



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTOS DE LEVONORGESTREL SOBRE LA  
FUNCIÓN HORMONAL DEL OVARIO**

**T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A  
SAÚL LIRA ALBARRÁN**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. FERNANDO LARREA GALLO  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**COMITÉ TUTOR  
DR. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Gual Castro del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en Ciudad de México, México, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto número CB-2009/127971 y número de beca 303218.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	7
1.1 Anticoncepción de emergencia (AE): definición e indicaciones	7
1.2 Desarrollo de la AE de progestina sola: esquemas de administración y efectividad del levonorgestrel en la AE	8
1.3 Características farmacológicas del levonorgestrel	9
1.4 Mecanismo de acción del levonorgestrel como anticonceptivo de emergencia	13
1.5 Regulación del desarrollo folicular	16
1.6 Maduración ovocitaria y acción de la progesterona	19
1.7 Estudios transcriptómicos de la calidad ovocitaria en humanos	21
1.8 Estudios transcriptómicos en células de la granulosa	22
<b>2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	23
2.1 Pregunta de investigación	23
2.2 Hipótesis	23
2.3 Objetivos	23
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	24
3.1 Reactivos	24
3.2 Animales y cultivo primario de células de la granulosa	24
3.3 Cuantificación de 17 $\beta$ -estradiol	26
3.4 Extracción del ARN	26
3.5 Diseño experimental y efectos a nivel transcripcional	27
3.6 Perfiles de expresión génica	28
3.7 Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados	29
3.8 RT-PCR cuantitativo	30
3.9 Evaluación del desarrollo folicular	31

3.10 Análisis de viabilidad celular	32
3.11 Análisis estadístico	32
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
4.1 Validación bioquímica del modelo experimental	33
4.2 Efectos del levonorgestrel sobre la actividad de la aromatasa y la expresión de <i>Cyp19a1</i>	40
4.3 Validación genómica del modelo experimental	45
4.4 Efectos genómicos del levonorgestrel sobre la fisiología ovárica	53
<b>5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>68</b>
<b>7. APÉNDICES</b>	<b>76</b>
<b>8. ARTÍCULOS PUBLICADOS, CAPÍTULOS DE LIBRO, PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y DISTINCIONES RECIBIDAS</b>	<b>89</b>

## ABREVIATURAS

AE: anticoncepción de emergencia

AMH: hormona anti-Mülleriana

AR: receptor a andrógenos

ARU: afinidad relativa de unión

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BMP: proteína morfogenética ósea

CE<sub>50%</sub>: concentración efectiva al 50%

CPGR: cultivo primario de células de la granulosa de rata

DES: dietilestilbestrol

DHT: dihidrotestosterona

DS: desviación estándar

E<sub>2</sub>: 17β-estradiol

EEM: error estándar de la media

ER: receptor a estrógenos; tipo alfa y tipo beta (ERα y ERβ, respectivamente)

FDA: *Food and Drug Administration*

FDR: tasa de descubrimientos falsos

FIN: finasterida

FSHh: hormona folículo estimulante humana

GDE: genes diferencialmente expresados

GDF: factor de crecimiento y diferenciación

GO: ontología génica

GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*; análisis de enriquecimiento de conjunto de genes

IPA: *Ingenuity Pathway Analysis*; análisis de ingenuidad de vías

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LH: hormona luteinizante

LNG: levonorgestrel

MAP: *Molecule Activity Predictor*; predicción de actividad molecular

MIX: 1-metil-3-isobutil-xantina

MR: receptor a mineralocorticoides

NES: *Normalized Enrichment Score*; valor de enriquecimiento normalizado

P<sub>4</sub>: progesterona

PGR: receptor a progesterona; isoformas A y B (PGRA y PGRB, respectivamente)

PKA: cinasa A de proteínas

REVIGO: *reduce + visualize Gene Ontology*

RMA: *Robust Multiarray Average*

RT-qPCR: PCR en tiempo real cuantitativo

RU486: mifepristona

SHBG: *sexual hormone binding globulin*; globulina transportadora de hormonas sexuales

TC: toxina del cólera

TE<sub>50%</sub>: tiempo medio efectivo

VC: veces de cambio

8-Br-AMPC: 8 bromo monofosfato cíclico de adenosina

## RESUMEN

En la actualidad el método más utilizado en anticoncepción hormonal de emergencia es la administración de la progestina sintética levonorgestrel (LNG). El principal mecanismo de acción del LNG es el retraso o la inhibición de la ovulación a nivel de la unidad hipotálamo hipofisaria. En este trabajo de tesis se investigaron los efectos del LNG sobre la esteroidogénesis ovárica con base a observaciones clínicas previas de nuestro grupo que sugieren a la aromatasa como un potencial blanco de acción del LNG. La hipótesis de trabajo establece que el LNG inhibe la expresión del gen que codifica a la aromatasa (*Cyp19a1*) y en consecuencia limita la biosíntesis de estrógenos a nivel ovárico, condicionando el efecto anovulatorio a nivel neuroendocrino. Como modelo experimental, para evaluar el efecto del LNG sobre la biosíntesis de estrógenos, se utilizó el cultivo primario de células de la granulosa de rata (CPGR) suplementado con andrógenos y estimulado con la hormona folículo estimulante humana (FSHh). Los resultados demostraron el efecto inhibitorio, concentración dependiente, del LNG sobre la biosíntesis de estradiol en CPGR. Este efecto se observó posterior a la generación de AMPc y a nivel de la expresión génica de *Cyp19a1*. De manera complementaria y para evaluar los posibles efectos del LNG sobre la fisiología ovárica, se realizó el análisis genómico funcional en 9 CPGR independientes: 3 en condiciones basales, 3 estimulados con FSHh y 3 coincubados con FSHh y LNG, utilizando micromatrices de expresión de genoma completo. El tratamiento de los CPGR con FSHh *versus* basal resultó en 372 genes diferencialmente expresados (GDE), al considerar como puntos de corte un valor  $|\gt 1.3 \text{ veces de cambio}|$  con una  $p < 0.1$ . El número de genes sobreexpresados fue de 174 y de subexpresados



198. Los dos genes más sobreexpresados por FSHh fueron *Lhcgr* y *Cyp19a1*. El análisis funcional de los GDE utilizando plataformas bioinformáticas complementarias permitió validar nuestro modelo experimental para evaluar los efectos genómicos del LNG a nivel de la fisiología ovárica. Al respecto, el tratamiento con LNG resultó en 329 GDE, 161 sobreexpresados y 168 subexpresados. El análisis de ontología génica de todos los 329 GDE identificó a la ovogénesis y a la generación del gameto femenino como los principales procesos biológicos sobrerrepresentados, siendo este último identificado también mediante análisis de enriquecimiento de conjunto de genes junto con la biosíntesis de esteroides. De manera similar, el LNG modificó la expresión de genes que participan en vías canónicas como la maduración del ovocito mediada por progesterona y la meiosis ovocitaria. El análisis *in silico* predijo que el LNG inhibe bio-funciones asociadas a la fisiología ovárica tales como la cantidad de folículos ováricos, la foliculogénesis y el metabolismo de esteroides. La inhibición de estas bio-funciones fue secundaria a dos de los genes más subexpresados por el tratamiento con LNG: *Cyp19a1* y *Lhcgr*. Los cambios, así como la direccionalidad de la expresión de algunos genes involucrados en los mecanismos de acción de la FSH para regular la esteroidogénesis ovárica, fueron validados por RT-qPCR de los ARNm de CPGR en presencia o ausencia de LNG. En conclusión, el presente estudio sugiere al ovario como uno de los sitios de acción de los efectos del LNG, en particular sobre la función hormonal de las células de la granulosa. Nuestros resultados destacan la importancia de la intercomunicación entre el ovocito y las células de la granulosa para la función reproductiva y hormonal del ovario, además de proporcionar las bases para el desarrollo de nueva tecnología anticonceptiva.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Anticoncepción de emergencia: definición e indicaciones.

La anticoncepción de emergencia (AE) se define como todos los métodos que se pueden utilizar como medidas urgentes para prevenir el embarazo después de un acto sexual sin protección, siempre y cuando sean empleados posteriores al coito, pero antes de la implantación del embrión. Por lo tanto, se considera un método de apoyo de uso ocasional más que de uso regular (Van Look and von Hertzen, 1993). El Consorcio de Anticoncepción de Emergencia plantea una definición semejante: “son métodos utilizados por las mujeres dentro de pocas horas o días posteriores a un acto sexual sin protección para prevenir un embarazo”. Las dos definiciones destacan que en esencia la AE, también conocida como anticoncepción poscoital o píldora del día siguiente, se emplea en un período determinado posterior a un acto sexual sin protección o con protección inadecuada (p.ej., ruptura del preservativo, olvido de la toma de anticonceptivos orales), así como en casos de abuso sexual, para prevenir un embarazo; este método difiere de la mayoría de los utilizados para la regulación de la fertilidad en que es de uso ocasional y no regular (Croxatto et al., 2001, 2015). En general en México, las usuarias de la AE son con frecuencia adolescentes que inician su vida sexual y que se vieron beneficiadas con la inclusión en 2004 de la AE en la Norma Oficial Mexicana de los Servicios de Planificación Familiar (NOM-005-SSA2-1993) (Lara et al., 2007). Desde hace más de una década en México se comercializan al menos cinco formulaciones comerciales de AE, entre ellas se incluyen los métodos de progestina sola (Schiavon, 2006, Schiavon and Westley, 2008).

## **1.2 Desarrollo de la AE de progestina sola: esquemas de administración y efectividad del levonorgestrel en la AE**

El desarrollo de la AE a base de hormonas esteroides se inició en la década de 1960, a través del uso de dosis altas de estrógenos sintéticos. Estas formulaciones tenían baja eficacia y varios efectos colaterales como náusea y vómito. Posteriormente, en la década de 1970, se planteó el método de Yuzpe que consiste en la administración de dos dosis de 100 µg de etinil estradiol con 1.0 mg de DL-norgestrel administradas en un intervalo de 12 horas en los primeros tres días posteriores al acto sexual (Yuzpe et al., 1974). En esta misma década se inició el desarrollo de regímenes de progestinas solas para uso poscoital en mujeres con relaciones sexuales irregulares (Kesserü et al., 1974), incluyendo el empleo de dispositivos intrauterinos solo de cobre (2015).

En 1999, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el plan B (AE a base de levonorgestrel [LNG]) como el primer régimen de progestina sola para AE. El uso de LNG tiene varias ventajas con respecto al método de Yuzpe, que incluye su mayor eficacia y la ausencia de efectos colaterales relacionados con el componente estrogénico (1998). Desde el año 2013, el LNG se puede comprar sin receta médica y sin restricción de edad. Por lo anterior, la AE a base de esta progestina ha ganado mayor atención debido a que es el producto más utilizado a nivel mundial para tales fines (Kahlenborn et al., 2015). Sin embargo, se ha introducido al mercado un método de AE hormonal con un modulador selectivo de los receptores de progesterona (acetato de ulipristal) que ha demostrado ser más eficaz que el LNG dado que puede emplearse hasta por cinco días posteriores al

acto sexual (Glasier et al., 2010), por lo que podría convertirse en el método más utilizado a nivel mundial.

En el uso del método de progestina sola, el LNG se puede administrar en dos dosis de 0.75 mg con un intervalo entre ellas de 12 horas o en una sola dosis de 1.5 mg (Arowojolu et al., 2002, von Hertzen et al., 2002). Esta progestina se ha etiquetado para su uso por hasta 72 horas, e incluso se ha sugerido que se puede utilizar hasta 96 horas, después de un acto sexual sin protección y se recomienda su administración lo más pronto posible después del acto sexual (Glasier et al., 2010, Cameron et al., 2017) . Los efectos secundarios más frecuentes observados con el tratamiento son las irregularidades menstruales sin la ocurrencia de otros eventos adversos asociados (Shohel et al., 2014).

### **1.3 Características farmacológicas del levonorgestrel**

El LNG es una progestina sintética de segunda generación derivada de la 19-nortestosterona con actividad agonista sobre el receptor de progesterona ( $P_4$ ) (Figura 1). El análisis de los parámetros farmacocinéticos del LNG mostró que la dosis oral de 1.5 mg se absorbe rápidamente resultando en una concentración máxima en plasma de 19.2 ng/mL después de 1.4 horas de su administración, área bajo la curva de 152.7 ng x hora/mL, vida media de 25 horas y biodisponibilidad cercana al 100% (Sarkar, 2011). El 47.5% de esta progestina se une a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG, *sexual hormone binding globulin*), el 50% a la albúmina sérica y el 2.5% se encuentra en forma libre en suero. De manera adicional, el LNG disminuye las concentraciones en suero de la SHBG en aproximadamente el 50% (Schindler et al., 2008).

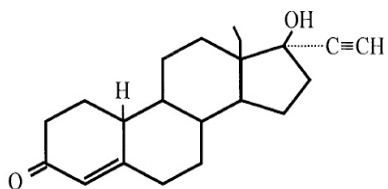


Figura 1. Estructura química del LNG: 13-etil-17β-etinil-17β-hidroxi-4-gonen-3-ona

El metabolismo del LNG *in vitro* e *in vivo* se realiza a través de la reducción del anillo A de su molécula por acción de las enzimas 5α-reductasa y la 3α- o 3β-deshidrogenasa, lo que se traduce en la generación de sus derivados tetrahidroreducidos (Figura 2). Estas modificaciones condicionan la pérdida de la actividad progestacional y la adquisición de la actividad estrogénica de los metabolitos del LNG, mediante su unión al receptor de estrógenos (Garcia-Becerra et al., 2002, Lemus et al., 1992).

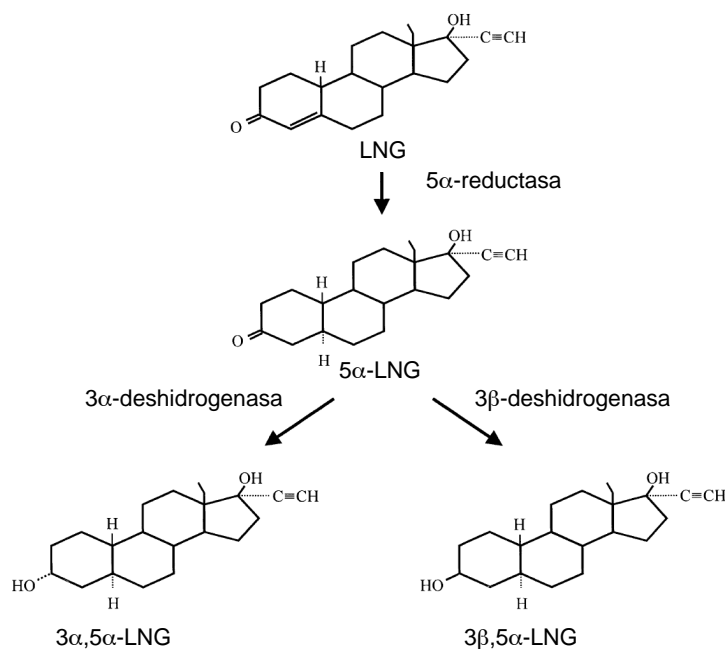


Figura 2. Estructura química del LNG y sus derivados reducidos en el anillo A. 5α-dihidrolevonorgestrel (5α-LNG); 3α,5α,- y 3β,5α-tetrahidrolevonorgestrel (3α,5α,-LNG y 3β,5α-LNG, respectivamente). Tomado de (Garcia-Becerra et al., 2002).

La actividad progestacional de una sustancia se puede determinar por la dosis requerida para inducir en la mujer el cambio de endometrio proliferativo a secretor (transformación endometrial), previa estimulación con estrógenos; además, se han utilizado bioanálisis para el estudio de los efectos de las progestinas sobre el endometrio estimulado por estrógenos, y sobre las gonadotropinas hipofisarias. Así se determinó que la potencia progestacional del LNG es mayor a nivel central y endometrial *versus* P<sub>4</sub> (Schindler et al., 2008).

Los efectos de las progestinas sobre la expresión génica son mediados por receptores intracelulares. En el caso del LNG estos efectos se realizan principalmente a través del receptor a P<sub>4</sub> (PGR) como se muestra en las Tablas 1 y 2, y en la Figura 3.

Tabla 1. Afinidad relativa de unión (ARU) del LNG a varios receptores nucleares.

<i>Receptor</i>	<i>Progesterona</i>	<i>Levonorgestrel</i>
PGR	100	323
GR	11 / 6 <sup>a</sup>	7.5
AR	3 / 62 <sup>b</sup>	58
MR	1000	17
ER	0.5	< 0.02

La ARU es la concentración de esteroide necesaria para desplazar el 50% del ligando marcado al receptor. Todas las ARU se determinaron por la unión *in vitro* a receptores recombinantes de esteroides humanos, excepto: ARU determinada por la sobreexpresión del hGR<sup>a</sup> o del hAR<sup>b</sup> en la línea celular COS-1. PGR = receptor a progesterona; GR = receptor a glucocorticoides; AR = receptor a andrógenos; MR = receptor a mineralocorticoides; ER = receptor a estrógenos. Tomado de (Africander et al., 2011).

Tabla 2. Concentraciones estimuladoras (CE<sub>50%</sub>) de la P<sub>4</sub>, LNG y sus derivados reducidos en el anillo A sobre la activación transcripcional de las isoformas del PGR.

<i>Esteroides</i>	<i>PGRA (mol/L)</i>	<i>PGRB (mol/L)</i>
P <sub>4</sub>	3.93 X 10 <sup>-8</sup>	6.42 X 10 <sup>-10</sup>
LNG	5.76 X 10 <sup>-11</sup>	6.07 X 10 <sup>-11</sup>
5α-LNG	8.19 X 10 <sup>-10</sup>	9.93 X 10 <sup>-10</sup>
3α,5α	1.07 X 10 <sup>-8</sup>	3.37 X 10 <sup>-8</sup>
3β,5α	6.49 X 10 <sup>-9</sup>	1.76 X 10 <sup>-8</sup>

Tomado de (Garcia-Becerra et al., 2002).

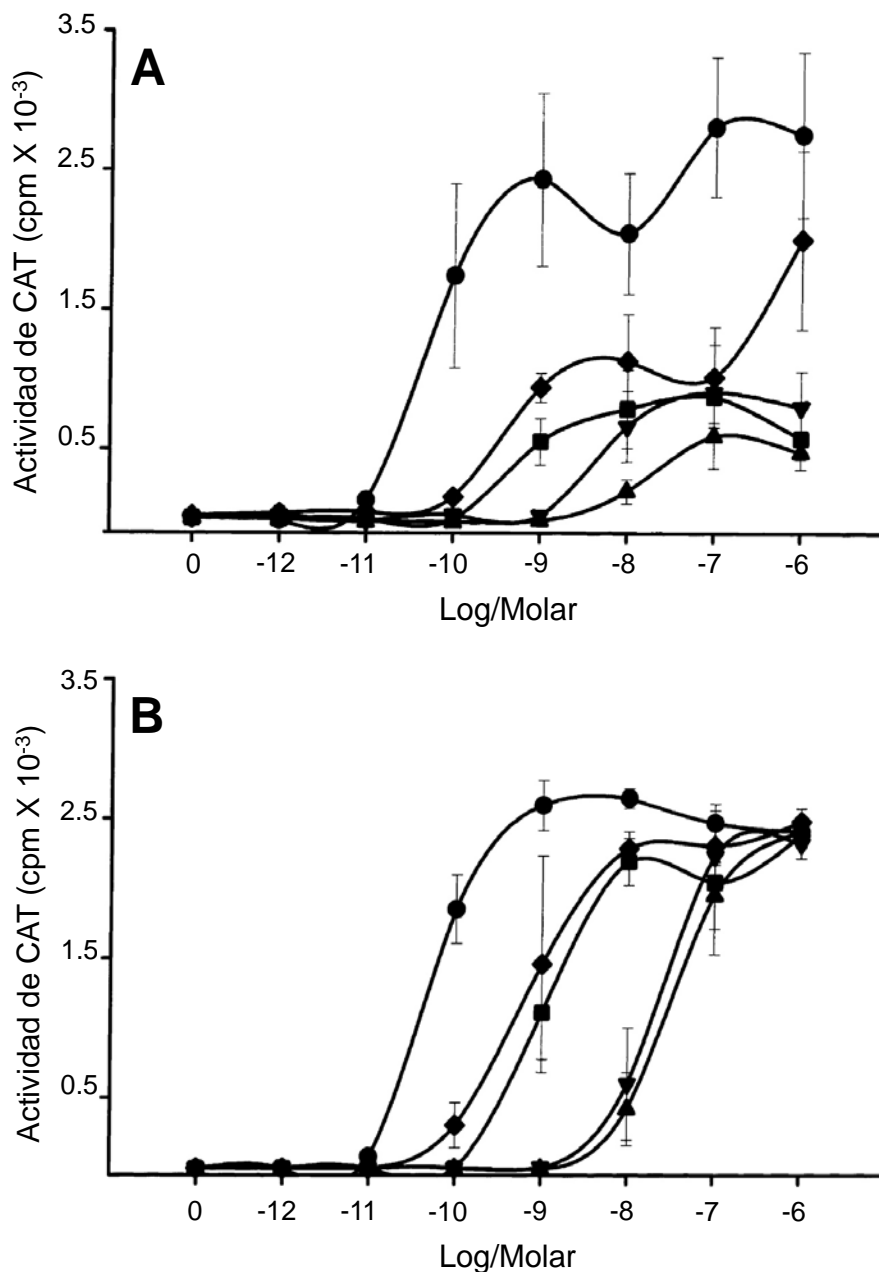


Figura 3. Activación dosis-dependiente de PGRA y PGRB por el LNG y sus derivados reducidos del anillo A. Los experimentos de transfección se realizaron en células HeLa utilizando el reportero PRE-E1b-CAT cotransfectado con vectores de expresión para PGRA (Panel A) o PGRB (Panel B). Las células se cultivaron en presencia o ausencia de concentraciones crecientes ( $10^{-12}$  a  $10^{-6}$ ) de P<sub>4</sub> (◆), LNG (●), 5 $\alpha$ -LNG, (■), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -LNG (▼) y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -LNG (▲), respectivamente. La actividad de CAT se determinó en 5  $\mu$ g de proteína celular. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes. Tomado de (García-Becerra et al., 2002).

Las progestinas sintéticas derivadas de la 19-nortestosterona, como noretisterona, gestodeno y levonorgestrel al ser biotransformadas a sus derivados tetrahidroreducidos adquieren la capacidad molecular de interactuar de manera selectiva con el ER $\alpha$  (Larrea et al., 2001). El metabolito 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -LNG es el que presenta mayor afinidad por el receptor a juzgar por la activación de la transcripción génica de manera similar a la observada con el natural (García-Becerra et al., 2002) y disminución de su actividad progestacional (García-Becerra et al., 2004) (Tabla 2; Figura 3). Estos resultados han sido importantes para establecer las bases de los efectos multihormonales que pueden derivarse del metabolismo de las hormonas esteroideas tanto naturales como sintéticas.

#### **1.4 Mecanismo de acción del levonorgestrel como anticonceptivo de emergencia**

Los posibles blancos de acción de la AE hormonal incluyen a la unidad hipotálamo-hipofisaria, al transporte de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, así como la funcionalidad de los mismos, la foliculogénesis y la ovulación, el proceso de fertilización, el desarrollo y transporte del embrión, la receptividad endometrial, el fenómeno de implantación y la función del cuerpo lúteo. En general, los consensos internacionales consideran que el principal mecanismo de acción de la AE oral a base de LNG es a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario al inhibir o retrasar la ovulación (Glasier et al., 2014, 2015).

Existen en la literatura evidencias que sugieren al ovario como sitio de acción hormonal del LNG (Heikinheimo et al., 1996, Ortiz et al., 2004). Todos estos estudios establecen que parte de los efectos del LNG se derivan de su



facultad de modificar la biosíntesis de estrógenos a través de interferir con la biodisponibilidad de andrógenos aromatizables, así como con la actividad de la enzima aromatasa. Estos efectos, además de los ya conocidos sobre la función gonadotrópica a nivel de la unidad hipotálamo-hipofisaria (Heikinheimo et al., 1996), son observados también a nivel de los procesos de desarrollo y maduración folicular como ha sido descrito previamente por nuestro grupo (Durand et al., 2001). A este respecto, es importante señalar que el diámetro folicular, así como, los eventos que se suceden a nivel hipotálamo-hipofisario durante la fase periovulatoria del ciclo menstrual son determinantes para condicionar los efectos del LNG sobre el proceso de la ovulación. Nuestro grupo y otros han descrito que la administración de LNG durante el ciclo inhibe la ovulación cuando el desarrollo folicular determinado por el diámetro de este no es mayor de 18 mm (Croxatto et al., 2004, Durand et al., 2010).

En relación con los efectos de LNG durante el ciclo menstrual, nuestro grupo informó que en mujeres que permanecieron ovulatorias después de la administración de LNG, presentaron concentraciones de estradiol ( $E_2$ ) y estrona en suero significativamente menores a las observadas en mujeres control sin tratamiento (Durand et al., 2010) (Figura 4). Estas observaciones apoyan un mecanismo de acción del LNG a nivel ovárico, mediante el cual la progestina afecta la biosíntesis de  $E_2$  en el folículo y de esta manera modifica los eventos que condicionan la descarga hipofisaria de LH, como fue descrito previamente en el mono *Macaca fascicularis* (Heikinheimo et al., 1996). En contraste, la administración peri y postovulatoria del LNG no interfirió en la función del cuerpo lúteo ni modificó la morfología endometrial, como se observó en otros modelos

como el mono *Cebus apella* (Ortiz et al., 2004).

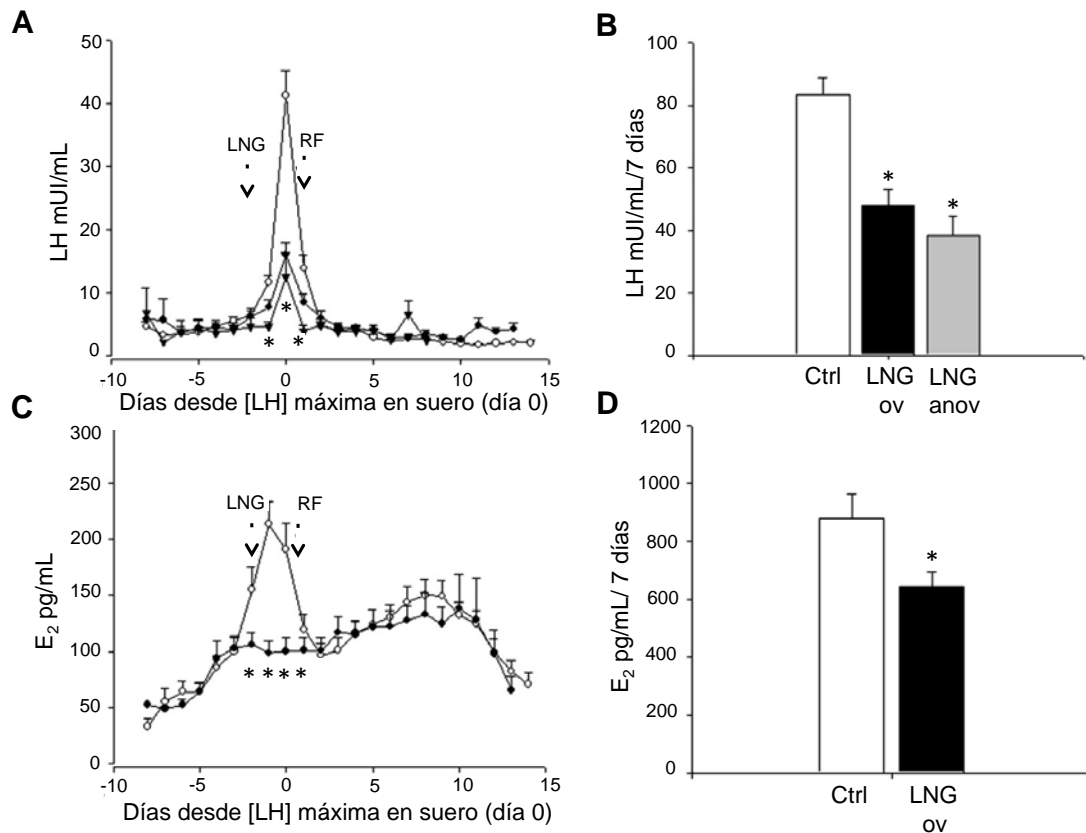


Figura 4. Concentraciones en suero y área bajo la curva de LH (paneles A y B, respectivamente) y E<sub>2</sub> (paneles C y D, respectivamente) durante los ciclos control (Ctrl) y tratados con LNG en mujeres ovulatorias (LNG-ov) y anovulatorias (LNG-anov). Ciclo control (○), LNG-ov (●), LNG-anov (▼), ruptura folicular (RF). Los resultados se expresan como la media ± EEM. \*p < 0.05 LNG-ov y LNG-anov versus Ctrl. Tomado de (Durand et al., 2010).

En la rata el LNG inhibió la ovulación dependiendo del momento de la administración del tratamiento, la dosis utilizada o ambas situaciones, pero no tuvo efecto sobre la fertilización o la implantación (Muller et al., 2003). En síntesis, los estudios realizados en primates, ratas y seres humanos descartan los efectos post fertilización del LNG como AE y sugieren que el mecanismo de acción de esta progestina se ubica fundamentalmente a nivel del eje reproductivo.

A este respecto, estudios con relación a los efectos de compuestos con actividad progestacional (promegestona, P<sub>4</sub>, 20 alfa-hidroxiP<sub>4</sub> y 17 alfa-hidroxiP<sub>4</sub>) en cultivos primarios de células de la granulosa de rata (CPGR) demostraron la acción inhibitoria de la P<sub>4</sub> sobre la esteroidogénesis estimulada por FSH, lo que representó un posible mecanismo por el cual la P<sub>4</sub> inhibe de manera directa pero reversible el desarrollo folicular ovárico debido a que el E<sub>2</sub> es necesario para la proliferación y maduración de las células de la granulosa (Schreiber et al., 1980). Posteriormente, se informó que en CPGR las progestinas suprimen la actividad de aromatasa estimulada por FSH y por lo tanto la producción de E<sub>2</sub>, al actuar en un sitio posterior a la generación de AMPc y no a través de la inhibición competitiva de la aromatasa (Schreiber et al., 1981). La inhibición *in vitro* de esta enzima por acción de la P<sub>4</sub> es dependiente de la dosis, de tal manera que es posible que la elevación en las concentraciones de P<sub>4</sub> en ambientes intraováricos o intrafoliculares en condiciones *in vivo* en las etapas periovulatorias (p.ej., en el caso de la administración exógena de P<sub>4</sub>), pudiera ser considerada nociva para el adecuado desarrollo folicular. De manera adicional, la disminución esperada en la biosíntesis de estrógenos secundaria al aumento de P<sub>4</sub> intrafolicular o a la administración de compuestos con similar actividad biológica, predispondría al desarrollo de atresia folicular por el inadecuado aporte de estrógenos (Fortune and Vincent, 1983).

### **1.5 Regulación del desarrollo folicular**

El desarrollo folicular ovárico (foliculogénesis) inicia con la generación de los folículos primordiales constituidos por un ovocito, en arresto de la profase de la

primera división meiótica, rodeado de una sola capa de células escamosas de la pre-granulosa. A partir de la reserva de folículos primordiales se reclutan continuamente folículos para formar una cohorte de folículos en crecimiento, con la característica de ser esta una etapa independiente de la acción de las gonadotropinas, pero regulada por miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) secretado por los ovocitos y/o las células de la teca/granulosa que rodean al ovocito y que actúan en forma paracrina o autocrina. En este sentido, en las etapas tempranas de la foliculogénesis, la hormona anti-Mülleriana (AMH, *anti-Müllerian hormone*), varias proteínas morfogenéticas (BMP, *bone morphogenetic protein*) y los factores de crecimiento y diferenciación (GDF, *growth and differentiation factor*) que pertenecen a la superfamilia de TGF- $\beta$  desempeñan un papel fundamental. Por ejemplo, gracias a la acción de la proteína BMP-7 y al incremento concomitante del número de receptores de FSH, los folículos primordiales se desarrollan en folículos primarios caracterizados por el crecimiento del ovocito y una sola capa de células de la granulosa que adopta la forma cuboide. Posteriormente, estos folículos se convierten en folículos secundarios o preantrales mediante la proliferación de las células de la granulosa en dos o tres capas que rodean al ovocito y una capa adicional de células de la teca que cubre al folículo. Durante esta transición es fundamental el GDF9 a la par de la disminución en la expresión de *AMH*, lo que incrementa la sensibilidad del folículo a la FSH y favorece su reclutamiento a la cohorte de folículos que serán dominantes. Finalmente, mediante la acción de la FSH se desarrollan los folículos terciarios o antrales cuando se forma una cavidad llena de líquido (antro) entre las

capas de las células de la granulosa (Gupta et al., 2015, Hsueh et al., 2015) (Figura 5).

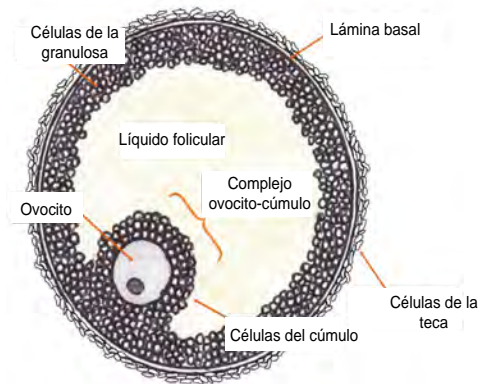


Figura 5. Representación de un folículo antral, tomado de (Hennet and Combelles, 2012).

Los folículos antrales tienen tres tipos de células somáticas (teca, granulosa y del cúmulo), lámina basal y líquido folicular; cada uno con funciones reguladoras en la diferenciación del ovocito. La estructura interna del folículo presenta dos tipos de células de la granulosa, las murales y un tipo especializado llamado del cúmulo que rodean al ovocito formando una estructura denominada complejo ovocito-cúmulo, mientras que las células de la granulosa murales forman la capa interna del folículo. Cada folículo está rodeado por una lámina basal, una placa especializada de matriz extracelular que separa el folículo interno del tercer tipo de célula folicular somática, las células de la teca. Estas células representan una capa vascularizada que define el límite externo del folículo antral. Es relevante señalar que el folículo antral en su conjunto constituye un microambiente especializado (nicho) adaptado a las necesidades del ovocito conforme se acerca al momento de la ovulación, durante el cual, el ovocito debe completar su crecimiento final, capacitación y maduración nuclear y citoplasmática para ser susceptible de ser fecundado (Hennet and Combelles, 2012).

## **1.6 Maduración ovocitaria y acción de la progesterona**

El ovocito para lograr su maduración necesita transitar desde la profase I a través de la meiosis I hasta detenerse (arresto meiótico) en la meiosis II, momento en el que se libera el folículo dominante que ha alcanzado su crecimiento completo. La maduración ovocitaria se da en respuesta a la secreción máxima de LH en la etapa preovulatoria, y se acompaña de un conjunto de cambios nucleares y citoplasmáticos en el ovocito. Los eventos a nivel del núcleo incluyen la progresión meiótica (p.ej., la ruptura de la envoltura nuclear y la condensación de los cromosomas), mientras que la maduración citoplasmática se caracteriza no solo por cambios en los organelos y su distribución (p.ej., retículo endoplásmico liso y gránulos corticales) sino además por el control post transcripcional a nivel de la poliadenilación que resulta fundamental para su almacenamiento a largo plazo, acompañado de la reactivación de los transcritos de ARNm. A la par de la maduración ovocitaria, ocurren cambios en las células del cúmulo que se expande y condiciona modificaciones en la comunicación entre ambos tipos celulares, impactando así en la calidad del ovocito a ser fecundado (Coticchio et al., 2015).

Las células del cúmulo además de comunicarse con el ovocito tienen señalización paracrina con las células de la granulosa y de la teca. Estas intercomunicaciones son fundamentales para regular la progresión de la meiosis en el ovocito. De manera adicional, las células de la teca y de la granulosa tienen funciones esteroideogénicas claves en el folículo al proporcionar los andrógenos que serán aromatizados a estrógenos, respectivamente (Atwood and Vadakkadath Meethal, 2016). Las funciones de ambas células son coordinadas por el ovocito, cuya actividad transcripcional de su genoma es regulada por las células del

cúmulo. Por lo anterior, se ha planteado que la salud y funcionalidad de las células somáticas en el folículo son un reflejo de la calidad ovocitaria y *viceversa* (Hennet and Combelles, 2012). La investigación en especies no mamíferas ha demostrado un papel fundamental de la  $P_4$  así como de sus receptores nucleares y unidos a membrana sobre la maduración ovocitaria y la ovulación. En forma complementaria, la secuenciación del genoma del bovino y el desarrollo de múltiples herramientas para dilucidar el significado de los datos transcriptómicos ha facilitado el incremento en el número de estudios que determinan el perfil global del transcriptoma en ovocitos maduros e inmaduros, así como en células de la granulosa o del cúmulo que rodea al ovocito, o incluso en otros tejidos en donde se ha demostrado que la  $P_4$  regula la expresión génica diferencial y vías canónicas establecidas (Fair and Lonergan, 2012). Por lo anterior, es relevante estudiar la función de un agonista progestacional como el LNG sobre el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria dado que la  $P_4$  afecta la calidad ovocitaria mediante sus efectos sobre el desarrollo del folículo dominante.

En cultivos primarios de células de la granulosa murinas incubadas en presencia de  $P_4$ , se estableció que la mayoría de los efectos de esta hormona son mediados por el PGRA que induce genes relacionados con procesos estructurales como el desarrollo vascular y la morfología celular, mientras que el PGRB indujo genes asociados con redes de citosinas inflamatorias relevantes para el proceso ovulatorio (Conneely et al., 2002). En contraste, el receptor de progesterona unido a membrana PGRMC1 parece estar involucrado en la maduración meiótica ovocitaria (Luciano et al., 2010). En síntesis, estos datos demuestran la función de la  $P_4$  y la señalización a través de su receptor tanto a nivel nuclear como

citoplasmático durante la maduración ovocitaria que podría impactar además en la calidad del ovocito.

## **1.7 Estudios transcriptómicos de la calidad ovocitaria en humanos**

Estudios iniciales realizados con RT-qPCR plantearon que los niveles de transcritos de genes candidatos en células de la granulosa y del cúmulo se asociaban a la calidad ovocitaria. Sin embargo, esta metodología que analiza únicamente la expresión de genes individuales no permitió generar modelos predictivos basados en la expresión de un patrón de múltiples genes para determinar el efecto de la calidad ovocitaria sobre variables clínicas de desenlace como la tasa de fertilización o embarazo posterior a procedimientos de fertilización asistida. Por lo anterior, solo con estudios a nivel genómico realizados con micromatrices de expresión se identificaron genes diferencialmente expresados que definen firmas transcriptómicas o biomarcadores que se asocian con la calidad del ovocito (Uyar et al., 2013). Por ejemplo, un estudio que evaluó las células foliculares de ovocitos que resultaron en un embarazo positivo *versus* las que generaron embriones con fallas en el desarrollo, identificó 115 genes diferencialmente expresados, destacando el *CYP19A1* como uno de los genes significativamente asociados con el desenlace de embarazo (Hamel et al., 2008). Esta observación sugiere el importante papel de la aromatasa no solo en la esteroidogénesis ovárica sino además en la calidad del ovocito, la cual puede ser evaluada con el análisis funcional de las firmas de expresión durante el desarrollo folicular a nivel de células de la granulosa.



## 1.8 Estudios transcriptómicos en células de la granulosa

El desarrollo folicular comprende cambios en diferentes compartimentos y modificaciones en sus firmas de expresión génica, en particular en células de la granulosa. Al respecto, un estudio con metodología genética genómica identificó marcadores genéticos asociados con el fenotipo de fertilidad con base a la expresión de *CYP19A1* en el modelo bovino (Guillemin et al., 2015). Este tipo de estudios ha contribuido además a la generación de metaanálisis de perfiles de expresión génica en células de la granulosa durante la foliculogénesis, lo que ha permitido conocer mejor la fisiología ovárica en una especie monoovulatoria (Khan et al., 2016). De manera adicional, existen bases de datos sobre la expresión ovárica de genes en la rata (Jo et al., 2004) así como en el modelo murino y en el ser humano (Hsueh and Rauch, 2012).

Con base a todos estos antecedentes, en particular las observaciones clínicas realizadas por nuestro grupo, se decidió estudiar los efectos de LNG sobre la capacidad esteroideogénica del ovario utilizando a las células de la granulosa como modelo experimental, incluyendo además el análisis bioinformático de sus efectos a nivel transcripcional, en particular sobre el desarrollo folicular así como la maduración y calidad del ovocito, lo que enriquecerá el conocimiento genómico de la fisiología ovárica.

## **2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Pregunta de investigación**

¿Tiene el levonorgestrel efectos sobre la biotransformación de androstendiona a 17 $\beta$ -estradiol a través de modificar la expresión de *Cyp19a1* en células de la granulosa mantenidas en cultivo y al mismo tiempo puede condicionar el desarrollo folicular por su actividad progestacional?

### **2.2 Hipótesis**

El levonorgestrel por su actividad progestacional inhibe la expresión de *Cyp19a1* a nivel ovárico además de regular la expresión de genes fundamentales en el desarrollo folicular identificados en procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y vías canónicas asociadas con la bio-función foliculogénesis.

### **2.3 Objetivos**

El objetivo principal del presente trabajo de tesis fue evaluar los efectos del levonorgestrel sobre la biosíntesis de 17 $\beta$ -estradiol por el ovario.

Los objetivos secundarios fueron analizar los efectos del levonorgestrel sobre la expresión global del genoma en células de la granulosa en términos de ontología génica (procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares), identificar las vías canónicas asociadas y predecir la actividad molecular de bio-funciones relacionadas con la esteroidogénesis ovárica y la foliculogénesis.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Reactivos**

La FSH hipofisaria (NIDDK-hFSH-I-SIAFP-1) fue generosamente donada por *The National Hormone and Pituitary Program* (Rockville, MD, USA). La preparación purificada de FSH humana (FSHh) fue libre de actividad inmunológica de prolactina, LH, hormona estimulante del tiroides y hormona del crecimiento. Estudios previos por nuestro grupo han demostrado la capacidad de esta FSHh para estimular la biosíntesis de  $17\beta$ -estradiol de manera concentración dependiente en CPGR (Larrea et al., 2005). El medio McCoy 5a (modificado sin suero) se obtuvo de Gibco, Life Technologies Co (Long Island, NY, USA). La disolución de penicilina-estreptomicina y el azul tripán se obtuvieron de Grand Island Biological Co (Santa Clara, CA, USA). El dietilestilbestrol (DES), la 4-androstendiona, el 1-metil-3-isobutil-xantina (MIX), el 8 bromo monofosfato cíclico de adenosina (8-Br-AMPC), toxina del cólera (TC),  $P_4$ , LNG, dihidrotestosterona (DHT), mifepristona (RU486), finasterida (FIN) y el etanol grado analítico se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO).

#### **3.2 Animales y cultivo primario de células de la granulosa**

##### *Animales*

Se utilizaron ratas hembra inmaduras de la estirpe Wistar, de 19 a 21 días de edad, mantenidas bajo un régimen de luz/obscuridad de 12/12 horas con alimento y agua a libre demanda. Las ratas se obtuvieron de la colonia del Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, previa

aprobación del protocolo de investigación por el Comité de Investigación en Animales.

#### *Implante de dietilestilbestrol*

Cada rata se implantó de manera subcutánea en la región dorsal con una cápsula de silástic de 10 mm de largo y 1.5 mm de diámetro interno conteniendo aproximadamente 10 mg de dietilestilbestrol. Después de permanecer 4 días con el implante, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó ovariectomía bilateral para colectar las células de la granulosa.

#### *Cultivo primario de células de la granulosa*

Las células de la granulosa se colectaron y se cultivaron de acuerdo al método descrito por Jia XC, Hsueh JW (Jia and Hsueh, 1986) con modificaciones menores (Villanueva et al., 1996). Los ovarios se decapsularon y las células de la granulosa se obtuvieron por punción folicular con aguja de calibre de 27 pulgadas. Las células se centrifugaron a 500 x g y 4°C, durante 10 minutos. Una alícuota fue diluida con tinción de azul tripán (0.4%) y las células viables se contaron con un hematocitómetro. Las células se cultivaron en placas de 6 pozos de 34 mm de diámetro (Nunc; Roskilde, Denmark) de poliestireno Nuncleon y sin revestimientos de matriz. En cada pozo se sembraron  $1.0 \times 10^6$  células viables en un volumen final de 3.0 mL de medio McCoy 5a, pH de 7.4, suplementado con L-glutamina (2 nM), androstendiona ( $1 \times 10^{-6}$  M) como precursor androgénico para su aromatización, DES (0.125  $\mu$ M), MIX (15  $\mu$ M) como inhibidor de fosfodiesterasa para potenciar la actividad de FSHh y antibióticos (100 UI/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina).

Las células se cultivaron durante 24 horas en un ambiente húmedo a 37°C, 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en medio libre de suero. Al final de este periodo, las células se incubaron durante 48 horas en presencia de FSHh u otros estimuladores de la cinasa A de proteínas (PKA) en presencia o ausencia de diferentes hormonas y compuestos. Al final de la incubación, se estudiaron los efectos de las hormonas y reactivos sobre las células de la granulosa mediante la cuantificación del 17β-estradiol en el medio de cultivo y la expresión de *Cyp19a1* en las células. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y por lo menos tres veces.

### **3.3 Cuantificación de 17β-estradiol**

El 17β-estradiol en el medio de cultivo de células de la granulosa se cuantificó por triplicado mediante radioinmunoanálisis específico utilizando estuches comerciales (Coat-A-Count, Estradiol, Siemens Healthcare Diagnostics, Plainfiel, IL, USA). La sensibilidad del análisis fue de 3 pg/mL y los coeficientes inter e intra análisis fueron < 10% y < 5%, respectivamente.

### **3.4 Extracción del ARN**

La extracción del ARN total de las células de la granulosa se llevó a cabo por medio de la técnica de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 2006) utilizando el reactivo de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células en presencia de 1 mL de TRIzol se cosecharon y colectaron en tubos eppendorf, a los cuales se les adicionó cloroformo frío. La fase acuosa se precipitó con isopropanol y etanol. El ARN se disolvió en 20 µL de agua grado biología

molecular. La concentración de ARN se cuantificó con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). La calidad de cada muestra de ARN se validó con el BioAnalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Germany) y se utilizaron las muestras con mejor calidad (RIN entre 8.0 y 9.7) para los experimentos con micromatrices de expresión.

### **3.5 Diseño experimental y efectos a nivel transcripcional**

Para el análisis de los efectos del LNG a nivel transcripcional se utilizaron 9 micromatrices Rat Gene 2.0 ST (Affymetrix). Las muestras se clasificaron en 3 grupos conformados con 3 réplicas biológicas cada uno (cada réplica por triplicado y una sola micromatriz por réplica) distribuidos de la siguiente manera: (1) Tres CPGR sin ningún estímulo etiquetados como Basal; (2) Tres CPGR estimulados con FSHh y; (3) Tres CPGR coincubados con FSHh y LNG. El DNA complementario (DNAc) blanco se preparó de acuerdo con el protocolo Whole-Transcript PLUS (WT) Sense Target Labeling (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA., USA). Para la síntesis de la primera cadena de DNAc se utilizó un conjunto de 200 ng de ARN de tres réplicas biológicas de cada condición experimental y la enzima Superscript II cebada con un oligómero poli(T) para la transcripción inversa. Posterior a la síntesis de la segunda cadena se realizó transcripción *in vitro* para generar ARNc. Los productos de ARNc se utilizaron como templados en un segundo ciclo de síntesis de DNAc para incorporar dUTPs a la nueva cadena. El DNAc se fragmentó con uracil-DNA glicosilasa y endonucleasa apurínica apirimidínica. Los fragmentos (40-70 mers) se marcaron mediante la adición de desoxinucleótidos terminales marcados con biotina. El DNAc fragmentado y

marcado se hibridó a la micromatriz. Las micromatrices se lavaron, se tiñeron para el DNAC biotinilado y se escanearon de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La micromatriz Rat Gene 2.0 ST representa 28,407 transcritos RefSeq cubiertos con una mediana de 22 sondas por gen, lo que asegura una detección precisa para cambios de expresión de transcritos a nivel de genoma completo (<http://affymetrix.com>).

### 3.6 Perfiles de expresión génica

Todas las comparaciones pareadas posibles entre los tres grupos (Basal, FSHh y FSHh-LNG) generaron dos contrastes de interés. Estos contrastes se enfocaron en identificar genes responsivos a los estímulos a través de analizar FSHh *versus* Basal (sin FSHh), o genes que respondieron a los efectos del tratamiento al analizar FSHh-LNG *versus* FSHh. Los datos sin procesar se corrigieron del ruido de fondo utilizando el algoritmo *Robust Multiarray Average* (RMA) (Irizarry et al., 2003) y se normalizaron por cuantiles (Bolstad et al., 2003). La expresión diferencial se determinó mediante modelos estadísticos lineales con coeficientes arbitrarios (Smyth, 2004); los contrastes de interés se analizaron con el paquete para el análisis de expresión génica *Bioconductor Library Limma* (Ritchie et al., 2015). Posteriormente, se aplicó la corrección para hipótesis múltiples utilizando la tasa de descubrimientos falsos (FDR, *False Discovery Rate*) (Colquhoun, 2014). Los genes se seleccionaron con base a los siguientes puntos de corte:  $|\text{veces de cambio (VC)} > 1.3|$  (la sensibilidad del qPCR en tiempo real) y un valor de significancia estadística de  $p \leq 0.1$ .

### 3.7 Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados

El análisis funcional se realizó con *Fatigo* de *Babelomics* 5.0 (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>) utilizando términos de ontología génica (procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares) obtenidos con la lista de genes diferencialmente expresados (GDE), como se describió previamente (Al-Shahrour et al., 2004, Alonso et al., 2015). La nomenclatura de los términos de ontología génica enriquecidos con GDE utiliza términos del *Gene Ontology Consortium* (Ashburner et al., 2000). El valor de p ajustado se calculó con una prueba exacta de Fisher que evalúa la sobrerrepresentación significativa de términos funcionales en la lista de GDE en relación con el resto del genoma humano, después de corregir para múltiples pruebas (múltiples hipótesis, una por cada término funcional) utilizando la FDR (Colquhoun, 2014). Para identificar y evitar la redundancia de los términos de ontología génica más representativos, se realizó un análisis de *REVIGO* (*reduce + visualize Gene Ontology*) (<http://revigo.irb.hr>) (Supek et al., 2011).

De manera adicional y para complementar los términos de ontología génica identificados por *FatiGO* y resumidos por *REVIGO*, se realizó un análisis de enriquecimiento con vías canónicas definidas por *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Ogata et al., 1999) y por *Reactome Pathway Database* (Joshi-Tope et al., 2005) mediante análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*; <http://www.broadinstitute.org/gsea>) utilizando una FDR < 25% y el valor de enriquecimiento normalizado (NES, *normalized enrichment score*) como el estadístico primario (Hung et al., 2012,



Subramanian et al., 2005). Por otra parte, mediante el análisis de solapamiento de los “bordes principales” (*leading edges*) de las gráficas de enriquecimiento, se identificaron vías canónicas que comparten genes en común, lo que se traduce en núcleos de genes modificados por FSHh o LNG.

Para estudiar los efectos del LNG sobre bio-funciones asociadas con el tratamiento de FSHh en células de la granulosa se utilizó el Análisis de Ingenuidad de Vías (IPA, *Ingenuity Pathway Analysis*; <http://www.ingenuity.com>). Una bio-función o vía canónica se consideró estadísticamente significativa cuando se obtuvo un valor de  $p < 0.05$  con la prueba exacta de Fisher a una cola (derecha). De manera adicional, y basado en un enfoque dirigido por nuestra hipótesis de trabajo sobre los efectos del LNG en la fisiología ovárica, se realizaron análisis de predicción de actividad molecular (MPA, *Molecule Activity Predictor*) (Lira-Albarran et al., 2017a, Lira-Albarran et al., 2017b).

### **3.8 RT-PCR cuantitativo**

En un microgramo de ARN total de alta calidad de cada muestra se llevó a cabo retrotranscripción utilizando el estuche comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche, Manheim, Germany) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNAc se amplificó en un volumen final de 10  $\mu$ L, con una mezcla de reacción que contiene agua grado biología molecular, DNAc, los iniciadores y la DNA polimerasa Taqman. Se utilizaron como controles negativos muestras incubadas en ausencia de transcriptasa reversa. Para detectar contaminación de la mezcla de reacción se utilizó un tubo con agua grado biología molecular en lugar de muestra de ARN. Para el PCR en tiempo real cuantitativo (RT-qPCR) se

utilizó el estuche comercial *TaqMan PCR Master Mix* (Roche, Mannheim, Germany). La mezcla con el DNAC, la enzima polimerasa y la sonda de hidrólisis tipo TaqMan (Universal Probe Library, ROCHE) se colocó en capilares de vidrio que se centrifugaron y se colocaron en el termociclador LightCycler® 2.0 Detection System (Applied Biosystems, CA, USA).

Los oligonucleótidos para amplificar cada gen se diseñaron con el programa en línea del fabricante (Universal Probe Library Assay Design Center, ROCHE, <https://www.roche-applied-science.com>) y se verificaron las secuencias con BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla A1 (Apéndice). Para cuantificar la expresión de los genes blanco, normalizados con la expresión del gen constitutivo *Actb* (Kozera and Rapacz, 2013), se utilizó el método comparativo  $C_t$  ( $\Delta\Delta C_t$ ) (Scheffe et al., 2006). Los niveles del ARNm se determinaron por triplicado para cada tratamiento.

### **3.9 Evaluación del desarrollo folicular**

Los ovarios se fijaron en paraformaldehído al 4% y se embebieron en parafina orientados de tal manera que se obtuvieron cortes sagitales. El análisis histológico se realizó por microscopía de luz en 6 cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de espesor en cada ovario, teñidos con técnica convencional de eosina-hematoxilina. El contenido y desarrollo folicular se evaluaron por visualización directa y los resultados se expresaron como la media normalizada por el número de cortes y grosor, además del grado de diferenciación folicular. El desarrollo folicular ovárico se estableció con los criterios morfológicos de (Pedersen and Peters, 1968).

### **3.10 Análisis de viabilidad celular**

Con el objetivo de evaluar la viabilidad y funcionalidad celular, se llevaron a cabo cultivos ( $1 \times 10^5$  células/mL) en presencia o ausencia de FSHh, P<sub>4</sub> o LNG durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó al término de la incubación mediante la actividad de deshidrogenasas mitocondriales utilizando el reactivo colorimétrico XTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). El producto generado se determinó 18 horas después por absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Multiskan Labsystems).

### **3.11 Análisis estadístico**

El tipo de distribución de los resultados se estableció con la prueba de Kólmogorov-Smirnov. Para comparar medias entre dos grupos se utilizó la prueba t pareada. La significancia estadística entre más de dos grupos se determinó por análisis de varianza seguido de la prueba post hoc de Tukey-Kramer. Las pruebas no paramétricas se utilizaron cuando estaban indicadas. Todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DS. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico NCSS 2004 (*Number Cruncher Statistical System*) (329 North 1000 East, Kaysville).

Las concentraciones efectivas al 50% al igual que el tiempo medio efectivo se estimaron con análisis de regresión no lineal a través del ajuste sigmoideo de las curvas concentración respuesta utilizando el programa Origin Pro 8 (OriginLab Corporation).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Validación bioquímica del modelo experimental

La respuesta de las células de la granulosa en cultivo en términos de la producción de  $E_2$  a diferentes concentraciones de FSHh se muestra en la Figura 6. La concentración efectiva al 50% ( $CE_{50\%}$ ) fue de  $1.37 \pm 0.08$  mUI/pozo, similar a la observada para la expresión del ARNm de *Cyp19a1* ( $2.0 \pm 0.05$  mUI/pozo) (Fig. 7).

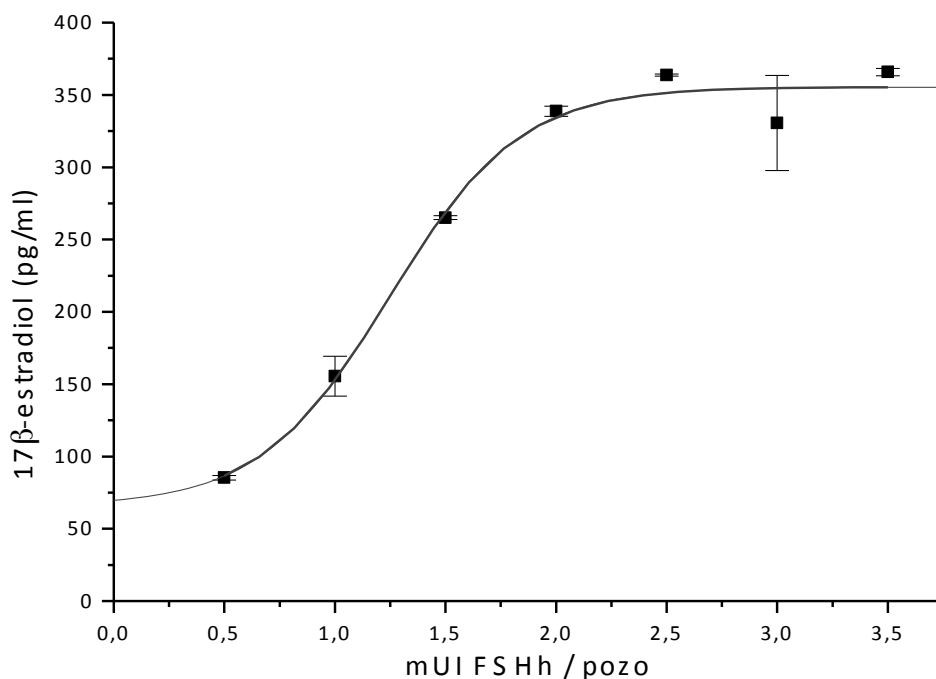


Figura 6. Efecto de varias concentraciones de FSHh sobre la biosíntesis de  $17\beta$ -estradiol (pg/ml) en células de la granulosa en cultivo obtenidas de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol. Un millón de células/pozo se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de FSHh por 72 horas. La producción de  $17\beta$ -estradiol se cuantificó en el medio de cultivo mediante radioinmunoanálisis específico. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres determinaciones. La  $CE_{50\%}$  de FSHh necesaria para biosintetizar  $17\beta$ -estradiol fue de  $1.37$  mUI/pozo  $\pm$   $0.08$  determinada por tres experimentos independientes.

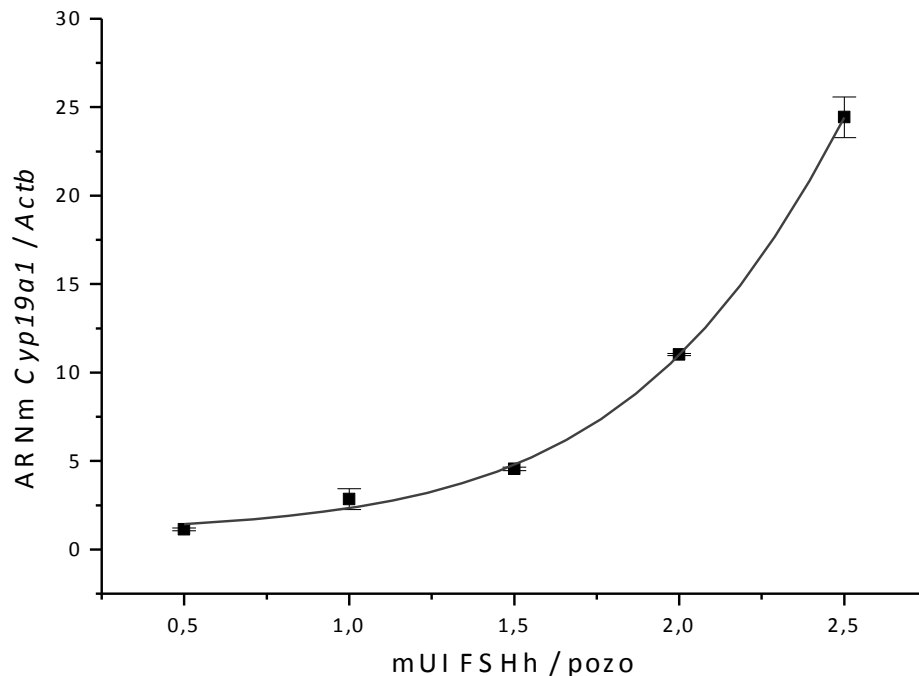


Figura 7. Efecto de varias concentraciones de FSHh sobre los niveles de ARNm de *Cyp19a1* en células de la granulosa en cultivo obtenidas de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol. Un millón de células/pozo se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de FSHh por 72 horas. Los niveles de ARNm de *Cyp19a1* se determinaron mediante RT-qPCR y los resultados se normalizaron con el uso de *Actb*. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres determinaciones. La  $CE_{50\%}$  de FSHh necesaria para expresar el ARNm de *Cyp19a1* fue de 2.0 mUI/pozo  $\pm$  0.05 determinada por tres experimentos independientes.

Al evaluar el efecto de FSHh en la biosíntesis de  $17\beta$ -estradiol y la expresión del ARNm de *Cyp19a1* durante 96 horas en CPGR, se confirmó la expresión tardía de este gen porque el tiempo efectivo medio ( $TE_{50\%}$ ) necesario para biosintetizar  $17\beta$ -estradiol fue de  $45.9 \pm 1.9$  horas (Figura 8) y para expresar el ARNm de *Cyp19a1* fue de  $41.0 \pm 6$  horas (Figura 9). Con estos resultados, se decidió incubar a las células de la granulosa por un período inicial de 24 horas seguido de otro de 48 horas en presencia de los compuestos a ser estudiados.

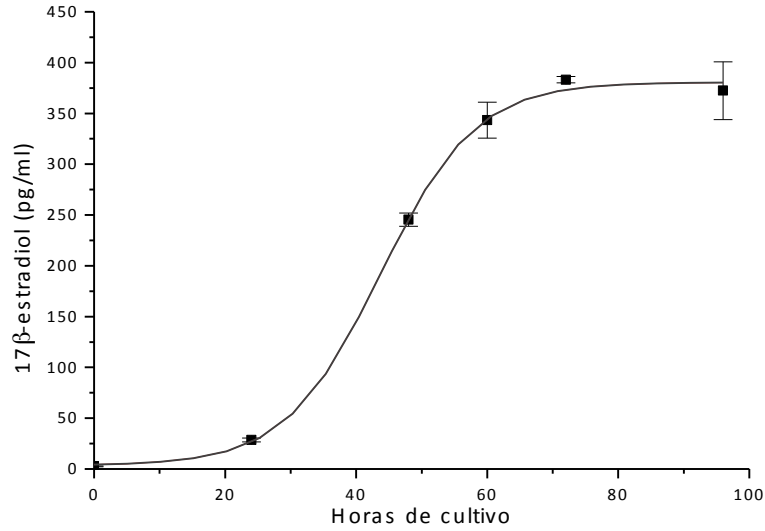


Figura 8. Efecto de 1.5 mUI/pozo de FSHh sobre la biosíntesis de 17β-estradiol (pg/ml) en células de la granulosa en cultivo obtenidas de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol. Un millón de células/pozo se cultivaron en presencia de FSHh por 96 horas. La producción de 17β-estradiol se cuantificó en el medio de cultivo a diferentes tiempos de incubación (0, 24, 48, 60, 72 y 96 horas) mediante radioinmunoanálisis específico. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres determinaciones. El tiempo efectivo medio ( $TE_{50\%}$ ) de FSHh necesario para producir 17β-estradiol fue de  $45.9 \pm 1.9$  horas determinado por tres experimentos independientes.

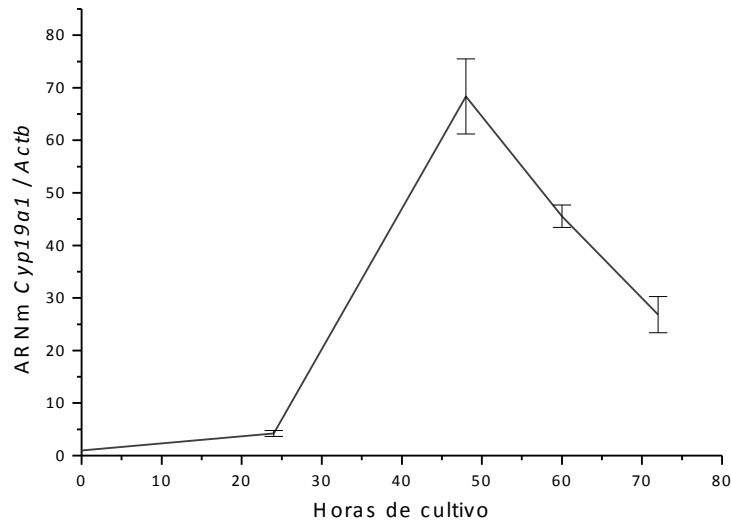


Figura 9. Efecto de 1.5 mUI/pozo de FSHh sobre los niveles de ARNm de *Cyp19a1* en células de la granulosa en cultivo obtenidas de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbetrol. Un millón de células/pozo se cultivaron en presencia de FSHh por 72 horas. Los niveles de ARNm de *Cyp19a1* se determinaron mediante RT-qPCR y los resultados se normalizaron con el uso de *Actb*. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres determinaciones. El tiempo efectivo medio ( $TE_{50\%}$ ) de FSHh necesario para expresar el ARNm de *Cyp19a1* fue de  $41.0 \pm 6$  horas determinado por tres experimentos independientes.

Las incubaciones de células de la granulosa en presencia de concentraciones crecientes de FSHh, de un activador del adenilato ciclasa (toxina del cólera [TC]) o de un análogo no hidrolizable de AMPc (8-Br-AMPc) incrementaron significativamente la actividad de la enzima aromatasa y la expresión del gen que la codifica (*Cyp19a1*) en los CPGR. Las veces de cambio de la concentración de 17β-estradiol en el medio de cultivo de células de la granulosa incubadas en presencia de FSHh durante 48 horas fueron de  $7.66 \pm 0.87$ . Este cambio correspondió a un incremento significativo en la concentración de 17β-estradiol de  $14.48 \pm 2.08$  pg/ml a  $110.98$  pg/ml  $\pm 7.48$  pg/ml en ausencia o presencia de 1.0 mUI FSH/ml, respectivamente. En el caso de la expresión de *Cyp19a1*, las veces de cambio relativas en presencia de FSHh fue de  $9.72 \pm 0.40$ . Las respuestas observadas con las mayores concentraciones de TC (0.1 ng/ml) y 8-Br-AMPc (0.1 mM) en términos de biosíntesis de 17β-estradiol fueron de 9 y 16 veces de cambio, respectivamente, y con relación a la expresión de *Cyp19a1* fueron de 10 y 15 veces de cambio (Figura 10).

Estas observaciones apoyan la presencia en nuestros cultivos primarios de un receptor funcional a FSH evolutivamente conservado, acoplado a proteínas G, así como la participación de un mecanismo de transducción de señales dependiente de AMPc en el control de la esteroidogénesis ovárica (Ulloa-Aguirre and Zarinan, 2016, Ulloa-Aguirre et al., 2007). De esta manera, nuestro modelo experimental permitió estudiar los efectos del LNG y la P<sub>4</sub> natural en células de la granulosa de rata estimuladas con FSHh, TC u 8-Br-AMPc.

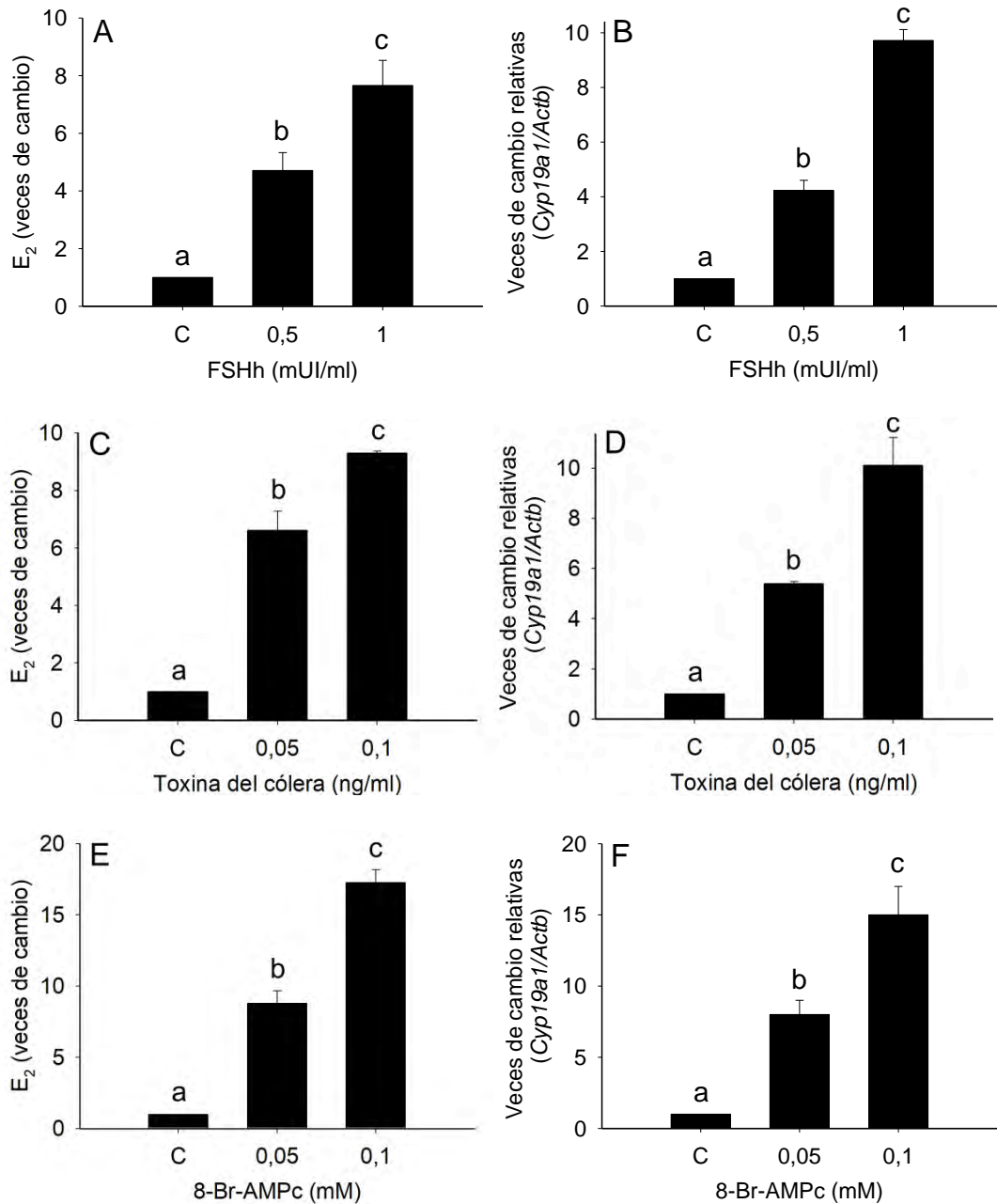


Figura 10. Efectos de FSHh, toxina del cólera u 8-Br-AMPC sobre la biosíntesis de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) (A, C, E, respectivamente) y sobre la expresión de *Cyp19a1* (B, D, F, respectivamente) en células de la granulosa estimuladas. Un millón de células/pozo se incubaron con concentraciones crecientes de los diferentes compuestos durante 48 horas después de un período de 24 horas sin estímulos. La biosíntesis de 17β-estradiol se cuantificó en el medio de cultivo mediante radioinmunoanálisis específico y el ARNm de *Cyp19a1* se estimó en las células por RT-qPCR. Cada barra representa la media ± DS de tres experimentos independientes por triplicado. \*p < 0.05 para barras con letras diferentes. C = condiciones basales (sin estímulos).



El LNG es una progestina sintética y por lo tanto se evaluó la expresión del gen que codifica al receptor de progesterona (*Pgr a-b*) en los CPGR. La expresión temporal del ARNm de *Pgr a-b* es semejante a la observada para el ARNm de *Cyp19a1* ( $TE_{50\%} = 49.0 \pm 5$  horas; Figura 11). En relación con los genes que codifican para los receptores alfa y beta de estrógenos (*Er  $\alpha$*  y *Er  $\beta$* , respectivamente) y el receptor de andrógenos (*Ar*), se observó una mayor expresión del gen *Ar* comparado con el resto de genes evaluados (Figura 12).

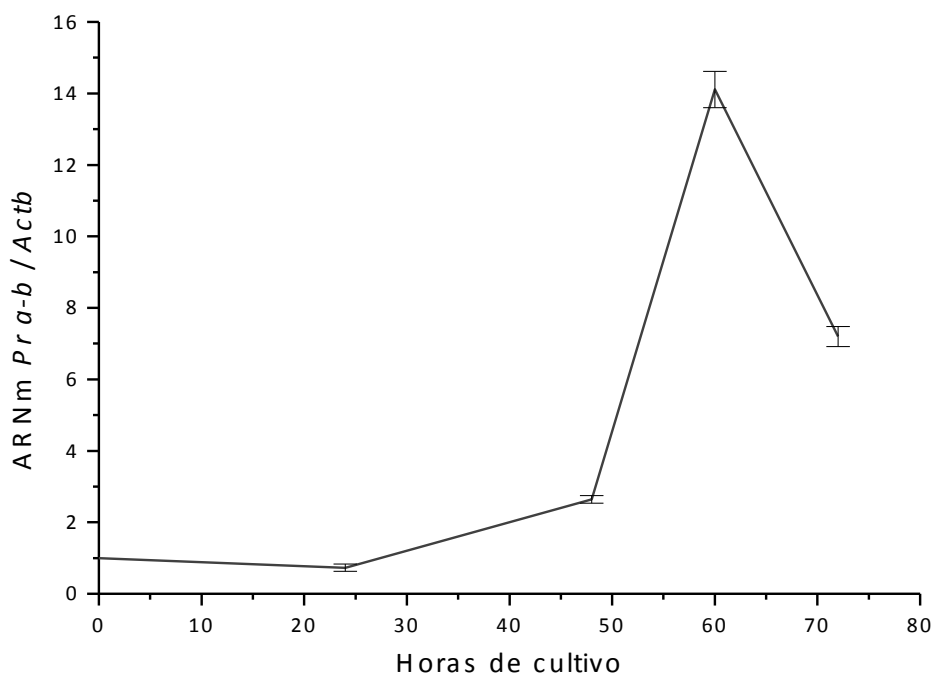


Figura 11. Efecto de 1.5 mUI/pozo de FSHh sobre los niveles de ARNm de *Pgr a-b* en células de la granulosa en cultivo obtenidas de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol. Un millón de células/pozo se cultivaron en presencia de FSHh por 72 horas. Los niveles de ARNm de *Pgr a-b* se determinaron mediante RT-qPCR y los resultados se normalizaron con el uso de *Actb*. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres determinaciones. El tiempo efectivo medio ( $TE_{50\%}$ ) de FSHh necesario para expresar el ARNm de *Pgr a-b* fue de  $49.0 \pm 5$  horas determinado por tres experimentos independientes.

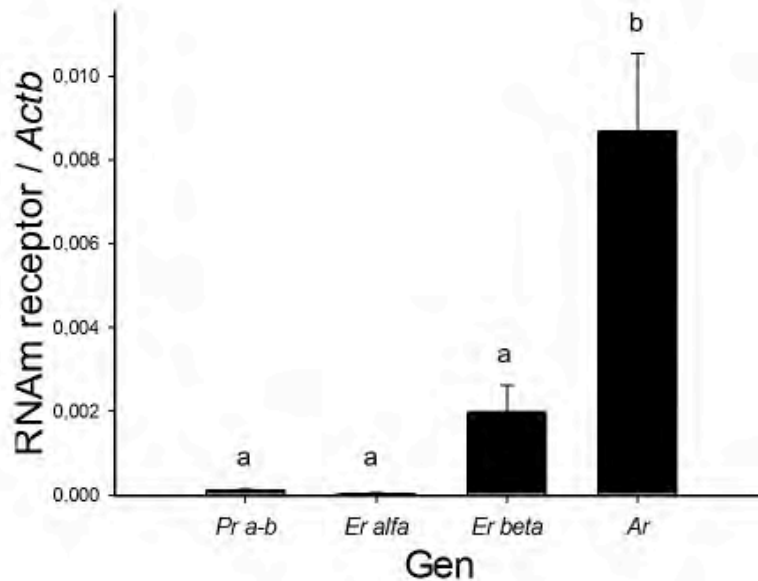


Figura 12. Expresión génica de los receptores a progesterona (*Pgr a-b*), estrógenos (*Er alfa* y *beta*) y andrógenos (*Ar*) en células de la granulosa en cultivo obtenidas de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol. Un millón de células/pozo se cultivaron sin estímulos por 72 horas. Los niveles de ARNm de cada receptor se determinaron mediante RT-qPCR y los resultados se normalizaron con el uso de *Actb*. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de tres determinaciones.

Con relación a los efectos del dietilestilbestrol utilizado para inducir el desarrollo folicular en ratas inmaduras, se observó el incremento estadísticamente significativo en el número de folículos antrales en el grupo de animales tratados con 10 mg de dietilestilbestrol por 4 días (Figura 13). Al cultivar las células provenientes de estos folículos durante 72 horas, se identificó inicialmente una morfología redondeada que de manera gradual se convirtió en ahusada sin datos microscópicos de muerte celular a lo largo del tiempo de incubación. Al final del mismo, las células de la granulosa en presencia de FSHh tendieron a disponerse en cúmulos (Figura A1, Panel A; Apéndice).

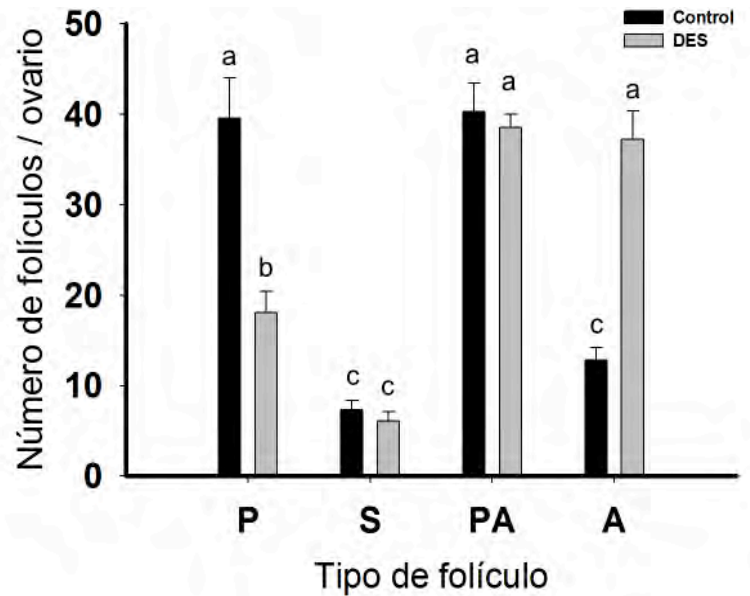


Figura 13. Desarrollo folicular en ratas de la estirpe Wistar implantadas a los 21 días de edad con una cápsula de silástico sin dietilestilbestrol (DES) (Grupo Control) o con 10 mg de DES (Grupo Tratado) y sacrificadas a los 25 días de edad. El número de folículos por ovario se clasificó con base a los criterios de (Pedersen and Peters, 1968) en folículos primarios (P), secundarios (S), preantrales (PA) y antrales (A). Cada barra representa la media  $\pm$  DS de 6 cortes por cada uno de los 5 ovarios analizados por grupo. \* $p < 0.05$  para barras con letras diferentes.

#### 4.2 Efectos del levonorgestrel sobre la actividad de aromatasa y la expresión de *Cyp19a1*.

El LNG y la  $P_4$  inhibieron, de manera estadísticamente significativa y dependiente de la concentración, la biosíntesis de  $17\beta$ -estradiol en CPGR estimulados con FSHh. Al incubar a las células de la granulosa con las mayores concentraciones de LNG y  $P_4$  evaluadas, la inhibición de la actividad de aromatasa fue de 60% y 80%, respectivamente. El efecto inhibitorio se identificó a nivel de la expresión de *Cyp19a1* y fue también concentración dependiente. En este sentido, la mayor inhibición con LNG y  $P_4$  fue de 60% y 75%, respectivamente. Estos resultados fueron similares a lo observado sobre la biosíntesis de  $17\beta$ -estradiol (Figura 14).

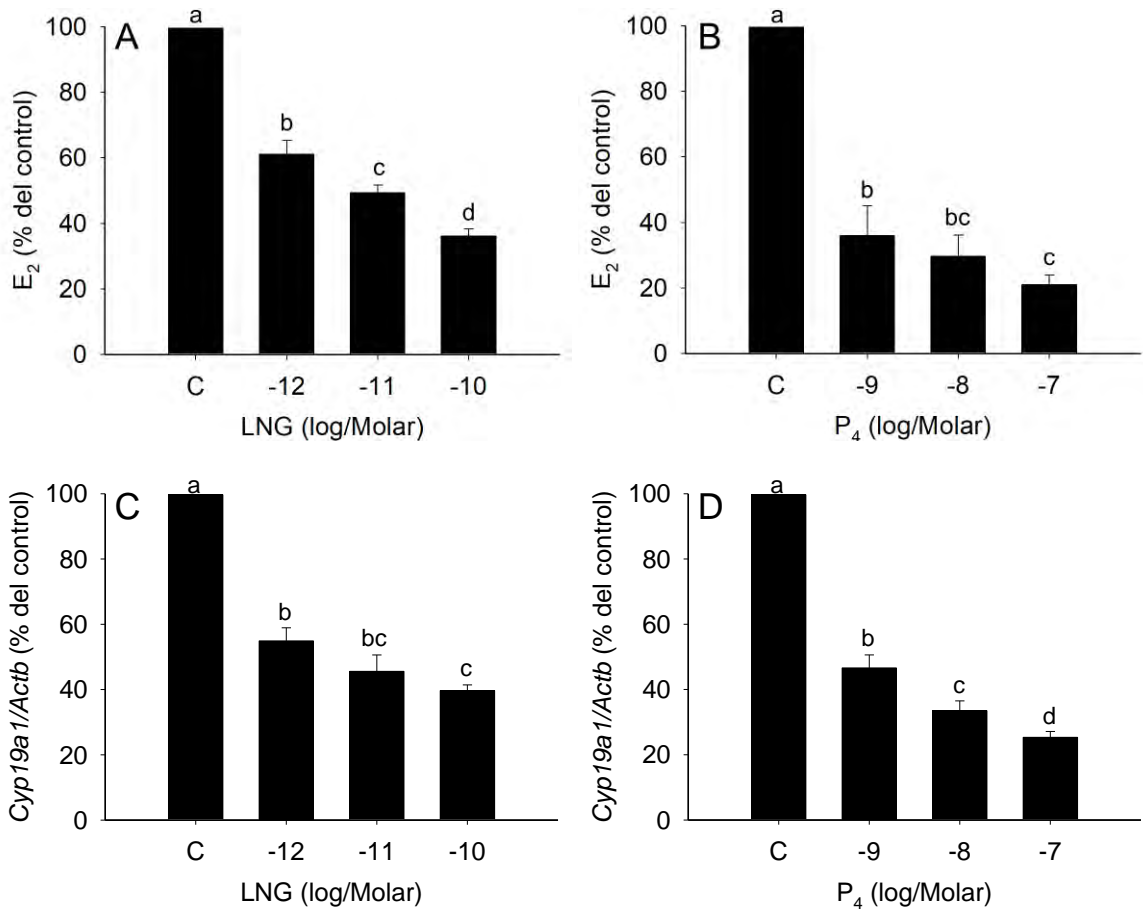


Figura 14. Efectos de LNG y P<sub>4</sub> sobre la biosíntesis de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) (A, B) y sobre la expresión de *Cyp19a1* (C, D) en células de la granulosa estimuladas con FSHh. Un millón de células/pozo se coincubaron con FSHh (1.5 mUI/pozo) en presencia o ausencia de LNG o P<sub>4</sub> durante 48 horas después de un período de 24 horas sin estímulos. La biosíntesis de 17β-estradiol se cuantificó en el medio de cultivo mediante radioinmunoanálisis específico y el ARNm de *Cyp19a1* se estimó en células por RT-qPCR. Cada barra representa la media ± DS de tres experimentos independientes por triplicado. \*p < 0.05 para barras con letras diferentes. C = Control (estimulo de FSHh).

La presencia de LNG o de la P<sub>4</sub> en los cultivos inhibió de manera estadísticamente significativa los efectos de la TC (0.1 ng/ml) u 8-Br-AMPC (0.1 mM) sobre la biosíntesis de 17β-estradiol y la expresión de *Cyp19a1* (Figura 15). La incubación en presencia de progestinas no modificó la morfología de las células de la granulosa estimuladas por FSHh (Figura A1, Panel B) ni su viabilidad (Figura A2).

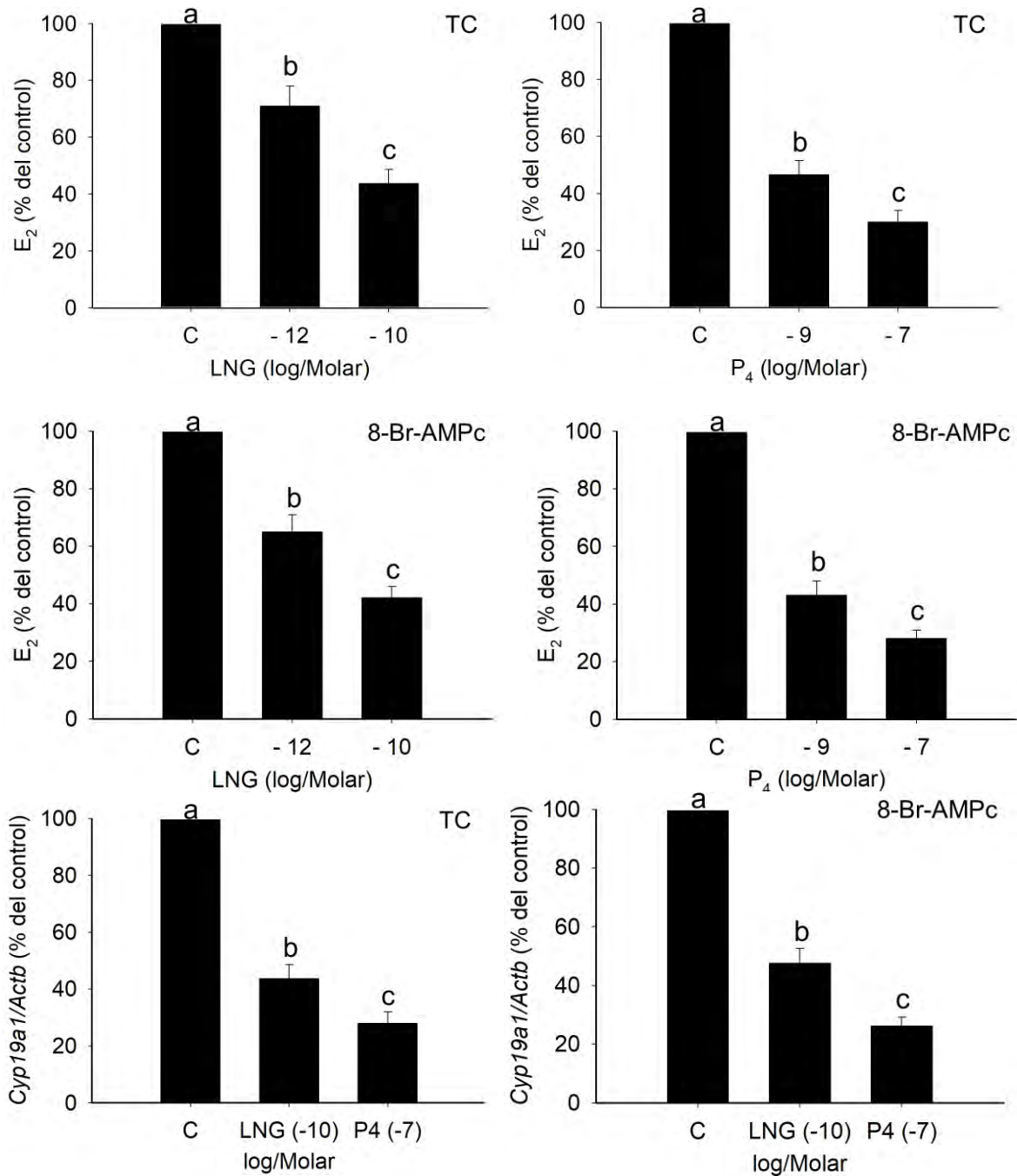


Figura 15. Efectos de LNG y P<sub>4</sub> sobre la biosíntesis de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) y sobre la expresión de *Cyp19a1* en células de la granulosa estimuladas con toxina del cólera (TC) u 8-Br-AMPC. Un millón de células/pozo se coincubaron con TC (0.1 ng/ml) u 8-Br-AMPC (0.1 mM) en presencia o ausencia de LNG o P<sub>4</sub> durante 48 horas después de un período de 24 horas sin estímulos. La biosíntesis de 17β-estradiol se cuantificó en el medio de cultivo mediante radioinmunoanálisis específico y el ARNm de *Cyp19a1* se estimó en células por RT-qPCR. Cada barra representa la media ± DS de tres experimentos independientes por triplicado. \*p < 0.05 para barras con letras diferentes. C = Control (estímulo con TC u 8-Br-AMPC).

Los efectos inhibitorios sobre la actividad de aromatasa dependiente de FSHh también se obtuvieron cuando las incubaciones se realizaron en presencia de 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), un andrógeno no aromatizable (Figura 16). Mientras este efecto fue estadísticamente significativo, se observó un 50% menos de eficacia cuando se comparó con la P<sub>4</sub> o el LNG.

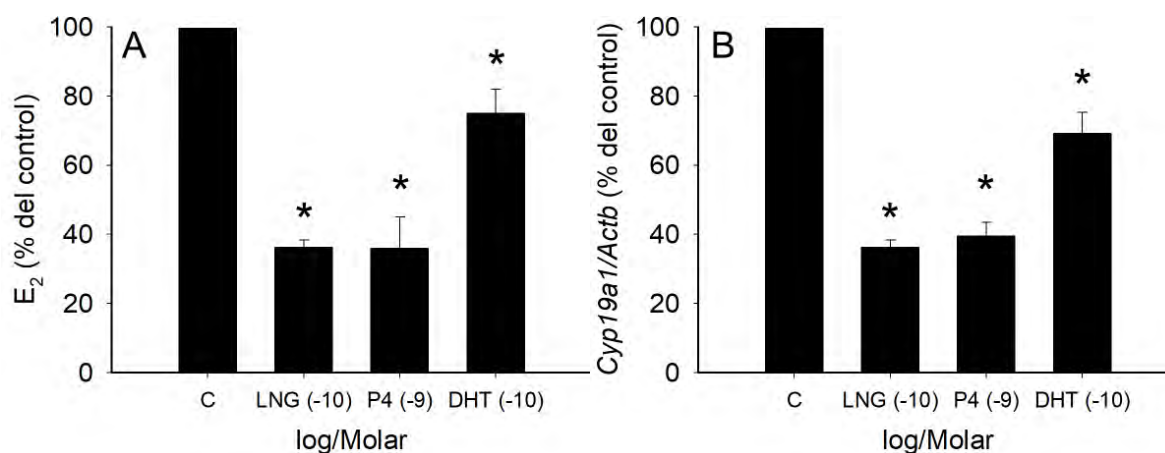


Figura 16. Efectos de LNG, P<sub>4</sub> y DHT sobre la biosíntesis de 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) (A) y sobre la expresión de *Cyp19a1* (B) en células de la granulosa estimuladas con FSHh. Un millón de células/pozo se coincubaron con FSHh (1.5 mUI/pozo) en presencia o ausencia de hormonas durante 48 horas después de un período de 24 horas sin estímulos. La biosíntesis de 17 $\beta$ -estradiol se cuantificó en el medio de cultivo mediante radioinmunoanálisis específico y el ARNm de *Cyp19a1* se estimó en células por RT-qPCR. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por triplicado. \*p < 0.05 versus C (estímulo con FSHh).

La presencia del antagonista del receptor de P<sub>4</sub> mifepristona (RU486) o del inhibidor de 5 $\alpha$ -reductasa finasterida (FIN) en el medio de cultivo, no modificó los efectos inhibitorios de LNG o P<sub>4</sub> sobre la actividad de aromatasa dependiente de FSHh (Figura 17) en CPGR. Estos resultados indican que estas células pueden estar funcionalmente afectadas por las progestinas mediante un mecanismo no dependiente del receptor de P<sub>4</sub>.

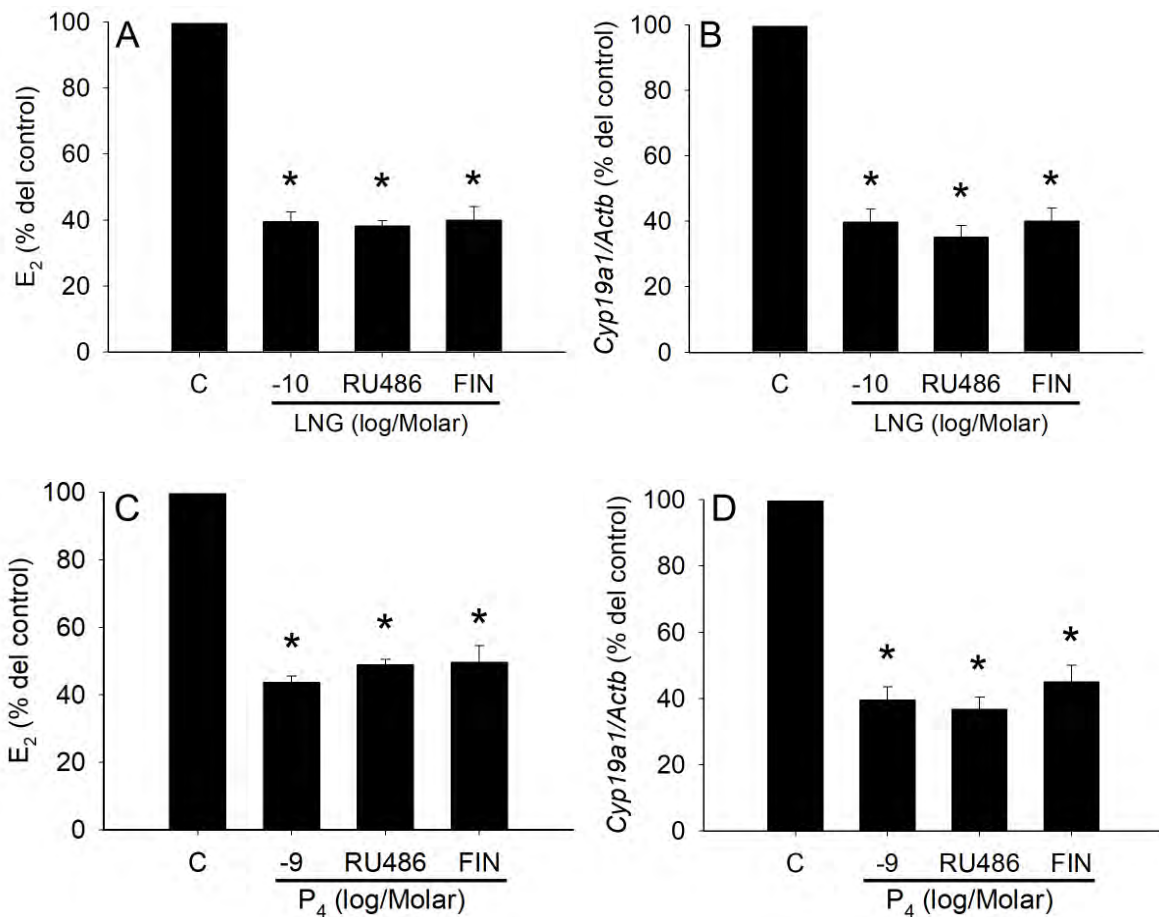


Figura 17. Efectos de RU486 ( $2.0 \times 10^{-7}$  M) y FIN ( $1.0 \times 10^{-9}$  M) sobre los efectos inhibitorios mediados por LNG o P<sub>4</sub> en la biosíntesis de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) (A, C) y la expresión de *Cyp19a1* (B, D) en células de la granulosa estimuladas con FSHh. Un millón de células/pozo se coincubaron con FSHh (1.5 mUI/pozo) en presencia o ausencia de LNG o P<sub>4</sub> con o sin RU486 o FIN durante 48 horas después de un período de 24 horas sin estímulos. La biosíntesis de 17β-estradiol se cuantificó en el medio de cultivo mediante radioinmunoanálisis específico y el ARNm de *Cyp19a1* se estimó en células por RT-qPCR. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes por triplicado. \*p < 0.05 versus C (estímulo con FSHh).

### 4.3 Validación genómica del modelo experimental.

Para estudiar los efectos del LNG sobre el perfil de expresión global del genoma en las células de la granulosa en cultivo, se utilizaron 9 micromatrices de expresión Rat Gene 2.0 ST de Affymetrix para la evaluación en triplicado de las siguientes condiciones experimentales: A) cultivos sin tratamiento (Basal), B) cultivos tratados con FSHh (CE<sub>50%</sub>) y C) cultivos coincubados con FSHh (CE<sub>50%</sub>) y LNG (1 X 10<sup>-10</sup> M). La identificación de los GDE bajo los contrastes analizados (FSHh *versus* Basal y FSHh-LNG *versus* FSHh) se determinó como se describió en la Sección 3.5. En la figura 18 se presentan los mapas de calor del análisis jerárquico no supervisado de ambos contrastes.

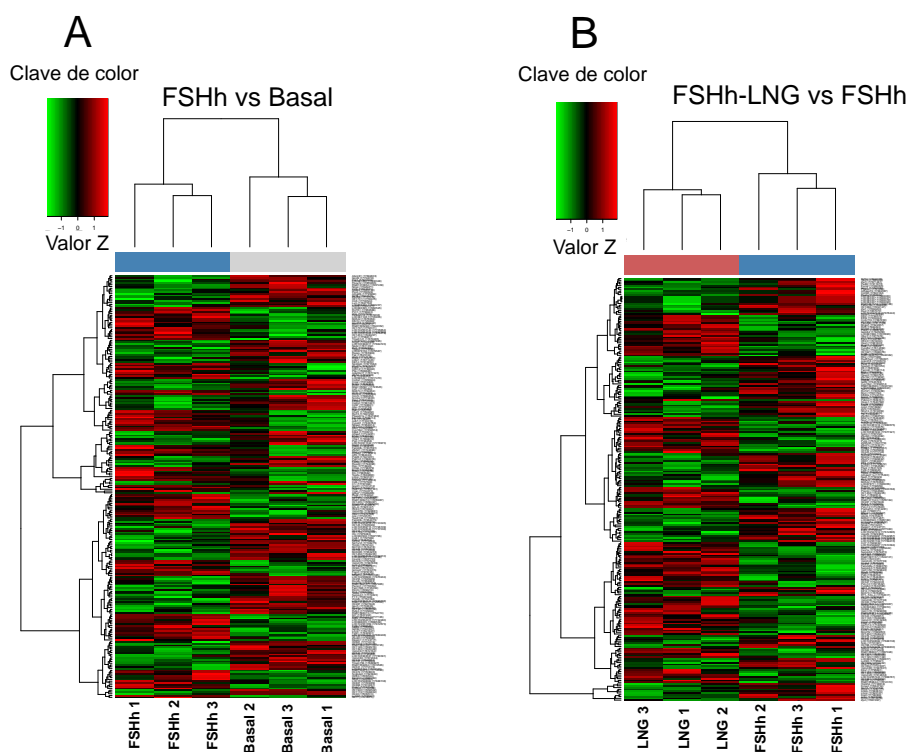


Figura 18. Análisis jerárquico no supervisado de los datos de las micromatrices Rat Gene 2.0 ST (Affymetrix) de: A) FSHh *versus* Basal y B) FSHh-LNG *versus* FSHh. Los mapas de calor de las figuras corresponden a una muestra por cada columna y a un gen por cada fila. Los colores indican las intensidades del valor de expresión génica (valor Z); rojo significa sobreexpresado, verde subexpresado y negro sin cambios.



Al comparar la condición FSHh *versus* Basal se identificaron 372 GDE, de los cuales 174 estuvieron sobreexpresados y 198 subexpresados (46.77% y 53.23%, respectivamente). La Tabla 1 muestra la lista de los genes con mayor magnitud de expresión diferencial en este contraste. El análisis funcional con *FatiGO* identificó términos de ontología génica (GO) sobrerrepresentados con genes sobreexpresados en CPGR tratados con FSHh. Los principales procesos biológicos identificados fueron la vía de señalización del receptor de activina y la regulación de la secreción de FSH (Tabla A2).

Tabla 1. Genes con mayor magnitud de expresión diferencial en el contraste FSHh *versus* Basal en CPGR.

Nombre del gen	Símbolo del gen	VC	Valor de p
Receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina	<i>Lhcgr</i>	4.11	5.3E-3
Citocromo P450 familia 19 subfamilia A miembro 1 (aromatasa)	<i>Cyp19a1</i>	3.12	2.3E-3
17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa I	<i>Hsd17b1</i>	2.41	1.9E-2
Inhibina, beta B	<i>Inhbb</i>	1.92	1.8E-2
Proteína 1 que contiene dominio Dep	<i>Depdc1</i>	1.80	2.8E-2
Secretogranina II	<i>Scg2</i>	1.75	9.5E-2
Factor de crecimiento transformante beta-inducido, 68-Kd	<i>Tgfbi</i>	1.74	7.2E-2
Inhibina, beta A	<i>Inhba</i>	1.73	6.2E-2
Receptor de prolactina	<i>Prlr</i>	1.70	2.3E-2
Matriz de ácido gamma-carboxiglutámico	<i>Mgp</i>	- 2.13	1.6E-2
Proteína 1 de choque de calor de 27-Kd	<i>Hspb1</i>	- 1.67	8.7E-2
Transcrito temprano 1e de ácido retinoico	<i>Raet1e</i>	- 1.65	3.9E-3
11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo 1	<i>Hsd11b1</i>	- 1.56	7.7E-2
Metaloproteinasa de matriz 2	<i>Mmp2</i>	- 1.52	6.1E-2

VC: Veces de cambio.

Un análisis de enriquecimiento de conjunto de genes sobre los efectos de FSHh utilizando una FDR < 25% identificó categorías funcionales adicionales en términos de GO (Tabla A3). Los procesos biológicos más enriquecidos fueron la vía de señalización de proteínas G acoplada a segundos mensajeros, la replicación del DNA, el proceso de biosíntesis de esteroides, la segregación de cromosomas, el ciclo celular mitótico, la secreción hormonal, el proceso reproductivo, la modificación de histonas y la recombinación meiótica. De los componentes celulares destacaron el huso, la región pericéntrica del cromosoma, el cinetocoro, el centro organizador de los microtúbulos, el cromosoma y el centrosoma. De las funciones moleculares, solo se identificó la actividad de sulfotransferasa. De manera complementaria, utilizando *KEGG* se identificó a la replicación del DNA y al ciclo celular como vías canónicas enriquecidas por la acción de FSHh en células de la granulosa. En forma adicional, con *Reactome Pathway Database* se identificaron 40 vías canónicas, entre las que destacaron el ciclo celular mitótico y el metabolismo de hormonas esteroides y vitaminas A y D (Figura A3).

El análisis de ingenuidad de vías identificó bio-funciones asociadas con el efecto de FSHh en CPGR, entre las que destacaron la foliculogénesis, incluyendo la formación, cantidad y crecimiento de folículos ováricos (en particular primarios y antrales, junto con la cantidad de células de la granulosa), así como la síntesis de estrógenos y la concentración de beta-estradiol, producto de la señalización de proteínas G acopladas a segundos mensajeros de nucleótido de AMPc, fenómenos que influyen de manera determinante en la ovulación (Tabla 2). En términos de vías canónicas, el *IPA* identificó a la señalización mediada por  $G_{\alpha s}$ ,

TGF- $\beta$  y AMPc, así como la biosíntesis de estrógenos, como las vías más asociadas con los efectos de la FSHh en este modelo (Tabla 3).

Tabla 2. Bio-funciones identificadas mediante *IPA* asociadas con el efecto de FSHh en CPGR.

<b>Bio-función</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Genes</b>
Concentración de beta-estradiol	3.08E-9	<i>Cnr1, Cyp19a1, Fshr, Inha, Inhba, Lhcgr, Parpbp, Prlr</i>
Cantidad de cuerpo lúteo	2.50E-7	<i>Cyp19a1, Fshr, Inha, Inhba, Inhbb, Lhcgr</i>
Cantidad de folículos ováricos	5.70E-7	<i>Cyp19a1, Fancd2, Fshr, Inha, Inhba, Inhbb, Lhcgr, Prlr</i>
Ovulación	2.14E-6	<i>Cyp19a1, Fshr, Inha, Inhba, Inhbb, Lhcgr, Prlr</i>
Desarrollo del ovario	3.42E-6	<i>Cyp19a1, Fshr, Ihh, Inha, Inhba, Inhbb, Let7, Lhcgr, Nppc</i>
Foliculogénesis	5.39E-6	<i>Cyp19a1, Fshr, Ihh, Inha, Inhba, Let-7, Lhcgr, Nppc</i>
Cantidad de folículos antrales	2.04E-5	<i>Cyp19a1, Inha, Inhba, Lhcgr</i>
Cantidad de folículos ováricos primarios	3.96E-5	<i>Cyp19a1, Fshr, Prlr</i>
Metabolismo de hormonas	1.59E-4	<i>Cnr1, Cyp19a1, Fgf9, Fshr, Inha, Inhba, Lhcgr, Prlr</i>
Síntesis de hormonas	1.64E-4	<i>Cnr1, Fgf9, Fshr, Inha, Inhba, Lhcgr, Prlr</i>
Tamaño del ovario	2.54E-4	<i>Fshr, Inhba, Lhcgr</i>
Metabolismo de esteroides	2.89E-4	<i>Cyp19a1, Fgf9, Fshr, Hsd17b1, Inha, Inhba, Kcnma1, Lhcgr, Prlr</i>
Cantidad de células gonadales	6.88E-4	<i>Cyp19a1, Fancd2, Fgf9, Fshr, Inha, Inhba, Lhcgr</i>
Crecimiento de folículos antrales	8.75E-4	<i>Inha, Inhba, Lhcgr</i>
Cantidad de células de la granulosa	9.18E-4	<i>Inhba, Lhcgr</i>

Síntesis de esteroides	9.33E-4	<i>Cyp19a1, Fgf9, Fshr, Hsd17b1, Inha, Inhba, Lhcgr, Prlr</i>
Síntesis de estrógenos	1.54E-3	<i>Cyp19a1, Hsd17b1, Lhcgr</i>
Formación de folículos antrales	1.70E-3	<i>Ihh, Inha</i>
Señalización de proteínas G acopladas a segundos mensajeros de nucleótido de AMPc	3.37E-3	<i>Cnr1, Fshr, Lhcgr</i>
Cantidad de células germinales	1.29E-2	<i>Cyp19a1, Fancd2, Fshr, Inha, Lhcgr</i>

Tabla 3. Vías canónicas principales identificadas mediante IPA asociadas con el tratamiento de FSHh en CPGR.

Vía canónica	Valor de p	Genes
Señalización por $G\alpha s$	1.56E-3	<i>Cnr1, Fshr, Gnb5, Lhcgr, Prkar2b</i>
Biosíntesis de estrógenos	2.44E-3	<i>Cyp19a1, Cyp2s1, Hsd17b1</i>
Señalización por TGF- $\beta$	4.48E-3	<i>Acvr1b, Inha, Inhba, Inhbb</i>
Señalización mediada por AMPc	2.52E-2	<i>Aplnr, Cnr1, Fshr, Lhcgr, Prkar2b</i>

En forma complementaria, se realizaron análisis dirigidos de predicción de actividad molecular de las bio-funciones concentración de beta-estradiol y foliculogénesis para poder evaluar posteriormente a nivel genómico la hipótesis de trabajo de que el LNG modifica la biosíntesis de  $17\beta$ -estradiol y el desarrollo folicular. La FSHh activó ambas bio-funciones, fundamentalmente a expensas de los niveles de expresión de los genes *Lhcgr* y *Cyp19a1*, los dos genes más sobreexpresados en nuestro estudio (Figura 19).

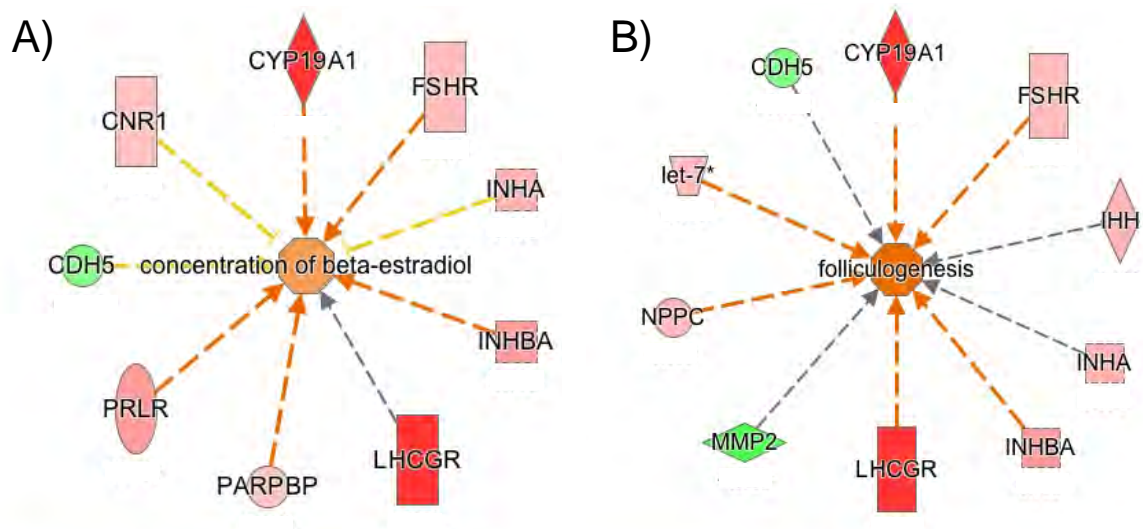
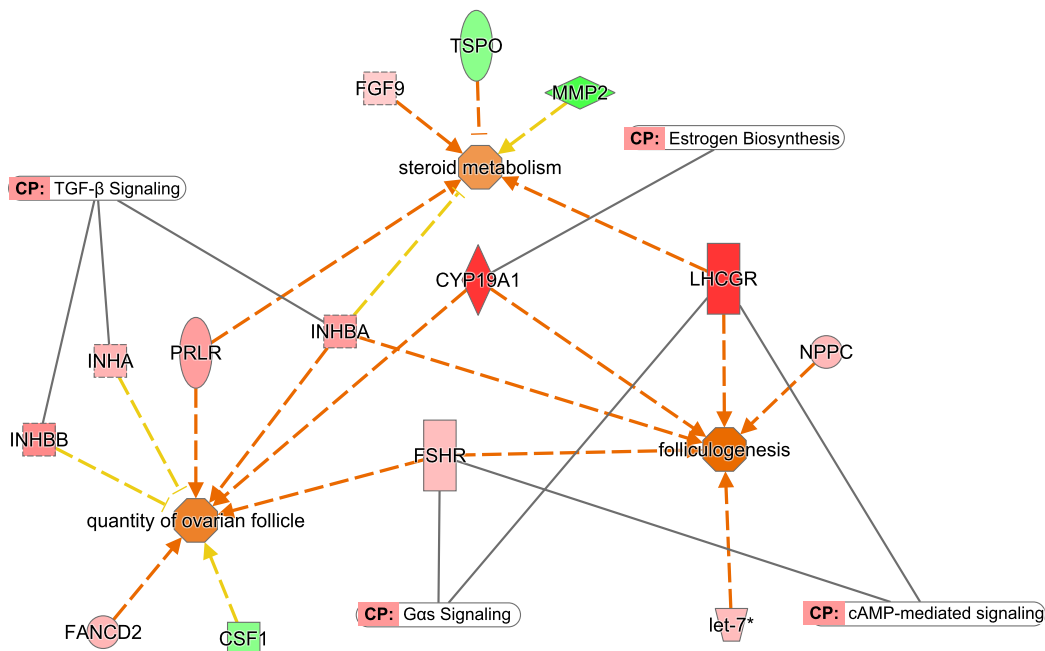


Figura 19. Análisis de predicción de actividad molecular de las bio-funciones: A) concentración de beta-estradiol y B) foliculogénesis utilizando la lista de 372 GDE en CPGR estimulados con FSHh *versus* condiciones basales. Los colores indican las relaciones predichas entre los niveles de expresión génica y las bio-funciones. Rojo: = genes más sobreexpresados; rosa = genes menos sobreexpresados; verde = genes subexpresados; naranja = bio-funciones activadas; líneas naranja = conducen a activación; líneas amarillas = hallazgos inconsistentes; líneas grises = efecto no predicho.

A través de análisis de ingenuidad de vías se generó un modelo global que resume los efectos de los GDE por la FSHh en los CPGR. De acuerdo con la predicción de actividad molecular por *IPA*, la foliculogénesis, la cantidad de folículos ováricos y el metabolismo de esteroides fueron bio-funciones activadas de manera secundaria a los cambios génicos inducidos por la FSHh (Figura 20).



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 20. Análisis de ingenuidad de vías de 372 GDE en CPGR estimulados con FSHh *versus* condiciones basales. Los colores indican las relaciones predichas entre los niveles de expresión génica y las bio-funciones. Rojo: = genes más sobreexpresados; rosa = genes menos sobreexpresados; verde = genes subexpresados; naranja = bio-funciones activadas; líneas naranja = conducen a activación; líneas amarillas = hallazgos inconsistentes; líneas grises sólidas = genes asociados con vías canónicas (CP).

Para validar los cambios observados en los análisis de la transcripción de genoma completo en CPGR estimulados con FSHh, se evaluó la expresión de genes clave en la fisiología ovárica como *Lhcgr*, *Cyp19a1*, *Fshr* y *Nppc* mediante RT-qPCR. Los resultados (Fig. 21) demostraron el paralelismo en la direccionalidad de los cambios observados en la micromatriz y se fundamentaron las predicciones generadas por *IPA* a partir de los niveles de expresión génica inducidos por FSHh.

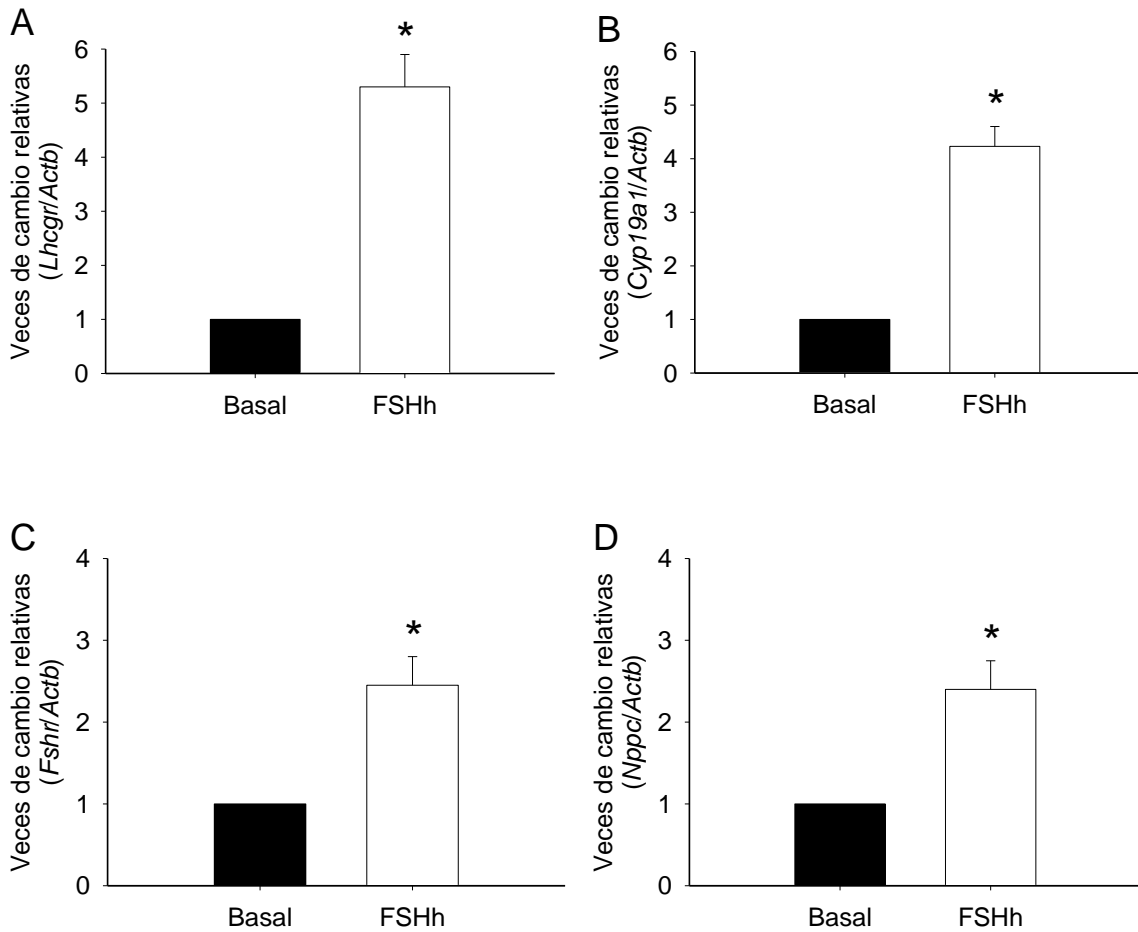


Figura 21. Validación por RT-qPCR de datos seleccionados de la micromatriz a partir del contraste FSHh *versus* Basal en CPGR. La expresión cuantitativa de los genes que codifican para A) el receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina (*Lhcgr*), B) la aromatasa (*Cyp19a1*), C) el receptor de FSH (*Fshr*) y D) el péptido natriurético C (*Nppc*) se normalizaron con el gen constitutivo que codifica para la beta-actina (*Actb*). Cada barra representa la media  $\pm$  DS de tres cultivos independientes por triplicado. \*  $p < 0.05$  *versus* Basal.

En síntesis, a través de distintas plataformas bioinformáticas complementarias se estableció que nuestro modelo experimental mimetiza *in vitro* los procesos fisiológicos observados *in vivo* secundarios a las respuestas biológicas a la FSHh en términos de ontología génica, vías canónicas establecidas y bio-funciones.

#### 4.4 Efectos genómicos del levonorgestrel sobre la fisiología ovárica.

El tratamiento de las células de la granulosa con FSHh en presencia de LNG resultó en 329 GDE, 161 (48.94%) sobreexpresados y 168 (51.06%) subexpresados. La Tabla 4 muestra la lista de los genes con mayor magnitud de expresión diferencial en el contraste FSHh-LNG *versus* FSHh. El análisis de ontología génica de los 329 GDE identificó a la ovogénesis y a la generación del gameto femenino como los principales procesos biológicos sobrerrepresentados (Tabla 5). Al analizar solamente los 168 genes subexpresados por el LNG se identificaron además otros procesos como fertilización, unión del espermatozoide a la zona pelúcida y reconocimiento huevo-espermatozoide (Tabla A4). Al resumir con *REVIGO* los procesos biológicos obtenidos con la lista de genes subexpresados se confirmó a la ovogénesis como el proceso con mayor significancia estadística (Figura 22). Con relación a los componentes celulares identificados, la región centromérica, el cinetocoro, el complejo MCM, el cromosoma nuclear y condensado, así como la horquilla de replicación, estuvieron sobrerrepresentados utilizando la totalidad de los GDE por LNG (Tabla A5).

Tabla 4. Genes con mayor magnitud de expresión diferencial en el contraste FSHh-LNG *versus* FSHh en CPGR.

Nombre del gen	Símbolo del gen	VC	Valor de p
Serpina familia B miembro 3	<i>Serpinb3</i>	1.67	1.1E-2
Receptor purinérgico P2y13	<i>P2ry13</i>	1.41	2.3E-3
Citocromo P450 familia 19 subfamilia A miembro 1 (aromatasa)	<i>Cyp19a1</i>	- 2.08	1.2E-2



Familia NLR que contiene dominio de pirina 9	<i>Nlrp9</i>	- 2.04	1.2E-2
Cinasa de proteínas TTK	<i>Ttk</i>	- 1.98	2.5E-2
Glicoproteína 3 de la zona pelúcida	<i>Zp3</i>	- 1.76	2.7E-2
Proteína 1 secretada por el ovocito, pseudogen	<i>Oosp1</i>	- 1.61	2.5E-2
Glicoproteína 2 de la zona pelúcida	<i>Zp2</i>	- 1.61	4.6E-2
Establecimiento de la cohesión de cromátidas hermanas N-acetiltransferasa 2	<i>Esco2</i>	- 1.59	4.9E-2
Receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina	<i>Lhcgr</i>	- 1.58	1.6E-2
Factor 9 de crecimiento y diferenciación	<i>Gdf9</i>	- 1.57	3.9E-2

VC: Veces de cambio.

Tabla 5. Análisis de ontología génica de 329 GDE en CPGR tratados con FSHh-LNG *versus* FSHh.

<b>Proceso biológico sobrerrepresentado</b>	<b>Nombres de los genes en cada categoría</b>	<b>Valor de p ajustado</b>
Ovogénesis (GO:0048477)	<i>Ihh, Amh, Gdf9, Dazl, Ccnb1, Zp3, Wee2, Tdrd5, Inhbb</i>	1.94E-04
Generación del gameto femenino (GO:0007292)	<i>Mcm8, Ihh, Amh, Gdf9, Dazl, Ccnb1, Zp3, Wee2, Tdrd5, Inhbb</i>	2.54E-04
Desarrollo del ovocito (GO:0048599)	<i>Gdf9, Dazl, Ccnb1, Zp3, Wee2, Tdrd5, Inhbb</i>	5.81E-04
Diferenciación del ovocito (GO:0009994)	<i>Gdf9, Dazl, Ccnb1, Zp3, Wee2, Tdrd5, Inhbb</i>	7.23E-04
Procesos celulares involucrados en la reproducción (GO:0048610)	<i>Ihh, Gdf9, Dazl, Zpbp2, Fancd2, Ccnb1, Suv39h2, Zp4, Zp2, Zp3, Tex15, Wee2, Tdrd5, Smc2, Smc4, Pdilt, Inhbb, Brdt</i>	2.48E-03
Condensación de los cromosomas mitóticos (GO:0007076)	<i>Nusap1, Smc2, Smc4, Cdca5</i>	3.90E-03
Segregación de cromosomas (GO:0007059)	<i>Ndc80, Mad2l1, Ccnb1, Nusap1, Smc2, Smc4, Ttk, Ska1, Cdca5, Esco2</i>	3.90E-03

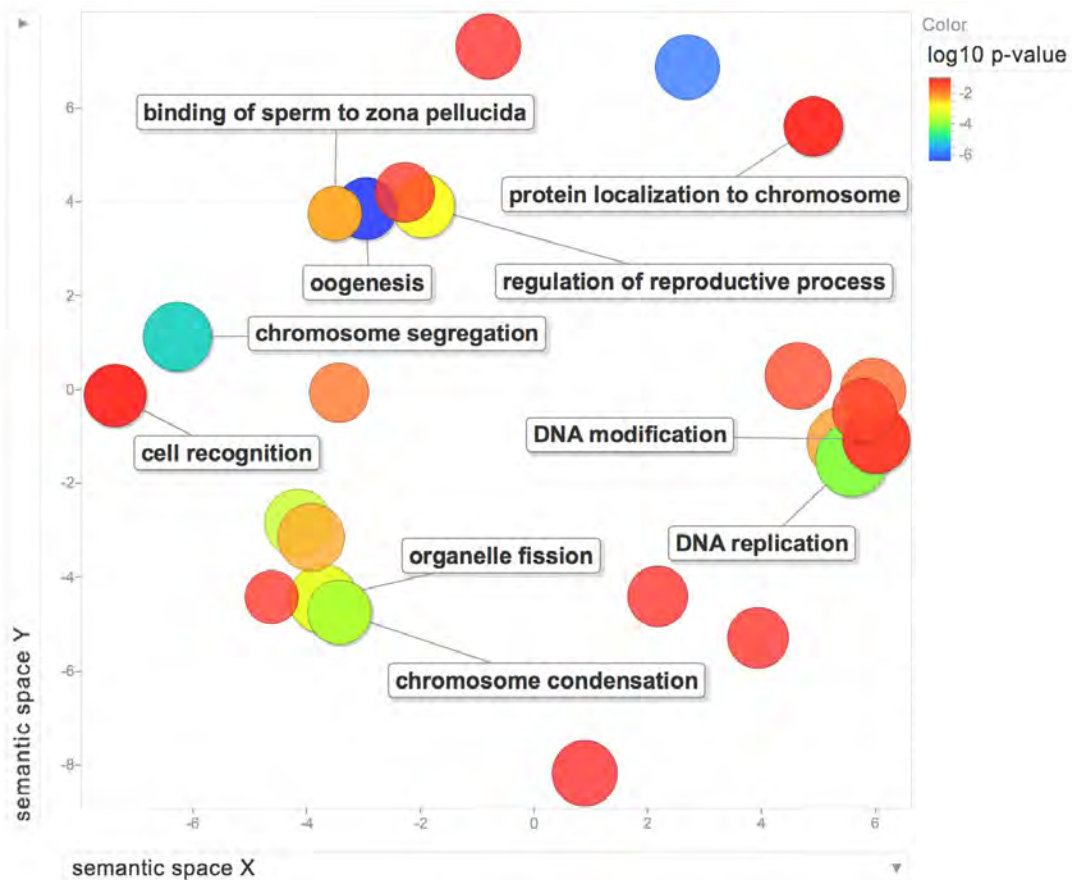


Figura 22. Análisis *REVIGO* de 70 procesos biológicos generados por *FatiGO* con la lista de 168 genes subexpresados en CPGR estimulados con FSHh-LNG *versus* FSHh. Los dispersogramas basados en similitud semántica muestran los núcleos representativos, en este caso, la burbuja que corresponde a la ovogénesis fue el proceso con la mayor significancia estadística. Los procesos semánticamente similares se localizan cercanos uno del otro en la gráfica. El color de cada burbuja correlaciona con su significancia estadística ( $\log_{10}$  p-value) y su tamaño con la frecuencia de los procesos en la base de datos GOA (<http://revigo.irb.hr>).

A partir de *GSEA*, se identificaron 52 conjuntos de genes asociados a procesos biológicos (Tabla A6). La mitosis, el ciclo celular y la replicación del DNA se encontraron entre los más significativos. La generación del gameto femenino y el proceso de biosíntesis de esteroides también se identificaron, pero con menor NES. De manera similar, en términos de las principales vías canónicas definidas

por *KEGG*, el ciclo celular, la replicación del DNA y la maduración del ovocito mediada por progesterona se encontraron entre las más significativas (Figura A4). La meiosis ovocitaria también se identificó, pero con menor NES (Tabla 6). En forma adicional, con la base de datos *Reactome* se identificaron 90 vías canónicas con FDR < 25%, incluyendo a la replicación del DNA, recombinación meiótica, meiosis y el metabolismo de hormonas esteroides como las más relacionadas con la hipótesis de trabajo.

Tabla 6. Vías canónicas identificadas por *GSEA* utilizando la base de datos *KEGG* en CPGR tratados con FSHh-LNG *versus* FSHh.

Vía canónica	NES	FDR
<b>Ciclo celular</b>	-2.61	0.00
<b>Replicación del DNA</b>	-2.29	0.00
<b>Maduración del ovocito mediada por progesterona</b>	-2.22	0.00
Reparación por escisión de nucleótidos	-2.18	0.00
Reparación por apareamiento erróneo	-2.15	0.00
Vía de señalización de p53	-2.09	0.00
Reparación por escisión de bases	-1.96	0.00
<b>Meiosis ovocitaria</b>	-1.81	0.01
Espliceosoma	-1.69	0.04
Recombinación homóloga	-1.56	0.11
Formación de eje dorso ventral	-1.49	0.18
Biosíntesis de glicosaminoglicanos condroitín sulfato	-1.44	0.23

*GSEA* = Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes

*KEGG* = *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

NES = Valor normalizado de enriquecimiento.

FDR = Tasa de descubrimiento falso.

Las vías canónicas resaltadas en negro fueron las más relacionadas con la hipótesis de trabajo sobre los efectos del LNG a nivel de la foliculogénesis.

El análisis de ingenuidad de vías identificó bio-funciones asociadas con los efectos del LNG en CPGR estimulados con FSHh, entre las que destacaron la cantidad de folículos ováricos y ovocitos, la foliculogénesis, la síntesis de estrógenos (concentración de beta-estradiol) y la formación de la zona pelúcida (Tabla A7); evaluadas por predicción de actividad molecular (Figura 23).

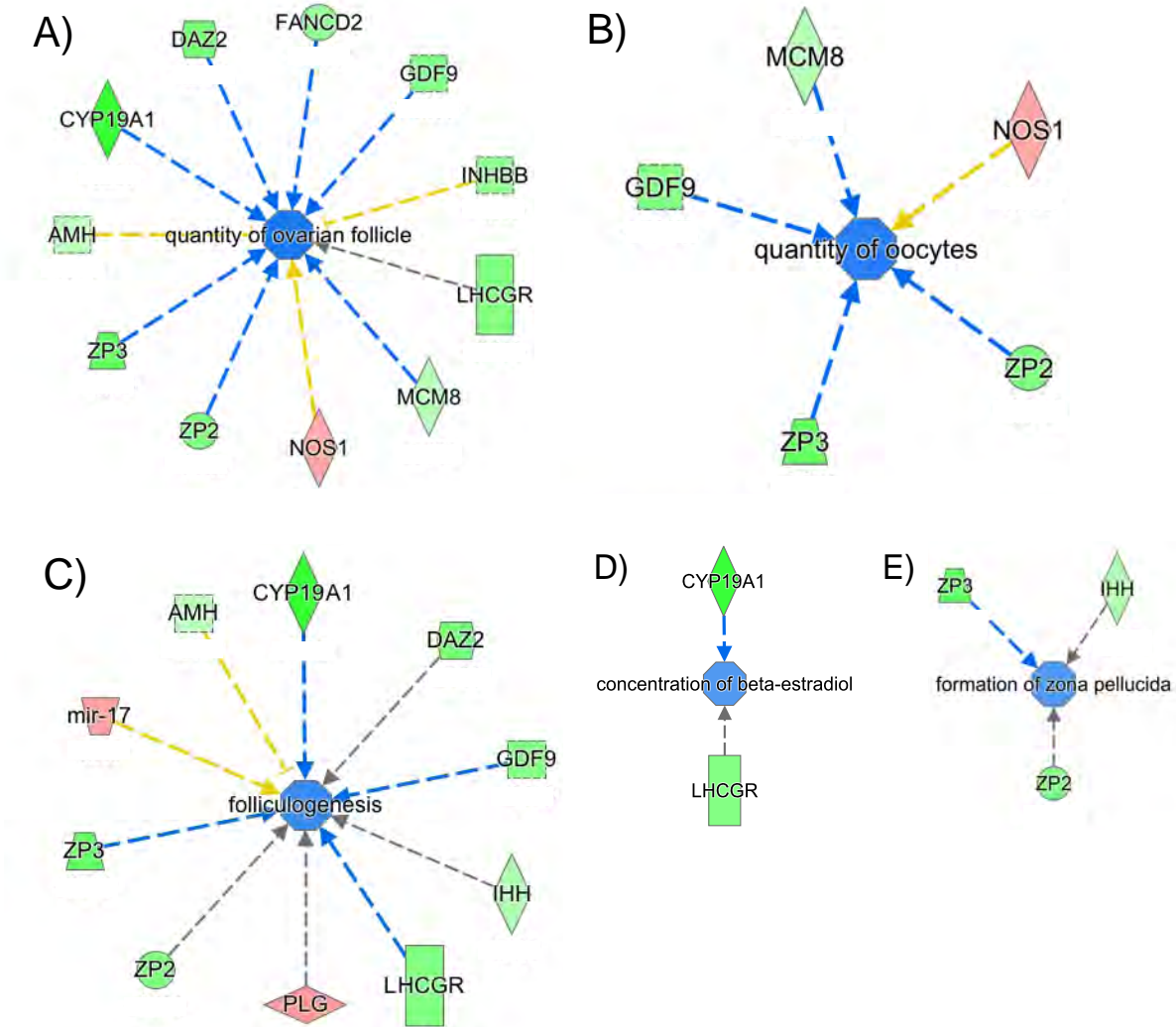
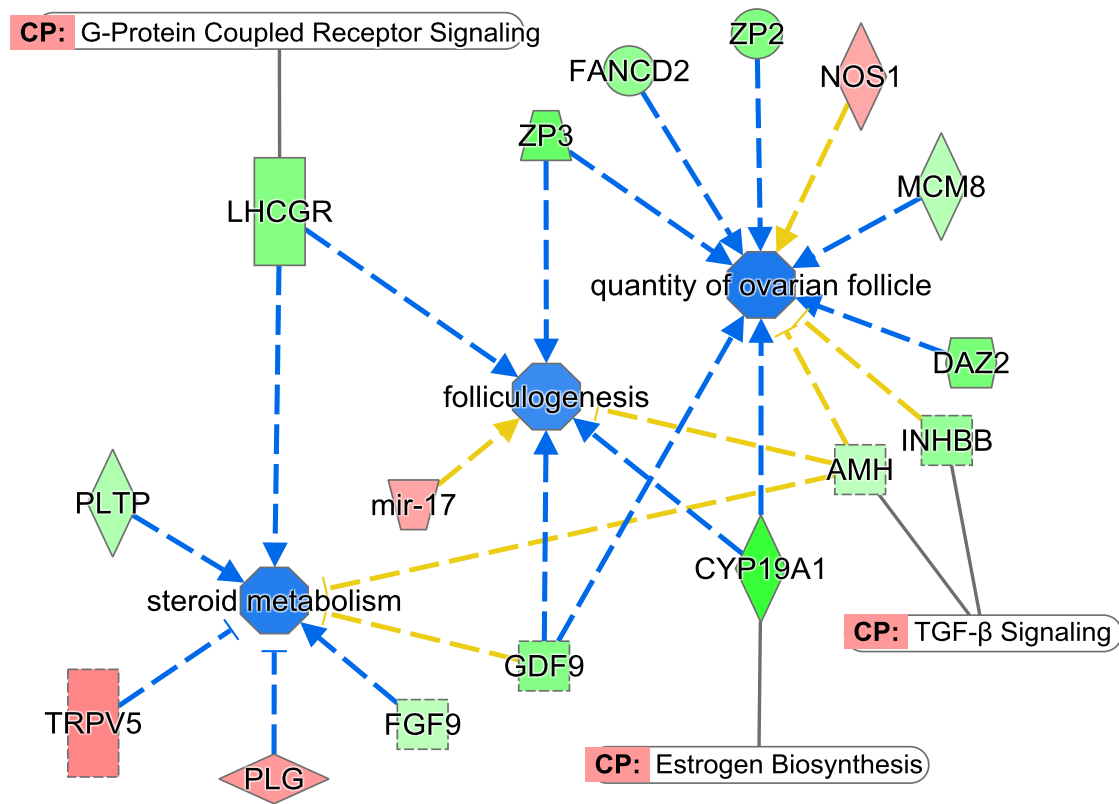


Figura 23. Análisis de predicción de actividad molecular de las bio-funciones: A) cantidad de folículos ováricos, B) cantidad de ovocitos, C) foliculogénesis, D) concentración de beta-estradiol y E) formación de zona pelúcida utilizando la lista de 372 GDE en CPGR coincubados con FSHh-LNG *versus* FSHh. Los colores indican las relaciones predichas entre los niveles de expresión génica y las bio-funciones. Rosa = genes sobreexpresados; verde = genes subexpresados; azul = bio-funciones inhibidas; líneas azules = conducen a inhibición; líneas amarillas = hallazgos inconsistentes; líneas grises = efecto no predicho.

Con el objetivo de evaluar *in silico* los efectos del LNG en CPGR estimulados con FSHh e integrar las observaciones realizadas en nuestros análisis bioquímicos y moleculares, se generó un modelo de predicción de actividad molecular de las bio-funciones más relacionadas con la hipótesis de trabajo, utilizando la totalidad de los GDE (Figura 24).



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 24. Análisis de ingenuidad de vías de 329 GDE en CPGR coincubados con FSHh-LNG *versus* FSHh. Los colores indican las relaciones predichas entre los niveles de expresión génica y las bio-funciones. Rosa = genes sobreexpresados; verde = genes subexpresados; azul = bio-funciones inhibidas; líneas azules = conducen a inhibición; líneas amarillas = hallazgos inconsistentes; líneas grises sólidas = genes asociados con vías canónicas (CP).

En el modelo *in silico* de los efectos genómicos del LNG a nivel de la fisiología ovárica, las tres bio-funciones se predicen inhibidas, fundamentalmente por los niveles de expresión de los genes *Cyp19a1* y *Lhcgr*. Estas observaciones confirman y apoyan la hipótesis de trabajo, así como los hallazgos del efecto inhibitorio del LNG sobre la actividad de aromatasa y la expresión de *Cyp19a1* en CPGR estimulados con FSHh. El subanálisis de los GDE en el contraste FSHh *versus* Basal comparado con FSHh-LNG *versus* FSHh, identificó 29 genes comunes a ambas condiciones. De estos genes, veintiuno fueron regulados a la baja, destacando *Cyp19a1* y *Lhcgr* como los más subexpresados (Tabla A8). Como se mencionó previamente, la direccionalidad de la expresión de ambos genes se asoció con funciones hormonales y gametogénicas a nivel del ovario, predichas como inhibidas por el LNG.

De manera similar a lo realizado con los CPGR estimulados con FSHh, algunos de los GDE en la micromatriz a partir del contraste LNG-FSHh *versus* FSHh, se validaron mediante RT-qPCR. Como se observa en la figura 25, la amplificación de *Lhcgr*, *Cyp19a1*, *Gdf* y *Amh* resultó en la expresión significativamente menor en presencia de LNG, confirmando la direccionalidad de la expresión génica observada en los datos de la micromatriz. Estos resultados apoyan además las predicciones derivadas del *IPA* cuando se evaluó la lista de GDE por el LNG. En resumen, esta progestina utilizada en anticoncepción hormonal de emergencia modifica procesos biológicos relacionados a la fisiología ovárica, tales como la foliculogénesis y la biosíntesis de 17 $\beta$ -estradiol.

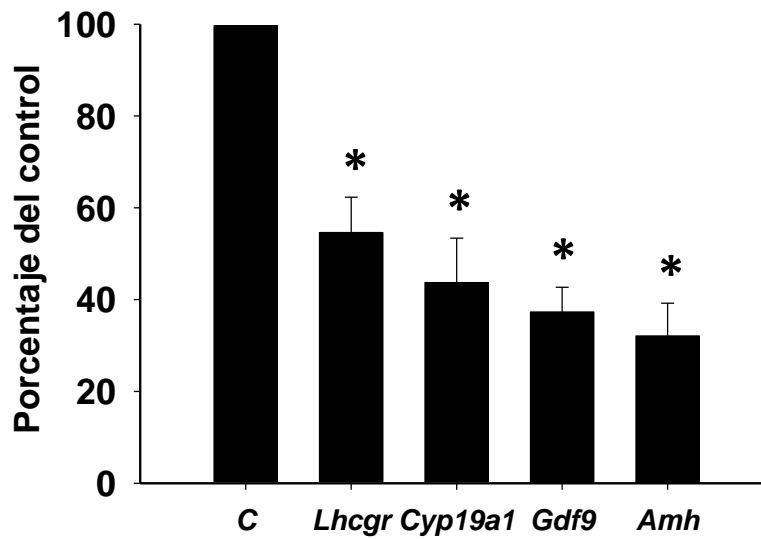


Figura 25. Validación por RT-qPCR de datos seleccionados de la micromatriz a partir del contraste FSHh-LNG *versus* FSHh en CPGR. La expresión cuantitativa de los genes que codifican para el receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina (*Lhcgr*), la aromatasa (*Cyp19a1*), el factor 9 de crecimiento y diferenciación (*Gdf9*) y la hormona antimülleriana (*Amh*) se normalizaron con el gen constitutivo que codifica para la beta-actina (*Actb*). Cada barra representa la media  $\pm$  DS de tres cultivos independientes por triplicado. \*  $p < 0.05$  *versus* C (FSHh sola).

## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo de tesis demuestran la capacidad del LNG para regular a la baja la expresión génica de *Cyp19a1* y por lo tanto la biosíntesis de estrógenos en cultivos primarios de células de la granulosa de rata. Estos datos proporcionan mayor evidencia de cómo la P<sub>4</sub> puede controlar la foliculogénesis, así como la regulación de la maduración ovocitaria, enriqueciendo el conocimiento genómico de la fisiología ovárica. En estudios previos de nuestro y otros grupos de investigación, la administración del LNG en mujeres sanas antes de la secreción máxima de LH (LH-2) resultó en la inhibición significativa de las concentraciones circulantes de 17 $\beta$ -estradiol y estrona, y de la amplitud de la secreción máxima de LH a la mitad del ciclo (Durand et al., 2010, Marions et al., 2004). Estos resultados se interpretaron como la posibilidad de un efecto directo del LNG sobre las células de la granulosa ováricas. Los datos presentados *in vitro* en esta tesis están de acuerdo con nuestra observación en mujeres con ciclos ovulatorios normales y sugieren que el LNG afecta directamente la función ovárica modificando la biosíntesis de estrógenos por las células de la granulosa. Al respecto, la evidencia generada en la década de 1980 sobre los efectos de la P<sub>4</sub> natural y las progestinas sintéticas a nivel de la esteroidogénesis en CPGR sugirió exclusivamente la inhibición de la aromatasa dependiente de FSH en un sitio posterior a la generación de AMPc (Schreiber et al., 1980, Schreiber et al., 1981), de tal manera que mecanismos más precisos aún no han sido determinados, particularmente porque el promotor proximal de *Cyp19a1* carece de elementos de respuesta canónicos al PGR (Hickey et al., 1990, Stocco, 2008).



De manera similar a lo observado en seres humanos, estudios realizados en otras especies como primates no humanos sugirieron al ovario como blanco de acción del LNG resultando en la disminución significativa de la biosíntesis de andrógenos y su aromatización a estrógenos. Por otra parte, los efectos del LNG sobre la foliculogénesis y la maduración folicular han sido también planteados (Heikinheimo et al., 1996). El hallazgo en este estudio de la ausencia de efectos de la finasterida en CPGR sugirió que los efectos de LNG sobre la producción estrogénica fueran mediados a través del PGR y no por la interacción de sus metabolitos tetrahidroreducidos con otros receptores para hormonas esteroides (García-Becerra et al., 2002, García-Becerra et al., 2004). Sin embargo, la observación en este estudio de la ausencia de efectos del RU486, un antagonista del PGR, en CPGR en presencia de LNG, tanto a nivel de la actividad de aromatasa inducida por FSH como de su expresión génica, sugirió la presencia de efectos genómicos adicionales no dependientes de esta progestina sobre la regulación de *Cyp19a1* (Bylander et al., 2015, Peluso, 2007, Peluso et al., 2008).

En la actualidad se considera al ovario y al ovocito como blancos para el desarrollo de anticonceptivos a través de sus efectos sobre la foliculogénesis, la maduración ovocitaria o la ovulación (Gupta et al., 2015). Estas observaciones indican que en el caso de que el LNG tenga efectos sobre las células de la teca y de la granulosa, se ofrecería una explicación plausible de su acción anticonceptiva, así como de otros efectos como los descritos por nuestro laboratorio sobre la amplitud de la descarga preovulatoria de la LH a mitad del ciclo menstrual (Durand et al., 2010). A este respecto, se ha planteado que la disminución en la amplitud de la liberación aguda de LH en suero podría afectar

los procesos de desarrollo folicular y maduración ovocitaria entendida esta como el reinicio de la meiosis y su progresión a la metafase de la segunda división meiótica (Assidi et al., 2010, Durand et al., 2010, Verpoest et al., 2000). Estas observaciones pueden ofrecer una explicación para la efectividad estimada de la anticoncepción hormonal de emergencia, particularmente en aquellas mujeres que permanecen ovulatorias después del tratamiento con LNG.

Las observaciones clínicas realizadas por nuestro grupo que sugieren los efectos del LNG a nivel de la función hormonal del ovario (Durand et al., 2010), particularmente sobre la aromatasa, se confirmaron con los datos *in vitro* en la presente tesis. Sin embargo, decidimos investigar los efectos de esta progestina sobre la expresión global del genoma en células de la granulosa con el objetivo de conocer los procesos biológicos involucrados en el mecanismo de acción del LNG, particularmente en las vías canónicas asociadas con la biosíntesis de esteroides, la foliculogénesis y la maduración ovocitaria.

En esta tesis, demostramos que de la lista de los 372 GDE en CPGR estimulados con FSHh, *Lhcgr* y *Cyp19a1* se encontraron entre los genes con mayor magnitud de expresión diferencial, siendo ambos fundamentales para la biosíntesis de estrógenos que promueven el desarrollo folicular al incrementar la expresión de receptores de gonadotropinas en las células de la granulosa y favorecer la proliferación de las mismas (Billig et al., 1993, Rosenfeld et al., 2001). El análisis funcional de los GDE sobreexpresados por FSHh identificó procesos biológicos sobrerrepresentados que participan en la reproducción, destacando el papel de *Fshr* en estos procesos. El análisis de enriquecimiento de conjunto de genes que utiliza la totalidad de la micromatriz de expresión identificó procesos

biológicos adicionales, esperados de acuerdo con los efectos de la FSHh sobre la fisiología ovárica, tales como la vía de señalización de proteínas G acoplada a segundos mensajeros, la biosíntesis de esteroides y varios relacionados con su acción mitogénica en el desarrollo folicular (Escamilla-Hernandez et al., 2008, Liu et al., 2009, Loreti et al., 2013, Puri et al., 2016). Con esta plataforma bioinformática se identificaron también componentes celulares involucrados en la segregación de cromosomas, lo que confirma los efectos de la FSHh en la foliculogénesis al promover la meiosis ovocitaria (Coticchio et al., 2015, van Tol et al., 1996). Las vías canónicas enriquecidas con genes modificados por FSHh fueron las relacionadas con la replicación del DNA, el ciclo celular y el metabolismo de hormonas esteroides, destacando el *Cyp19a1* como el gen más sobreexpresado en el núcleo de enriquecimiento de esta última. De esta manera, mediante el análisis funcional con ambos enfoques bioinformáticos se establecieron los efectos de la FSHh sobre las células de la granulosa.

El análisis de ingenuidad de vías identificó a la foliculogénesis y a la síntesis de estrógenos como las bio-funciones asociadas con las acciones de FSHh en CPGR e involucradas en los procesos de diferenciación de las células de la granulosa, la respuesta ovulatoria y la maduración folicular (Couse et al., 2005, Emmen et al., 2005). En relación con la foliculogénesis, destacaron en particular la cantidad de los folículos primarios y el crecimiento de los folículos antrales, mientras que a nivel de la síntesis de estrógenos fueron relevantes la concentración de beta-estradiol y la cantidad de células de la granulosa, producto también de la actividad estrogénica previa del implante con DES que estimuló la proliferación de las mismas (Jia and Hsueh, 1986). En las bio-funciones señaladas

se identificaron los genes *Lhcgr*, *Cyp19a1* y *Fshr*, todos significativamente sobreexpresados por la acción de la FSHh, los que participan además en la mayoría de las vías canónicas identificadas por IPA, como la señalización por  $G\alpha_s$ , TGF- $\beta$  y AMPc, y la biosíntesis de estrógenos. Es conocido que a través de estas vías canónicas se establece el diálogo entre las células somáticas y el ovocito lo que permite el arresto meiótico junto con el desarrollo folicular que concluye con la maduración ovocitaria (Conti et al., 2012, Wigglesworth et al., 2013). De manera adicional y con el objetivo de evaluar posteriormente nuestra hipótesis de trabajo sobre los efectos del LNG a nivel de la fisiología ovárica, se realizaron análisis MAP de las bio-funciones foliculogénesis y concentración de beta-estradiol. La sobreexpresión de *Cyp19a1*, *Fshr*, *Lhcgr* y *Nppc* predicen activación de estas bio-funciones, destacando la importante participación de *Nppc* en el proceso de arresto meiótico del ovocito en mamíferos (Piquette et al., 1991, Wigglesworth et al., 2015, Emori and Sugiura, 2014).

El LNG modificó significativamente la expresión de 329 genes, de entre los cuales el *Cyp19a1* resultó en el gen más subexpresado, así como *Zp2*, *Zp3*, *Lhcgr* y *Gdf9*, pero con menor magnitud de cambio. El análisis funcional de los GDE en el contraste FSHh-LNG versus FSHh mostró que la ovogénesis y la generación del gameto femenino fueron los procesos biológicos sobrerrepresentados con mayor significancia estadística. En relación con los componentes celulares, el LNG modificó la expresión de genes que participan en la condensación del cromosoma, evento observado durante la progresión meiótica (Coticchio et al., 2015). En forma complementaria, el análisis de enriquecimiento de conjunto de genes identificó

procesos biológicos similares, incluyendo la biosíntesis de esteroides y de manera muy interesante la vía canónica denominada maduración del ovocito mediada por progesterona. Al respecto, es conocida la participación de la P<sub>4</sub> en el desarrollo folicular a nivel de la transición de folículo primario a secundario, a través de inhibir al mismo tiempo biomarcadores de calidad ovocitaria como el Cyp19a1 (Hamel et al., 2008). De esta manera el LNG podría por su actividad progestacional modificar los procesos biológicos que condicionan el adecuado desarrollo y maduración del folículo ovárico. Estas observaciones se confirmaron con el modelamiento *in silico* de las bio-funciones cantidad de folículos ováricos y ovocitos, foliculogénesis, concentración de beta-estradiol y formación de la zona pelúcida. A este respecto, existe suficiente información para establecer con base a la subexpresión de los genes *Cyp19a1*, *Gdf9*, *Zp2* y *Zp3*, la inhibición de las bio-funciones arriba señaladas (Toda et al., 2001, Yan et al., 2001, Gupta, 2015).

Nuestros datos indican que los efectos del LNG en CPGR modifican etapas tempranas de la foliculogénesis y la ovogénesis; como fue el caso del factor 9 de crecimiento y diferenciación (*Gdf9*), la hormona antimülleriana (*Amh*), miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ , y el *Cyp19a1*. En el caso del *Gdf9*, este factor es necesario para la proliferación de células de la granulosa, el crecimiento folicular, la diferenciación apropiada de las células del cúmulo y la inhibición de la luteinización prematura del folículo (Emori and Sugiura, 2014, Oktem and Urman, 2010). De manera similar, *AMH*, que se expresa en células de la granulosa, inhibe el ensamblado del folículo primordial durante la foliculogénesis (Weenen et al., 2004, Nilsson et al., 2011). Recientemente, AMH también se ha considerado como

un regulador de la esteroidogénesis, particularmente de genes que codifican para enzimas esteroidogénicas en el ovario (Grossman et al., 2008, Sacchi et al., 2016). El hecho de que LNG afecte la expresión de *Cyp19a1* y *Lhcgr* en CPGR está de acuerdo y apoya sugerencias previas realizadas en estudios en mujeres ovulatorias en quienes las concentraciones de estradiol en suero fueron significativamente menores en la fase periovulatoria del ciclo tratado con LNG (Durand et al., 2010). Finalmente, estos resultados pueden ofrecer también una explicación sobre como el LNG, a través de la disrupción del asa regulatoria ovocito-célula de la granulosa, pudiera prevenir el embarazo sin afectar la ovulación en mujeres en tratamiento de anticoncepción de emergencia. Sin embargo, se requiere de investigación adicional para comprender el papel biológico de los cambios de expresión en genes individuales y su participación en vías canónicas identificadas en este estudio.

En conclusión, en la presente tesis se desarrolló un modelo experimental, que integra los efectos de los GDE por FSHh en CPGR y se estableció que mimetiza *in vitro* la fisiología ovárica *in vivo* en términos de ontología génica, vías canónicas y bio-funciones. Al evaluar los efectos del LNG en nuestro modelo, se concluye que esta progestina tiene al ovario como un sitio blanco, en particular las funciones de la célula de la granulosa a nivel tanto de los procesos hormonales como reproductivos. De manera adicional, de los resultados de la expresión génica condicionada por el LNG y su análisis funcional destaca la importancia del asa ovocito-célula de la granulosa como unidad fisiológica clave para asegurar un proceso reproductivo normal, abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de tecnología anticonceptiva.

## 6. REFERENCIAS

1998. Randomised controlled trial of levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation. *Lancet*, 352, 428-33.
2015. Practice Bulletin No. 152: Emergency Contraception. *Obstet Gynecol*, 126, e1-11.
- AFRICANDER, D., VERHOOG, N. & HAPGOOD, J. P. 2011. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids*, 76, 636-52.
- AL-SHAHROUR, F., DIAZ-URIARTE, R. & DOPAZO, J. 2004. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, 20, 578-80.
- ALONSO, R., SALAVERT, F., GARCIA-GARCIA, F., CARBONELL-CABALLERO, J., BLEDA, M., GARCIA-ALONSO, L., SANCHIS-JUAN, A., PEREZ-GIL, D., MARIN-GARCIA, P., SANCHEZ, R., CUBUK, C., HIDALGO, M. R., AMADOZ, A., HERNANSAIZ-BALLESTEROS, R. D., ALEMAN, A., TARRAGA, J., MONTANER, D., MEDINA, I. & DOPAZO, J. 2015. Babelomics 5.0: functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res*, 43, W117-21.
- AROWOJOLU, A. O., OKEWOLE, I. A. & ADEKUNLE, A. O. 2002. Comparative evaluation of the effectiveness and safety of two regimens of levonorgestrel for emergency contraception in Nigerians. *Contraception*, 66, 269-73.
- ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M. & SHERLOCK, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25, 25-9.
- ASSIDI, M., DIELEMAN, S. J. & SIRARD, M. A. 2010. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. *Reproduction*, 140, 835-52.
- ATWOOD, C. S. & VADAKKADATH MEETHAL, S. 2016. The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. *Mol Cell Endocrinol*, 430, 33-48.
- BILLIG, H., FURUTA, I. & HSUEH, A. J. 1993. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 133, 2204-12.
- BOLSTAD, B. M., IRIZARRY, R. A., ASTRAND, M. & SPEED, T. P. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19, 185-93.
- BYLANDER, A., GUNNARSSON, L., SHAO, R., BILLIG, H. & LARSSON, D. G. 2015. Progesterone-mediated effects on gene expression and oocyte-cumulus complex transport in the mouse fallopian tube. *Reprod Biol Endocrinol*, 13, 40.
- CAMERON, S. T., LI, H. & GEMZELL-DANIELSSON, K. 2017. Current controversies with oral emergency contraception. *BJOG*, 124, 1948-1956.
- COLQUHOUN, D. 2014. An investigation of the false discovery rate and the misinterpretation of p-values. *R Soc Open Sci*, 1, 140216.

- CONNELLY, O. M., MULAC-JERICEVIC, B., DEMAYO, F., LYDON, J. P. & O'MALLEY, B. W. 2002. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res*, 57, 339-55.
- CONTI, M., HSIEH, M., ZAMAH, A. M. & OH, J. S. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol*, 356, 65-73.
- COTICCHIO, G., DAL CANTO, M., MIGNINI RENZINI, M., GUGLIELMO, M. C., BRAMBILLASCA, F., TURCHI, D., NOVARA, P. V. & FADINI, R. 2015. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update*, 21, 427-54.
- COUSE, J. F., YATES, M. M., DEROO, B. J. & KORACH, K. S. 2005. Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology*, 146, 3247-62.
- CROXATTO, H. B., BRACHE, V., PAVEZ, M., COCHON, L., FORCELLEDO, M. L., ALVAREZ, F., MASSAI, R., FAUNDES, A. & SALVATIERRA, A. M. 2004. Pituitary-ovarian function following the standard levonorgestrel emergency contraceptive dose or a single 0.75-mg dose given on the days preceding ovulation. *Contraception*, 70, 442-50.
- CROXATTO, H. B., DEVOTO, L., DURAND, M., EZCURRA, E., LARREA, F., NAGLE, C., ORTIZ, M. E., VANTMAN, D., VEGA, M. & VON HERTZEN, H. 2001. Mechanism of action of hormonal preparations used for emergency contraception: a review of the literature. *Contraception*, 63, 111-21.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1, 581-5.
- DURAND, M., DEL CARMEN CRAVIOTO, M., RAYMOND, E. G., DURAN-SANCHEZ, O., DE LA LUZ CRUZ-HINOJOSA, M., CASTELL-RODRIGUEZ, A., SCHIAVON, R. & LARREA, F. 2001. On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception*, 64, 227-34.
- DURAND, M., KOISTINEN, R., CHIRINOS, M., RODRIGUEZ, J. L., ZAMBRANO, E., SEPPALA, M. & LARREA, F. 2010. Hormonal evaluation and midcycle detection of intrauterine glycodeclin in women treated with levonorgestrel as in emergency contraception. *Contraception*, 82, 526-33.
- EMMEN, J. M., COUSE, J. F., ELMORE, S. A., YATES, M. M., KISSLING, G. E. & KORACH, K. S. 2005. In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER){alpha} and ER{beta} null mice indicate a role for ER{beta} in follicular maturation. *Endocrinology*, 146, 2817-26.
- EMORI, C. & SUGIURA, K. 2014. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Anim Sci J*, 85, 627-33.
- ESCAMILLA-HERNANDEZ, R., LITTLE-IHRIG, L., ORWIG, K. E., YUE, J., CHANDRAN, U. & ZELEZNIK, A. J. 2008. Constitutively active protein kinase A qualitatively mimics the effects of follicle-stimulating hormone on granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol*, 22, 1842-52.
- FAIR, T. & LONERGAN, P. 2012. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. *Reprod Domest Anim*, 47 Suppl 4, 142-7.



- FORTUNE, J. E. & VINCENT, S. E. 1983. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biol Reprod*, 28, 1078-89.
- GARCIA-BECERRA, R., BORJA-CACHO, E., COONEY, A. J., JACKSON, K. J., LEMUS, A. E., PEREZ-PALACIOS, G. & LARREA, F. 2002. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- $\alpha$ . *J Steroid Biochem Mol Biol*, 82, 333-41.
- GARCIA-BECERRA, R., COONEY, A. J., BORJA-CACHO, E., LEMUS, A. E., PEREZ-PALACIOS, G. & LARREA, F. 2004. Comparative evaluation of androgen and progesterone receptor transcription selectivity indices of 19-nortestosterone-derived progestins. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 91, 21-7.
- GLASIER, A., GEMZELL-DANIELSSON, K., BOUCHARD, P., GENAZZANI, A. R., AL-AZZAWI, F., BERGA, S., BIRKHAEUSER, M., BRINCAT, M., DE MELO, N. R., FOIDART, J. M., KENEMANS, P., LUNENFELD, B., MARUO, T., MILEWICZ, A., NAFTOLIN, F., NG, E. H., SCHINDLER, A., SIMON, C., SIMONCINI, T., SIMPSON, E., SISELES, N., SMETNIK, V., TARLATZIS, B. & VON SCHOULTZ, B. 2014. ISGE statement on oral emergency contraception. *Gynecol Endocrinol*, 30, 681-2.
- GLASIER, A. F., CAMERON, S. T., FINE, P. M., LOGAN, S. J., CASALE, W., VAN HORN, J., SOGOR, L., BLITHE, D. L., SCHERRER, B., MATHE, H., JASPART, A., ULMANN, A. & GAINER, E. 2010. Ulipristal acetate versus levonorgestrel for emergency contraception: a randomised non-inferiority trial and meta-analysis. *Lancet*, 375, 555-62.
- GROSSMAN, M. P., NAKAJIMA, S. T., FALLAT, M. E. & SIOW, Y. 2008. Mullerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil Steril*, 89, 1364-70.
- GUILLEMIN, N., DUFORT, I. & SIRARD, M. A. 2015. A Genetical Methodology to Identify Genetic Markers of a Bovine Fertility Phenotype Based on CYP19A1 Gene Expression. *GENE EXPRESSION TO GENETICAL GENOMICS*, 8, 9-18.
- GUPTA, S. K. 2015. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J Reprod Immunol*, 108, 90-7.
- GUPTA, S. K., MALIK, A. & ARUKHA, A. P. 2015. Ovarian and oocyte targets for development of female contraceptives. *Expert Opin Ther Targets*, 19, 1433-46.
- HAMEL, M., DUFORT, I., ROBERT, C., GRAVEL, C., LEVEILLE, M. C., LEADER, A. & SIRARD, M. A. 2008. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod*, 23, 1118-27.
- HEIKINHEIMO, O., GORDON, K., WILLIAMS, R. F. & HODGEN, G. D. 1996. Inhibition of ovulation by progestin analogs (agonists vs antagonists): preliminary evidence for different sites and mechanisms of actions. *Contraception*, 53, 55-64.
- HENNET, M. L. & COMBELLES, C. M. 2012. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol*, 56, 819-31.
- HICKEY, G. J., KRASNOW, J. S., BEATTIE, W. G. & RICHARDS, J. S. 1990. Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Mol Endocrinol*, 4, 3-12.

- HSUEH, A. J., KAWAMURA, K., CHENG, Y. & FAUSER, B. C. 2015. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev*, 36, 1-24.
- HSUEH, A. J. & RAUCH, R. 2012. Ovarian Kaleidoscope database: ten years and beyond. *Biol Reprod*, 86, 192.
- HUNG, J. H., YANG, T. H., HU, Z., WENG, Z. & DELISI, C. 2012. Gene set enrichment analysis: performance evaluation and usage guidelines. *Brief Bioinform*, 13, 281-91.
- IRIZARRY, R. A., BOLSTAD, B. M., COLLIN, F., COPE, L. M., HOBBS, B. & SPEED, T. P. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 31, e15.
- JIA, X. C. & HSUEH, A. J. 1986. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology*, 119, 1570-7.
- JO, M., GIESKE, M. C., PAYNE, C. E., WHEELER-PRICE, S. E., GIESKE, J. B., IGNATIUS, I. V., CURRY, T. E., JR. & KO, C. 2004. Development and application of a rat ovarian gene expression database. *Endocrinology*, 145, 5384-96.
- JOSHI-TOPE, G., GILLESPIE, M., VASTRIK, I., D'EUSTACHIO, P., SCHMIDT, E., DE BONO, B., JASSAL, B., GOPINATH, G. R., WU, G. R., MATTHEWS, L., LEWIS, S., BIRNEY, E. & STEIN, L. 2005. Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic Acids Res*, 33, D428-32.
- KAHLENBORN, C., PECK, R. & SEVERS, W. B. 2015. Mechanism of action of levonorgestrel emergency contraception. *Linacre Q*, 82, 18-33.
- KESSERÜ, E., GARMENDIA, F., WESTPHAL, N. & PARADA, J. 1974. The hormonal and peripheral effects of d-norgestrel in postcoital contraception. *Contraception*, 10, 411-24.
- KHAN, D. R., FOURNIER, E., DUFORT, I., RICHARD, F. J., SINGH, J. & SIRARD, M. A. 2016. Meta-analysis of gene expression profiles in granulosa cells during folliculogenesis. *Reproduction*, 151, R103-10.
- KOZERA, B. & RAPACZ, M. 2013. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*, 54, 391-406.
- LARA, D., VAN DIJK, M. G., GARCIA, S. G. & GROSSMAN, D. 2007. [Introducing Emergency Contraception in the Mexican Family Planning Official Norm]. *Gac Med Mex*, 143, 483-7.
- LARREA, F., GARCIA-BECERRA, R., LEMUS, A. E., GARCIA, G. A., PEREZ-PALACIOS, G., JACKSON, K. J., COLEMAN, K. M., DACE, R., SMITH, C. L. & COONEY, A. J. 2001. A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER alpha. *Endocrinology*, 142, 3791-9.
- LARREA, F., SANCHEZ-GONZALEZ, S., GARCIA-BECERRA, R. & MENDEZA, I. 2005. [Sites of prolactin inhibition on gonadotropin-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells]. *Gac Med Mex*, 141, 259-66.
- LEMUS, A. E., VILCHIS, F., DAMSKY, R., CHÁVEZ, B. A., GARCÍA, G. A., GRILLASCA, I. & PÉREZ-PALACIOS, G. 1992. Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41, 881-90.
- LIRA-ALBARRAN, S., DURAND, M., LARREA-SCHIAVON, M. F., GONZALEZ, L., BARRERA, D., VEGA, C., GAMBOA-DOMINGUEZ, A., RANGEL, C. & LARREA, F.

- 2017a. Ulipristal acetate administration at mid-cycle changes gene expression profiling of endometrial biopsies taken during the receptive period of the human menstrual cycle. *Mol Cell Endocrinol*, 447, 1-11.
- LIRA-ALBARRAN, S., LARREA-SCHIAVON, M. F., GONZALEZ, L., DURAND, M., RANGEL, C. & LARREA, F. 2017b. The effects of levonorgestrel on FSH-stimulated primary rat granulosa cell cultures through gene expression profiling are associated to hormone and folliculogenesis processes. *Mol Cell Endocrinol*, 439, 337-345.
- LIU, Z., RUDD, M. D., HERNANDEZ-GONZALEZ, I., GONZALEZ-ROBAYNA, I., FAN, H. Y., ZELEZNIK, A. J. & RICHARDS, J. S. 2009. FSH and FOXO1 regulate genes in the sterol/steroid and lipid biosynthetic pathways in granulosa cells. *Mol Endocrinol*, 23, 649-61.
- LORETI, N., FRESNO, C., BARRERA, D., ANDREONE, L., ALBARRAN, S. L., FERNANDEZ, E. A., LARREA, F. & CAMPO, S. 2013. The glycan structure in recombinant human FSH affects endocrine activity and global gene expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 366, 68-80.
- LUCIANO, A. M., LODDE, V., FRANCIOSI, F., CECILIANI, F. & PELUSO, J. J. 2010. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction*, 140, 663-72.
- MARIONS, L., CEKAN, S. Z., BYGDEMAN, M. & GEMZELL-DANIELSSON, K. 2004. Effect of emergency contraception with levonorgestrel or mifepristone on ovarian function. *Contraception*, 69, 373-7.
- MULLER, A. L., LLADOS, C. M. & CROXATTO, H. B. 2003. Postcoital treatment with levonorgestrel does not disrupt postfertilization events in the rat. *Contraception*, 67, 415-9.
- NILSSON, E. E., SCHINDLER, R., SAVENKOVA, M. I. & SKINNER, M. K. 2011. Inhibitory actions of Anti-Mullerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. *PLoS One*, 6, e20087.
- OGATA, H., GOTO, S., SATO, K., FUJIBUCHI, W., BONO, H. & KANEHISA, M. 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*, 27, 29-34.
- OKTEM, O. & URMAN, B. 2010. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod*, 25, 2944-54.
- ORTIZ, M. E., ORTIZ, R. E., FUENTES, M. A., PARRAGUEZ, V. H. & CROXATTO, H. B. 2004. Post-coital administration of levonorgestrel does not interfere with post-fertilization events in the new-world monkey *Cebus apella*. *Hum Reprod*, 19, 1352-6.
- PEDERSEN, T. & PETERS, H. 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*, 17, 555-7.
- PELUSO, J. J. 2007. Non-genomic actions of progesterone in the normal and neoplastic mammalian ovary. *Semin Reprod Med*, 25, 198-207.
- PELUSO, J. J., ROMAK, J. & LIU, X. 2008. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations. *Endocrinology*, 149, 534-43.

- PIQUETTE, G. N., LAPOLT, P. S., OIKAWA, M. & HSUEH, A. J. 1991. Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 128, 2449-56.
- PURI, P., LITTLE-IHRIG, L., CHANDRAN, U., LAW, N. C., HUNZICKER-DUNN, M. & ZELEZNIK, A. J. 2016. Protein Kinase A: A Master Kinase of Granulosa Cell Differentiation. *Sci Rep*, 6, 28132.
- RITCHIE, M. E., PHIPSON, B., WU, D., HU, Y., LAW, C. W., SHI, W. & SMYTH, G. K. 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 43, e47.
- ROSENFELD, C. S., WAGNER, J. S., ROBERTS, R. M. & LUBAHN, D. B. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*, 122, 215-26.
- SACCHI, S., D'IPPOLITO, G., SENA, P., MARSELLA, T., TAGLIASACCHI, D., MAGGI, E., ARGENTO, C., TIRELLI, A., GIULINI, S. & LA MARCA, A. 2016. The anti-Mullerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. *J Assist Reprod Genet*, 33, 95-100.
- SARKAR, N. N. 2011. The emergency contraceptive drug, levonorgestrel: a review of post-coital oral and peri-coital vaginal administration for prevention of pregnancy. *J Obstet Gynaecol*, 31, 703-7.
- SCHEFE, J. H., LEHMANN, K. E., BUSCHMANN, I. R., UNGER, T. & FUNKE-KAISER, H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*, 84, 901-10.
- SCHIAVON, R. 2006. [Emergency contraception and adolescents]. *Gac Med Mex*, 142 Suppl 2, 111-6.
- SCHIAVON, R. & WESTLEY, E. 2008. From pilot to mainstream: a decade of working in partnerships to expand access to emergency contraception in Mexico. *Glob Public Health*, 3, 149-64.
- SCHINDLER, A. E., CAMPAGNOLI, C., DRUCKMANN, R., HUBER, J., PASQUALINI, J. R., SCHWEPPE, K. W. & THIJSSEN, J. H. 2008. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*, 61, 171-80.
- SCHREIBER, J. R., NAKAMURA, K. & ERICKSON, G. F. 1980. Progestins inhibit FSH-stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 19, 165-73.
- SCHREIBER, J. R., NAKAMURA, K. & ERICKSON, G. F. 1981. Progestins inhibit FSH-stimulated granulosa estrogen production at a post-cAMP site. *Mol Cell Endocrinol*, 21, 161-70.
- SHOHEL, M., RAHMAN, M. M., ZAMAN, A., UDDIN, M. M., AL-AMIN, M. M. & REZA, H. M. 2014. A systematic review of effectiveness and safety of different regimens of levonorgestrel oral tablets for emergency contraception. *BMC Womens Health*, 14, 54.
- SMYTH, G. K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3, Article3.
- STOCCO, C. 2008. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*, 73, 473-87.

- SUBRAMANIAN, A., TAMAYO, P., MOOTHA, V. K., MUKHERJEE, S., EBERT, B. L., GILLETTE, M. A., PAULOVICH, A., POMEROY, S. L., GOLUB, T. R., LANDER, E. S. & MESIROV, J. P. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15545-50.
- SUPEK, F., BOSNJAK, M., SKUNCA, N. & SMUC, T. 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, 6, e21800.
- TODA, K., TAKEDA, K., OKADA, T., AKIRA, S., SAIBARA, T., KANAME, T., YAMAMURA, K., ONISHI, S. & SHIZUTA, Y. 2001. Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol. *J Endocrinol*, 170, 99-111.
- ULLOA-AGUIRRE, A. & ZARINAN, T. 2016. The Follitropin Receptor: Matching Structure and Function. *Mol Pharmacol*, 90, 596-608.
- ULLOA-AGUIRRE, A., ZARINAN, T., PASAPERA, A. M., CASAS-GONZALEZ, P. & DIAS, J. A. 2007. Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine*, 32, 251-63.
- UYAR, A., TORREALDAY, S. & SELI, E. 2013. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril*, 99, 979-97.
- VAN LOOK, P. & VON HERTZEN, H. 1993. Emergency contraception. *Br Med Bull.*, 49, 148-70.
- VAN TOL, H. T., VAN EIJK, M. J., MUMMERY, C. L., VAN DEN HURK, R. & BEVERS, M. M. 1996. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol Reprod Dev*, 45, 218-24.
- VERPOEST, W. M., CAHILL, D. J., HARLOW, C. R. & HULL, M. G. 2000. Relationship between midcycle luteinizing hormone surge quality and oocyte fertilization. *Fertil Steril*, 73, 75-7.
- VILLANUEVA, L. A., MENDEZ, I., AMPUERO, S. & LARREA, F. 1996. The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol Hum Reprod*, 2, 725-31.
- VON HERTZEN, H., PIAGGIO, G., DING, J., CHEN, J., SONG, S., BARTFAI, G., NG, E., GEMZELL-DANIELSSON, K., OYUNBILEG, A., WU, S., CHENG, W., LUDICKE, F., PRETNAR-DAROVEC, A., KIRKMAN, R., MITTAL, S., KHOMASSURIDZE, A., APTER, D., PEREGOUDOV, A. & REGULATION, W. H. O. R. G. O. P.-O. M. O. F. 2002. Low dose mifepristone and two regimens of levonorgestrel for emergency contraception: a WHO multicentre randomised trial. *Lancet*, 360, 1803-10.
- WEENEN, C., LAVEN, J. S., VON BERGH, A. R., CRANFIELD, M., GROOME, N. P., VISSER, J. A., KRAMER, P., FAUSER, B. C. & THEMEN, A. P. 2004. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, 10, 77-83.
- WIGGLESWORTH, K., LEE, K. B., EMORI, C., SUGIURA, K. & EPPIG, J. J. 2015. Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod*, 92, 23.

- WIGGLESWORTH, K., LEE, K. B., O'BRIEN, M. J., PENG, J., MATZUK, M. M. & EPPIG, J. J. 2013. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E3723-9.
- YAN, C., WANG, P., DEMAYO, J., DEMAYO, F. J., ELVIN, J. A., CARINO, C., PRASAD, S. V., SKINNER, S. S., DUNBAR, B. S., DUBE, J. L., CELESTE, A. J. & MATZUK, M. M. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*, 15, 854-66.
- YUZPE, A., THURLOW, H., RAMZY, I. & LEYSHON, J. 1974. Post coital contraception--A pilot study. *J Reprod Med.*, 13, 53-8.

## 7. APÉNDICES

Tabla A1. Lista de oligonucleótidos usados para amplificación génica por RT-qPCR.

Gen	Sentido	Antisentido	TP	Número de acceso
<i>Actb</i>	TGCCCTAGACTTCGAG CAAG	GGCAGCTCATAGCTCTT CTCC	72	NM_031144.2
<i>Cyp19a1</i>	GGAAATCCCACTGTT GTTGG	TGAAGTTTTCCACCACT TTCAA	77	NM_017085.2
<i>Lhcgr</i>	CTGGAGAAGATGCAC AGTGG	CTGCAATTTGGTGAAG AAATA	78	NM_012978.1
<i>Fshr</i>	GAAAGGATCATTTGCT GGATTT	CTTCCAAGACATCATT TGAGAGA	68	NM_199237.1
<i>Nppc</i>	AGCGGTCTGGGATGT TAGTG	CCAAGGATGACCTCAGT GC	75	NM_053750.1
<i>Gdf9</i>	ATACCGTCCGGCTCTT CAG	TTAAATAGCAGGTCCAC CATTG	94	NM_021672.1
<i>Amh</i>	CTGGACACCGTGCCTT TC	CACTGTGTGGCAGGTC CTC	64	NM_012902.1

TP = Tamaño del producto en pares de bases

Tabla A2. Análisis de ontología génica (GO) de 174 genes sobreexpresados en CPGR estimulados con FSHh.

Proceso biológico sobrerrepresentado	Nombres de los genes en cada categoría	Valor de p ajustado
Vía de señalización del receptor de activina (GO:0032924)	<i>Acvr1b, Fgf9, Inhba, Inhbb, Lefty2</i>	1.42E-2
Regulación de la secreción de hormona folículo estimulante (GO:0046880)	<i>Inha, Inhba, Inhbb</i>	2.07E-2
Desarrollo de características sexuales primarias femeninas (GO:0046545)	<i>Acvr1b, Inha, Lhcgr, Fshr, Tox2, Inhba</i>	5.35E-2
Diferenciación sexual femenina (GO:0046660)	<i>Acvr1b, Inha, Lhcgr, Fshr, Tox2, Inhba</i>	5.35E-2
Regulación de procesos reproductivos (GO:2000241)	<i>Acvr1b, Nppc, Cnr1, Inhba, Inhbb</i>	5.96E-2
Desarrollo de procesos que participan en la reproducción (GO:0003006)	<i>Cyp19a1, Acvr1b, Inha, Fgf9, Prlr, Nppc, Lhcgr, Fshr, Tox2, Inhba, Inhbb</i>	6.71E-2

Tabla A3. Conjuntos de genes o vías canónicas significativas asociadas con el tratamiento de FSHh en CPGR.

Base de datos	Término de ontología génica o vía canónica	NES	FDR
GO / PB	Vía de señalización de proteínas G acoplada a segundos mensajeros	1.88	0.11
GO / PB	Replicación del DNA	1.72	0.13
GO / PB	Proceso de biosíntesis de esteroides	1.71	0.13
GO / PB	Segregación de cromosomas	1.70	0.12
GO / PB	Ciclo celular mitótico	1.70	0.12
GO / PB	Secreción hormonal	1.57	0.19
GO / PB	Proceso reproductivo	1.56	0.18
GO / PB	Modificación de histonas	1.54	0.19
GO / PB	Recombinación meiótica	1.51	0.21
GO / CC	Huso	1.97	0.01
GO / CC	Región pericéntrica del cromosoma	1.84	0.02
GO / CC	Cinetocoro	1.75	0.06
GO / CC	Centro organizador de los microtúbulos	1.74	0.05
GO / CC	Cromosoma	1.71	0.05
GO / CC	Centrosoma	1.54	0.15
GO / FM	Actividad de sulfotransferasa	1.94	0.04
KEGG	Replicación del DNA	1.93	0.02
KEGG	Ciclo celular	1.47	0.24
Reactome	Ciclo celular mitótico	2.06	0.003
Reactome	Metabolismo de hormonas esteroides y vitaminas A y D	2.02	0.003

GO = Ontología génica      PB = Proceso biológico

CC = Componente celular      FM = Función molecular

*KEGG* = *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

NES = Valor normalizado de enriquecimiento

FDR = Tasa de descubrimiento falso



Tabla A4. Análisis de ontología génica (GO) de 168 genes subexpresados en CPGR tratados con FSHh-LNG *versus* FSHh.

<b>Proceso biológico sobrerrepresentado</b>	<b>Nombres de los genes en cada categoría</b>	<b>Valor de p ajustado</b>
Replicación del DNA (GO:0006260)	<i>Mcm8, Mcm3, Gins1, Ticrr, Mcm10, Mms22l, Rpa3, Rrm2, Rfc2, Terf1, Esco2</i>	1.00E-4
Condensación de cromosomas (GO:0007076)	<i>Ccnb1, Nusap1, Smc2, Smc4, Cdca5</i>	1.71E-4
División nuclear (GO:0000280)	<i>Mad2l1, Ccnb1, Wee2, Nusap1, Smc2, Smc4, Ska1, Cdca5, Terf1, Mybl2</i>	2.86E-4
Ovogénesis (GO:0048477)	<i>Ihh, Amh, Gdf9, Dazl, Ccnb1, Zp3, Wee2, Tdrd5, Inhbb</i>	4.01E-4
Generación del gameto femenino (GO:0007292)	<i>Mcm8, Ihh, Amh, Gdf9, Dazl, Ccnb1, Zp3, Wee2, Tdrd5, Inhbb</i>	4.01E-4
Fisión de organelos (GO:0048285)	<i>Mad2l1, Ccnb1, Wee2, Nusap1, Smc2, Smc4, Ska1, Cdca5, Terf1, Mybl2</i>	7.71E-4
Procesos celulares involucrados en la reproducción (GO:0048610)	<i>Ihh, Gdf9, Dazl, Zpbp2, Fancd2, Ccnb1, Suv39h2, Zp4, Zp2, Zp3, Tex15, Wee2, Tdrd5, Smc2, Smc4, Pdilt, Inhbb, Brdt</i>	1.03E-3
Regulación de procesos del ciclo celular (GO:0010564)	<i>Ticrr, Dtl, Dazl, Mad2l1, Plk4, Ccnb1, Zwilch, Wee2, Nusap1, Ttk, Cdca5, Terf1</i>	1.32E-3
Fertilización (GO:0009566)	<i>Nlrp5, Zpbp2, Zp4, Zp2, Zp3, Tex15, Wee2</i>	1.70E-3
Desarrollo del ovocito (GO:0048599)	<i>Gdf9, Dazl, Ccnb1, Zp3, Wee2, Tdrd5, Inhbb</i>	4.35E-3
Diferenciación del ovocito (GO:0009994)	<i>Gdf9, Dazl, Ccnb1, Zp3, Wee2, Tdrd5, Inhbb</i>	5.84E-3

Unión del esperma a la zona pelúcida (GO:0007339)	<i>Zpbp2, Zp4, Zp2, Zp3</i>	5.96E-3
Reconocimiento huevo-espermatozoide (GO:0035036)	<i>Zpbp2, Zp4, Zp2, Zp3</i>	7.31E-3
Segregación de cromosomas (GO:0007059)	<i>Ndc80, Mad2l1, Ccnb1, Nusap1, Smc2, Smc4, Ttk, Ska1, Cdca5, Esco2</i>	8.38E-3

---

Tabla A5. Análisis de ontología génica (GO) de 329 GDE en CPGR tratados con FSHh-LNG *versus* FSHh.

<b>Componente celular sobrerrepresentado</b>	<b>Nombres de los genes en cada categoría</b>	<b>Valor de p ajustado</b>
Cromosoma, región centromérica (GO:0000775)	<i>Ndc80, Mad2l1, Dnmt1, Ccnb1, Zwilch, Nup107, Ska1, Esco2</i>	3.84E-4
Cromosoma nuclear (GO:0000228)	<i>Ndc80, Hist2h4, Mms22l, Ccnb1, Suv39h2, Uhrf1, Rpa3, Smc2, Cdca5, Terf1, Esco2</i>	7.75E-4
Cromosoma condensado (GO:0000793)	<i>Ndc80, Fancd2, Ccnb1, Smc2, Smc4, Ska1, Cdca5</i>	1.89E-3
Cinetocoro (GO:0048599)	<i>Ndc80, Mad2l1, Ccnb1, Zwilch, Nup107, Ska1</i>	1.89E-3
Horquilla de replicación (GO:0005657)	<i>Dnmt1, Mms22l, Uhrf1, Rpa3, Rfc2</i>	1.89E-3
Complejo MCM (GO:0042555)	<i>Mcm8, Mcm3, Mms22l</i>	2.90E-3
Cinetocoro exterior del cromosoma condensado (GO:0000940)	<i>Ndc80, Ccnb1, Ska1</i>	2.90E-3

---

Tabla A6. GSEA utilizando términos de ontología génica en CPGR tratados con FSHh-LNG *versus* FSHh.

Proceso biológico	NES	FDR
<b>Mitosis</b>	-2.54	0.00
Fase M del ciclo celular mitótico	-2.53	0.00
Fase del ciclo celular	-2.51	0.00
Proceso del ciclo celular	-2.51	0.00
<b>Replicación del DNA</b>	-2.45	0.00
Fase M	-2.44	0.00
Ciclo celular mitótico	-2.41	0.00
Punto de control del ciclo celular (GO 0000075)	-2.40	0.00
Ciclo celular (GO 0007049)	-2.34	0.00
Regulación de la mitosis	-2.26	0.00
Regulación del ciclo celular	-2.26	0.00
Replicación de DNA dependiente de DNA	-2.24	0.00
Proceso metabólico del DNA	-2.20	0.00
Punto de control de integridad del DNA	-2.13	0.00
Segregación de cromosomas	-2.11	0.00
Organización y biogénesis de microtúbulos del citoesqueleto	-2.11	0.00
<b>Generación del gameto femenino</b>	-2.08	0.00
Punto de control del ciclo celular mitótico	-2.08	0.00
Reparación del DNA	-2.08	0.00
Respuesta al estímulo de daño al DNA	-2.04	0.00
Regulación de la replicación del DNA	-2.00	0.00
Empaquetamiento del DNA	-1.96	0.00
Proceso metabólico de sulfuro	-1.94	0.00
Procesos basados en microtúbulos	-1.87	0.01
Organización y biogénesis del cromosoma	-1.83	0.01
Respuesta a estímulos endógenos	-1.83	0.01
Ciclo celular meiótico	-1.75	0.03
Regulación de la actividad de cinasa de proteínas dependiente de ciclina	-1.75	0.03
Generación del gameto	-1.72	0.04
Ensamblaje del complejo proteína RNA	-1.69	0.05
Inicio de la traducción	-1.69	0.05

Recombinación meiótica	-1.69	0.05
Interfase	-1.68	0.05
Exportación nuclear	-1.67	0.05
Interfase del ciclo celular mitótico	-1.63	0.05
Transición G1 S del ciclo celular mitótico	-1.63	0.07
Regulación del inicio de la traducción	-1.63	0.07
Reparación de ruptura de doble cadena	-1.62	0.07
Meiosis I	-1.62	0.07
Replicación del genoma viral	-1.59	0.09
Transducción de señales de repuesta a daño al DNA	-1.57	0.10
Proceso de biosíntesis de proteoglicanos	-1.57	0.11
Remodelación de la cromatina	-1.56	0.11
Reproducción sexual	-1.54	0.12
<b>Proceso de biosíntesis de esteroides</b>	-1.53	0.13
Biogénesis y ensamblaje de complejo de ribonucleoproteínas	-1.52	0.13
Reproducción	-1.53	0.13
Recombinación del DNA	-1.51	0.14
Proceso de biosíntesis de compuestos sulfúricos	-1.48	0.16
Proceso de biosíntesis de lípidos	-1.49	0.16
Organización y biogénesis del citoesqueleto	-1.45	0.20
Regulación del proceso metabólico del DNA	-1.44	0.21

---

GO = Ontología génica

NES = Valor normalizado de enriquecimiento

FDR = Tasa de descubrimiento falso

Los procesos biológicos resaltados en negro fueron los más relacionados con la hipótesis de trabajo sobre los efectos del LNG a nivel de la foliculogénesis y la biosíntesis de estradiol.

Tabla A7. Bio-funciones identificadas en la base de datos de *IPA* y asociadas con el efecto de FSHh-LNG *versus* FSHh en CPGR.

Bio-función	Valor de p	Genes
Cantidad de folículos ováricos	7.72E-8	<i>Amh, Cyp19a1, Daz2, Fancd2, Gdf9, Inhbb, Lhcgr, Mcm8, Nos1, Zp2, Zp3</i>
Formación de la zona pelúcida	3.08E-6	<i>Ihh, Zp2, Zp3</i>
Foliculogénesis	1.12E-5	<i>Amh, Cyp19a1, Daz2, Gdf9, Ihh, Lhcgr, Mir17, Plg, Zp2, Zp3</i>
Cantidad de folículos de De Graaf	1.70E-5	<i>Cyp19a1, Inhbb, Lhcgr, Nos1, Zp2, Zp3</i>
Cantidad de células gonadales	1.80E-5	<i>Cyp19a1, Daz2, Egr4, Fancd2, Fgf9, Gdf9, Lhcgr, Mcm8, Mybl1, Nos1, Zp2, Zp3</i>
Gametogénesis	4.35E-5	<i>Amh, Bcl2l10, Brdt, Cyp19a1, Daz2, Egr4, Fancd2, Gdf9, Ihh, Inhbb, Lhcgr, Mcm8, Mybl1, Nlrp14, Pdilt, Tdrd5, Tex15, Zp2, Zp3, Zpbp2</i>
Cantidad de células ováricas	5.23E-5	<i>Gdf9, Lhcgr, Mcm8, Nos1, Zp2, Zp3</i>
Cantidad de células germinales	5.36E-5	<i>Cyp19a1, Daz2, Egr4, Fancd2, Gdf9, Lhcgr, Mcm8, Mybl1, Nos1, Zp2, Zp3</i>
Recombinación del DNA	1.66E-4	<i>Dnmt1, Fancd2, Kpna2, Mcm8, Mms22l, Mybl1, Rad51ap1, Rfc2, Tex15, Uhrf1</i>
Meiosis de células gonadales	2.23E-4	<i>Amh, Brdt, Egr4, Fancd2, Lhcgr, Mad2l1, Mcm8, Tex15</i>
Cantidad de ovocitos	2.76E-4	<i>Gdf9, Mcm8, Nos1, Zp2, Zp3</i>
Morfología anormal de la zona pelúcida	3.42E-4	<i>Gdf9, Zp2, Zp3</i>
Morfología anormal de los folículos ováricos	3.46E-4	<i>Cyp19a1, Daz2, Gdf9, Lhcgr, Mcm8, Zp2, Zp3</i>
Morfología anormal de los ovocitos	3.74E-4	<i>Gdf9, Mcm8, Padi6, Zp3</i>
Metabolismo de esteroides	5.95E-4	<i>Amh, Cyp19a1, Cyp2b6, Cyp2e1, Fgf9, Gdf9, Lhcgr, P2ry13, Plg, Pltp, Trpv5, Ugt2b17</i>

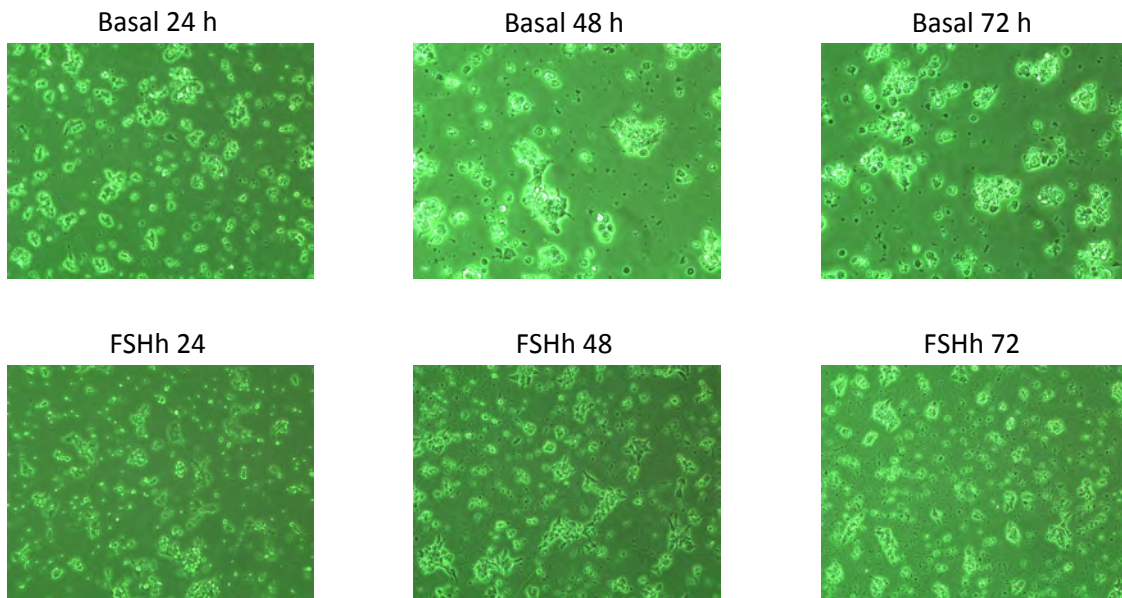
Síntesis de estrógenos	7.90E-4	<i>Amh, Cyp19a1, Lhcgr, Plg</i>
Ovulación	7.91E-4	<i>Cyp19a1, Inhbb, Lhcgr, Nos1, Zp2, Zp3</i>
Formación del cuerpo lúteo	9.94E-4	<i>Daz2, mir-17, Plg</i>
Cantidad de los componentes del cromosoma	9.94E-4	<i>Mad211, Melk, Mms221</i>
Fertilidad	1.40E-3	<i>Amh, Brdt, Cyp19a1, Gdf9, Inhbb, Lhcgr, Nos1, Pdgfb, Pdilt, Plg, Pltp, Relb, Usp2, Zp3, Zpbp2</i>
Cantidad de cuerpo lúteo	1.46E-3	<i>Cyp19a1, Inhbb, Lhcgr, Nos1</i>
Cantidad de folículos preantrales	2.06E-3	<i>Amh, Gdf9</i>
Cantidad de folículos ováricos secundarios	2.06E-3	<i>Cyp19a1, Mcm8</i>
Cantidad de folículos antrales	3.37E-3	<i>Amh, Cyp19a1, Lhcgr</i>
Síntesis de beta-estradiol	4.39E-3	<i>Amh, Lhcgr, Plg</i>
Ovogénesis	4.47E-3	<i>Gdf9, Inhbb, Mcm8, Zp3</i>
Esteroidogénesis de hormonas	6.28E-3	<i>Amh, Fgf9, Gdf9, Lhcgr, Pdgfb, Plg</i>
Cantidad de folículos ováricos primarios	7.14E-3	<i>Cyp19a1, Gdf9</i>
Fertilización	7.52E-3	<i>Daz2, Gdf9, Nlrp5, Pltp, Tex15, Usp2, Zpbp2</i>
Síntesis de esteroides	1.22E-2	<i>Amh, Cyp19a1, Fgf9, Gdf9, Lhcgr, Pdgfb, Plg, Pltp, Pon3</i>
Unión a la zona pelúcida	1.32E-2	<i>Zp2, Zp3, Zpbp2</i>
Arresto en la progresión del ciclo celular de los ovocitos	1.46E-2	<i>Mad211</i>
Arresto en el punto de control del huso de los ovocitos	1.46E-2	<i>Mad211</i>
Arresto en el crecimiento de folículos antrales	1.46E-2	<i>Lhcgr</i>
Maduración de los folículos antrales	1.46E-2	<i>Lhcgr</i>
Maduración de los folículos de De Graaf	1.46E-2	<i>Lhcgr</i>

Tabla A8. Genes con mayor magnitud de expresión diferencial en la condición FSHh-LNG *versus* FSHh comparado con FSHh *versus* Basal en CPGR.

Nombre del gen	Símbolo del gen	VC	Valor de p
Citocromo P450 familia 19 subfamilia A miembro 1 (aromatasa)	<i>Cyp19a1</i>	- 2.08	1.2E-2
Receptor de hormona luteinizante/coriogonadotropina	<i>Lhcgr</i>	- 1.58	1.6E-2
Grupo de complementación D2 de la anemia de Fanconi	<i>Fancd2</i>	- 1.58	5.6E-2
Inhibina, beta B	<i>Inhbb</i>	- 1.47	5.3E-2
Factor 10 de iniciación de la replicación y mantenimiento de minicromosomas	<i>Mcm10</i>	- 1.31	7.2E-2
Factor 9 de crecimiento de fibroblastos	<i>Fgf9</i>	- 1.28	5.9E-2
Proteína disulfuro semejante a isomerasa, expresada en testículos	<i>Pdilt</i>	1.32	1.9E-2
Paraoxonasa 3	<i>Pon3</i>	1.31	9.8E-2

VC = Veces de cambio

A)



B)

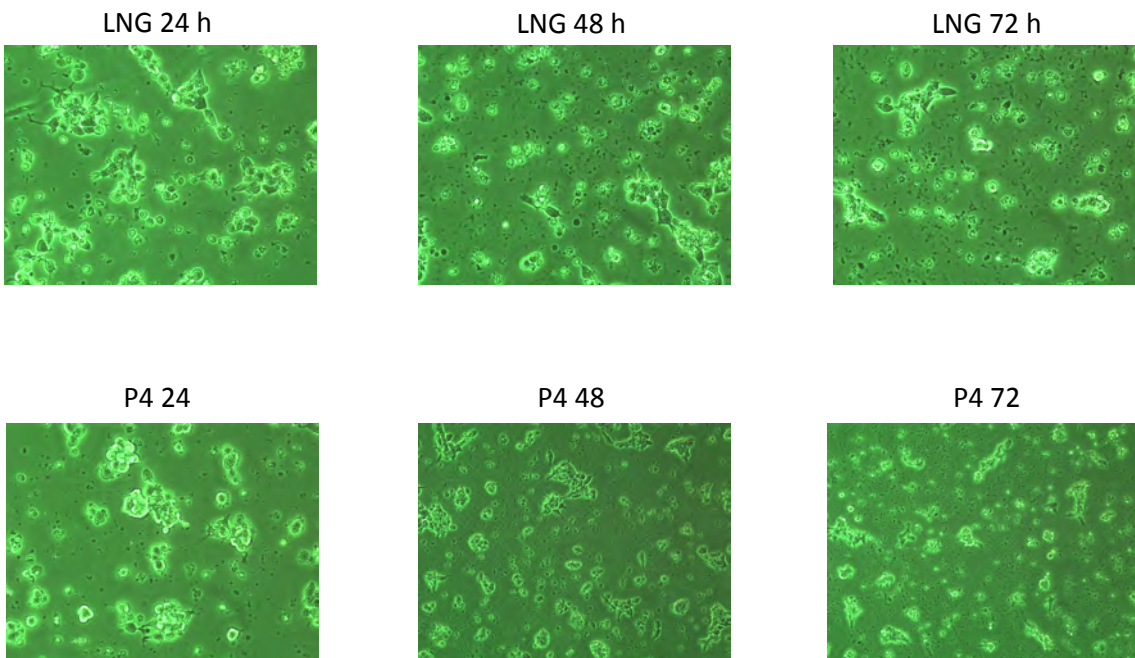


Figura A1. Morfología de las células de la granulosa de rata mantenidas en cultivo durante 96 h incubadas en ausencia (Basal) o presencia de FSHh (panel A) o coincubadas con FSHh-LNG o FSHh-P<sub>4</sub> (panel B).



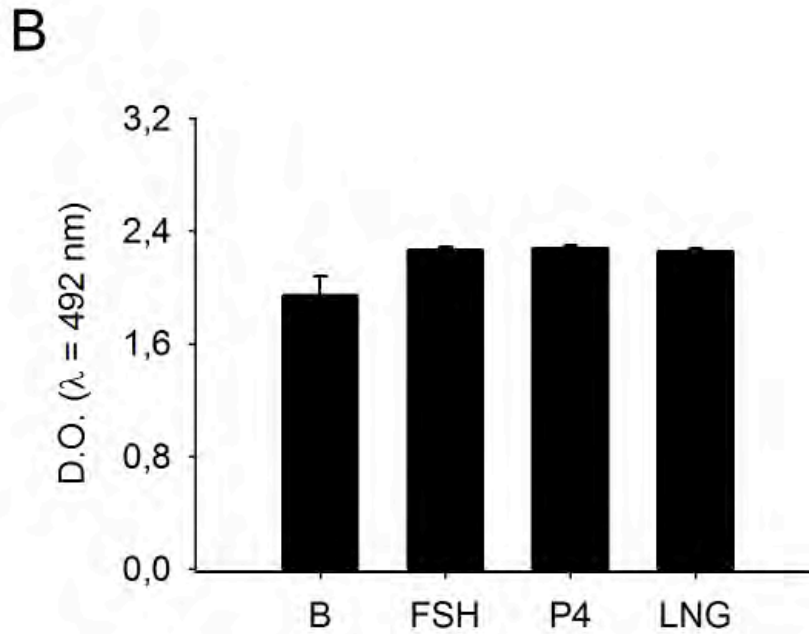
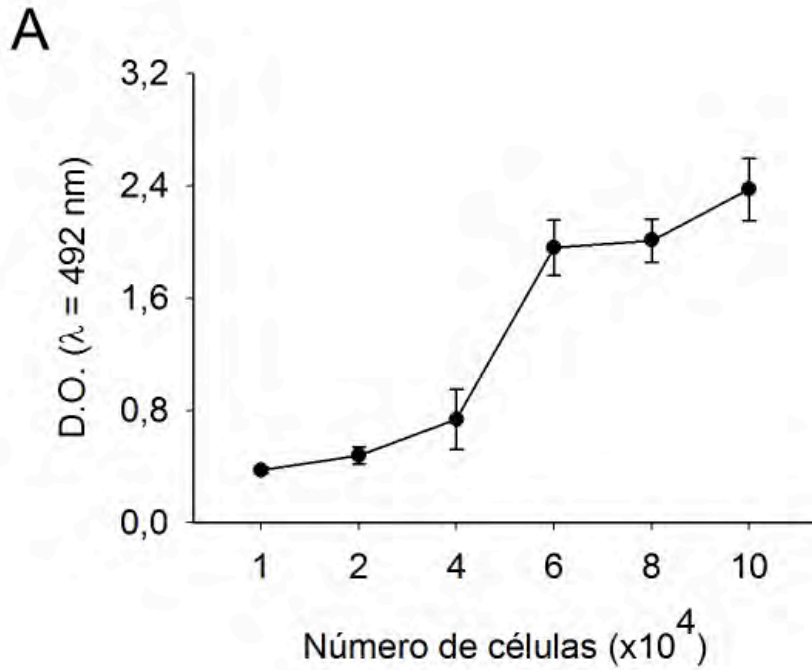
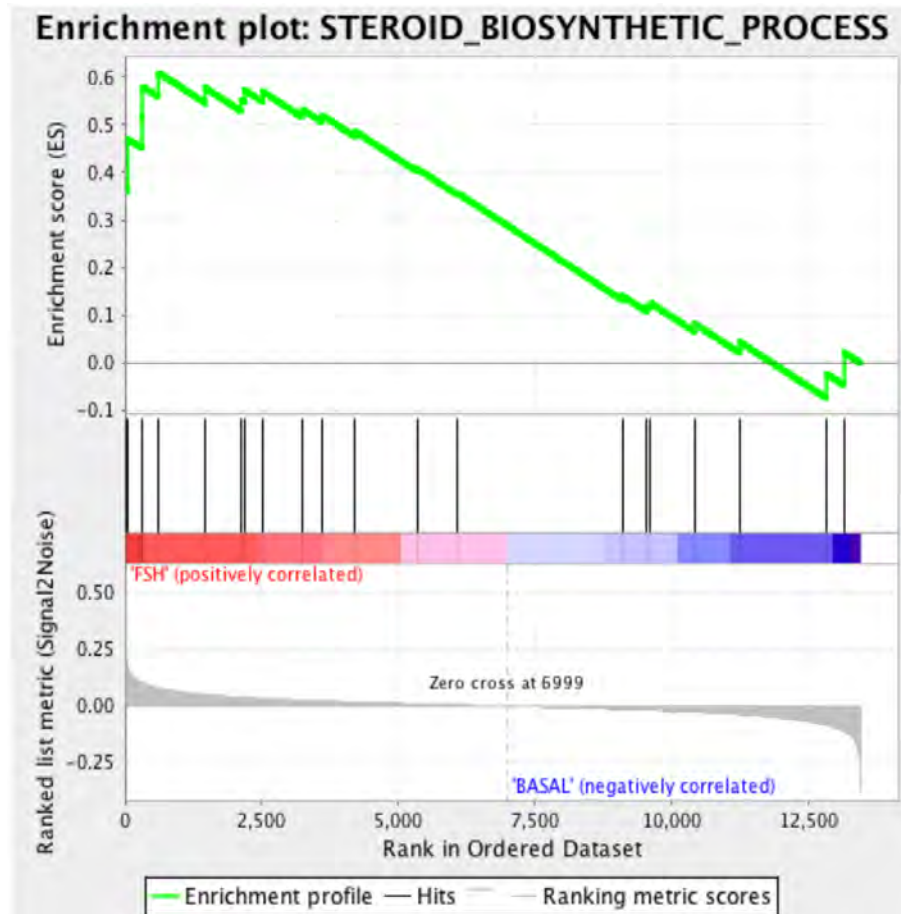


Figura A2. A) Validación del ensayo de proliferación XTT. B) Viabilidad de las células de la granulosa de rata mantenidas en cultivo incubadas en presencia de FSHh o coincubadas con FSHh-P<sub>4</sub> o FSHh-LNG.

A)



B)

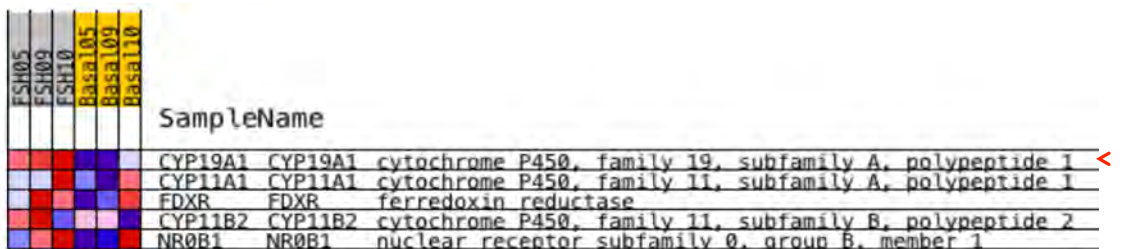


Figura A3. A) Gráfica de enriquecimiento de la vía canónica “Metabolismo de hormonas esteroides y vitaminas A y D”, definida por *Reactome Pathway Database* en CPGR estimulados con FSHh. B) Mapa de calor del núcleo de enriquecimiento de la vía canónica. La flecha en color rojo destaca a *Cyp19a1* como el gen con mayor magnitud de expresión diferencial en la condición FSHh versus Basal (<http://www.broadinstitute.org/gsea>).

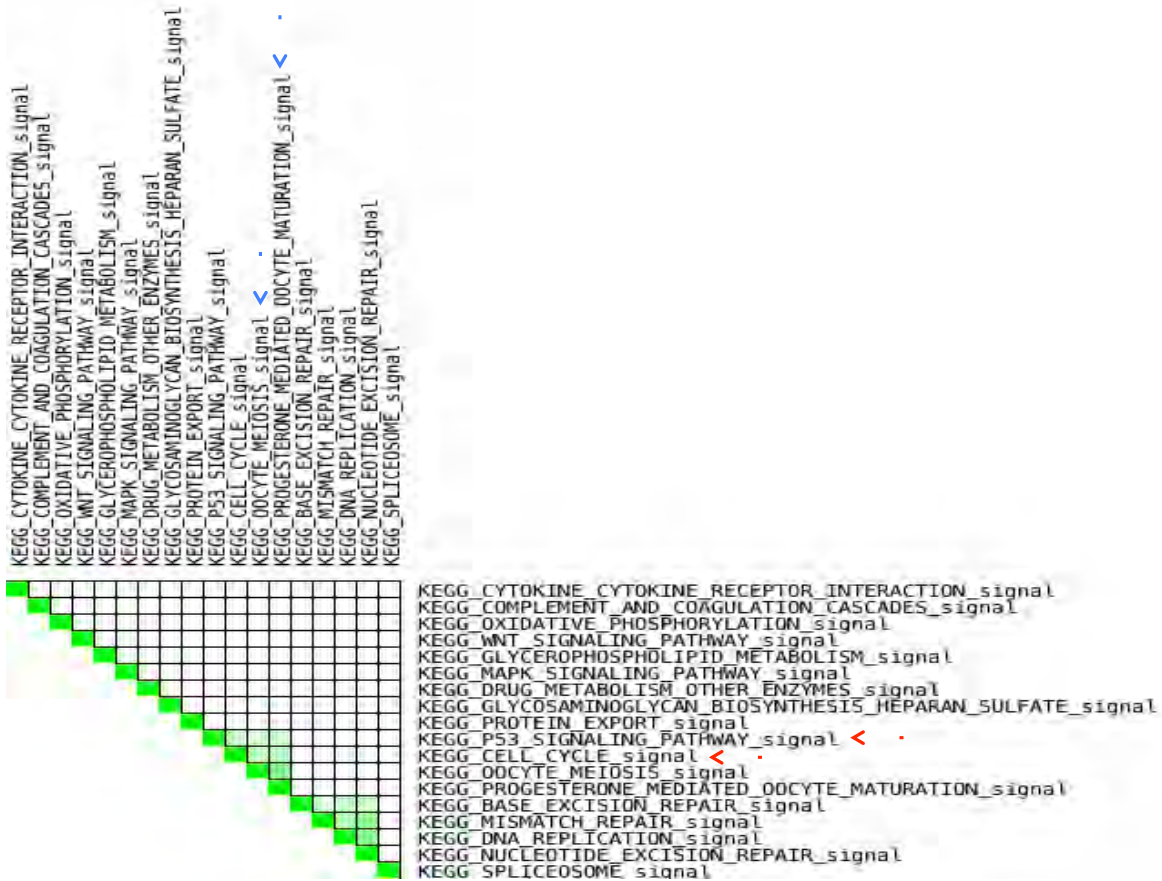


Figura A4. Análisis de “solapamiento de los bordes principales, conjunto a conjunto” (*leading edge, set to set*) de las vías canónicas definidas por *KEGG* en CPGR incubados con LNG-FSHh. Las flechas en color azul señalan las vías correspondientes a la meiosis ovocitaria y a la maduración del ovocito mediada por progesterona. Las flechas en color rojo destacan la vía de señalización de p53 y del ciclo celular. La intensidad del color verde correlaciona con el grado de superposición entre dos vías, que se traduce en el número de genes que comparten. En este caso, la maduración del ovocito mediada por progesterona comparte más genes con la meiosis ovocitaria en comparación con el resto de vías canónicas definidas por *KEGG* (<http://www.broadinstitute.org/gsea>).

## **8. ARTÍCULOS PUBLICADOS, CAPÍTULOS DE LIBRO, PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y DISTINCIONES RECIBIDAS.**

### **Artículos publicados con agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biomédicas (se anexan publicaciones en extenso).**

Lira-Albarrán S, Larrea-Schiavon MF, González L, Durand M, Rangel C, Larrea F. The effects of levonorgestrel on FSH-stimulated primary rat granulosa cell cultures through gene expression profiling are associated to hormone and folliculogenesis processes. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Jan 5;439:337-345.

Lira-Albarrán S, Durand M, Larrea-Schiavon MF, González L, Barrera D, Vega C, Gamboa-Domínguez A, Rangel C, Larrea F. Ulipristal acetate administration at mid-cycle changes gene expression profiling of endometrial biopsies taken during the receptive period of the human menstrual cycle. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 May 15;447:1-11.

### **Artículos publicados en colaboración.**

González L, Lira-Albarrán S, Méndez I, Díaz L, Larrea F. The role of the ovarian cycle and the effects of mitogen-induced cytokines on human prolactin gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Endocr Res.* 2018 Feb;43(1):39-46.

Loreti N, Fresno C, Barrera D, Andreone L, Lira Albarrán S, Fernandez EA, Larrea F, Campo S. The glycan structure in recombinant human FSH affects endocrine activity and global gene expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Feb 5;366(1):68-80.

## **Capítulos de libro en inglés.**

A. Ulloa-Aguirre, T. Zariñán, S. Lira-Albarrán. Mutation of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene. Reference Module in Biomedical Sciences, 2018.

Ulloa-Aguirre A, Lira-Albarrán S. Clinical Applications of Gonadotropins in the Male. Prog Mol Biol Transl Sci. 2016;143:121-174.

Lorenza Díaz, Mauricio Díaz-Muñoz, Leticia González, Saúl Lira-Albarrán, Fernando Larrea and Isabel Méndez. Prolactin in the Immune System. <http://dx.doi.org/10.5772/53538>. INTECH. Prolactin, editado por György M. Nagy y Bela E. Toth, ISBN 978-953-51-0943-3, Publicado: enero 23, 2013.

## **Capítulos de libro en español.**

Saúl Lira Albarrán, Ma. del Carmen Cravioto Galindo, Marta Durand Carbajal, Fernando Larrea Gallo. Alteraciones de la función ovárica. Endocrinología Clínica de Dorantes y Martínez. Capítulo 68. 5a edición. Ed. Manual Moderno; Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2016. ISBN: 978-607-448-249-2.

Raffaella Schiavon Ermani, Saúl Lira Albarrán, Fernando Larrea Gallo. Ovarios. Endocrinología Clínica de Dorantes y Martínez. Capítulo 67. 5a edición. Ed. Manual Moderno; Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2016. ISBN: 978-607-448-249-2.

Saúl Lira Albarrán. Aspectos genéticos de diabetes mellitus tipo 1 y 2. Endocrinología Clínica de Dorantes y Martínez. Capítulo 37. 5a edición. Ed. Manual Moderno; Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2016. ISBN: 978-607-448-249-2.

Saúl Lira Albarrán, Leticia González Ibarra, Nayeli Martínez Cruz, Fernando Larrea Gallo. Estrategias genéticas y moleculares aplicadas al estudio de la endocrinología reproductiva: la vía *KISS1/GPR54* como ejemplo. Tópicos Selectos

en Endocrinología Molecular II. Capítulo 7. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2013.

Nayeli Martínez Cruz, Lidia Arce Sánchez, Saúl Lira Albarrán, Claudia Martínez López, Yuriria Valle Carmona, Raúl Guerrero Muñiz, Marta Durand Carbajal. Factores de regulación intraovárica del desarrollo folicular. Tópicos Selectos en Endocrinología Molecular II. Capítulo 6. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2013.

Jazmín Arteaga Vázquez, Alejandro Martínez Juárez, Saúl Lira Albarrán. Citogenética molecular del síndrome de Turner y del síndrome de Klinefelter. Tópicos Selectos en Endocrinología Molecular II. Capítulo 3. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2013.

Nitzia López Juárez, Saúl Lira Albarrán, Leticia González Ibarra, Fernando Larrea Gallo. Alteraciones hormonales de la función ovárica. Endocrinología clínica. Capítulo 64. 4a edición. Ed. Manual Moderno; Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2012. ISBN: 978-607-448-249-2.

Susana Kofman Alfaro, Julio Mayorga Camargo, Carlos Alberto Venegas Vega, Saúl Lira Albarrán. Desórdenes del desarrollo sexual. Genética clínica. Capítulo 10. Ed. Manual Moderno. México, 2012. ISBN: 978-607-448-251-5.

Leticia González Ibarra, Fernando Larrea Gallo, Saúl Lira Albarrán. Aspectos funcionales de la prolactina: inmunidad y cáncer. Tópicos Selectos en Endocrinología Molecular I. Capítulo 17. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2012.

Bertha Chávez Cano, Saúl Lira Albarrán, Susana Kofman Alfaro, Felipe Vilchis Uribe. Aspectos genéticos de los desórdenes del desarrollo sexual. Tópicos Selectos en Endocrinología Molecular I. Capítulo 3. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. México, 2012.

## **Presentaciones en congresos.**

Ulipristal Acetate Administration at Midcycle Changes the Receptivity Gene Expression Profiling of Endometrial Biopsies Taken during the Window of Implantation of the Human Menstrual Cycle. Saul Lira-Albarran<sup>1</sup>, Leticia Gonzalez<sup>1</sup>, David Barrera<sup>1</sup>, Claudia Vega<sup>1</sup>, Marta Durand<sup>1</sup>, Claudia Rangel<sup>2</sup>, Fernando Larrea<sup>1</sup>. (1) Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, Mexico City, Mexico (2) Departamento de Genómica Computacional, INMEGEN, Mexico City, Mexico. The Endocrine Society's 99th Annual Meeting. Orlando, FL, USA. Del 1 al 4 de abril de 2017.

Genomic Effects of Levonorgestrel on Folliculogenesis in Primary Rat Ovarian Granulosa Cell Cultures. Saúl Lira<sup>1</sup>, Marco Larrea<sup>2</sup>, Leticia González<sup>1</sup>, Claudia Rangel<sup>2</sup>, Fernando Larrea<sup>1</sup>. (1) Dept of Reproductive Biology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, (2) Computational Genomics, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico. The Endocrine Society's 98th Annual Meeting. Boston, MA, USA. Del 1 al 4 de abril de 2016.

Saúl Lira, Leticia González, Rocío García-Becerra, David Ordaz-Rosado, Marta Durand, Fernando Larrea. Levonorgestrel Inhibits *Cyp19a1* Expression in Primary Rat Ovarian Granulosa Cell Cultures. Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, Mexico City, Mexico. 16th International Congress of Endocrinology and The Endocrine Society's 96th Annual Meeting. Chicago, IL, USA. Del 21 al 24 de junio de 2014.

Efecto de levonorgestrel sobre la esteroidogénesis ovárica. Lira S, González L, Larrea F. Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, Ciudad de México, México. Magno Congreso Internacional de Endocrinología, Diabetes y Reproducción. Cancún, México. Del 12 al 15 de noviembre de 2013.

Efectos de Levonorgestrel sobre la función hormonal del ovario. Lira Albarrán S, González L, Larrea F. Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, Ciudad de México, México. XVIII Congreso Panamericano de Endocrinología. La Habana, Cuba. Del 8 al 11 de mayo de 2012.

### **Distinciones recibidas.**

Premio de Investigación Médica Dr. Jorge Rosenkranz en el área clínica en su edición número 31, correspondiente al año 2015, con el trabajo titulado “Efectos de la administración postovulatoria de un modulador selectivo de receptores de progesterona sobre la expresión del genoma del endometrio humano durante la ventana de implantación”.