daya S. *Fertil Steril*, 2002; 77:711-4.
46. Andersen C.Y., Westergaard L.G. , van Wely M. *Reprod Biomed Online*, 2004; 9:231-6.
47. Lispi M., Bassett R., Crisci C., Mancinelli M., Martelli F., Ceccarelli D., et al. *Reprod Biomed Online*, 2006; 13:179-93.
48. Robinson L.J., Tourkova I., Wang Y., Sharrow A.C., Landau M.S., Yaroslavskiy B.B., et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 394:12-7.
49. Zhu L.L., Blair H., Cao J., Yuen T., Latif R., Guo L., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109:14574-9.
50. Radu A., Pichon C., Camparo P., Antoine M., Allory Y., Couvelard A., et al. *N Engl J Med*, 2010; 363:1621-30.
51. Choi J.H., Wong A.S., Huang H.F. , Leung P.C. *Endocr Rev*, 2007; 28:440-61.
52. Leung P.C. , Choi J.H. *Hum Reprod Update*, 2007; 13:143-62.
53. Galandrin S., Oligny-Longpre G. , Bouvier M. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:423-30.
54. Mailman R.B. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:390-6.
55. Violin J.D. , Lefkowitz R.J. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:416-22.
56. Andresen B.T. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2011; 11:92-8.
57. Richards J.S. *Endocrinology*, 2001; 142:2184-93.
58. Xu F., Stouffer R.L., Muller J., Hennebold J.D., Wright J.W., Bahar A., et al. *Mol Hum Reprod*, 2011; 17:152-65.
59. Assou S., Haouzi D., Dechaud H., Gala A., Ferrieres A. , Hamamah S. *Biomed Res Int*, 2013; 2013:354582.
60. Velthut-Meikas A., Simm J., Tuuri T., Tapanainen J.S., Metsis M. , Salumets A. *Mol Endocrinol*, 2013; 27:1128-41.
61. Chronowska E. *Biomed Res Int*, 2014; 2014:213570.
62. Yerushalmi G.M., Salmon-Diyon M., Yung Y., Maman E., Kedem A., Ophir L., et al. *Mol Hum Reprod*, 2014; 20:719-35.
63. Tranchant T., Durand G., Gauthier C., Crepieux P., Ulloa-Aguirre A., Royere D., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2011; 331:109-18.
64. Casas-Gonzalez P., Scaglia H.E., Perez-Solis M.A., Durand G., Scaglia J., Zarinan T., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2012; 364:71-82.
65. Reiter E., Ahn S., Shukla A.K. , Lefkowitz R.J. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012; 52:179-97.
66. Gonzalez-Maeso J., Yuen T., Ebersole B.J., Wurmbach E., Lira A., Zhou M., et al. *J Neurosci*, 2003; 23:8836-43.
67. Sternini C., Spahn M., Anton B., Keith D.E., Jr., Bunnett N.W., von Zastrow M., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93:9241-6.

68. Keith D.E., Anton B., Murray S.R., Zaki P.A., Chu P.C., Lissin D.V., et al. *Mol Pharmacol*, 1998; 53:377-84.
69. Benovic J.L., Staniszewski C., Mayor F., Jr., Caron M.G., Lefkowitz R.J. *J Biol Chem*, 1988; 263:3893-7.
70. Barak L.S., Oakley R.H., Laporte S.A., Caron M.G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98:93-8.
71. Wehbi V., Tranchant T., Durand G., Musnier A., Decourtye J., Piketty V., et al. *Mol Endocrinol*, 2010; 24:561-73.
72. Dias J.A., Bonnet B., Weaver B.A., Watts J., Kluetzman K., Thomas R.M., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2011; 333:143-50.
73. Dias J.A., Campo B., Weaver B.A., Watts J., Kluetzman K., Thomas R.M., et al. *Biol Reprod*, 2014; 90:19.
74. Perez-Solis M.A., Macias H., Acosta-MontesdeOca A., Pasapera A.M., Fierro R., Ulloa-Aguirre A., et al. *Endocrine*, 2010; 37:98-105.
75. Thomas R.M., Nechamen C.A., Mazurkiewicz J.E., Ulloa-Aguirre A., Dias J.A. *Endocrinology*, 2011; 152:1691-701.
76. Maya-Nunez G., Janovick J.A., Aguilar-Rojas A., Jardon-Valadez E., Leanos-Miranda A., Zarinan T., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2011; 337:16-23.
77. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. *Genome Biol*, 2009; 10:R25.
78. Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D.R., et al. *Nat Protoc*, 2012; 7:562-78.
79. Kumagai M., Kim J., Itoh R., Itoh T. *Bioinformatics*, 2013; 29:1806-8.
80. Margolin A.A., Nemenman I., Basso K., Wiggins C., Stolovitzky G., Dalla Favera R., et al. *BMC Bioinformatics*, 2006; 7 Suppl 1:S7.
81. de Matos Simoes R., Emmert-Streib F. *PLoS One*, 2012; 7:e33624.
82. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102:15545-50.
83. Consortium T.G.O. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36:D440-4.
84. Cerami E.G., Gross B.E., Demir E., Rodchenkov I., Babur O., Anwar N., et al. *Nucleic Acids Res*, 2011; 39:D685-90.
85. Benjamini Y., Hochberg, Y. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1995; Series B 57:289-300.
86. Kramer A., Green J., Pollard J., Jr., Tugendreich S. *Bioinformatics*, 2014; 30:523-30.
87. Rajagopal S., Ahn S., Rominger D.H., Gowen-MacDonald W., Lam C.M., Dewire S.M., et al. *Mol Pharmacol*, 2011; 80:367-77.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



RAIUNAM.MX

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Director Científico
aull@unam.mx

Ciudad de México, 12 de octubre de 2016.

- Dr. Federico Leopoldo Rodríguez Weber
Presidente del Comité de Ética e Investigación
- Dr. Francisco Javier Ochoa Carrillo
Presidente del Comité de Investigación

Estimados Doctores:

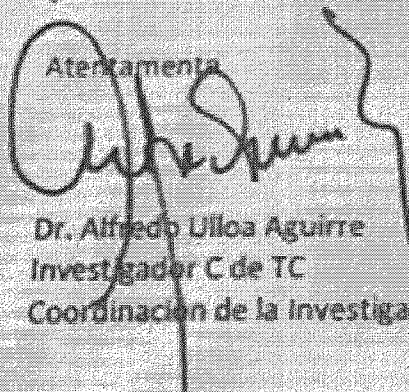
Por medio de la presente solicito a los Comités que ustedes presiden, la revisión, evaluación y dictamen del protocolo titulado: "Agonismo selectivo de las isoformas naturales y recombinantes de la folitropina humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas in vivo e in vitro homólogos y heterólogos".

Asimismo, anexamos los siguientes documentos:

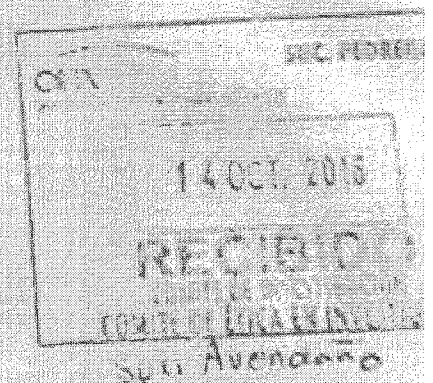
- Protocolo 5 de octubre de 2016.
- Forma de consentimiento, versión 5 de octubre, 2016.
- Contrato de cesión de ovocitos por la donadora, Unidad de Medicina Reproductiva, HAP.
- Póliza de Seguro Protección Médico Legal, investigadores asociados (responsables de la inducción)
- CV Investigador responsable y asociados.
- Constancia Citiprogram, investigador responsable.

Sin más por el momento, quedo al pendiente de su respuesta y agradezco la atención otorgada a presente.

Atentamente



Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Investigador C de TC
Coordinación de la Investigación Científica, UNAM



Red de Apoyo a la Investigación (RAI)
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S3
Edificio de Radiología, 2o. Piso
Vasco de Quiroga No. 15, Taban 14000
México D.F.
Tel. 52 555487 608



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:
FOLIO DE REGISTRO: RAI-1864-16/19-1

Fecha de registro del Protocolo: 26 de Octubre de 2016

Título del Protocolo:
Agonismo Selectivo de las Isoformas Naturales y Recombinantes de la Folitropina Humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas *in vivo* e *in vitro* homólogos y heterólogos.

Propuesta: X a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Institución de Adscripción	Universidad Nacional Autónoma de México
Departamento de Adscripción	Red de Apoyo a la Investigación
Teléfono	55 5487-6080 Extensión 6350
Correo electrónico	aulloaa@unam.mx

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Dr. Fernando Larrea Gallo	Biología de la Reproducción	Médico Especialista	54870900 Ext. 2412	fernando.larreag@incmnsz.mx
Saúl Lira Albarrán	Biología de la Reproducción	Maestría Médico Especialista	54870900 Ext. 2418	saul.lira@incmnsz.mx

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	01	11	2016
Fecha tentativa de finalización.	01	11	2019

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

1) Institución en donde se realizará el proyecto.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán / Red de Apoyo a la Investigación



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

Objetivo general.

Analizar los efectos agonistas selectivos de análogos naturales (tri- y tetraglicosilados, de origen hipofisario y urinario) y recombinantes (tetra- y pentaglicosilados) de la FSH, así como de moduladores alostéricos del FSHR (ADX61623 y ADX68692), mediante estudios bioquímicos y de secuenciación de ARNm de alto rendimiento, en diferentes contextos celulares y sistemas: a) sistemas *in vitro* homólogos (células de la granulosa humanas inmortalizadas –células KGN- y células de riñón de embrión humano –HEK293-); b) dos sistemas heterólogos (células de Sertoli de ratón inmortalizadas –línea MSC-1- y células de la granulosa de rata en cultivo); y c) un sistema *in vivo* (células de la granulosa humanas proveniente de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada), así como proponer modelos de activación selectiva de las diferentes cascadas de señalización reguladas por cada uno de los análogos estudiados.

Objetivos específicos.

1. Estudiar el o los efectos selectivos de diferentes análogos de la FSH (FSH urinaria pura, FSH recombinante y coriofolitropina alfa) disponibles en el mercado y con variaciones en su glicación, en la activación de las vías de señalización mediadas por las proteínas Gs, Gi y Gq/11, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de Gs y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.

2. Estudiar el o los efectos selectivos de diferentes análogos naturales de la FSH hipofisaria (FSH tri- y tetraglicosilada) en la activación de las vías de señalización mediadas por las proteínas Gs, Gi y Gq/11, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de Gs y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.

3. Estudiar el efecto de los moduladores alostéricos ADX61623 y ADX68692 en el agonismo selectivo de las diferentes preparaciones naturales y recombinantes de la FSH sobre las vías de señalización mediadas por las proteínas Gs, Gi y Gq/11, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de Gs y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.

4. Analizar el transcriptoma global de células de la granulosa humanas obtenidas de mujeres estimuladas con FSH recombinante, FSH urinaria o coriogonadotropina alfa, durante su maduración folicular final, mediante secuenciación de alto rendimiento (NGS) y validar los resultados mediante RT-PCR cuantitativo.

5. Analizar el transcriptoma global de células HEK-293, KGN y MSC-1, y de células de la granulosa de rata en cultivo estimuladas con diferentes preparaciones naturales y recombinantes de la FSH, en presencia o ausencia de moduladores alostéricos, mediante NGS y validar los resultados de los genes identificados expresados de forma diferencial mediante RT-PCR cuantitativo.

6. Caracterizar la activación selectiva de las diferentes vías de señalización intracelular provocadas por las preparaciones naturales y recombinantes de la FSH estudiadas empleando análisis computacional y modelado probabilístico, con base en los resultados obtenidos de los estudios bioquímicos y transcriptómicos.

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Para identificar con precisión agonistas selectivos del FSHR (y de otros GPCRs) y moléculas alostéricas para este y otros receptores, que den lugar al diseño de nuevas estrategias terapéuticas, patentables y potencialmente aplicables en el tratamiento de enfermedades reproductivas y en anticoncepción, es necesario contar con un modelo experimental como lo es el cultivo primario de células de la granulosa de rata, que complemente las observaciones en el modelo humano y líneas celulares. Para tal efecto, ratas hembra de 19 a 21 días de edad necesitan ser implantadas de manera subcutánea con una cápsula de Silastic que contenga 10 mg de dietilestilbestrol para inducir la proliferación de células de la granulosa y así obtener suficiente RNA para poder evaluar la expresión génica inducida por diferentes análogos de la FSH en presencia o ausencia de moduladores alostéricos del FSHR, mediante secuenciación de nueva generación.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embriónados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B: X	C:	D:	E:
------------	----	------	----	----	----

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Con la experiencia acumulada en el proyecto "Efectos del levonorgestrel sobre la función hormonal del ovario" (REF: CINVA 34, Clave: BRE-34-10-13-1) que correspondió a la tesis doctoral del investigador Saúl Lira Albarrán (datos publicados recientemente en *Molecular and Cellular Endocrinology*, doi: 10.1016/j.mce.2016.09.020) se estableció que cada cultivo primario de células de la granulosa requiere de 10 ratas de la estirpe Wistar de 19 a 21 días de edad (estimuladas por 4 días con un implante de silastic que contiene dietiestilbestrol) para obtener aproximadamente 20,000,000 de células por cultivo. Con esta cantidad de células se pueden sembrar 1,000,000 de células por pozo para obtener en promedio 5,000 ng de RNA/pozo.

Como primer punto, es necesario establecer en un estudio piloto las concentraciones efectivas al 50% (CE_{50%}) de cada una de las 5 preparaciones a ser estudiadas (FSH urinaria pura, FSH recombinante, coriofolitropina alfa, FSH tri- y tetraglicosilada) en términos de expresión génica de *Cyp19a1* (aromatasa) y acumulación de estradiol en el medio de cultivo. Para tal efecto, se solicitan 50 animales para realizar cinco cultivos primarios independientes (estudiaremos cada preparación en un solo cultivo para reducir el número de animales solicitados).

Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar el efecto de la CE_{50%} de distintas isoformas de la FSH en presencia o ausencia de moduladores selectivos del FSHR sobre la expresión génica global de células de la granulosa de rata, mediante secuenciación de RNA y la posterior confirmación de los genes diferencialmente expresados a través de RT-PCR cuantitativo. Para tales experimentos se requiere de una cantidad importante de RNA de alta pureza y calidad. Por lo anterior, es indispensable realizar al menos 5 cultivos primarios independientes con cada una de las 5 preparaciones de FSH (en presencia o ausencia de moduladores selectivos de FSHR) para obtener la cantidad suficiente de RNA para su análisis. De esta manera, se necesitarían 25 cultivos primarios, lo que representa 250 ratas para poder evaluar los 10 grupos experimentales.

En resumen, se solicitan 300 ratas de la estirpe Wistar de 19 a 21 días de edad.

- 6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.
NO APLICA

- 7) Mencione el número y las especies animales, así como el genero que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas de la estirpe Wistar	300		19-21 días	Hembra
No. de Grupos experimentales:		10		
No. de animales por grupo:		30		
No. TOTAL DE ANIMALES:		300		

- 8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.
Los animales permanecerán 4 días a partir de que se implanten de manera subcutánea con una cápsula de Silastic, y posteriormente serán sacrificados.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.			
Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.			
Toma de muestras biológicas.			
Colocación de cánulas y sondas.			
Técnica para observación y modificación de conducta.			
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.			
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		Una sola vez se realizará una incisión subcutánea en la región dorsal
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.			
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)			
Restricción física			
Confinamiento o aislamiento			
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.			
Inducción de lesiones			
Agentes teratogénicos o carcinogénicos			
Administración de sustancias químicas tóxicas			
Implantes o injertos	X		Un solo implante subcutáneo con una cápsula de Silastic que contiene 10 mg de dietilestilbestrol
Estudios estereotáxicos.			
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

Se emplearán ratas hembras inmaduras de la estirpe Wistar, de 19 a 21 días de edad, mantenidas bajo un régimen de luz/obscuridad de 12/12 h y con alimento y agua a libre demanda. Con la finalidad de estimular la proliferación de las células ováricas, las ratas se implantarán subcutáneamente bajo anestesia en la región dorsal con cápsulas de silástico conteniendo aproximadamente 10 mg de dietilestilbestrol y se mantendrán con el implante durante 4 días. Posteriormente, los animales serán sacrificados con pentobarbital 120 mg /kg IP y las células de la granulosa se obtendrán por punción folicular con aguja fina.

La rata será anestesiada con ketamina/xilacina, a dosis de 90 mg/kg + 10 mg/kg, por vía intraperitoneal. Posteriormente se rasurará el dorso de la rata para realizar antisepsia con alcohol isopropílico al 70%. Después se llevará a cabo una incisión de 15 mm de largo y 10 mm de ancho en la región dorsal para implantar subcutáneamente una cápsula de silástico de 10 mm de largo y 1.5 mm de diámetro interno conteniendo aproximadamente 10 mg de dietilestilbestrol. Para suturar piel se utilizará nailon 3/0. Posteriormente, se vigilará al animal hasta su completa recuperación.

Bibliografía: Waynforth H.B. y Flecknell P.A. Experimental and Surgical Technique in the Rat. 2a ed. Ed. Academic Press. 1992. Londres, UK. Capítulos 1, 3 y 4.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

--

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Anestésico	Ketamina	90 mg/kg	Intraperitoneal	Una sola vez
Sedante y analgésico no narcótico	Xilacina	10 mg/kg	Intraperitoneal	Una sola vez

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?
 Patrón respiratorio: número de respiraciones por minuto y profundidad de la respiración.
 Color de las mucosas, tiempo de llenado capilar, temperatura corporal, ojos.
 Reflejos podal y anal.

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).
NO APLICA

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección; posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

El tiempo que permanecerán los animales en el bioterio es muy corto (tan solo 4 días posteriores al implante), por lo que se espera que no presenten complicaciones por el procedimiento. No obstante, al menos una vez al día el investigador Saúl Lira Albarrán acudirá al bioterio a evaluar a los animales.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal	X			
b) Apariencia		X		
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)		X		
d) Conducta espontánea.		X		
e) Conducta provocada.	X			



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 - 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 - 2. Moderada del 10-20%
 - 3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 - 1. 0 si es normal.
 - 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 - 3. 2 si está afectado.
 - 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

De acuerdo a la experiencia del protocolo previo (REF: CINVA 34, Clave: BRE-34-10-13-1), no observamos deterioro en el bienestar en los animales secundario al procedimiento de un implante subcutáneo. Sin embargo, consideramos que una pérdida del 10% del peso corporal es un criterio para establecer el "punto final humanitario".

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Pentobarbital 120 mg /kg IP

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

17) El protocolo representa riesgo biológico?

- a) No b) Si



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMML5_sect_V.pdf

De acuerdo a la clasificación ABSL, el proyecto no representa riesgo biológico dado que no trabajaremos con agentes que potencialmente puedan ocasionar enfermedad en humanos adultos inmunocompetentes.

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?

Los animales serán eutanizados y los cadáveres colocados en bolsa amarilla, la cual será etiquetada con los datos que identifiquen al Investigador, Departamento al que pertenece, número de animales (incluyendo edad), fecha del evento y tipo de eutanasia utilizada. Posteriormente, serán transportados en contenedor para residuos biológico infecciosos hasta el DIEB donde serán registrados en la bitácora correspondiente y entregados al personal para su incineración.

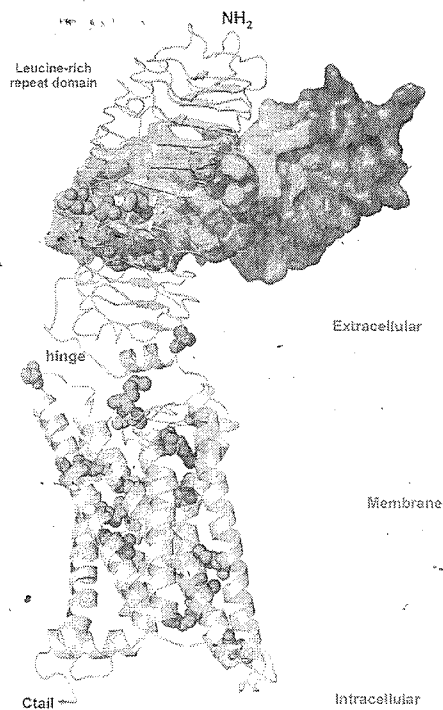
Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Nombre y firma del Investigador Responsable

	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Agonismo Selectivo de las Isoformas Naturales y Recombinantes de la Folitropina Humana. Estudios bioquímicos y transcriptómicos en sistemas *in vivo* e *in vitro* homólogos y heterólogos



Investigador Responsable:

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre,
Director Científico, Red de Apoyo a la Investigación (RAI), Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Investigador Asociado:

Dr. Saúl Lira-Albarrán
Depto. de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ, Ciudad de México, México.

Resumen

Las gonadotropinas son hormonas estructuralmente complejas que contienen cadenas de oligosacáridos que regulan su tráfico intracelular, eficiencia de secreción, vida media plasmática e interacción con su receptor en la célula blanco. La hormona estimulante del folículo (FSH) posee 4 oligosacáridos, dos en su subunidad β y dos en la α . Sin embargo, existen variantes que poseen únicamente 3 oligosacáridos (FSH21/18 -variante triglicosilada-) y que presentan particularidades en su mecanismo de acción y efectos biológicos. En este proyecto, se estudiará la selectividad funcional de las variantes tetra- y tri-glicosiladas de la FSH, empleando diferentes estrategias bioquímicas, genómicas y computacionales. Se retarán diferentes líneas celulares así como células de la granulosa de rata en cultivo, con diversas concentraciones de las isoformas de FSH y se analizarán sus efectos sobre la cinética de la activación de segundos mensajeros y sus cascadas de señalización, incluyendo fosforilación de efectores, así como la desensibilización e internalización del complejo FSH/receptor y la producción de los diferentes ARNm inducidos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados serán integrados para su análisis computacional y modelado probabilístico para determinar si los análogos estudiados presentan agonismo selectivo.

I. Antecedentes y marco teórico

Las gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo o folitropina (FSH), son fundamentales en la regulación endocrina de la función gonadal. Ambas gonadotropinas son sintetizadas y secretadas por los gonadotropos de la hipófisis anterior en respuesta a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo medio basal. Las células blanco de la LH son las células de Leydig del testículo y las células de la teca y del cuerpo lúteo del ovario, en tanto que para la FSH son las células de Sertoli del testículo y las de la granulosa del ovario. En el testículo, la LH estimula la síntesis de esteroides sexuales, principalmente de testosterona, siendo este andrógeno indispensable para la gametogénesis; en el ovario esta gonadotropina regula la síntesis de andrógenos en las células de la teca y de progesterona y estradiol en las células lúteas, siendo además indispensable para la ruptura del folículo maduro y la liberación del ovocito. En las células de la granulosa del ovario, la FSH regula la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos sintetizados en la célula de la teca, así como la maduración folicular, esto es, el crecimiento del folículo secundario a folículo antral. Ambas gonadotropinas controlan también la síntesis de otros factores de crecimiento y hormonas de naturaleza peptídica que a su vez regulan de forma autocrina y/o paracrina la función testicular y folicular. Los esteroides sexuales y algunas de las hormonas producidas localmente por el estímulo gonadotrópico (por ejemplo, activinas e inhibinas) ejercen un efecto de retrocontrol negativo o positivo, tanto a nivel hipotalámico como hipofisario, en la síntesis y secreción de ambas gonadotropinas, configurándose así el circuito primario del eje regulador de la función gonadal [1, 2].

Las gonadotropinas pertenecen a la familia de las hormonas glicoproteicas, de la que son miembros también la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina (TSH) y la coriogonadotropina producida por la placenta (hCG). Estas hormonas son glicoproteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad- α , que es común a todos los miembros de la familia, asociada mediante uniones no covalentes con una subunidad- β , que es específica para cada hormona y que le confiere a cada una sus propiedades biológicas particulares. Cada subunidad contiene 1 ó 2 cadenas de oligosacáridos unidos a residuos de aspargina (N-glicosilación); la hCG posee además una extensión en el extremo carboxilo terminal de su subunidad- β , con 4 residuos de

serina glicosilados (*O*-glicación) cuyos oligosacáridos terminan en ácido siálico, lo que le confiere una vida media plasmática más prolongada y sustancialmente mayor a la del resto de las hormonas glicoproteicas [3, 4, 1, 5]. Los residuos de oligosacáridos de todas las gonadotropinas son altamente heterogéneos lo que da lugar a múltiples formas moleculares o isoformas de cada hormona [6-11]. Los oligosacáridos en las moléculas de las hormonas glicoproteicas juegan un papel importante en diversas funciones de cada hormona, incluyendo su plegamiento, heterodimerización, control de calidad, transporte y maduración conformacional intracelulares, eficiencia de su secreción y determinación de su vida media y destino metabólico en la circulación, así como en su interacción con su receptor en la célula blanco. Además su glicación terminal diferencial permite que la proteína regule de manera fina cada una de sus propiedades, sin necesidad de un cambio en la secuencia primaria [6, 8, 12, 10, 13, 14, 11]. Por último, las estructuras de los oligosacáridos en estas hormonas juegan también un papel importante en algunas de sus propiedades fisicoquímicas, tales como la disociación entre sus subunidades, su estabilidad térmica y las propiedades antigénicas que se han observado cuando estas estructuras son modificadas [15-18].

Los receptores para las hormonas glicoproteicas pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G (GPCR), que son los principales blancos terapéuticos en la actualidad. De hecho, los beneficios de ~50% de todos los medicamentos aprobados tienen como blanco estos receptores. Específicamente, los receptores de las hormonas glicoproteicas pertenecen a la familia o grupo A de los GPCRs, que corresponde a los receptores semejantes a la rodopsina y al receptor β -adrenérgico [19]. Todos estos receptores tienen en común el estar compuestos por una larga cadena polipeptídica que cruza 7 veces la membrana celular formando dominios transmembranales (TMs) con estructura secundaria de hélices- α , unidas por 3 lazos extracelulares (EL) y 3 intracelulares (IL) y con un dominio NH_2 -terminal extracelular de longitud variable y un extremo COOH -terminal intracelular [19]. En el caso de los receptores para las gonadotropinas (los FSHR y LH/hCGR), el dominio NH_2 -terminal es extenso (300 a 400 aminoácidos) y posee una región rica en leucinas (e isoleucinas) que es en donde ocurre la unión específica de sus agonistas o ligantes, en tanto que el dominio o cola COOH -terminal está palmitoilado en 2 ó 3 residuos de cisteína, lo que permite su óptimo transporte intracelular del aparato de Golgi a la membrana plasmática, así como su reciclamiento a la membrana después de su internalización mediada por la activación del receptor [20, 21]; esta modificación permite también la formación de un lazo intracelular adicional a través del anclaje de los residuos de palmítico a la cara interna de la membrana celular (Fig. 1). En el FSHR, este dominio también posee residuos de serina y de treonina que son blanco de fosforilación y del subsecuente reclutamiento de arrestinas, que son moléculas que intervienen en el desacoplamiento del receptor a su(s) proteína(s) G, previo a su internalización estimulada por el ligante y a la activación de la vía de las MAPKs (por **m**itogen **a**ctivated **p**rotein **k**inases), específicamente de las ERK1/2 (por **e**xtracelular **s**ignal-**r**egulated **k**inases) independiente de las cinasas A (PKA) y C (PKC) de proteínas [4, 20, 22]. Las arrestinas juegan un papel importante en el agonismo selectivo del FSHR y de otros GPCRs, como se describirá más adelante [22].

Al igual que los receptores para las otras hormonas glicoproteicas, el FSHR se caracteriza por presentar un dominio extracelular NH_2 -terminal (o ectodominio) muy extenso (Fig. 1) el cual interacciona con su agonista respectivo (la FSH). El ectodominio posee a su vez 2 subdominios, el subdominio de unión de alta afinidad para el agonista, localizado en el centro del ectodominio y el subdominio involucrado en la especificidad de la señal. Ambos forman una estructura integral compuesta por repetidos ricos en leucina.

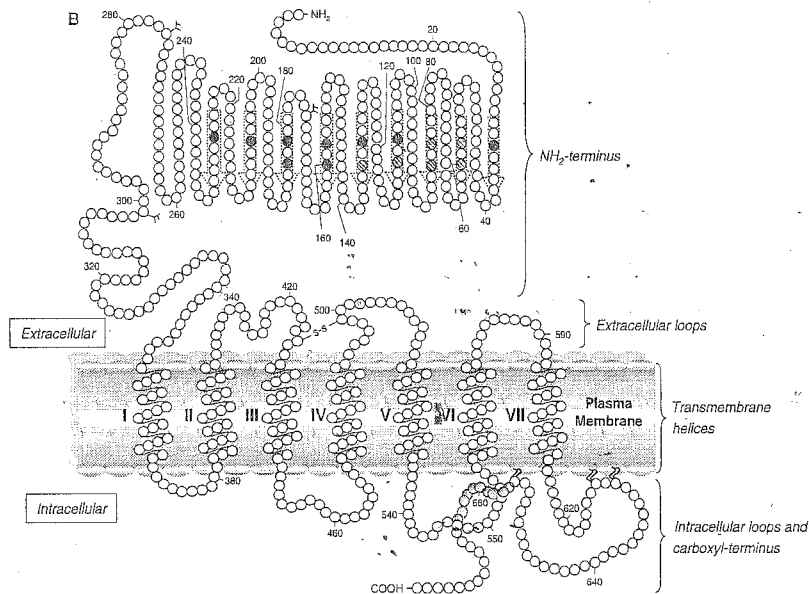


Figura 1. Representación esquemática del FSHR, con sus aminoácidos en círculos claros o grises y negros (residuos de leucina e isoleucina). La figura muestra sus diferentes dominios, así como el anclaje a la membrana en su porción COOH-terminal a través de su palmitoilación en las cisteínas 627, 629 y 655 (ref. 20).

En ausencia del agonista, el ectodominio del FSHR *inhibe* la activación (esto es, los cambios conformacionales, de forma semejante a la ocupación de un receptor por agonistas inversos) del dominio transmembranal a través de su anclaje en los lazos extracelulares del receptor que son parte integral del dominio transmembranal (Fig. 1) [23, 24]. La unión de alta afinidad de la FSH en el subdominio correspondiente, provoca un cambio conformacional en la hormona formándose *de novo* un "paquete de unión" en la interfase de las 2 subunidades que es específico para un residuo sulfatado de tirosina, presente en la posición 335 (extremo COOH-terminal) del subdominio de la especificidad de la señal (en la región "hinge" o *bisagra*), ubicado en una estructura semejante a una asa u horquilla. Este residuo de tirosina se impulsa y coloca en el paquete de unión de la hormona elevando así la horquilla y provocando un cambio conformacional que "libera" de la inhibición a la región transmembranal del receptor, iniciándose así su activación [24]. En este contexto, el ectodominio del FSHR libre (y de los otros receptores relacionados -LHR, TSHR-) actúa como un agonista inverso [25]. Finalmente, los cambios conformacionales en la región transmembranal son transmitidos a los dominios intracelulares, a los que se asocian diferentes moléculas efectoras [26].

La activación del FSHR ocurre después de la unión del agonista. La vía de señalización intracelular clásica o canónica mediada por el módulo *Gas/AMPC/PKA* (cinasa A de proteínas) ha sido reconocida durante los últimos 20 años como el mecanismo efector básico de la acción biológica de las gonadotropinas. Se ha demostrado, sin embargo, que el FSHR también se acopla a múltiples proteínas G activando así una amplia serie de cinasas de proteínas, con o sin la intervención de andamios específicos (*vide infra*) [27, 28, 20, 29, 30, 22] (Figs. 2 y 3). Esta compleja red de señalización, que induce finalmente la transcripción de diferentes genes, indica que la señal de transducción mediada por el complejo FSH/FSHR no es lineal y que su activación involucra varias conformaciones del receptor que pueden ser diferencialmente estabilizadas por agonistas. Como se describirá más adelante, en el caso de las variantes de glicosilación de la FSH (variantes por carga, que son las primeras que se caracterizaron), los primeros conceptos sobre sus efectos agonistas diferenciales o selectivos, fueron sugeridos por nuestro grupo años antes de que el

concepto de agonismo selectivo [31-33] emergiera en la farmacología contemporánea como un concepto plenamente establecido (proyectos 28589-N y 0004P-N9505 financiados por el CONACyT)[34, 35]. El estudio a nivel bioquímico y genómico del agonismo selectivo de diferentes análogos naturales y recombinantes de la FSH y el efecto de moduladores alostéricos del FSHR, empleando tecnología de punta, es precisamente el objetivo fundamental de esta propuesta.

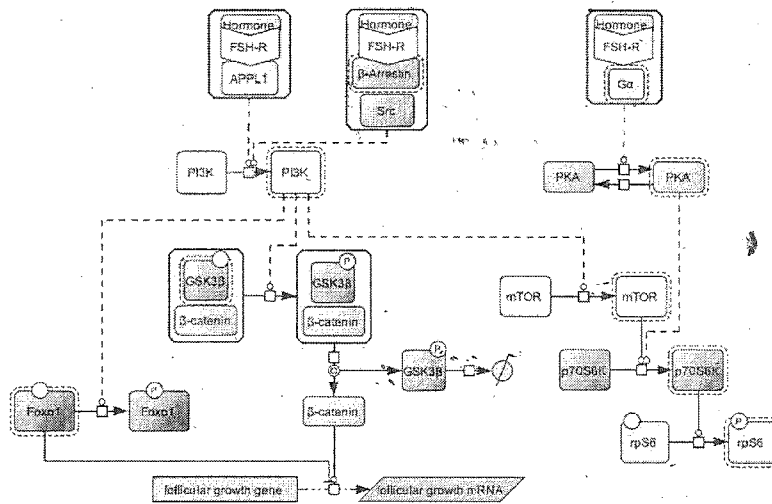


Figura 2. Vías de señalización activadas por el FSHR y esquematizadas utilizando el Cell Designer (Nat. Biotechnol. 2005; 23:961) (ref. 22).

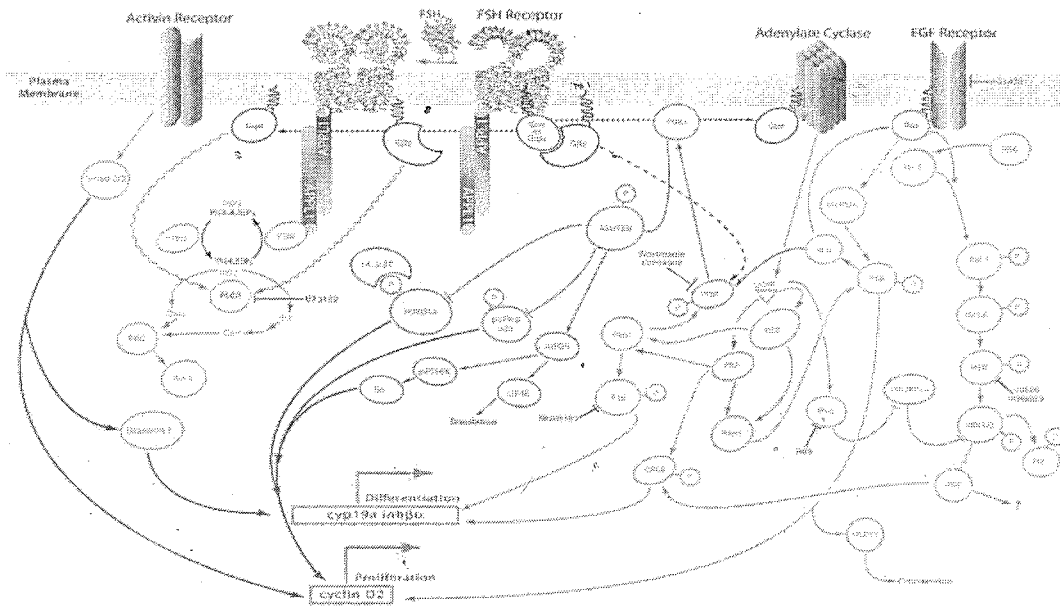


Figura 3. Las vías de señalización del FSHR y su relación con efectores y acopladores (sin incluir las β-arrestinas) y otros receptores membranales. Nótese como APPL1 acopla la señalización del receptor a la PI3K provocando el incremento en la producción de IP3. (refs. 20 y 75).

1.1 Aspectos estructurales y funcionales de la FSH

La FSH humana tiene un peso molecular de 32 KDa y está compuesta por 203 residuos de aminoácidos; de éstos, 92 corresponden a la subunidad- α común y 111 a la subunidad- β [36]. Posee 4 sitios de glicación en asparagina, dos en cada subunidad; en la subunidad- α los sitios de glicación se localizan en Asn52 y Asn78, en tanto que en la subunidad- β se encuentran en las asparinas 7 y 24 [4, 5, 36]. La glicosilación de la subunidad subunidad- β en estas asparinas es, sin embargo, variable (*macroheterogeneidad* de la FSH) pudiendo glicosilarse únicamente en posición 7 ó 24 (FSH triglicosilada), en ambas (FSH tetraglicosilada) o en ninguna (diglicosilada) [37], dependiendo de la etapa reproductiva de la donadora [38, 11] (Fig. 4). Los carbohidratos de la molécula de FSH comprenden aproximadamente el 30% de la masa total de la hormona [36]. Por otro lado, durante su síntesis, los oligosacáridos de cada antena de oligosacáridos son sujetos a un extenso procesamiento, produciéndose así una gran cantidad de variantes de cada molécula (di-, tri- o tetraglicosilada) de FSH con estructuras intermedias de oligosacáridos, que se secretan a la circulación y que se excretan en la orina después de la degradación de las formas poco sializadas o desializadas en el hígado [6]. Estas variaciones estructurales en la estructura de los oligosacáridos son la base química de su *microheterogeneidad* molecular. Como sucede con otras glicoproteínas, las estructuras de los oligosacáridos de la folitropina (y de otras hormonas glicoproteicas) son extremadamente variables y juegan un papel importante determinando diferentes propiedades de las hormonas incluyendo su vida media plasmática y su capacidad para unirse al receptor, activarlo y desencadenar una o varias señales de transducción intracelular [6, 10]. Por ejemplo, en las folitropinas humana y equina se han identificado al menos 35 diferentes tipos de oligosacáridos; en la FSH humana ~90% del total de oligosacáridos están sializados o sulfatados, lo cual les confiere

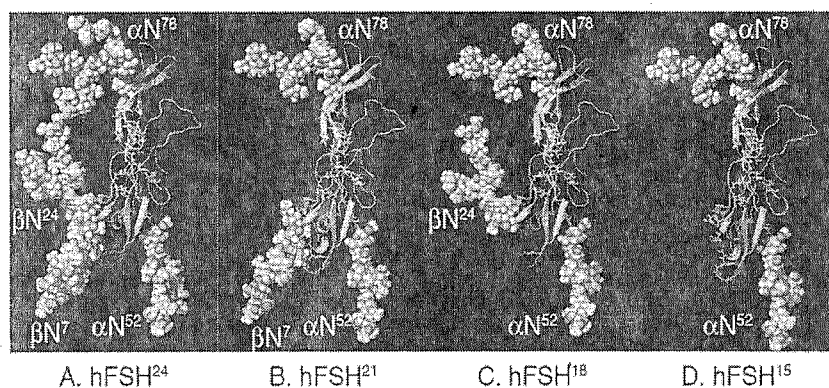


Figura 4. Modelos computacionales de las diferentes formas glicosiladas de la FSH: Tetraglicosilada (A), triglicosilada sin el oligosacárido en Asn24 (B) o Asn7 (C) y diglicosilada (sin oligosacáridos en la subunidad- β) (D).

características funcionales particulares tales como mayor o menor vida media plasmática y por lo tanto determinada actividad biológica neta en condiciones *in vivo*; el ácido siálico prolonga, en tanto que los residuos de sulfato acortan la vida media de la glicoproteína en la circulación [6, 10]. Por otro lado, se ha demostrado exhaustivamente que los residuos de carbohidratos internos al ácido siálico pueden influenciar la actividad biológica de la hormona a nivel de su célula blanco [10]. Estudios de mutagénesis dirigida y con isoformas naturales han demostrado que los oligosacáridos de la subunidad- β juegan un papel importante en la tasa de depuración plasmática de las gonadotropinas y de su potencia biológica, en tanto que el oligosacárido en posición α Asn52 es esencial para la activación del receptor y la transducción de señales intracelulares [39, 16, 17]. De hecho, la eliminación de este oligosacárido ya sea por métodos químicos o por mutagénesis sitio-dirigida, generan moléculas de gonadotropinas con una capacidad incrementada para unirse al

receptor, pero incapaces de inducir la transducción de señales intracelulares. Se desconoce con precisión porqué este sitio de glicación es crítico para la señalización intracelular pero no para la unión al receptor. Posiblemente, la deglicosilación en este sitio podría prevenir la agregación del receptor; de hecho, se ha informado que anticuerpos contra la hCG restauran el defecto en la inducción de señalización causado por la deglicosilación de la molécula en este sitio particular [36]. Una segunda posibilidad es que la longitud de la rama del oligosacárido Man(α 1-6)Man en el sitio α Asn52, pueda provocar interferencia estérica, disminuyendo la afinidad de la hormona para el receptor y permitiendo al mismo tiempo la flexibilidad necesaria para la transducción de la señal. Estudios recientes sobre la estructura tridimensional de la FSH complementamente glicosilada en complejo con el dominio extracelular del receptor (FSHR_{HB})/FSH, predicen contactos por puentes de hidrógeno entre el residuo GlcNAc proximal en α Asn52y β Tyr58, lo cual posiblemente contribuye a la estabilización del dímero de la hormona [23]. En este escenario, un cambio conformacional (aún leve) podría repositionar los residuos críticos involucrados en la unión al receptor, los cuales se encuentran exactamente en la misma región del sitio de adherencia del oligosacárido. Ahora bien, el hecho de que las variantes deprivadas de α Asn52 presenten una elevada constante de afinidad, sugiere que la formación de un complejo fuertemente unido podría alterar la conformación final del complejo hormona-receptor productivo de una señal intracelular. Estudios más recientes indican, sin embargo, que el FSHR forma *trímeros* en la membrana celular y que cada complejo (ya sea monómero, dímero o trímero), puede unir únicamente una molécula del agonista [23]. Estos hallazgos, sugieren que las isoformas de la FSH pueden provocar *diferentes efectos* sobre la conformación del trímero, lo que podría potencialmente influir en la(s) señal(es) de transducción mediadas por el FSHR (*vide infra*).

La estructura de la FSH en complejo con el ectodominio del FSHR [40], muestra que los carbohidratos tienen poca influencia en la estructura general de la proteína y que en la interface de unión entre FSH y el FSHR_{HB} (el dominio de unión del receptor, *vide supra*) no hay carbohidratos; esto podría explicar porqué la deglicación de FSH no abroga la unión pero afecta profundamente la transducción de la señal. Sin embargo, el oligosacárido α Asn52 se encuentra cerca del sitio de unión del ligante con el receptor y se desconoce qué tipo de cambios o acomodamientos realiza la estructura FSHR₁₋₂₅₀ para unir a la FSH. El que las variantes de glicosilación de la FSH provoquen efectos diversos en la transducción de señales intracelulares y respuestas biológicas en sistemas *in vitro*, sugiere fuertemente que la unión de FSH a su receptor provoca rearrreglos (aún desconocidos) en la estructura transmembranal del receptor y que dependiendo del rearrreglo particular se definirá la intensidad o el tipo de respuesta biológica al estímulo con la gonadotropina.

La síntesis de las variantes naturales de glicación de la FSH está regulada hormonalmente, principalmente por los estrógenos producidos en el ovario [41]. La producción y secreción de las variantes poco sializadas aumenta durante la fase folicular tardía y preovulatoria del ciclo menstrual y su producción es marginal después de la menopausia, lo que indica que los estrógenos regulan positivamente su producción [42]. En modelos experimentales, las variantes poco sializadas desaparecen más rápido de la circulación pero presentan mayor actividad biológica en términos de producción de AMPc, aromatización de andrógenos y producción de activador del plasminógeno tisular, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* [12]. Estas observaciones, originales de nuestro laboratorio, son importantes porque indican que la actividad biológica de la FSH está finamente regulada por el tipo de carbohidratos presente en las cadenas de oligosacáridos. La evidencia parecería indicar que las variaciones estructurales de los oligosacáridos durante el ciclo estral y

menstrual representan un mecanismo regulatorio a través del cual la hipófisis anterior modula la intensidad de la señal gonadotrópica hacia el ovario.

Estudios recientes de Bousfield y cols. [37] en la Universidad de Wichita (KS, EUA) han aislado 4 grandes grupos de glicofomas de la FSH humana en la hipófisis y la orina de mujeres, de las cuales las formas tetraglicosilada y triglicosilada son las más importantes (Fig. 4), ya que su abundancia relativa varía con la etapa reproductiva de la mujer. La forma triglicosilada [FSH²¹-21 por su masa molecular o M_r - con un solo sitio glicosilado en la subunidad- β (Asn7) y los 2 sitios en la subunidad- α (Asn52 y Asn78)] es más abundante en la etapa reproductiva (representando el 53-72% del total de la FSH), en tanto que la tetraglicosilada (FSH²⁴) (esto es, con glicosilación completa) se incrementa progresivamente con la edad [38]. La FSH²¹ tiene una vida media plasmática menor, posee una afinidad mayor para el FSHR que la forma tetraglicosilada y es más activa biológicamente en sistemas *in vitro* (células de la granulosa de rata y células HEK-293), en tanto que la FSH²⁴ es más activa en osteoclastos, lo que sugiere que esta isoforma en particular podría estar involucrada en el desgaste óseo que se presenta durante la posmenopausia (Bousfield, G., comunicación personal). Las formas di-, tri- y tetraglicosiladas de la FSH natural definen la *macroheterogeneidad* de la FSH, en tanto que el tipo de carbohidratos terminales presentes en los oligosacáridos de cada una de estas variantes (principalmente la cantidad de ácido siálico y el número de antenas de los oligosacáridos) define la *microheterogeneidad* de una molécula particular de esta gonadotropina (a sea di-, tri-, o tetra-glicosilada) [6, 37]. Así, dos moléculas tetraglicosiladas de la FSH pueden diferir en su grado de microheterogeneidad [1].

La FSH recombinante (recFSH) producida en células CHO (células ováricas de hamster chino), es tetraglicosilada, contiene menos ácido siálico que la excretada en orina de mujeres postmenopáusicas (en la que predominan las formas ricamente sializadas), presenta mayor potencia biológica *in vitro* (e. *in vivo*) pero menor vida media plasmática [1, 43] (Fig. 5). La FSH urinaria (uFSH) semeja más el perfil de formas moleculares presentes en la hipófisis que su homóloga recombinante (Fig. 5), su vida media plasmática es más corta y su potencia biológica es menor que la forma recombinante. Aquí es importante enfatizar que estas dos formas de la FSH difieren de forma importante en su *microheterogeneidad*, la cual es la responsable de las diferencias en respuestas biológicas *in vitro* e *in vivo* (Fig. 5). Recientemente se ha comercializado una nueva preparación recombinante de la FSH de larga acción y que corresponde a la recFSH tetraglicosilada a la que se le ha agregado mediante tecnología recombinante el carboxilo terminal de la hCG, el cual es rico en oligosacáridos ligados a serinas [44]. Hasta la fecha se desconoce si esta preparación en particular es más o menos potente que las otras dos en sistemas *in vitro*.

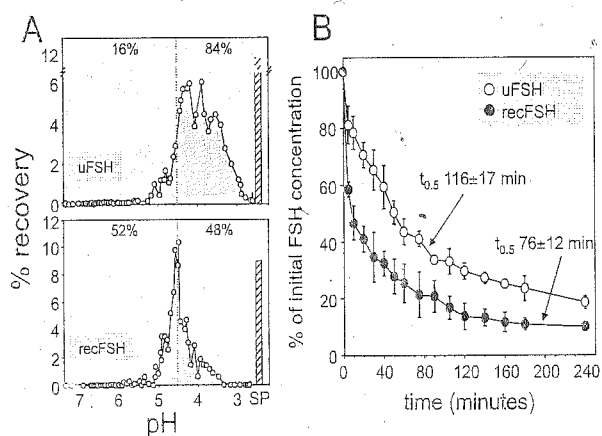


Figura 5. A: Patrón de distribución por carga (*microheterogeneidad*) de una preparación altamente purificada de FSH urinaria (uFSH) y de FSH recombinante (recFSH). La distribución de las isoformas mayores y menores a un pH de elución de 5.5 entre las 2 preparaciones difiere de forma importante. B: Vida media plasmática de los 2 análogos de la FSH mostrados en A; la vida media es más prolongada para la FSH urinaria, la cual tiene un mayor contenido de carbohidratos cargados negativamente -ácido siálico, principalmente- que la recFSH (ref. 1).

Las gonadotropinas humanas han sido utilizadas desde hace varias décadas para el tratamiento de la infertilidad en la mujer. En particular, la FSH exógena, ya sea recombinante o concentrada y purificada a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas, ha sido una herramienta fundamental en las tecnologías modernas de reproducción asistida (ART). Existen varias preparaciones recombinantes y naturales de la FSH que son ampliamente utilizadas en programas de fertilización asistida para la hiperestimulación controlada del crecimiento folicular. Básicamente existen en el mercado 3 preparaciones que contienen únicamente FSH: a) recFSH producida en células CHO; b) Preparaciones de FSH urinaria altamente purificada de orina de mujeres postmenopáusicas; c) Una quimera compuesta por recFSH a la cual se le ha fusionado la extensión COOH-terminal de la subunidad- β de la CG (recFSH de larga acción, bautizada por el fabricante como coriolfolitropina- α), la cual se encuentra ricamente sializada (ya que tiene cuatro sitios adicionales de *O*-glicosilación) [45-47]. Aunque la información al respecto es aún contradictoria, se ha informado que la preparación recombinante es más eficaz que la urinaria para inducir crecimiento folicular en mujeres tratadas con una u otra formulación; aparentemente se requiere de menos dosis total de recFSH y menor tiempo de administración para inducir desarrollo folicular múltiple [45-47]. Los resultados en términos de tasa de embarazo han sido contradictorios; un meta-análisis de 18 estudios publicados en el 2002 reveló que las preparaciones recombinantes dieron lugar a tasas de embarazo mayores que la preparación urinaria, en tanto que otro posterior (2004, 5 estudios)[45, 46], no reveló ninguna diferencia en este parámetro. A pesar de estos estudios, no existe todavía una respuesta a la pregunta de cuál preparación es la óptima para estimular el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria y si estas diferentes preparaciones (natural vs recombinante) presentan agonismo selectivo y/o estimulan o inhiben diferencialmente la transcripción de genes regulados por la FSH, ya que aunque básicamente son tetraglicosiladas, todas ellas difieren entre sí en su grado de *microheterogeneidad*. La información relacionada con la eficacia comparativa de la coriolfolitropina- α vs recFSH y uFSH, tanto *in vivo* como *in vitro* es muy escasa ya que esta preparación fue introducida en el mercado recientemente.

Dilucidar parcial o totalmente estas preguntas no es un aspecto trivial que pueda ser aplicado únicamente al tratamiento para la infertilidad. Estudios recientes han sugerido que la FSH puede ejercer efectos extraováricos (por ejemplo en hueso, regulando la actividad de los osteoclastos [48, 49], angiogénicos [50] y promotores del crecimiento e invasión del cáncer epitelial del ovario [51, 52]). El conocimiento de la relación estructura-actividad de las diferentes formulaciones de la FSH (incluyendo las formas naturales di-, tri- y tetraglicosiladas) y de pequeñas moléculas con actividad gonadotrópica o reguladoras del FSHR, y particularmente sus potenciales efectos selectivos en señales de transducción intracelular y en la expresión génica de sus células blanco, podría tener, por lo tanto, implicaciones importantes en la terapéutica medicamentosa.

1.2 Vías de señalización estimuladas por la FSH

Como se mencionó anteriormente, la vía de señalización intracelular clásica o canónica $G_{\alpha s}$ /AMPC/PKA (cinasa A de proteínas) ha sido reconocida durante los últimos 20 años como el mecanismo efector básico de la acción biológica de las gonadotropinas [27, 28, 20, 22]. Se ha demostrado, sin embargo, que el FSHR también se acopla a otras proteínas G, incluyendo la proteína G_i y a la vía mediada por el trifosfato de inositol, particularmente a dosis altas del agonista [22]. Además de la PKA, la FSH activa también a otras cinasas de proteínas, incluyendo la PI3K (a través del andamio APPL1, de β -arrestinas y de Src), la PKB (a través de mecanismos dependientes e independientes de $G_{\alpha s}$ /PKA como Epac -proteína de intercambio activada por AMPC-), ERK1/2

(a través de PKA y de β -arrestinas) y a otras vías que se muestran en las figuras 2 y 3 [22]. Esta compleja red de señalización, que conlleva a la transcripción de diferentes genes, indica que la señal de transducción mediada por el complejo FSH/FSHR no es lineal y que su activación involucra diferentes conformaciones del receptor que pueden ser diferencialmente estabilizadas por agonistas. En este escenario, el agonista natural activaría *todas* las vías de señalización dependientes del mismo, en tanto que análogos con actividad agonista (y aún antagonista para ciertos efectos), podrían preferentemente activar una (o varias) cascadas de señalización, lo que se conoce como *agonismo selectivo* (Fig. 6) [53, 54, 33, 55, 56, 22].

La activación del FSHR por su agonista (FSH) en la célula de la granulosa activa a su vez diversas cascadas de señalización, que eventualmente influyen en la transcripción de diferentes genes que regulan una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la proliferación y diferenciación, la inhibición de la apoptosis, la esteroidogénesis y la aromatización de los andrógenos producidos en la célula de la teca, la producción de diversas hormonas no esteroideas y de factores de crecimiento, etc. [57, 28]. En particular, diversos estudios han empleado secuenciación de alto rendimiento (next-generation sequencing –NGS–) en un intento por caracterizar los efectos de esta gonadotropina en la transcripción génica de células de la granulosa (murales) y del cumulus ooforus (que son las células de la granulosa que rodean al ovocito) de folículos preovulatorios en primates no humanos y en mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada [58-62]. El gran problema con prácticamente todos estos estudios es que los esquemas de inducción de la maduración folicular han incluido, además de FSH recombinante (o de la combinación FSH/LH de origen urinario), la administración de dosis elevadas de hCG para estimular la maduración final ovocitaria, lo que indudablemente ha influido de manera dramática en los perfiles de expresión génica de las células de la granulosa al provocar su diferenciación a células granulosa-luteínicas [58-62]. Aunque la información derivada de estos estudios ha sido, indudablemente, útil para conocer el perfil general de la transcripción de numerosos genes en células de la granulosa y del cumulus (las cuales no expresan el FSHR) de folículos preovulatorios estimulados con rFSH o la combinación uFSH/uLH, su diseño no ha permitido identificar si los diferentes análogos de la FSH empleados inducen de manera diferencial y selectiva la expresión de genes particulares regulados por esta hormona. El presente estudio pretende explorar este aspecto con mayor detalle, aplicando diferentes diseños experimentales en sistemas *in vitro* e *in vivo* que permitan identificar con precisión los genes que son expresados o reprimidos de forma selectiva y diferencial en respuesta al estímulo con distintas preparaciones de la FSH empleadas de forma rutinaria en programas de fertilización asistida y así poder caracterizar el agonismo selectivo de estos análogos.

1.3 Agonismo Selectivo

El *agonismo selectivo* (también conocido como selectividad funcional, tráfico dirigido por el agonista, eficacia colateral y agonismo sesgado –biased agonism–) es un concepto de gran importancia en la farmacología moderna, que describe la propiedad o capacidad de ciertos ligandos y análogos de activar de forma *diferencial* una o varias cascadas de señalización a través de un GPCR particular [53](Fig. 6). Este concepto ha retado al concepto clásico de eficacia intrínseca, en el que agonistas completos o parciales activan consistente y simultáneamente varias señales de transducción a través de la estabilización de una sola conformación activa del receptor (o de una conformación inactiva como en el caso de agonistas inversos), dependiendo de su afinidad por el mismo (es decir, por la intensidad de la interacción ligante-receptor) y de su eficacia intrínseca,

determinada por la capacidad del ligante unido para inducir una respuesta biológica [33, 56]. El concepto de *agonismo selectivo* implica, por lo tanto, que no existe una sola conformación activa del receptor y que ligantes diferentes (o mutaciones en la molécula del receptor) pueden estabilizar ciertas conformaciones activas del receptor de forma selectiva [32]. Estos ligantes incluyen aquellos que se comportan como antagonistas para una vía de señalización en particular y como agonistas para una vía diferente en la misma célula. Así, por ejemplo, ciertos agonistas (o una mutación particular del receptor) podrían preferencialmente reclutar o activar efectores no dependientes de las proteínas G, como son las β -arrestinas, es decir, modular un subconjunto de señales de transducción activadas habitualmente por un agonista completo, sin provocar efectos sobre otras señales (activadas por el agonista completo) (Fig. 6) [63, 64]. Se ha demostrado que en respuesta a ciertos compuestos, algunos GPCR pueden activar de forma diferencial y selectiva sus cascadas de señalización asociadas; estos receptores incluyen los receptores 5-HT₂ serotoninérgicos, los receptores opioides- μ , los receptores para angiotensina II, β_2 -adrenérgicos y D_{2L} y D₁ dopaminérgicos y el receptor V₂ de vasopresina, por citar algunos [54, 33, 55, 65]. Por ejemplo, en el caso de ligantes serotoninérgicos asociados a los receptores 5HT_{2A} y 5HT_{2B}, se ha observado que la eficacia relativa de ciertos agonistas para cada uno de los receptores difiere dependiendo del efecto que se evalúe (acumulación de fosfatos de inositol -IP- mediada por la activación de la

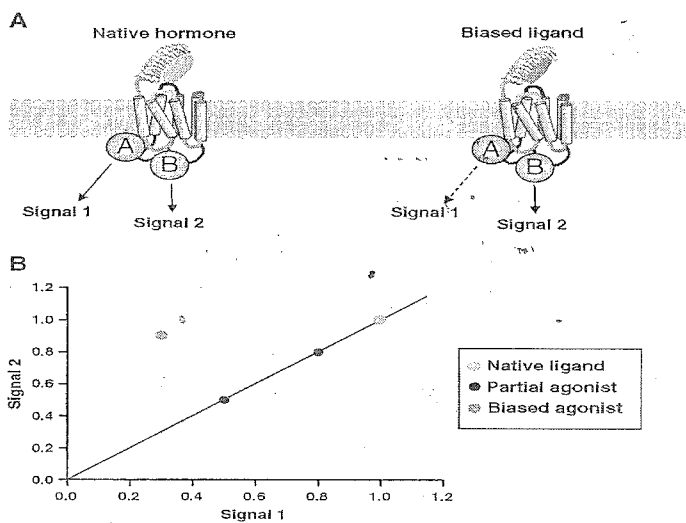


Figura 6: Agonismo selectivo en GPCRs. **A:** la hormona nativa activa 2 cascadas de señalización (señales 1 y 2 – efectores A y B), en tanto que un agonista selectivo activa preferencialmente la señal 2 a través del efector B; **B:** Relación entre las señales 1 y 2 mostradas en A con el estímulo del ligante nativo, 2 agonistas parciales y un agonista selectivo. La magnitud de la señal 2 para este último es aproximadamente 4 veces mayor que aquella de la señal 1 (ref. 22).

fosfolipasa C -PLC- o liberación de ácido araquidónico [33]. Igualmente, la eficacia de agonistas serotoninérgicos para activar los mecanismos de desensibilización de su receptor varía dependiendo del agonista [66, 33]. En el caso de receptores opioides- μ , se han encontrado diferencias en la capacidad de sus agonistas para inducir endocitosis del receptor en fibroblastos transfectados y en neuronas que expresan estos receptores *in vivo* [67, 68], la cual no correlaciona con su eficacia intrínseca para activar la adenilil ciclasa o canales GIRK (canales de potasio rectificadores hacia el interior activados por una proteína G). Para los receptores β_2 -adrenérgicos, se ha encontrado que determinados agonistas pueden inducir efectos diferenciales en sitios específicos de fosforilación del receptor y en su endocitosis [69], en tanto que para agonistas del receptor V₂ de vasopresina es posible separar los efectos en la inducción de transducción de señales de aquellos involucrados en la endocitosis [70]. La aplicación de este concepto relativamente reciente, ha abierto nuevos caminos

para el descubrimiento de estrategias terapéuticas innovadoras.

En el caso de la FSH, las variaciones en su glicosilación pueden potencialmente conferir a una variante determinada la capacidad de comportarse como agonista selectivo y de ejercer, por ejemplo, control sobre la expresión de diferentes ARNm. De hecho, en estudios recientes se ha encontrado que una isoforma parcialmente deglicosilada de la LH equina, con capacidad de unirse tanto al receptor de LH como al de FSH, ejerce agonismo preferencial hacia la señalización dependiente de β -arrestinas a juzgar por el patrón de fosforilación de la proteína ribosomal S6 (rpS6); esta misma variante también promovió de forma selectiva la fosforilación de MAPK-ERK1/2 a través de la vía de la β -arrestina, independientemente de la mediada por la proteína Gs [71]. En el caso de pequeñas moléculas, recientemente se ha encontrado que moduladores alostéricos del FSHR (ADX61623 y ADX68692; Addex Pharmaceuticals SA, Ginebra, Suiza) que bloquean la acción de FSH en el ovario, provocan antagonismo selectivo, ya que aunque bloquean la vía Gs-PKA-progesterona no lo hacen con aquella que regula la producción de estradiol, tanto *in vitro* como *in vivo* [72, 73]. A nivel del FSHR, se ha documentado que ciertas mutaciones pueden provocar efectos selectivos sobre efectores acoplados a este receptor al estimularse con el agonista, como es el caso de las mutaciones A189V y N431I. En el caso de la primera cuando el FSHR A189V se expresó en la membrana plasmática a densidades bajas, la señalización mediada por β -arrestinas predominó sobre aquella mediada por la proteína Gs [63]. En la segunda mutación, la expresión del FSHR N431I no afectó la señalización mediada por la FSH natural pero sí su eficacia colateral, ya que su desensibilización e internalización disminuyeron de forma notable [64, 26].

Como se mencionó anteriormente, los efectos diferenciales de las variantes por carga de la FSH natural (Fig. 5A) fueron demostrados por el grupo del investigador responsable de la presente propuesta, tiempo antes de que el concepto de agonismo selectivo emergiera en la farmacología de los GPCRs tal y como la conocemos en la actualidad [34, 35, 12]. Así, demostramos que a concentraciones equimolares, las variantes pobres en ácido siálico eran más potentes que las intensamente sializadas para provocar la producción de AMPc, la aromatización de andrógenos y la actividad del activador de plasminógeno tisular (incluyendo la producción de sus ARNm) en células de la granulosa en cultivo; por el contrario, las variantes fuertemente sializadas fueron más potentes que sus contrapartes menos sializadas para inducir la producción del ARNm de la inhibina- α [35]. Esta serie de estudios también encontró que una variante de FSH escasamente sializada y con antenas ricas en manosa y oligosacáridos híbridos, inhibió la aromatización de los andrógenos y la actividad del activador de plasminógeno tisular e indujo una curva dosis respuesta de tipo bifásica, con la disminución en producción de AMPc a concentraciones elevadas de la variante, lo que sugirió la activación simultánea de diferentes subtipos de proteínas G, en este caso en particular, de la proteína Gi/Go [34]. Aquí es importante subrayar que toda esta serie de estudios se realizó empleando variantes semipuras de extractos de hipófisis anterior humanas y que hasta la fecha no existen estudios con macrovariantes de glicosilación naturales ni recombinantes, ni con pequeñas moléculas con actividad agonista de FSH, que hayan documentado efectos selectivos de estos agonistas en la transducción de señales mediadas por el FSHR.

El estudio del agonismo selectivo a nivel del FSHR humano es de gran importancia, no sólo conceptualmente sino también para su aplicación en la terapéutica medicamentosa. La caracterización de los efectos selectivos de diversos agonistas de la FSH a través del estudio de la expresión de ARNm inducidos por estas variantes, de la activación de diversas señales de transducción y cascadas de señalización mediadas por el FSHR y de su eficacia colateral (evaluada

a través del estudio de su cinética de internalización), en diferentes contextos celulares, podría tener un gran impacto en el tratamiento de la infertilidad, la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica en los programas de ART, la osteoporosis en la posmenopausia y la anticoncepción, por ejemplo, en los que sus efectos diferenciales podrían ser explotados para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Resumiendo:

1. La FSH es una hormona glicoproteica indispensable para la función reproductiva. Su estructura molecular es compleja y existen diferentes formas o variantes moleculares de la misma. Su macroheterogeneidad está dada por el número de oligosacáridos incorporados en sus subunidades, en tanto que su microheterogeneidad la constituye su variabilidad en residuos de ácido siálico o sulfato terminales o el número y estructura de las antenas de sus oligosacáridos.
2. La unión de la FSH a su receptor va seguida de la activación de múltiples cascadas de señalización que conllevan en su célula blanco a la activación de diferentes genes que regulan la maduración folicular y ovocitaria.
3. Ciertos agonistas son capaces de activar y estabilizar a su receptor específico en una o varias conformaciones, lo que les permite activar o inhibir *selectivamente* algunas vías de señalización particulares. En el caso del FSHR, se ha encontrado que un agonista experimental activó selectivamente la cascada de señalización de las MAPKs mediada por β -arrestinas, sobre aquella mediada por la proteína Gs, lo cual indicó que la conformación de este receptor puede ser estabilizada preferencialmente por agonistas selectivos.
4. Se desconoce si análogos naturales de la FSH (FSH tri- y tetraglicosiladas) de origen hipofisario o urinario (fracción excretada), así como análogos recombinantes utilizados en la terapéutica medicamentosa de la infertilidad, provocan efectos selectivos sobre alguna cascada de señalización en particular. Para el caso de pequeñas moléculas con actividad alostérica en el FSHR se desconoce si además de regular ciertos efectos selectivos a nivel del receptor (progesterona vs estradiol) son capaces de regular de la misma forma la expresión de otros genes involucrados en la función de la célula de la granulosa. Caracterizar estos efectos selectivos podría servir de base para la generación de nuevas combinaciones de medicamentos o de estrategias terapéuticas innovadoras en diferentes enfermedades reproductivas o en otros sistemas en donde esté involucrado el FSHR.

1.2 Originalidad y relevancia científica básica del proyecto

Resulta claro que los mecanismos de control hormonal mediados por las gonadotropinas están relacionados a una diversidad de vías mucho más vasta de lo que antes se consideraba. Sin embargo, la actividad a nivel sistémico de muchas de las vías interrelacionadas y la posibilidad de comunicación entre éstas hace que su descubrimiento y análisis requiera de metodologías de investigación más sofisticadas. En fechas recientes, el análisis de datos masivos derivados de las tecnologías genómicas nos ha dotado de una capacidad sin precedente para avanzar en el conocimiento de los intrincados procesos implicados en la señalización y el control hormonal. Tecnologías como la secuenciación de cobertura amplia del genoma y transcriptoma nos proveen la oportunidad de estudiar los orígenes moleculares de los procesos metabólicos y de señalización que determinan tales fenotipos complejos. Mediante el análisis computacional y el modelado probabilístico de los datos generados, por ejemplo, en la secuenciación del transcriptoma y la experimentación en biología celular, es posible categorizar y priorizar las vías más activas y los

mecanismos biológicos implicados en los procesos de control hormonal mediante un enfoque sistemático e integrativo.

El estudio bioquímico de la diversidad y selectividad en la transducción de la señal intracelular inducido por diferentes análogos naturales y recombinantes de la FSH y modulado por moléculas alostéricas, así como el análisis del transcriptoma inducido por éstos, revelará patrones globales de expresión genética característicos bajo diferentes condiciones y vías de señalización preferentemente activadas por diferentes ligantes. Del estudio de tales patrones será posible determinar qué moléculas son clave en la inducción del fenotipo y la respuesta hormonal y a partir de éstas reconstruir las posibles vías implicadas, para posteriormente analizar los mecanismos bioquímicos de acción asociados a tales vías, con miras al perfilado diagnóstico y la posible implementación terapéutica. Hasta la actualidad no existen estudios que hayan empleado este enfoque bioquímico-transcriptómico para caracterizar vías de señalización particulares para variantes estructurales de un ligante determinado, como lo es en este caso la hormona estimulante del folículo, fundamental en la regulación de la función reproductora en el humano.

II. Hipótesis

Los análogos naturales y recombinantes de la FSH, así como moduladores alostéricos del FSHR provocan efectos selectivos en la expresión génica y en la activación de cascadas de señalización mediadas por el FSHR.

III. Objetivo general

Analizar los efectos agonistas selectivos de análogos naturales (tri- y tetraglicosilados, de origen hipofisario y urinario) y recombinantes (tetra- y pentaglicosilados) de la FSH, así como de moduladores alostéricos del FSHR (ADX61623 y ADX68692), mediante estudios bioquímicos y de secuenciación de ARNm de alto rendimiento, en diferentes contextos celulares y sistemas: *a*) sistemas *in vitro* homólogos (células de la granulosa humanas immortalizadas -células KGN- y células de riñón de embrión humano -HEK293-); *b*) dos sistemas heterólogos (células de Sertoli de ratón immortalizadas -línea MSC-1- y células de la granulosa de rata en cultivo); y *c*) un sistema *in vivo* (células de la granulosa humanas proveniente de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada), así como proponer modelos de activación selectiva de las diferentes cascadas de señalización reguladas por cada uno de los análogos estudiados.

III.1 Objetivos específicos

1. Estudiar el o los efectos selectivos de diferentes análogos de la FSH (FSH urinaria pura, FSH recombinante y coriofolitropina alfa) disponibles en el mercado y con variaciones en su glicosilación, en la activación de las vías de señalización mediadas por las proteínas G_s , G_i y $G_{q/11}$, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de G_s y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares immortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.
2. Estudiar el o los efectos selectivos de diferentes *análogos naturales* de la FSH hipofisaria (FSH tri- y tetraglicosilada) en la activación de las vías de señalización mediadas por las proteínas G_s , G_i y $G_{q/11}$, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de G_s y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en

las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.

3. Estudiar el efecto de los moduladores alostéricos ADX61623 y ADX68692 en el agonismo selectivo de las diferentes preparaciones naturales y recombinantes de la FSH sobre las vías de señalización mediadas por las proteínas G_s , G_i y $G_{q/11}$, la activación de las MAPKs (ERK1/2) dependientes de G_s y de β -arrestinas, y en las cinéticas de desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR en las líneas celulares inmortalizadas HEK-293, KGN y MSC-1.
4. Analizar el transcriptoma global de células de la granulosa humanas obtenidas de mujeres estimuladas con FSH recombinante, FSH urinaria o coriogonadotropina alfa, durante su maduración folicular final, mediante secuenciación de alto rendimiento (NGS) y validar los resultados mediante RT-PCR cuantitativo.
5. Analizar el transcriptoma global de células HEK-293, KGN y MSC-1 estimuladas con diferentes preparaciones naturales y recombinantes de la FSH, en presencia o ausencia de moduladores alostéricos, mediante NGS y validar los resultados de los genes identificados expresados de forma diferencial mediante RT-PCR cuantitativo.
6. Caracterizar la activación selectiva de las diferentes vías de señalización intracelular provocadas por las preparaciones naturales y recombinantes de la FSH estudiadas empleando análisis computacional y modelado probabilístico, con base en los resultados obtenidos de los estudios bioquímicos y transcriptómicos.

IV. Metas

1. Validar a la secuenciación de nueva generación como una herramienta que permita identificar con alta sensibilidad y especificidad el agonismo selectivo de diferentes análogos de la FSH (y de otras hormonas con blancos en GPCRs), para que eventualmente pueda ser utilizada en el tamizaje a gran escala de nuevas moléculas agonistas o antagonistas con propiedades selectivas en la señalización intracelular de sus células blanco.
2. Identificar con precisión agonistas selectivos del FSHR (y de otros GPCRs) y moléculas alostéricas para este y otros receptores, que den lugar al diseño de nuevas estrategias terapéuticas, patentables y potencialmente aplicables en el tratamiento de enfermedades reproductivas, osteoporosis, cáncer epitelial del ovario y en anticoncepción.
3. Consolidar un grupo de trabajo multidisciplinario para el estudio y diseño de nuevos medicamentos entre los investigadores adscritos a la Red de Apoyo a la Investigación de los Institutos Nacionales de Salud (SSA)-Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM y aquellos que pertenezcan al Consorcio RAI (*vide infra*).

V. Material y Métodos

V.1 Material:

Análogos de la FSH y moduladores alostéricos:

Los diferentes análogos de la FSH que se estudiarán serán los siguientes:

- a. FSH recombinante –análogo tetraglicosilado- producida por células CHO (Gonal-F, Laboratorios Merck-Serono, México).

- b. FSH urinaria altamente purificada –tetraglicosilado- (Bravelle, Ferring Pharmaceutical, México).
- c. Coriofolitropina alfa –análogo pentaglicosilado con cuatro sitios glicosilados en *N* (aspargina) y uno en *O* (serina) (Lyrixtim, Shering-Plough, México).
- d. FSH hipofisaria, triglicosilada (hFSH²¹) y tetraglicosilada (hFSH²⁴). Ambas serán provistas por el Dr. George Bousfield, Wichita State University, Wichita, KA, EUA. La obtención y purificación de ambas preparaciones son parte del macroproyecto “*Age-related changes in gonadotropin glycosylation and function*”, en desarrollo en esta universidad y en el que el investigador responsable de la presente propuesta forma parte del External Advisory Committee desde el año 2008.
- e. ADX61623 y ADX68692 -moduladores alostéricos- (Addex Pharma S.A, Plan-les-Ouates, Ginebra, Suiza). Ambos moduladores serán donados por el Dr. James A. Dias, Department of Biomedical Sciences, State University of New York at Albany, Albany, Nueva York, EUA, con quien el investigador responsable de la presente propuesta ha colaborado estrechamente en el desarrollo de proyectos de investigación desde el año de 1999. Los Dres. George Bousfield (Wichita State University), James A. Dias y el investigador responsable forman parte del consorcio sCORTS (Studium Consortium for Research and Training in Reproductive Sciences, Tours, France), lo que garantizará la provisión de los reactivos descritos en *d* y *e*.

Líneas celulares y células de la granulosa humanas:

Líneas celulares:

- a. Células HEK-293 hFSHR⁺ que expresan de manera estable el FSHR humano: Esta línea celular está disponible en el laboratorio del investigador responsable y se tiene amplia experiencia en su manejo (ver listado de referencias).
- b. Células MSC-1 (Mouse Sertoli Cells): Esta línea celular está disponible en el laboratorio del investigador responsable y se tiene experiencia en su manejo [74].
- c. Células KGN (derivada de tumor de células de la granulosa humanas): Esta línea celular está disponible en el laboratorio del investigador responsable y se tiene experiencia en su manejo [75].

Las células humanas de la granulosa serán obtenidas de voluntarias sanas sometidas a hiperestimulación ovárica controlada en la Clínica de Fertilización Asistida del Hospital Ángeles del Pedregal de la Ciudad de México. Las mujeres serán tratadas con las preparaciones comerciales descritas anteriormente, con esquemas de estimulación convencionales y las células de la granulosa de folículos preovulatorios serán obtenidas del material recuperado en la punción folicular para la captura del ovocito, que es un procedimiento de rutina previo a la fertilización *in vitro*.

El resto de los materiales que se utilizará se menciona en la descripción de los métodos (*vide infra*).

V.2 Métodos:

Cultivos Celulares:

Las células HEK-293, MSC-1 y KGN serán expandidas y cultivadas siguiendo las técnicas antes descritas por el laboratorio del investigador responsable. Las células HEK-293 que expresan de

forma permanente el FSHR, se cultivarán y mantendrán en medio Eagle modificado (Dulbecco; DMEM, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos; los cultivos subconfluentes se transfectarán con el gene reportero pSOMLuc tal y como se ha descrito previamente [63]. Las células MSC-1 se cultivarán en DMEM suplementado y se co-transfectarán con el cDNA del FSHR y el gene reportero pSOMLuc por medio de endocitosis por liposomas, en tanto que las células KGN se cultivarán en medio DMEN/F12 suplementado con SFB y antibióticos serán transformadas con adenovirus recombinante (1×10^5 partículas virales por célula) para expresar el FSHR. El cultivo de células de la granulosa de rata se realizará utilizando ratas Wistar de 21 días de edad, pretratadas con dietilestilbestrol (DES) tal y como se describió previamente. Después de 4 días de la implantación de las cápsulas de DES, los animales serán eutanizados y se recuperarán de los folículos antrales las células de la granulosa por punción. Las células serán cultivadas en placas de 6 pozos de poliestireno e incubadas en presencia de medio de cultivo McCoy suplementado con glutamina, androstenediona y antibióticos a 37 C, en ambiente húmedo con 95% CO₂:5%O₂. Después de 24 horas de incubación, las células serán expuestas durante 48 a diferentes concentraciones de las 4 preparaciones de FSH (tetraglicosilada, triglicosilada, FSH_h y FSH recombinante humana) y su efecto en la expresión de ARN mensajeros se analizará como se describe posteriormente.

Incubaciones:

Después de 48 horas de incubación a 37° C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂, las células HEK-293, MSC-1 y KGN serán estimuladas con los diferentes análogos de la FSH a dosis progresivas (curvas dosis-respuesta) o a las equivalentes a la DE₅₀ y V_{max} de cada preparación (estudios de RNAseq y pERK1/2), en ausencia o presencia de ADX61623 ó ADX68692, de toxina pertussis o del inhibidor de la cinasa A de proteínas (PKA), H89, durante tiempos variables, dependiendo de la lectura deseada: producción de AMPc (Gs y Gi), recambio de fosfoinosítidos con la producción de 1,4,5-tri-fosfato de inositol (IP3) (Gq/11), inducción de la fosforilación de ERK1/2 (pERK), y desensibilización, internalización y reciclamiento del FSHR provocados por el análogo. Los detalles de las incubaciones están ampliamente descritos en las referencias de estudios del investigador principal. En el caso de la determinación de IP3, las células serán inicialmente pre-expuestas a 4 µCi/ml de [³H]-myo-inositol y posteriormente al análogo de FSH [76]. Para los estudios de desensibilización inducida por el ligante, la primera incubación se realizará durante 2 horas en tanto que la segunda será de 30 minutos, en presencia de dosis máximas del análogo [64].

Medición de las respuestas:

Estudios de unión de análogos al FSHR: La unión de cada uno de los análogos en ausencia o presencia del modulador alostérico al FSHR en cada línea celular, será evaluado por radioreceptor, tal y como ha sido extensamente descrito por el laboratorio del investigador principal [21].

Producción de AMPc: La producción intra- y extracelular del AMPc inducido por la exposición a los análogos de FSH será medida y cuantificada mediante el radioinmunoanálisis (RIA) implementado en el laboratorio de investigador principal así como por quimioluminiscencia, después de procesar las células siguiendo las técnicas descritas previamente [63].

Recambio de fosfatos de inositol (producción de IP3): La separación de IP3 y su cuantificación en respuesta a los análogos de FSH será realizada utilizando cromatografía de intercambio iónico en

columnas de Dowex y por espectrometría de centelleo líquido, tal y como se ha descrito previamente [76].

Fosforilación de ERK1/2: La cantidad de ERK1/2 fosforilada en respuesta a la activación del efector PKA y/o del reclutamiento de β -arrestinas será detectada en precipitados de proteínas intracelulares mediante inmunoblots empleando como anticuerpo primario anti-fosfo-ERK1/2 p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, EUA) (dilución 1:3000) e IgG anti-ratón secundario conjugado con peroxidasa de rábano (horseradish). La señal se generará utilizando el estuche Pierce ECL EB. La carga equivalente de proteínas en el gel se confirmará mediante la incubación de las membranas con el anticuerpo primario anti-ERK2 total (dilución 1:10000) de Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, CA, EUA). Se realizarán experimentos coexpresando una forma dominante negativa de las β -arrestinas 1 y 2 (arr319-418) [63] para verificar el papel de estas moléculas en la fosforilación de ERK1/ERK2.

Desensibilización del FSHR: La cinética de desensibilización del FSH provocada por el ligante se medirá mediante la cuantificación de AMPc por RIA, después de una exposición inicial con dosis crecientes del ligante y una posterior con dosis máximas del mismo [64].

Internalización del FSHR: Dado que en el sistema FSH-FSHR el complejo ligante-receptor es internalizado y parcialmente reciclado, se realizarán experimentos para estudiar el papel de diferentes análogos de FSH en estos procesos inducidos por el estímulo del agonista. La cinética de internalización del FSHR inducida por el ligante se analizará por medio de citometría de flujo y microscopía confocal. Las células transfectadas con el FSHR se incubarán con el análogo de FSH por 0' y hasta 120'. A los 0', 60' y 120' se detendrá la incubación en 4 pozos mediante lavado con medio de cultivo y las células de un par se incubarán nuevamente en tubos de citometría en presencia del Ac Mab106.105 y posteriormente con el Ac secundario anti-Fc IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Becton Dickinson and Co. -BD- Nueva Jersey, EUA). Aquellas del par restante serán sometidas al mismo tratamiento pero después de su permeabilización con Cytotfix/cytoperm (BD). La cantidad de FSHR en la superficie de las células (no internalizado) y en su interior (internalizado) será medida por citometría de flujo empleando un citómetro LSR II Fortessa (BD). Para los estudios de microscopía confocal, las células transfectadas cultivadas sobre cubreobjetos redondos tratados con Histogrip (Life Technologies) y depositados en placas de 12 pozos, serán estimuladas con diferentes análogos en ausencia y presencia de los moduladores alostéricos durante 120'. Después de su lavado, las células se fijarán e incubarán con el anticuerpo primario anti-FSHR mAb106.105, seguido del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC a una dilución 1:200 (Millipore, Temecula CA, USA). Las laminillas serán visualizadas en un microscopio confocal ZEISS LSM 710-DUO (Fig. 7).

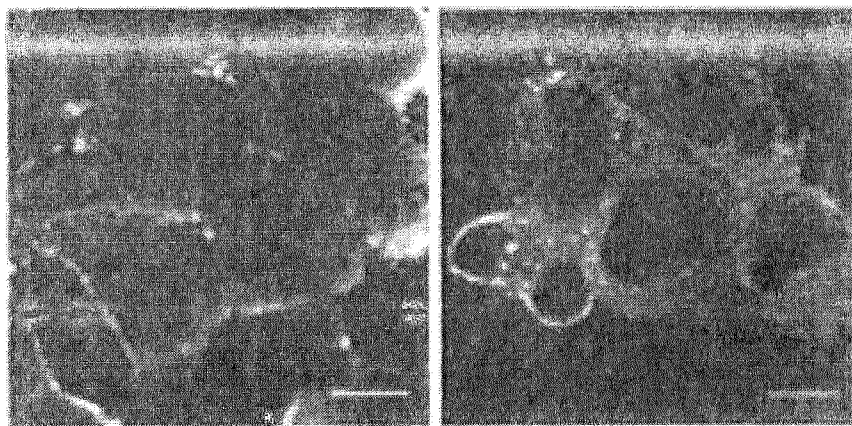


Figura 7. Internalización del FSHR sobreexpresado en células HEK-293, después de la exposición a 100 ng/ml de recFSH. Después de la incubación por 2 horas con el agonista y de su fijación, las células fueron expuestas al Ac anti-FSH Mab 106.105 y posteriormente al segundo anticuerpo conjugado con FITC

y visualizadas por microscopía confocal. **A:** FSHR antes de la exposición a FSH; **B:** FSHR 2 horas después del estímulo

Para los estudios de reciclamiento del FSHR a la membrana plasmática, las células serán expuestas durante 2 horas al análogo de la FSH y posteriormente se incubarán durante 4 horas adicionales en ausencia del análogo, al término de las cuales se cuantificará el FSHR presente en la membrana (internalizado-reciclado) y en el interior de la célula (degradado) por medio de citometría de flujo.

Caracterización del transcriptoma en líneas celulares y células de la granulosa humanas y de rata mediante secuenciación de nueva generación:

Generación de bibliotecas: La secuenciación del transcriptoma global se realizará en células HEK-293, MSC-1, KGN y de la granulosa de rata estimuladas y no estimuladas con diferentes análogos de la FSH, así como en células de la granulosa humanas obtenidas de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada. La preparación de las bibliotecas de ADNc será la recomendada para secuenciación a gran escala en el secuenciador HiSeq 2500 (plataforma Illumina). Después de la extracción del ARN total y de eliminar el ARN ribosomal, el ARNm se purificará utilizando perlas magnéticas prefabricadas (TruSeq Total RNA with Ribo-Zero Gold, Illumina, San Diego, CA, EUA). Posterior a la fragmentación, se sintetizará el ADNc empleando el estuche Transcriptasa Reversa SuperScript II, cebadores aleatorios, RNaseOUT, dNTPs y T4 Gene 32. Las bibliotecas serán preparadas siguiendo las recomendaciones para la secuenciación de ARNm de Illumina. Cada biblioteca tendrá un tamaño de inserto aproximado de 150-200 pares de bases y la calidad y tamaño de los mismos se verificará utilizando un Bioanalizador 2100 de Agilent Technologies. La generación de clusters y la secuenciación en ambos extremos de los fragmentos (paired-end) se realizarán empleando los procedimientos estándar recomendados para el HiSeq 2500 y los estuches TruSeq SNS v3-HS y TruSeq PE Cluster v3-cBot-HS (Illumina). La fidelidad de la secuenciación se verificará empleando el control Phix Control v3 (Illumina).

Análisis de expresión: Para el análisis bioinformático del transcriptoma se realizará un análisis de control de calidad en las secuencias usando la herramienta FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Una vez que se hayan eliminado los adaptadores y se cuente con secuencias de alta calidad, las lecturas de cada condición se mapearán al genoma humano de referencia (hg19) empleando el software TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu>) que utiliza la herramienta bowtie [77]. Los alineamientos generados por TopHat serán alimentados al software cufflink (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) para ensamblar los transcritos y generar el transcriptoma de cada condición. Los ensamblados serán procesados con la herramienta Cuffmerge (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>), que genera una base uniforme (normalización) para calcular la expresión génica y la transcripción en cada condición con base al conteo de lecturas y/o FPKM (fragmentos por Kilobase de exón por millón de lecturas) sobre los transcritos del genoma. Las lecturas y los archivos de salida de Cuffmerge se alimentarán a la herramienta Cuffdiff (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) para calcular los niveles de expresión, determinar la significancia estadística en cada condición e identificar los genes que son regulados diferencialmente a nivel transcripcional o post-transcripcional [78]. Para la visualización de los datos, se utilizarán los programas GenomeBrowser (<http://www.broad.mit.edu/annotation/argo/>) y Tasuke [79].

Validación de los resultados: El nivel de los transcritos diferencialmente expresados se medirá mediante PCR en tiempo real, empleando el sistema TaqMan y el equipo PCR SetpOnePlus; ambos

de Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). La preparación de las muestras se llevará al cabo empleando reactivos (sondas, cebadores y Mezcla Maestra Universal TaqMan para PCR) de esta misma compañía. Se utilizará el ARNm de β -actina como gen constitutivo para normalizar los datos. El número de ciclos, la temperatura y la duración de las amplificaciones serán optimizados para cada transcripto en el laboratorio del investigador responsable.

Análisis computacional y modelado probabilístico de los datos generados:

Una vez realizado el mapeo de las lecturas de secuenciación del transcriptoma y el ensamblado de los transcritos, se procederá a su consolidación contra un templado para obtener un ensamblado final del transcriptoma (*vide supra*). A partir de las lecturas de profundidad de este ensamblado se realizará un análisis de expresión de transcritos para generar una matriz de expresión diferencial de genes. Con estos datos se procederá al modelado probabilístico, para el que se utilizarán métodos basados en teoría de redes y cálculos de información mutua (una medida no-lineal de correlación que toma en cuenta distribuciones no estacionarias de datos) mediante los algoritmos INFOTHEO y ARACNe [80, 81]. El estudio de enriquecimiento estadístico de patrones de expresión (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) [82], categorías biológicas de Gene Ontology [83] y vías canónicas (Pathway Commons) [84], se realizará mediante minado en las bases de datos correspondientes; la significancia estadística se determinará por una prueba hipergeométrica corregida mediante el método de Benjamini-Hochberg (False Discovery Rate, FDR) [85]. Posteriormente las vías y procesos biológicos enriquecidos estadísticamente serán validados mediante el módulo de diseño de vías de Ingenuity Pathway [86], un equivalente *in silico* de los ensayos funcionales previo a la validación *in vitro* e *in vivo*. El agonismo selectivo relativo de cada agonista, en ausencia y presencia de los moduladores alostéricos será cuantificada siguiendo estrategias computacionales generales validadas para otros GPCRs (v.gr. el receptor β -adrenérgico)[87].

V.3 Obtención de células humanas de la granulosa murales y del cumulus:

Las células humanas de la granulosa se obtendrán de los líquidos de folículos maduros de mujeres normales (donadoras de ovocitos) sometidas a hiperestimulación ovárica controlada en el Programa de Donación de Óvulos para fertilización asistida del Hospital Ángeles del Pedregal. Habitualmente estas células son desechadas después de la identificación y separación mecánica del ovocito del líquido folicular y de las células del cumulus que lo rodean. Se utilizarán células de la granulosa y del cumulus de 12 donadoras (4 mujeres estimuladas con cada preparación comercial de FSH) a las cuales se les aplicarán protocolos rutinarios de hiperestimulación ovárica controlada con cada preparación. En breve: Cada voluntaria será estimulada a partir del 3er. día de su ciclo con recFSH (Gonal F), FSH urinaria altamente purificada (Bravelle) o coriolfolitropina-alfa (Lyrixtim) y la asignación para cada tratamiento será al azar. Los 3 tratamientos han demostrado ser ampliamente efectivos para la hiperestimulación ovárica controlada. Cuando se identifiquen al menos 2 folículos >14 mm se iniciará la administración de un antagonista de la GnRH [Cetrorelix; (Cetrotide^R), 0.25 mg al día, s.c.] para prevenir la secreción prematura de LH endógena y la luteinización del folículo. Las últimas fases de la maduración ovocitaria se inducirán mediante la administración del análogo del GnRH, triptorelina (Gonapeptyl^R), 0.1 mg s.c. en dosis única. La administración de este agonista, permitirá minimizar el estímulo de la LH endógena sobre la expresión génica de las células de la granulosa de los folículos maduros. Treinta y dos a 34 horas

IX. Presupuesto global

Gasto de inversión: \$644,000.00

Gasto corriente: \$1,484,000.00

TOTAL GASTO CORRIENTE + GASTO DE INVERSIÓN: \$2,000,000.00

X. Resultados entregables

Artículos originales: Debido a la complejidad del proyecto y a lo ambicioso de sus objetivos y metas, se contempla que los resultados generados por el desarrollo del proyecto den lugar a:

- a. Al menos 4 artículos originales publicables en revistas de alto impacto en las áreas respectivas: 2 relacionados con los datos bioquímicos y otros 2 con los del transcriptoma, correspondientes a los resultados obtenidos con las preparaciones naturales y las comerciales.
- b. Al menos 2 artículos de revisión, que describan el concepto de agonismo selectivo aplicado al receptor estudiado que integre globalmente los datos obtenidos con las diferentes preparaciones.
- c. Al menos 6 presentaciones en congresos, 3 nacionales (Sociedad Mexicana de Bioquímica, Ciencias Fisiológicas, Farmacología) y 3 internacionales (Endocrine Society, EUA, principalmente), a partir del 2º año del desarrollo del proyecto.

Formación de recursos humanos: Se contempla que el desarrollo del proyecto requerirá de la participación de alumnos de posgrado. Al menos 2 estudiantes de maestría y 2 de doctorado en Ciencias Biomédicas, cuyos proyectos de tesis estarían enfocados a los estudios bioquímicos (1 de maestría y 1 de doctorado) y a los de transcriptómica (distribuidos de igual forma). Se incorporará igualmente un alumno del Curso de Especialización en Biología de la Reproducción del HAP, para el rubro relacionado con la obtención de las células humanas de la granulosa.

XI. Multidisciplinariedad del proyecto

El carácter multidisciplinario del proyecto requerirá la participación de especialistas en diferentes áreas, incluyendo la endocrinología reproductiva clínica, la biología molecular, la genómica, la bioinformática y la biología de sistemas. Todos los co-investigadores que participarán en el proyecto son Técnicos Académicos o Investigadores adscritos a la Red de Apoyo a la Investigación, que es en donde se desarrollará el estudio. La tecnología que requiere el desarrollo del proyecto está actualmente desarrollada en el laboratorio del investigador responsable.

XII. Bibliografía

1. Ulloa-Aguirre A., Timossi C. *Reprod Biomed Online*, 2000; 1:48-62.
2. Ulloa-Aguirre A., Zarinan T., Dias J.A., Conn P.M. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:411-23.
3. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Gotschall R.R., Baker V.L., Moore W.T. *Mol Cell Endocrinol*, 1996; 125:3-19.
4. Ulloa-Aguirre A., Timossi C. *Hum Reprod Update*, 1998; 4:260-83.

5. Dias J.A., Cohen B.D., Lindau-Shepard B., Nechamen C.A., Peterson A.J., Schmidt A. *Vitam Horm*, 2002; 64:249-322.
6. Ulloa-Aguirre A., Midgley A.R., Jr., Beitins I.Z., Padmanabhan V. *Endocr Rev*, 1995; 16:765-87.
7. Ulloa-Aguirre A., Stanislaus D., Janovick J.A., Conn P.M. *Arch Med Res*, 1999; 30:420-35.
8. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Damian-Matsumura P., Dias J.A. *Endocrine*, 1999; 11:205-15.
9. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Mendez J.P. *Hum Reprod*, 2001; 16:599-604.
10. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Barrios-de-Tomasi J., Maldonado A., Nayudu P. *Biol Reprod*, 2003; 69:379-89.
11. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Walton W.J., Nguyen V.T., Huneidi J., Singh V., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2007; 260-262:40-8.
12. Barrios-De-Tomasi J., Timossi C., Merchant H., Quintana A., Avalos J.M., Andersen C.Y., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2002; 186:189-98.
13. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Butnev V.Y., Nguyen V.T., Gray C.M., Dias J.A., et al. *Biochemistry*, 2004; 43:10817-33.
14. Barrios-de-Tomasi J., Nayudu P.L., Brehm R., Heistermann M., Zarinan T., Ulloa-Aguirre A. *Reprod Biomed Online*, 2006; 12:428-41.
15. Blithe D.L. *J Biol Chem*, 1990; 265:21951-6.
16. Bishop L.A., Robertson D.M., Cahir N., Schofield P.R. *Mol Endocrinol*, 1994; 8:722-31.
17. Bishop L.A., Nguyen T.V., Schofield P.R. *Endocrinology*, 1995; 136:2635-40.
18. Blithe D.L., Iles R.K. *Endocrinology*, 1995; 136:903-10.
19. Ulloa-Aguirre A., Conn P.M., *G protein-coupled receptors and the G protein family*, in *Handbook of Physiology-Endocrinology: Section 7, Cellular Endocrinology*, P.M. Conn, Editor 1998, Oxford University Press: New York, USA. p. 87-141.
20. Ulloa-Aguirre A., Zarinan T., Pasapera A.M., Casas-Gonzalez P., Dias J.A. *Endocrine*, 2008; 32:251-63.
21. Uribe A., Zarinan T., Perez-Solis M.A., Gutierrez-Sagal R., Jardon-Valadez E., Pineiro A., et al. *Biol. Reprod.*, 2008; 78:869-82.
22. Ulloa-Aguirre A., Crepieux P., Poupon A., Maurel M.C., Reiter E. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011; 12:259-74.
23. Jiang X., Liu H., Chen X., Chen P.H., Fischer D., Sriraman V., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109:12491-6.
24. Jiang X., Dias J.A., He X. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:424-51.
25. Vassart G., Pardo L., Costagliola S. *Trends Biochem Sci*, 2004; 29:119-26.
26. Ulloa-Aguirre A., Reiter E., Bousfield G., Dias J.A., Huhtaniemi I. *Adv Pharmacol*, 2014; 70:37-80.
27. Gonzalez-Robayna I.J., Falender A.E., Ochsner S., Firestone G.L., Richards J.S. *Mol Endocrinol*, 2000; 14:1283-300.
28. Richards J.S., Russell D.L., Ochsner S., Hsieh M., Doyle K.H., Falender A.E., et al. *Recent Prog Horm Res*, 2002; 57:195-220.
29. Musnier A., Heitzler D., Boulo T., Tesseraud S., Durand G., Lecureuil C., et al. *Cell Mol Life Sci*, 2009; 66:3487-503.
30. Musnier A., Blanchot B., Reiter E., Crepieux P. *Cell Signal*, 2010; 22:707-16.
31. Kobilka B.K. *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1768:794-807.
32. Kobilka B.K., Deupi X. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:397-406.

33. Urban J.D., Clarke W.P., von Zastrow M., Nichols D.E., Kobilka B., Weinstein H., et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007; 320:1-13.
34. Timossi C.M., Barrios de Tomasi J., Zambrano E., Gonzalez R., Ulloa-Aguirre A. *Neuroendocrinology*, 1998; 67:153-63.
35. Timossi C.M., Barrios-de-Tomasi J., Gonzalez-Suarez R., Arranz M.C., Padmanabhan V., Conn P.M., et al. *J Endocrinol*, 2000; 165:193-205.
36. Bousfield G.R., Dias J.A. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011; 12:289-302.
37. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Butnev V.Y., Hiromasa Y., Harvey D.J., May J.V. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:989-97.
38. Walton W.J., Nguyen V.T., Butnev V.Y., Singh V., Moore W.T., Bousfield G.R. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86:3675-85.
39. Sairam M.R. *Faseb J*, 1989; 3:1915-26.
40. Fan Q.R., Hendrickson W.A. *Nature*, 2005; 433:269-77.
41. Damian-Matsumura P., Zaga V., Maldonado A., Sanchez-Hernandez C., Timossi C., Ulloa-Aguirre A. *J Mol Endocrinol*, 1999; 23:153-65.
42. Zambrano E., Olivares A., Mendez J.P., Guerrero L., Diaz-Cueto L., Veldhuis J.D., et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 80:1647-56.
43. Timossi C., Damian-Matsumura P., Dominguez-Gonzalez A., Ulloa-Aguirre A. *Mol Hum Reprod*, 1998; 4:1032-8.
44. Verboost P., Sloot W.N., Rose U.M., de Leeuw R., Hanssen R.G., Verheijden G.F. *Eur J Pharmacol*, 2011; 651:227-33.
45. Daya S. *Fertil Steril*, 2002; 77:711-4.
46. Andersen C.Y., Westergaard L.G., van Wely M. *Reprod Biomed Online*, 2004; 9:231-6.
47. Lispi M., Bassett R., Crisci C., Manicini M., Martelli F., Ceccarelli D., et al. *Reprod Biomed Online*, 2006; 13:179-93.
48. Robinson L.J., Tourkova I., Wang Y., Sharrow A.C., Landau M.S., Yaroslavskiy B.B., et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 394:12-7.
49. Zhu L.L., Blair H., Cao J., Yuen T., Latif R., Guo L., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109:14574-9.
50. Radu A., Pichon C., Camparo P., Antoine M., Allory Y., Couvelard A., et al. *N Engl J Med*, 2010; 363:1621-30.
51. Choi J.H., Wong A.S., Huang H.F., Leung P.C. *Endocr Rev*, 2007; 28:440-61.
52. Leung P.C., Choi J.H. *Hum Reprod Update*, 2007; 13:143-62.
53. Galandrin S., Oligny-Longpre G., Bouvier M. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:423-30.
54. Mailman R.B. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:390-6.
55. Violin J.D., Lefkowitz R.J. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:416-22.
56. Andresen B.T. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2011; 11:92-8.
57. Richards J.S. *Endocrinology*, 2001; 142:2184-93.
58. Xu F., Stouffer R.L., Muller J., Hennebold J.D., Wright J.W., Bahar A., et al. *Mol Hum Reprod*, 2011; 17:152-65.
59. Assou S., Haouzi D., Dechaud H., Gala A., Ferrieres A., Hamamah S. *Biomed Res Int*, 2013; 2013:354582.
60. Velthut-Meikas A., Simm J., Tuuri T., Tapanainen J.S., Metsis M., Salumets A. *Mol Endocrinol*, 2013; 27:1128-41.
61. Chronowska E. *Biomed Res Int*, 2014; 2014:213570.
62. Yerushalmi G.M., Salmon-Divon M., Yung Y., Maman E., Kedem A., Ophir L., et al. *Mol Hum Reprod*, 2014; 20:719-35.

63. Tranchant T., Durand G., Gauthier C., Crepieux P., Ulloa-Aguirre A., Royere D., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2011; 331:109-18.
64. Casas-Gonzalez P., Scaglia H.E., Perez-Solis M.A., Durand G., Scaglia J., Zarinan T., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2012; 364:71-82.
65. Reiter E., Ahn S., Shukla A.K., Lefkowitz R.J. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012; 52:179-97.
66. Gonzalez-Maeso J., Yuen T., Ebersole B.J., Wurmbach E., Lira A., Zhou M., et al. *J Neurosci*, 2003; 23:8836-43.
67. Sternini C., Spann M., Anton B., Keith D.E., Jr., Bunnett N.W., von Zastrow M., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93:9241-6.
68. Keith D.E., Anton B., Murray S.R., Zaki P.A., Chu P.C., Lissin D.V., et al. *Mol Pharmacol*, 1998; 53:377-84.
69. Benovic J.L., Staniszewski C., Mayor F., Jr., Caron M.G., Lefkowitz R.J. *J Biol Chem*, 1988; 263:3893-7.
70. Barak L.S., Oakley R.H., Laporte S.A., Caron M.G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98:93-8.
71. Wehbi V., Tranchant T., Durand G., Musnier A., Decourtye J., Piketty V., et al. *Mol Endocrinol*, 2010; 24:561-73.
72. Dias J.A., Bonnet B., Weaver B.A., Watts J., Kluetzman K., Thomas R.M., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2011; 333:143-50.
73. Dias J.A., Campo B., Weaver B.A., Watts J., Kluetzman K., Thomas R.M., et al. *Biol Reprod*, 2014; 90:19.
74. Perez-Solis M.A., Macias H., Acosta-MontesdeOca A., Pasapera A.M., Fierro R., Ulloa-Aguirre A., et al. *Endocrine*, 2010; 37:98-105.
75. Thomas R.M., Nechamen C.A., Mazurkiewicz J.E., Ulloa-Aguirre A., Dias J.A. *Endocrinology*, 2011; 152:1691-701.
76. Maya-Nunez G., Janovick J.A., Aguilar-Rojas A., Jardon-Valadez E., Leanos-Miranda A., Zarinan T., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2011; 337:16-23.
77. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. *Genome Biol*, 2009; 10:R25.
78. Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D.R., et al. *Nat Protoc*, 2012; 7:562-78.
79. Kumagai M., Kim J., Itoh R., Itoh T. *Bioinformatics*, 2013; 29:1806-8.
80. Margolin A.A., Nemenman I., Basso K., Wiggins C., Stolovitzky G., Dalla Favera R., et al. *BMC Bioinformatics*, 2006; 7 Suppl 1:S7.
81. de Matos Simoes R., Emmert-Streib F. *PLoS One*, 2012; 7:e33624.
82. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102:15545-50.
83. Consortium T.G.O. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36:D440-4.
84. Cerami E.G., Gross B.E., Demir E., Rodchenkov I., Babur O., Anwar N., et al. *Nucleic Acids Res*, 2011; 39:D685-90.
85. Benjamini Y., Hochberg, Y. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1995; Series B 57:289-300.
86. Kramer A., Green J., Pollard J., Jr., Tugendreich S. *Bioinformatics*, 2014; 30:523-30.
87. Rajagopal S., Ahn S., Rominger D.H., Gowen-MacDonald W., Lam C.M., Dewire S.M., et al. *Mol Pharmacol*, 2011; 80:367-77.

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**