



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

“REGULACION DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm QUE CODIFICA PARA LA SIALILTRANSFERASA ST3-O/N UNA DE LAS ENZIMAS QUE SIALIZA A LA GONADOTROPINA CORIÓNICA PLACENTARIA HUMANA.”

TESIS

Que para obtener el grado de **Maestro en Biología Experimental**

PRESENTA

Biol. Exp. Pablo Enrique Domínguez López

CODIRECTORES DE TESIS:

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Dr. Pablo Damian Matsumura

ASESORES:

Dra. Laura Díaz Cueto
Dr. Fabián Arechavaleta Velasco

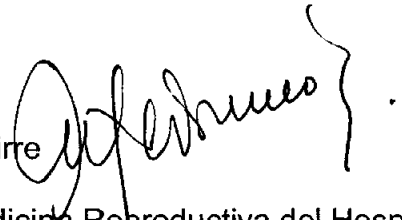
México, D. F.

NOVIEMBRE 2005

COMITÉ TUTORAL

Co-Tutor

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre



Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 "Dr. Luis Castelazo Ayala", IMSS.

Co-Tutor

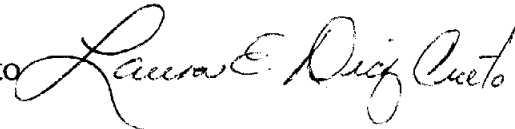
Dr. Pablo Damian Matsumura



Profesor Titular del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Asesores

Dra. Laura Elena Díaz Cueto

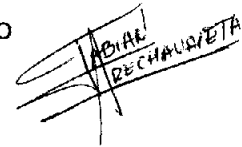


Investigadora Asociada B

Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 "Dr. Luis Castelazo Ayala", IMSS.

Dr. Fabián Jesús Arechavaleta Velasco

Investigador Asociado C



Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 "Dr. Luis Castelazo Ayala", IMSS.

COMITÉ TUTORAL

Co-Tutor

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Dr. Luis Castelazo Ayala”, IMSS.

Co-Tutor

Dr. Pablo Damian Matsumura

Profesor Titular del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Asesores

Dr. Fabián Jesús Arechavaleta Velasco

Investigador Asociado C

Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Dr. Luis Castelazo Ayala”, IMSS.

Dra. Laura Elena Díaz Cueto

Investigadora Asociada B

Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Dr. Luis Castelazo Ayala”, IMSS.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa formó parte del padrón de posgrados de excelencia del CONACYT con número de registro UAM-I: 309-0. actualmente se encuentra dentro del padrón de programas de PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

Mi reconocimiento al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo a través de la beca-crédito con número de registro 169501.

JURADO DE EXAMEN

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis “REGULACION DE LA EXPRESION DEL ARNm QUE CODIFICA PARA LA SIALILTRANSFERASA ST3-O/N UNA DE LAS ENZIMAS QUE SIALIZA A LA GONADOTROPINA CORIONICA PLACENTARIA HUMANA.” el día 03 de Noviembre del año 2005.

Dr. Miguel Betancourt Rule.

PRESIDENTE

Dr. Fabián Jesús Arechavaleta Velasco.

SECRETARIO

Dra. Laura Elena Díaz Cueto.

VOCAL

**Con eterna gratitud, respeto y cariño, este trabajo se lo dedico a
mis padres y hermano.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Ulloa Aguirre por darme la oportunidad de formar parte de su excelente grupo de trabajo, la confianza depositada y su dirección para la realización de este proyecto de investigación.

A mis padres y hermano por el invaluable apoyo en cada momento de mi formación profesional. A Lulú por su confianza, consejos y amor. Gracias por creer siempre en mí.

Al Dr. Fabián Arechavaleta y la Dra. Laura Díaz por su guía, tiempo, paciencia, esfuerzo y conocimientos invertidos en mi formación profesional.

Al Dr. Pablo Matsumura por su tiempo y apoyo académico incondicional.

A mis maestros Enrique Mendieta Márquez y Joaquín Herrera Muñoz por su apoyo para iniciar esta etapa profesional.

A la Dra. Aleida Olivares por su tiempo y conocimientos compartidos. A mis compañeros y amigos de laboratorio Aída, David, Yan, Rocío, Arturo, Angélica.

RESUMEN

La gonadotropina coriónica (hCG) es una hormona de naturaleza glicoproteica, sintetizada y secretada por trofoblastos diferenciados en sinciotrofoblastos de la placenta. Durante los primeros meses de embarazo la hCG mantiene la producción de progesterona por el cuerpo lúteo hasta que la placenta es capaz de llevar a cabo esta función. Estructuralmente, la gonadotropina coriónica está constituida por una subunidad α y una subunidad β . En el humano, la subunidad- α consta de 92 residuos de aminoácidos y tiene dos cadenas de oligosacáridos complejos unidos a asparagina (Asn) a través de enlaces *N*-glicosídicos en las posiciones Asn52 y Asn78. La subunidad- β está formada por 145 residuos de aminoácidos con dos sitios de glicosilación localizados en las posiciones Asn13 y Asn30 con enlaces *N*-glicosídicos. Adicionalmente, esta subunidad contiene otros cuatro sitios de glicosilación unidos a serina (Ser) por medio de enlaces *O*-glicosídicos.

Las sialiltransferasas son una familia conformada por al menos 20 enzimas altamente específicas en el reconocimiento del tipo de enlace de los oligosacáridos a los cuales les adicionan residuos de ácido siálico. La diversidad funcional de las glicoproteínas que contienen ácido siálico en sus estructuras de oligosacáridos y el hecho de que estas estructuras son expresadas de manera específica o selectiva en diversos tejidos y tipos celulares, sugiere que para algunas proteínas glicosiladas el proceso de sialización podría estar regulada por factores que modulan la síntesis y secreción de las mismas moléculas glicoprotéicas.

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto que tiene el 8Br-AMPC sobre la expresión de la sialiltransferasa ST3-O/N y en la síntesis y secreción de la hCG en la línea celular BeWo (células de coriocarcinoma humano).

El análisis de la expresión génica para la sialiltransferasa ST3-O/N y β hCG se realizó mediante la técnica de Northern blot, la cual reveló que en condiciones sin estimular la tendencia observada en la expresión de la ST3-O/N fue de un ligero incremento hacia el final del tiempo de cultivo (96 horas), mientras que para la β hCG mostró una disminución con el paso del tiempo. Cuando las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de 8Br-AMPC la expresión de sialiltransferasa y de la β hCG resultó ser de manera dosis-dependiente. En cuanto a la estimulación con 0.75 mM de 8Br-AMPC, la expresión máxima de la ST3-O/N se dio en las primeras 24 horas postratamiento con una tendencia a disminuir hasta el final del ensayo. Por otro lado, la expresión máxima del gen para β hCG se obtuvo a las 48 horas, observando una suave tendencia a disminuir hacia el final del cultivo.

En cuanto a la secreción de la hCG la cuantificación se realizó mediante la técnica de Radioinmunoensayo de doble anticuerpo en fase líquida. Tanto en condiciones basales como en la estimulación con 0.75 mM de 8Br-AMPC, la tendencia observada en la secreción de la hCG fue de una acumulación al medio de cultivo a través del tiempo. Mientras que la estimulación con diferentes concentraciones de 8Br-AMPC la secreción de la hCG fue dosis-dependiente.

Con lo anterior se concluye que el AMPC influye tanto en la expresión de los ARNm de la sialiltransferasa ST3-O/N y β hCG como en la síntesis y secreción de la hCG en esta línea celular.

INDICE

ANTECEDENTES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA.....	4
GLICOSILACIÓN DE LA hCG	7
GLICOSILTRANSFERASAS.....	8
SIALILTRANSFERASAS.....	11
SIALIZACIÓN DE HORMONAS GLICOPROTEICAS.....	16
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVO	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
HIPOTESIS	21
DISEÑO EXPERIMENTAL	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
CULTIVO CELULAR.....	23
RADIOINMUNOENSAYO (RIA).....	24
EXTRACCIÓN DE ARN	26
SONDAS DE HIBRIDIZACIÓN PARA NORTHERN BLOT	26
NORTHERN BLOT	28
ANÁLISIS DE DATOS.....	29
RESULTADOS	31
PRODUCCIÓN DE hCG Y EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA SUBUNIDAD β DE LA hCG Y ST3-O/N POR LAS CÉLULAS BeWo EN CONDICIONES BASALES	31
EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 8Br-AMPC EN LA PRODUCCIÓN DE hCG Y EN LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA β hCG Y ST3-O/N POR LAS CELULAS BeWo.....	33
EFECTO DEL 8Br-AMPC SOBRE LA SECRECIÓN DE LA hCG Y LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA β hCG Y ST3-O/N EN CÉLULAS BeWo A DIFERENTES TIEMPOS.	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIÓN	43
REFERENCIAS	44

ANTECEDENTES

El embarazo es un proceso en el cual el organismo materno experimenta una serie de ajustes fisiológicos que le ayudan a conservar su homeostasis. En este sentido la placenta juega un papel fundamental, ya que permite mantener el equilibrio entre la madre y el feto regulando de manera selectiva diversas funciones corporales en ambos organismos. Es interesante observar que desde el inicio del embarazo hasta el trabajo de parto, la placenta juega un papel principal en las funciones tales como: 1) la transferencia de nutrientes y oxígeno, 2) la eliminación de productos del desecho metabólico fetal, 3) el establecimiento de una barrera inmunológica, 4) la termorregulación y 5) la síntesis de hormonas y factores de crecimiento[1].

La formación de la placenta es un proceso altamente regulado por factores de crecimiento y hormonas, el cual inicia con la interacción de la capa externa del blastocisto o trofoectodermo, con el tejido endometrial de la madre. Después de la fase inicial de la implantación y alrededor de los días 6 al 12 post-fertilización, la diferenciación de los trofoblastos provenientes de la capa del trofoectodermo da origen a dos tipos celulares principales, los citotrofoblastos extravelosos y los citotrofoblastos vellosos. A partir del día 14, se puede observar la presencia de los citotrofoblastos columnares y de las células gigantes placentarias que son el resultado de la diferenciación de los citotrofoblastos extravelosos. Por su parte, y al mismo tiempo, los citotrofoblastos vellosos se fusionan para formar a los sincicios primitivos que dan origen a las vellosidades placentarias primarias. Conforme el embarazo avanza se observa un aumento en la proliferación y fusión

de los citotrofbastos vellosos, dando origen a los sinciotrofbastos multinucleados e incrementando la ramificación de las vellosidades coriónicas, las cuales conforma el árbol velloso característico de la placenta humana. Finalmente, este sinciotrofbasto mitóticamente inactivo, pero que desde el punto de vista funcional representa la unidad fundamental de la placenta, es el que establece el contacto directo con la sangre materna que llena los espacios intervellosos, facilitando de esta manera el intercambio de oxígeno, nutrientes y desechos fetales entre la madre y el feto (Fig.1) [2, 3].

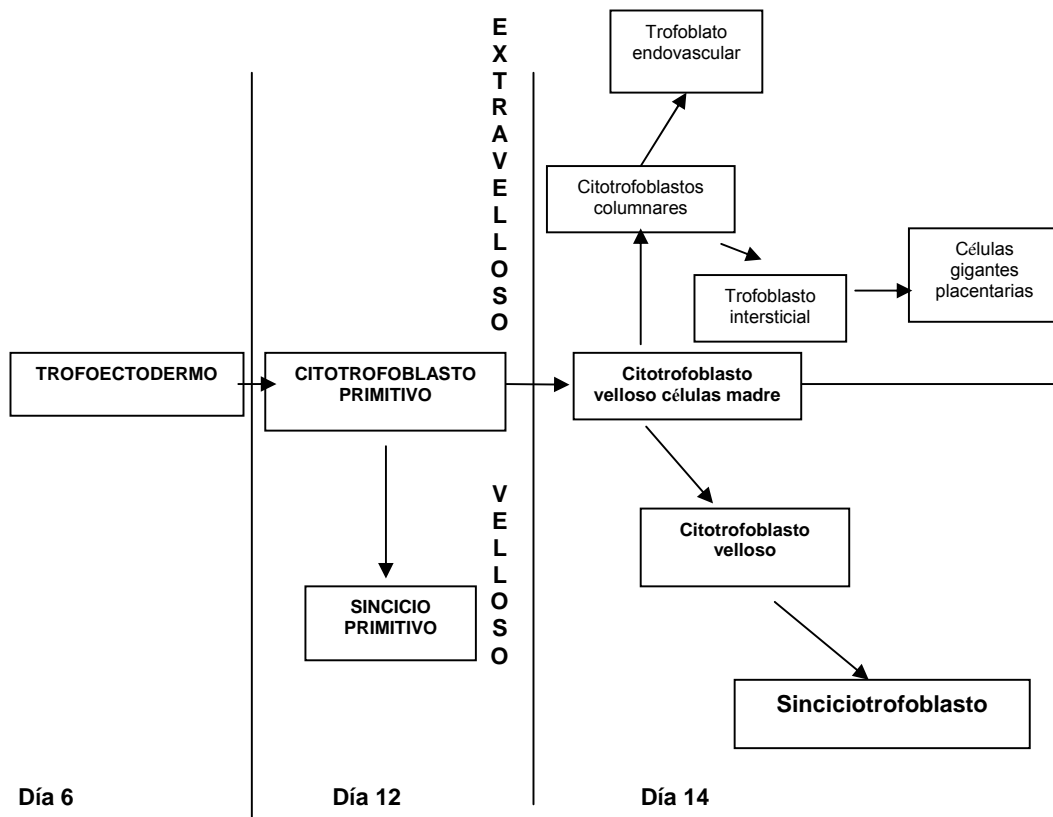


Figura 1.- La diferenciación del trofoectodermo en el sitio de la implantación comienza alrededor del día 6 con la aparición del citotrofbasto primitivo el cual da origen tanto al citotrofbasto velloso como al sinciotrofbasto entre los días 12 a 14 [2].

Desde el punto de vista endocrino, la función principal de la placenta comprende la producción de esteroides y de hormonas peptídicas que se relacionan directamente con el mantenimiento y desarrollo del embarazo. En relación con la síntesis de esteroides, la placenta tiene un sistema incompleto, ya que depende del aporte de precursores provenientes de las circulaciones materna y fetal. En la placenta el colesterol es convertido a pregnenolona y luego en forma rápida a progesterona. Para la síntesis de estrógenos, posee una capacidad de aromatización importante para lo cual utiliza como precursores andrógenos circulantes provenientes principalmente del feto, aunque también de la madre; el principal andrógeno utilizado es el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) producido en las glándulas suprarrenales del feto. Una de las enzimas presentes en gran cantidad en la placenta es la sulfatasa, por medio de la cual la DHEAS es convertida en dehidroepiandrosterona (DHEA) y así el metabolismo continúa hacia la formación de androstendiona, testosterona y finalmente estrona y estradiol. En cuanto a las hormonas proteicas, la placenta produce principalmente gonadotropina coriónica humana (hCG) y lactógeno placentario (hPL), sin embargo también es capaz de sintetizar algunas hormonas semejantes en estructura a las producidas por el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, tales como la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), la somatostatina, la inhibina, la activina y la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) [3, 4]. De todas estas hormonas proteicas, la hCG juega un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento del embarazo.

GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA

La gonadotropina coriónica humana pertenece a la familia de hormonas glicoprotéicas, que también incluye a la hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La hCG es sintetizada y secretada principalmente por el sinciotrofoblasto aunque también lo hace el citotrofoblasto y la hipófisis anterior, así como células provenientes de diversas patologías trofoblásticas como el coriocarcinoma, la mola hidatidiforme, la mola invasiva y los tumores malignos no gestacionales. Posee acción autocrina y paracrina influyendo de manera fundamental en el proceso de diferenciación de los citotrofoblastos, estimulando de manera importante la formación de estructuras sinciciales. Además, se considera que una de las funciones principales de esta hormona es el rescate de la actividad esteroidogénica del cuerpo luteo para la síntesis de progesterona (P_4), cuya producción es de gran importancia para el mantenimiento del embarazo. Por otra parte, se sabe que la producción de la hCG comienza desde la etapa de blastocisto y que aproximadamente entre el primero y segundo día post-fertilización, esta hormona se produce en cantidades detectables en el suero materno alcanzando su pico máximo entre los 50 y 60 días del embarazo, descendiendo de manera progresiva para mantenerse en concentraciones bajas detectables en suero materno a partir de la semana 18 y hasta el final del embarazo [4-6].

Estructuralmente, la hCG es un heterodímero constituido por una subunidad α y una subunidad β unidas de forma no covalente. La subunidad α es común

para todos los miembros de la familia de hormonas glicoproteicas y esta codificada por un solo gen localizado en el cromosoma 6. Su peso molecular es de aproximadamente 16000 daltones y consta de 92 residuos de aminoácidos, con dos cadenas de carbohidratos unidos a la cadena peptídica mediante enlaces N-glicosídicos en las posiciones Asn52 y Asn78. Por su parte, la subunidad β difiere en cada hormona, confiriéndoles especificidad a cada una de ellas. Esta subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 23000 daltones, y está codificada por seis genes localizados en el cromosoma 19. La proteína sintetizada posee 145 aminoácidos de los cuales 97 de ellos son idénticos a la subunidad β LH. Por otra parte, al igual que en la subunidad α , la subunidad β posee dos sitios de glicosilación con uniones N-glicosídicos en los residuos Asn13 y Asn30, además contiene otros cuatro sitios de glicosilación con uniones O-glicosídicos en los residuos de serina 121,127,132 y 138 localizados en el extremo carboxilo terminal (Fig. 2) [7-10].

Se ha demostrado que durante el embarazo temprano, los oligosacáridos unidos en los residuos de estos aminoácidos específicos, se encuentran altamente glicosilados y conforme el embarazo progresa la hCG hiperglicosilada es rápidamente reemplazada por formas menos glicosiladas, las cuales predominan hasta el final del embarazo [11-13].

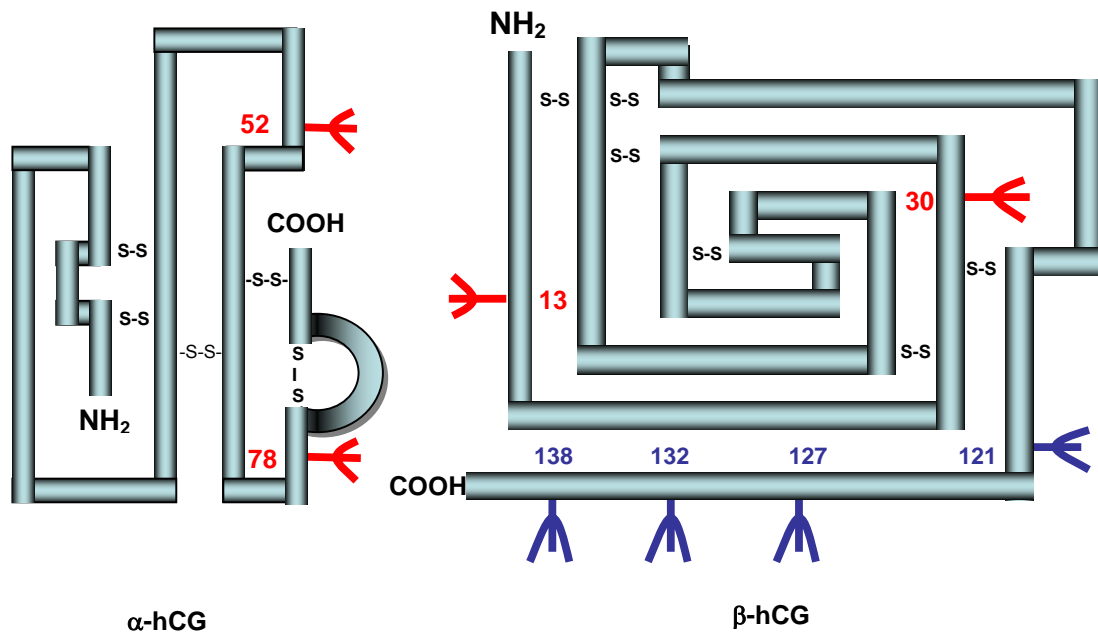


Figura 2.- Sitios de glicosilación de las subunidades de la hCG. En rojo los oligosacáridos unidos a residuos de Asparagina (N-unidos) y en negro los oligosacáridos unidos a residuos de serina (O-unidos) [14].

Las subunidades de la hCG son sintetizadas de manera individual, ensambladas en el retículo endoplasmico y procesadas en el aparato de Golgi. En el caso específico de células provenientes de tumores trofoblásticos, la proporción de secreción de las subunidades difiere considerablemente de los trofoblasto normales; por ejemplo, en la mola hidatidiforme la subunidad β de la hCG se encuentra aumentada en orina en una proporción dos veces mayor que en el embarazo normal, mientras que la subunidad α se encuentra en concentraciones semejantes en ambas circunstancias. Estas diferencias han permitido determinar hCG proveniente de embarazos normales o de enfermedades trofoblásticas gestacionales como el coriocarcinoma y los tumores trofoblásticos [13, 15].

Finalmente, se ha demostrado que existe una gran variedad de factores que inducen o inhiben tanto la síntesis como la secreción de la gonadotropina coriónica. Algunas de ellas son la hormona liberadora de gonadotropinas, el ácido γ -aminobutírico, el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento transformante β , la inhibina y la activina, el factor estimulante de colonias de macrófagos, el factor de necrosis tumoral α , las interleucinas 1 y 6, la progesterona, los glucocorticoides, el ácido retinoico, el péptido vasoactivo intestinal y la insulina (Fig. 3) [16].

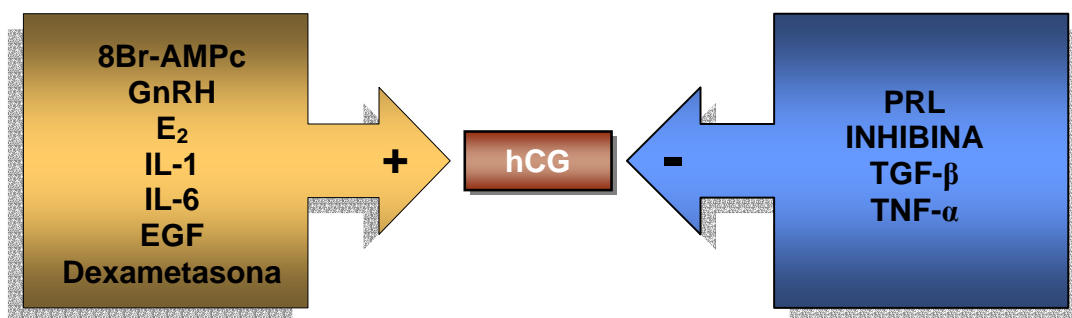


Figura 3.- Reguladores de la secreción de la hCG. Efecto estimulatorio (+) e inhibitorio (-). Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), estradiol (E₂), interleucina (IL), factor de crecimiento epidérmico (EGF), prolactina (PRL), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α)[4].

GLICOSILACIÓN DE LA hCG

La glicosilación de las hormonas glicoproteicas constituye un evento clave co- y postraduccional, que ocurre de manera específica y que está determinado tanto por las enzimas que participan como por la ruta que sigue el péptido naciente a través del retículo endoplásmico y el complejo de Golgi.

GLICOSILTRANSFERASAS

Las glicosiltransferasas son un grupo de enzimas involucradas en la biosíntesis de glicoproteínas, las cuales se encuentran localizadas en las membranas del retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Su función es transferir residuos de carbohidratos de un sustrato donador activado, generalmente un nucleósido, a oligosacáridos unidos a aminoácidos específicos de una cadena polipeptídica. La especificidad de las enzimas tanto por el sustrato donador como por el aceptor constituye la base primaria para la determinación de la estructura del oligosacárido producido por la célula. Se ha estimado que alrededor de cien glicosiltransferasas participan en la síntesis de un oligosacárido, desde el reconocimiento del sitio específico de glicosilación en la cadena polipeptídica hasta el procesamiento del oligosacárido en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El sitio de consenso para la incorporación de oligosacáridos en las hormonas glicoproteicas es Asn-X- Thr / Ser, donde X puede ser cualquier aminoácido. En la asparagina el aceptor del oligosacárido es el γNH_2 por el cual se establece que sean conocidos como N-unidos, mientras que para la treonina o la serina es el grupo funcional OH donde se establece la glicosilación y el cual da origen a los oligosacáridos de tipo O-unidos. Es importante mencionar que no solo existe un sitio de glicosilación sino varios sitios a lo largo de la cadena polipeptídica de las hormonas glicoprotéicas (Fig. 4) [17, 18].

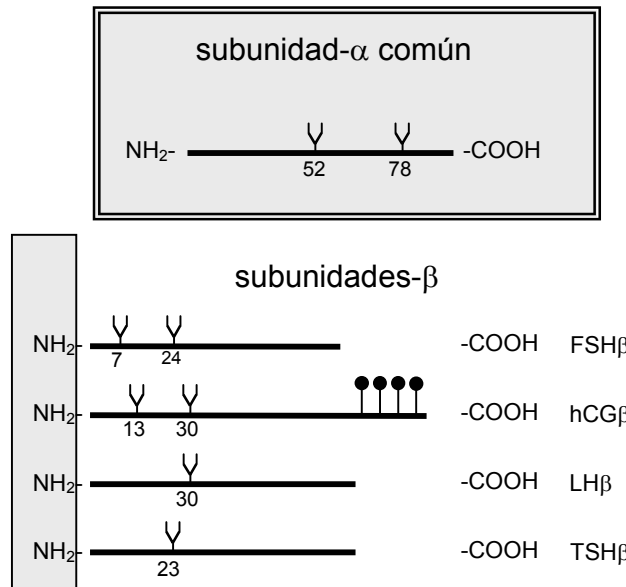


Figura 4.- Sitios de glicosilación en las hormonas glicoprotéicas humanas. Las cadenas de proteínas están indicadas por las barras horizontales, los oligosacáridos *N*-ligados por las estructuras ramificadas y los *O*-ligados por círculos negros. Los números indican los residuos de aminoácidos receptores de los oligosacáridos [19].

Una vez unido el carbohidrato a la glicoproteína, comienza el remodelamiento en la estructura básica del oligosacárido mediante substituciones laterales y terminales por la acción de enzimas específicas. Estas enzimas se agrupan en familias, basadas principalmente en el tipo de azúcar que transfieren. Por ejemplo, la *N*-acetil galactosaminiltransferasa, *N*-acetil glucosaminiltransferasa y galactosiltransferasa adicionan *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y galactosa (Gal) respectivamente. De igual forma, las sulfotransferasas y sialiltransferasas añaden residuos de sulfato (SO₄) y ácido siálico (AS) respectivamente, en los residuos terminales (GalNAc ó Gal) de las

antenas como uno de los eventos finales del procesamiento de las cadenas de oligosacaridos de las hormonas glicoprotéicas (Fig. 5) [14, 20, 21].

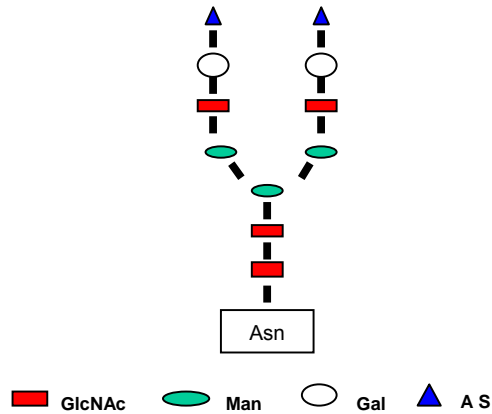


Figura 5.- Esquema de la estructura biantenaria de oligosacaridos unidos a residuos de asparagina de las hormonas glicoprotéicas. N-Acetil glucosamina (GlcNAc), manosa (Man), galactosa (Gal), ácido siálico (AS) [14].

Estas modificaciones dan origen a estructuras heterogéneas, en donde la formación de distintos patrones de ramificación implica una complejidad reflejada en el número variable de antenas terminales posibles, encontrando desde monoantenas hasta tetraantenas sulfatadas, sializadas o ambas, las cuales tienen como objetivo primordial la definición del espacio ocupado por el oligosacárido, la vida media plasmática y la actividad biológica de las glicoproteínas. Además, este remodelamiento permite adquirir una microheterogeneidad molecular, dando lugar a la síntesis y secreción de diferentes isoformas (Fig. 6) [18, 22-25].

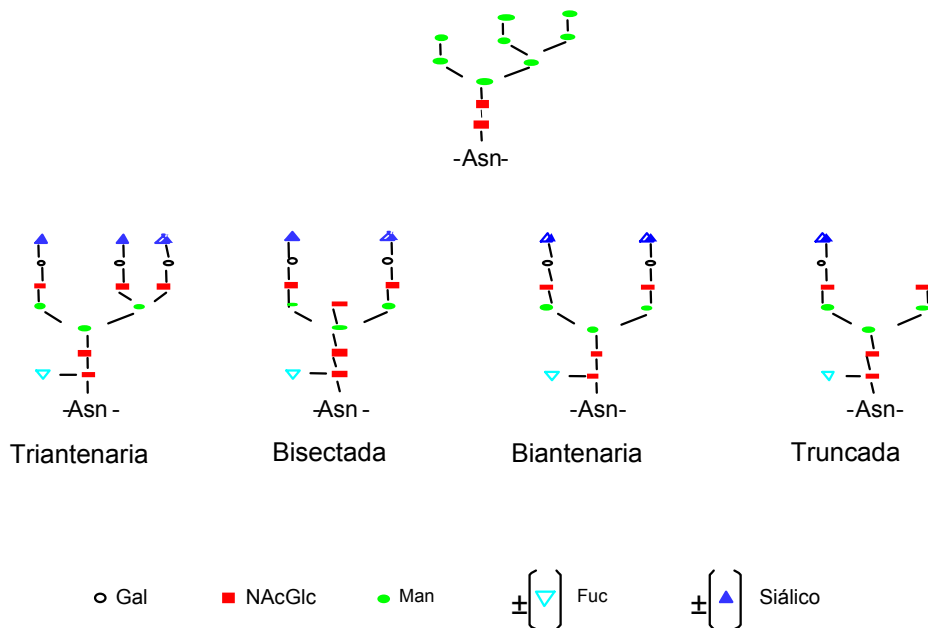


Figura 6.- Representación esquemática de la estructura y de las unidades que componen a las cadenas de oligosacáridos y el tipo de ramificaciones más comunes. N-Acetil glucosamina (GlcNAc), manosa (Man), galactosa (Gal), ácido siálico, fucosa (fuc) [24].

SIALILTRANSFERASAS

Las sialiltransferasas son una familia de enzimas conformada por alrededor de 18 miembros y juegan un papel importante en la biosíntesis de secuencias de oligosacáridos siálicos. Estas enzimas son consideradas glicoproteínas de membrana tipo II generalmente ancladas en el aparato de Golgi y en cuya estructura se distinguen cuatro dominios: 1) uno expuesto hacia el citoplasma, conteniendo el extremo amino terminal, 2) uno transmembranal altamente hidrofóbico, 3) una región denominada “tallo” que es sensible a la proteólisis y 4) un dominio catalítico hacia el luz del aparato de Golgi. Este último contiene el extremo carboxilo terminal. Dentro del dominio catalítico se han identificado

secuencias o regiones de aminoácidos altamente homólogas entre las diferentes sialiltransferasas, a las cuales se les ha denominado como regiones específicas de sialización larga, corta y muy corta (L-sialylmotif, S-sialylmotif y VS-sialylmotif, por sus siglas en inglés) (Fig. 7). Se postula que la L-sialylmotif tiene la función de reconocer el sustrato donador mientras que la S-sialylmotif juega un papel importante en la identificación de la secuencia del oligosacárido aceptor, aunque también en forma parcial reconoce la secuencia del sustrato donador. [26-30].

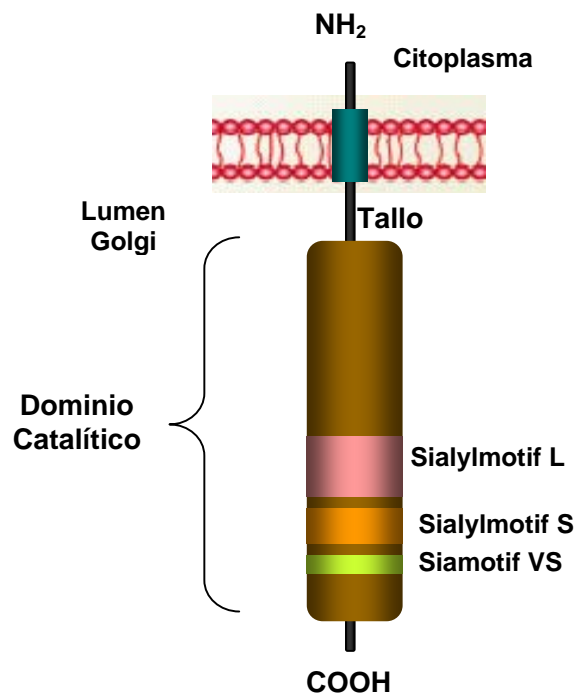


Figura 7. Representación esquemática de la estructura general de las sialiltransferasas.

La función principal de esta familia de enzimas es transferir residuos de ácido siálico a partir de monofosfatos de nucleótidos sializados, como el ácido citosín-monofosfato-*N*-acetilneuramínico (CMP-NeuA) y el guanósín-monofosfato-

N-acetilneuramínico (GMP-NeuA), a las posiciones terminales de los oligosacáridos de las glicoproteínas ligándolos principalmente a residuos de galactosa previendo así que la glicoproteína sea removida de la circulación sanguínea rápidamente. Una característica importante de estas enzimas es su alta especificidad en el reconocimiento de la secuencia de los oligosacáridos aceptores y el carbono anomérico para formar el enlace entre el ácido siálico y el residuo de galactosa [31, 32].

NOMENCLATURA DE LAS SIALILTRANSFERASAS

NOMBRE	ABREVIATURA	ESTRUCTURA FORMADA
Gal β 1,3GalNAc α 2,3 sialiltransferasa	ST3GalI (ST3-O)	Neu5Ac α 2,3 Gal β 1,3GalNAc
Gal β 1,3GalNAc α 2,3 sialiltransferasa	ST3 Gal II	Neu5Ac α 2,3 Gal β 1,3GalNAc
Gal β 1,3/4GlcNAc α 2,3 sialiltransferasa	ST3 Gal III (ST3-N)	Neu5Ac α 2,3 Gal β 1,3GlcNAc Neu5Ac α 2,3 Gal β 1,4GlcNAc
Gal β 1,3GalNAc/ Gal β 1,4GlcNAc α 2,3 sialiltransferasa	ST3 Gal IV (ST3-O/N)	Neu5Ac α 2,3 Gal β 1,3GalNAc Neu5Ac α 2,3 Gal β 1,4GlcNAc
Gal β 1,4GlnNAc α 2,6 sialiltransferasa	ST6GalI (ST6N)	Neu5Ac α 2,6 Gal β 1,4GlcNAc
Gal β 1,3GalNAc α 2,6 sialiltransferasa	ST6GalNAcII	Neu5Ac α 2,6 Gal β 1,3GalNAc
Sia α 2,3 Gal β 1,4(3)GlnNAc α 2,8 sialiltransferasa	ST8Sia II (STX)	Neu5Ac α 2,8 Gal β 1,4(3)GlnNAc
Sia α 2,3 Gal β 1,4GlnNAc α 2,8 sialiltransferasa	ST8Sia III	Neu5Ac α 2,8 Gal β 1,4GlnNAc

TABLA 1. Nombre, abreviatura y estructura formada por algunas sialiltransferasas. [32, 33].

La expresión y actividad de las sialiltransferasas es regulada por diversos mecanismos, que son tejido y célula específicos [34]. Por ejemplo, la expresión de

las isoformas A1, A2, B1, B2, B3 y BX de la sialiltransferasa ST3Gal IV presentan un patrón de expresión tejido específico, ya que isoformas de tipo B se sintetizan en diferentes tejidos mientras que las de tipo A solamente se localizan en testículo, ovario y placenta. De manera particular, la regulación de la transcripción de estas isoformas es a través de la actividad de distintos promotores denominados pA, pB1, pB2, pB3 y pBx, por lo que se ha sugerido que la expresión tejido específico depende de la actividad del promotor presente [35, 36], por ejemplo, se ha demostrado por mutagénesis sitio-dirigida que la regulación transcripcional de la sialiltransferasa ST3Gal IV está controlado por factores transcripcionales específicos como el factor AP2 [37]. En el caso de la placenta, la actividad del promotor pA es fundamental para la expresión de la ST3Gal IV. Por otro lado, también se ha demostrado que algunas hormonas esteroides controlan tanto la actividad como la expresión de las sialiltransferasas por ejemplo, la actividad de la ST6N pero no de la ST3N disminuye en ratas tratadas con dexametasona. Por el contrario, este esteroide incrementa la expresión de la α 2-6 sialiltransferasa en fibroblastos y hepatocitos aislados de ratas adultas [38, 39]. Por otra parte, se ha determinado que existe una disminución en la expresión de la α 2-3 sialiltransferasa en hipófisis de ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol [40, 41], mientras que la hidrocortisona tiene el mismo efecto para la α 2-6 sialiltransferasa en células provenientes de intestino delgado de ratas recién nacidas [34, 42]. En otras estirpes celulares como las células MCF-7 (células de cáncer de mama), el β -estradiol induce un aumento en la expresión de ST3Gal III pero carece de efecto alguno en la expresión de la ST3Gal IV y ST3Gal I [43].

Algunos eventos celulares también se ven influenciados por la actividad de las distintas sialiltransferasas, por ejemplo, 1) durante la diferenciación de las células de neuroblastoma estimuladas con ácido retinoico, en donde la actividad de la sialiltransferasa ST6N se incrementa de manera proporcional al grado de diferenciación [44-46], 2) en los cambios generados durante la plasticidad neural dependientes de una sialización diferencial de miembros de las sialiltransferasas ST3, ST6 y ST8 [47] y 3) en el control de la hemostasis por la estabilización de factores de la coagulación por glicoproteínas como el factor von Willebrand que depende de la actividad diferencial de las sialiltransferasas ST3Gal IV y ST6Gal I [48]. Toda la evidencia anterior sugiere entonces que la regulación de la expresión de las sialiltransferasas se da principalmente de manera diferencial y a nivel transcripcional.

SIALIZACIÓN DE HORMONAS GLICOPROTEICAS

En cuanto a la orientación de los oligosacáridos *N*-unidos a las hormonas glicoproteínas, los resultados de estudios cristalográficos muestran que la proyección de cada uno de ellos es hacia la parte externa de la cadena peptídica de la subunidad α . Únicamente los dos primeros residuos de *N*-acetil glucosamina, y posiblemente también el de manosa, que constituyen el núcleo común de cada oligosacárido de las subunidades α y β , tienen un contacto sustancial con la cadena polipeptídica de la proteína, por lo que las regiones periféricas de estos oligosacáridos aparentemente no interactúan directamente. Por otro lado, los oligosacáridos *N*-unidos de la subunidad β hCG, difieren tanto en la posición como

en los residuos de carbohidratos terminales con respecto a la FSH y TSH, lo cual es importante para la especificidad de cada hormona; comparado con la β LH, la β hCG además de poseer un sitio más de N-glicosilación (Asn13) contiene cuatro sitios de O-glicosilación en el extremo carboxilo y presenta residuos de azúcares siálicos en los oligosacáridos N y O-unidos, mientras que la LH posee residuos terminales sulfatados, esta diferencia tanto estructural como de composición en la glicosilación de la cadena polipeptídica, constituye una evidencia clara del papel funcional que puede jugar cada una de las glicoproteínas [22].

En el caso específico de la gonadotropina coriónica humana sintetizada por trofoblastos en cultivo de placentas normales provenientes del primer y segundo trimestre, así como de muestras de orina de mujeres con embarazo normal, la ramificación de sus oligosacáridos N-unidos en la subunidad α (Asn 58, 78) son del tipo monoantena y biantena (49% y 37% respectivamente) mientras que en la subunidad β (Asn13, 30) predominan las del tipo biantena (50%), aunque también se encuentran del tipo triantena (13%) y monoantena (5%), pero en cada una de ellas el grado de sialización es del 98-100%, es decir, que el último residuo del oligosacárido de cada antena contiene un residuo de ácido siálico. Por el contrario, la hCG producida por células de coriocarcinoma así como de otras enfermedades trofoblásticas, muestran patrones de glicosilación diferentes en los oligosacáridos N-unidos. Por ejemplo, la proporción de oligosacáridos triantenarios en las subunidades α y β de la hCG durante el primer trimestre de un embarazo es del 6.8% y 14%, mientras que en la hCG proveniente de un coriocarcinoma es del

9.8% y 51% respectivamente, por lo que a la hCG hiperglicosilada se le ha denominado antígeno de trofoblasto invasivo (ITA por sus siglas en inglés) [11]. Por otro lado las estructuras tetraantenarias se incrementan hasta en un 60% en la hCG proveniente de células de coriocarcinoma y la proporción es mayor en la mola hidatiforme invasiva [7]. Además, la presencia anormal de oligosacáridos desializados mono y triantenarios es de aproximadamente un 97%, ocasionando que su carga neta sea menos negativa [49].

La gonadotropina coriónica humana secretada a la circulación durante el embarazo, posee múltiples formas moleculares tanto en su estructura polipeptídica como en la composición de sus oligosacáridos. Es conocido que durante las primeras 5 a 6 semanas de gestación, la glicosilación de la hCG sintetizada por la placenta, es semejante a la hCG secretada por células provenientes de coriocarcinomas, es decir, contienen un número de residuos de fucosa mayor en los oligosacáridos biantenarios de la subunidad- β . A partir de la 13^a semana de gestación, el grado de sialización de la hormona disminuye progresivamente, detectándose entre 20 y 30 variantes moleculares. Este cambio se acompaña de un aumento significativo en su depuración plasmática, correlacionándose temporalmente con el rápido incremento en las concentraciones circulantes de progesterona y estradiol. Estos datos sugieren que la disminución y mantenimiento de las concentraciones relativamente bajas de hCG durante el segundo y tercer trimestres del embarazo, podrían deberse no sólo a la disminución en la síntesis de la gonadotropina sino también a los cambios estructurales de sus

oligosacáridos (menor grado de sialización) [50-55], de tal forma que cuando el contenido de ácido siálico disminuye la gonadotropina coriónica se elimina rápidamente de la circulación. A la vez, la disminución del contenido de ácido siálico favorece la acción de la gonadotropina, lo que le permite que pueda conservar la capacidad de activar la transducción de señal e inducir un efecto biológico. Lo anterior permite concluir que la presencia en la circulación de la gonadotropina coriónica con variantes en su grado de sialización, provoca que las células blanco estén expuestas tanto a señales persistentes de baja o mediana intensidad (altamente sializadas) o a señales breves pero de alta intensidad (poco sializadas), que a pesar de su vida media relativamente corta pueden ejercer su función biológica [56].

Se cuenta con información sobre la expresión y síntesis de la hCG, así como de las sialiltransferasas que sializan a este tipo de glicoproteínas [33] y de los mecanismos que controlan las modificaciones post-traduccionales de la glicoproteína antes de ser secretada. Sin embargo, aun no existe información sobre la regulación de la expresión diferencial de la hCG y la sialiltransferasa ST3Gal-IV, además de desconocerse hasta la fecha cuales son las moléculas capaces de inducir la expresión de esta sialiltransferasa en células provenientes de un coriocarcinoma.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se sabe que la diferenciación del citotrofoblasto a sinciotrofoblasto inducida por diferentes señales fisiológicas durante el embarazo humano, está asociado a la síntesis y secreción de la hCG, además ya se ha determinado el patrón de glicosilación/sialización de esta hormona durante la gestación y las enzimas principales que transfieren los carbohidratos a la estructura proteica, sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la expresión tanto de la gonadotropina coriónica humana como de la sialiltransferasa ST3-O/N, una de las enzimas que la sializan. El estudio de los mecanismos que controlan la expresión de la hCG y de la sialiltransferasa ST3-O/N, permitirá por lo tanto, un mejor entendimiento del significado fisiológico de las modificaciones postraduccionales de la hormona durante la gestación.

OBJETIVO

Evaluar los efectos que tiene el análogo 8Br-AMPC sobre la expresión del ARNm que codifica a la sialiltransferasa ST3-O/N y a la subunidad β de la hCG, así como en la secreción de la gonadotropina coriónica en la línea celular BeWo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar los cambios en la expresión de los ARNm de la enzima ST3-O/N y la subunidad β de la hCG durante la diferenciación espontánea del trofoblasto de la línea celular BeWo *in vitro*.
- Correlacionar la expresión de los ARNm de la enzima ST3-O/N y de la subunidad β hCG con respecto al tiempo de incubación en presencia ó ausencia del análogo 8Br-AMPC.
- Cuantificar la secreción de la hCG en el medio de cultivo en las células BeWo estimuladas con el 8Br-AMPC.

HIPÓTESIS

Si el AMPC incrementa la síntesis y secreción de la hCG *in vitro*, entonces este mensajero será capaz de aumentar también la expresión del ARNm que codifica para la sialiltransferasa ST3-O/N, una de las enzimas que sializa a la gonadotropina coriónica humana.

DISEÑO EXPERIMENTAL

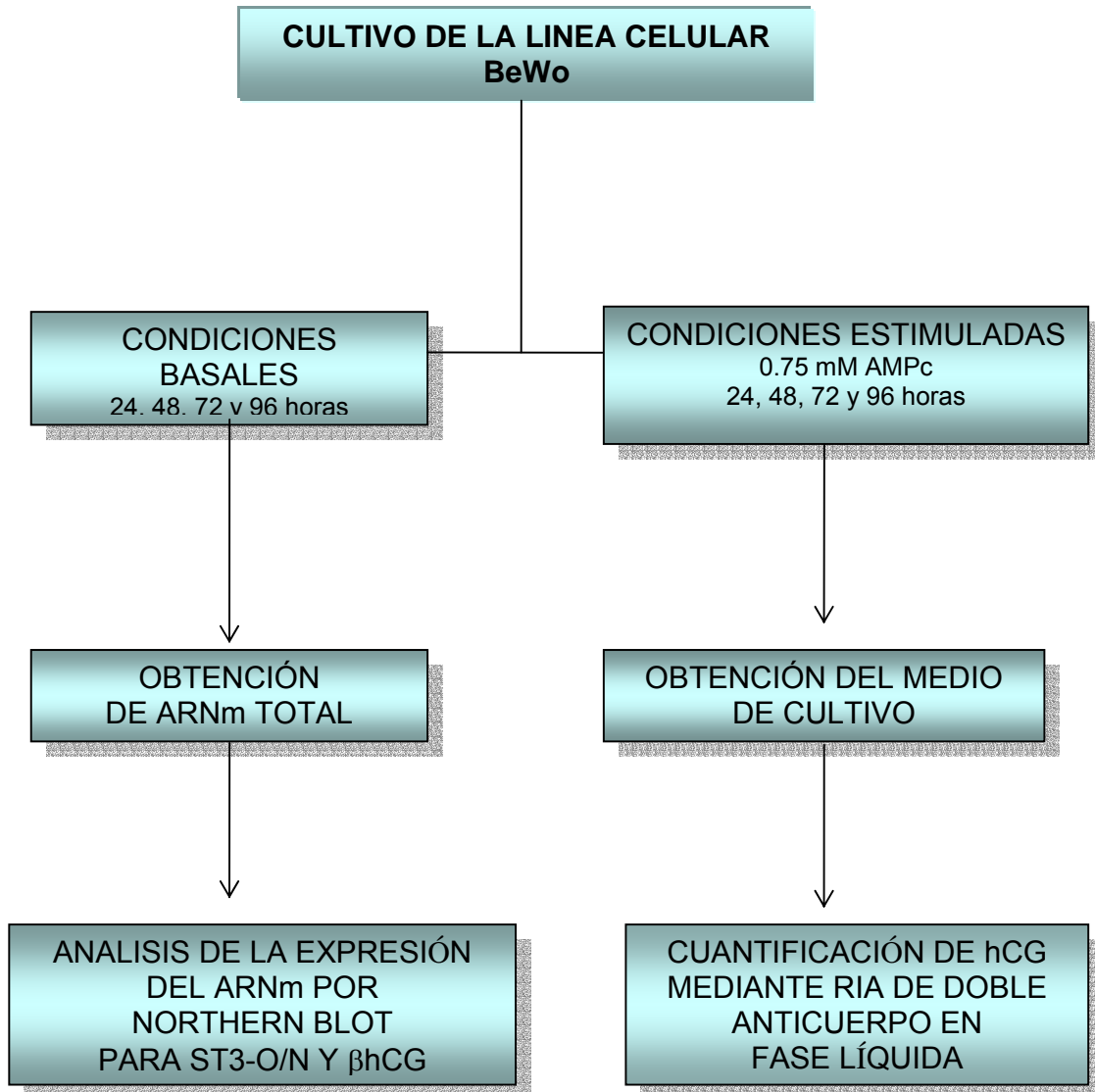


Diagrama de flujo de las fases del diseño experimental seguido en el presente trabajo de investigación.

MATERIAL Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

Para este proyecto se utilizó la línea celular derivada de un coriocarcinoma humano denominada como BeWo (ATCC:CCL98). La morfología de esta línea es de tipo epitelial, siendo principalmente citotrofoblastos que pueden diferenciarse a sinciotrofoblastos. Además, estas células producen progesterona, gonadotropina coriónica, lactógeno placentario, estrógenos, estrona, estriol y estradiol.

Las células BeWo fueron cultivadas en cajas de polipropileno estériles de 75 cm² (Corning Inc., Corning, NY, EUA) utilizando el medio DMEM con alto contenido de glucosa (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA) y complementado suplementado con suero fetal bovino al 10% (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA), piruvato de sodio (1 mM) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA) y una mezcla de penicilina (100 U/ml) estreptomina (100 µg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml) (Invitrogen) (DMEM-S).

Para cada experimento, las células BeWo se despegaron de la caja mediante el uso de una solución que contenía 0.25% de tripsina y 1 mM de EDTA-4Na (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA). A la suspensión celular se le agregaron 10 ml de DMEM-S y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos. Las células BeWo se resuspendieron en 2 mL de DMEM-S, y se tomó una alícuota para contar las células viables en una cámara de Neubauer por el método de exclusión del azul tripano. Posteriormente, las células BeWo fueron sembradas en

placas de 6 pozos con diámetro de 962 mm²/pozo (Corning, NY, EUA) depositando, 1.5 X 10⁶ células/pozo en 2 mL de DMEM-S. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora Forma Scientific Modelo 3158 (Forma Scientific Inc., Marietta, OH, EUA) a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y después de 16 horas se estimularon con 8Br-AMPc 0.75 mM; durante 24, 48, 72 y 96 horas. Transcurridos los tiempos de estimulación se procedió a la recolección de los sobrenadantes y a la lisis celular para la obtención de ARN total.

Para los experimentos de dosis-respuesta, las células BeWo se incubaron por 48 horas en presencia de las siguientes concentraciones del análogo 8Br-AMPc: 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 mM (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO EUA). Transcurrido cada tiempo de estimulación, se recolectaron los medios de incubación y se extrajo el ARN total de las células.

RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

La cuantificación de la hCG en los medios de cultivo se realizó por la técnica del RIA siguiendo el método descrito por Sufi y cols. [57]. Se utilizó una preparación altamente purificada de hCG como estándar (hCG CR 127) proporcionada por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica. Este mismo estándar se empleó como trazador al ser marcado con ¹²⁵I siguiendo el método de la cloramina T [58]. Brevemente, se radiomarcaron 2.5 µg de hCG CR-127 con 1 mCi de I¹²⁵ utilizando 1 mg/mL de cloramina T como agente oxidante durante 30 segundos, deteniendo la reacción con 50 µL de

metabisulfito de sodio (2 mg/mL) y 200 μ L de una solución que contenía ioduro de potasio (10 mg/mL) y sacarosa (160 mg/mL). La hormona radiomarcada fue separada mediante una columna de cromatografía en sephadex G-100, colectando fracciones de 1 mL. La radioactividad de cada fracción se cuantificó en un contador de radiaciones gamma Wallac Wizard modelo 1470 (PerkinElmer Inc., Boston, MA, EUA) y aquellas fracciones correspondientes a la hormona radiomarcada se almacenaron a -20° C hasta su uso posterior. Para la determinación de hCG se utilizó el anticuerpo de conejo anti-hCG H-180 batch # 2 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) a una dilución final de 1:25,000, obteniéndose un porcentaje de unión entre el 30 y el 40%. Para la precipitación del inmunocomplejo se utilizó un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo (obtenido en suero de burro inmunizado), a una dilución de 1:15 en PBS-polietilenglicol al 8%. Las concentraciones del estándar partieron de 0.65 ng hasta 66.66 ng/mL. De manera general, 100 μ L de medio de cultivo se diluyeron en 300 μ L de amortiguador de fosfatos que contenía 0.1% (PBS-Gel) y a esta mezcla de reacción se le adicionaron 13,000 cpm de la hCG marcada radioactivamente y el primer anticuerpo. Los tubos de reacción se incubaron a 4°C durante 18 horas al término de las cuales se agregaron 200 μ L del segundo anticuerpo e incubando durante 18 horas a 4°C. por ultimo, la reacción se detuvo añadiendo 1 mL de agua fría, seguido de centrifugación a 3,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se cuantificó la radioactividad de los inmunocomplejos precipitados en el contador de radiaciones gamma.

EXTRACCIÓN DE ARN

Se aisló el ARN total de las células BeWo utilizando una solución comercial TRIZol (Invitrogen) de acuerdo al método descrito por el fabricante. Brevemente, la técnica consistió en añadir 1 ml del reactivo por cada 1.5×10^6 células, seguido de la adición de 200 μ L de cloroformo y agitación durante 15 segundos. A continuación se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos a 4° C, para obtener tres fases, una inferior que contenía la fase orgánica, una intermedia conteniendo las proteínas y una superior acuosa que contenía el ARN total. A partir de esta fase acuosa se precipitó en ARN con la adición de 0.5 ml de isopropanol dejando reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se realizó un lavado con etanol al 75%, seguido nuevamente de una centrifugación a 7,500 x g durante 5 minutos y finalmente se resuspendió en agua tratada con DEPC mediante incubación a 50°C durante 5 minutos. La concentración de ARN total se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

SONDAS DE HIBRIDIZACIÓN PARA NORTHERN BLOT

Las sondas de hibridización utilizadas fueron diseñadas y sintetizadas en nuestro laboratorio con base en la estructura primaria del ADNc reportado previamente [59], utilizando la técnica de retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir del ARN mensajero obtenido de placentas humanas. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR se muestran en la tabla 2.

Nombre	Secuencia
ST3-O/N sentido	5'- CAC ACT CCT CGT CCT GGT AGC -3'
ST3-O/N antisentido	5'- GGA CGT GAG GTT CTT GAT AGC -3'
GAPDH sentido	5'- TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT -3'
GAPDH antisentido	5'- GTG GTG GAC CTC ATG GCC CAC ATG -3'
β hCG sentido	5'-ATG GTG GTG TTG ACG GTG ATG-3'
β hCG antisentido	5'-G AGT CGT CGT CGT TGT CAT CGT-3'

TABLA 2. Secuencia de oligonucleotidos empleados en la construcción de las sondas para la sialiltransferasa ST3-O/N, β hCG y como sonda de normalización gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Las sondas fueron marcadas radioactivamente utilizando el estuche comercial Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, EUA) de acuerdo al método descrito por el fabricante. Brevemente, se desnaturalizaron 32 ng de ADNc a 95° C por 5 minutos que posteriormente se colocaron en hielo. El ADNc desnaturalizado se mezcló con 50 μ Ci de [α -³²P]dCTP y una perla de reacción que contenía amortiguador, dATP, dGTP, dTTP, enzima DNA polimerasa (fragmento Klenow) y oligodeoxribonucleotidos al azar. Esta solución se incubó durante 1 hora a 37° C y se detuvo la reacción con 5 μ L de EDTA 0.2 M (pH=8). Finalmente se purificaron las sondas marcadas utilizando una columna de Sephadex G-50 (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, EUA).

NORTHERN BLOT

Se separaron 15 µg de los ARN's obtenidos por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.0% conteniendo formaldehído al 6%. Previamente las muestras se secaron al vacío durante 25 minutos en el Savant DNA120 Speed Vac (Thermo Electron Corp., Milford, MA, EUA) y se resuspendieron mediante calentamiento a 70° C durante 10 minutos en 1.2 µL de HEPES-EDTA 3X (buffer 1) y 2.3 µL de formaldehído al 6% más formamida (buffer 2). Al término de este período se adicionaron 0.85 µL del buffer de carga que contenía 322 µL de buffer 1, 400 mg de sacarosa, 5 mg de xileno-cianol, 5 mg de verde bromocresol y 0.1µL de Bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/mL. Finalmente las muestras fueron depositadas en los pozos del gel. La electroforesis se realizó durante 2 horas a 90 Volts constantes utilizando una solución amortiguadora HEPES-EDTA 1X con formaldehído al 6%. La integridad de los ARN's se observó con luz UV.

Una vez finalizada la electroforesis, los ARN's fueron transferidos por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, EUA) utilizando una solución de 10X SSC (solución salina de citratos) durante toda la noche. Los ARN's transferido fueron fijados por entrecruzamiento mediante la exposición de ambos lados de la membrana a radiación ultravioleta utilizando un aparato UV-stratalinker 1800 (Stratagene Corp., La Jolla, CA EUA).

La membrana con el ARN fijado fue incubada en un horno de hibridación "Big Shot" modelo 230400 (Boeckel Scientific, Feasterville, PA, EUA) toda la

noche a 65°C en solución de prehibridación (0.25 M Na₂HPO₄ pH 7.2 y SDS 7%). Al término de este tiempo, se reemplazó la solución de prehibridación con la solución de hibridación (0.25 M Na₂HPO₄ pH 7.2, SDS 7%) más 16 ng de la sonda marcada previamente y desnaturalizada a 95°C. La hibridación con la sonda se realizó durante 18 horas a 65°C con agitación constante en el horno de hibridación. Finalizada la hibridación, las membranas fueron lavadas cuatro veces en agitación constante a 55° C; dos veces con una solución de SSC 1X con 0.1% de SDS y dos veces más con otra solución de SSC 0.2X con SDS al 0.1%. Terminados los lavados las membranas se expusieron a una película autorradiográfica Kodak Biomax MS (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA) y después de un tiempo promedio de 14 horas la película fue revelada. Las bandas de los ARNm fueron analizadas con el programa Labworks Analysis Software (UVP Inc., Upland, CA, EUA) y los resultados se expresan en unidades arbitrarias como la densidad óptica del ARNm problema/densidad óptica del ARNm de la GAPDH (este último usado como gen de referencia). El incremento se determinó asignando de manera arbitraria el valor de 1 a la expresión a las 24 horas de cultivo.

ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico de las variables experimentales se realizó usando el programa estadístico Sigma Stat para Windows, Versión 2.0 (Jandel Corp., EUA) con el cual se hicieron las pruebas de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, seguida del método de Dunnett para comparaciones múltiples. En dichas pruebas, el límite

máximo permitido del valor alfa (α) fue de 0.05 y el valor expresado como p es la significancia existente en cada caso.

RESULTADOS

PRODUCCIÓN DE hCG Y EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA SUBUNIDAD β de la hCG Y ST3-O/N POR LAS CÉLULAS BeWo EN CONDICIONES BASALES

La secreción de la hCG al medio de cultivo por las células BeWo fue evaluada por la técnica de RIA. La producción de la hCG se incrementó diariamente hasta alcanzar un máximo a las 96 horas de cultivo, tiempo en el que se obtuvo un incremento estadísticamente significativo con respecto al control (Fig. 8).

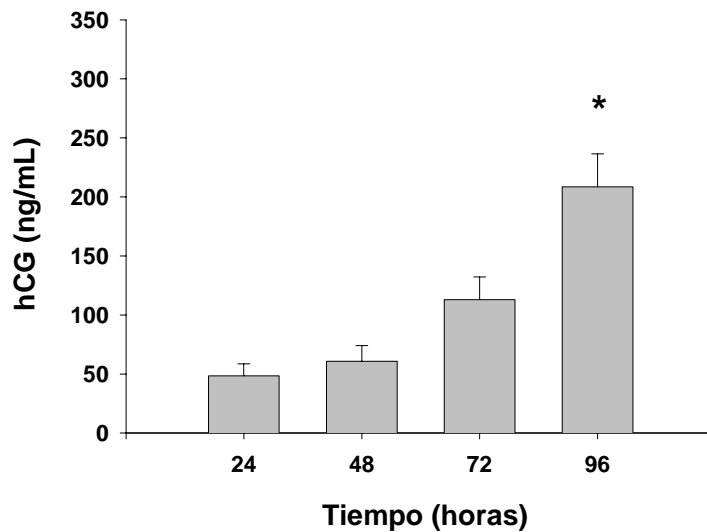


Figura 8. Secreción de la hCG al medio de cultivo por células BeWo en condiciones basales. Cada barra representa la media \pm EE de tres diferentes experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ con respecto a las 24 horas.

A diferencia de la secreción de hCG, la expresión del ARNm de la subunidad β de la hCG mostró una disminución significativa a partir de las 48 horas de cultivo (Fig. 9a). Por su parte, la expresión del ARNm de la ST3-O/N

aumento de manera dependiente del tiempo de cultivo, obteniéndose un máximo a las 96 horas. Aunque este incremento no fue estadísticamente significativo (Fig. 9b).

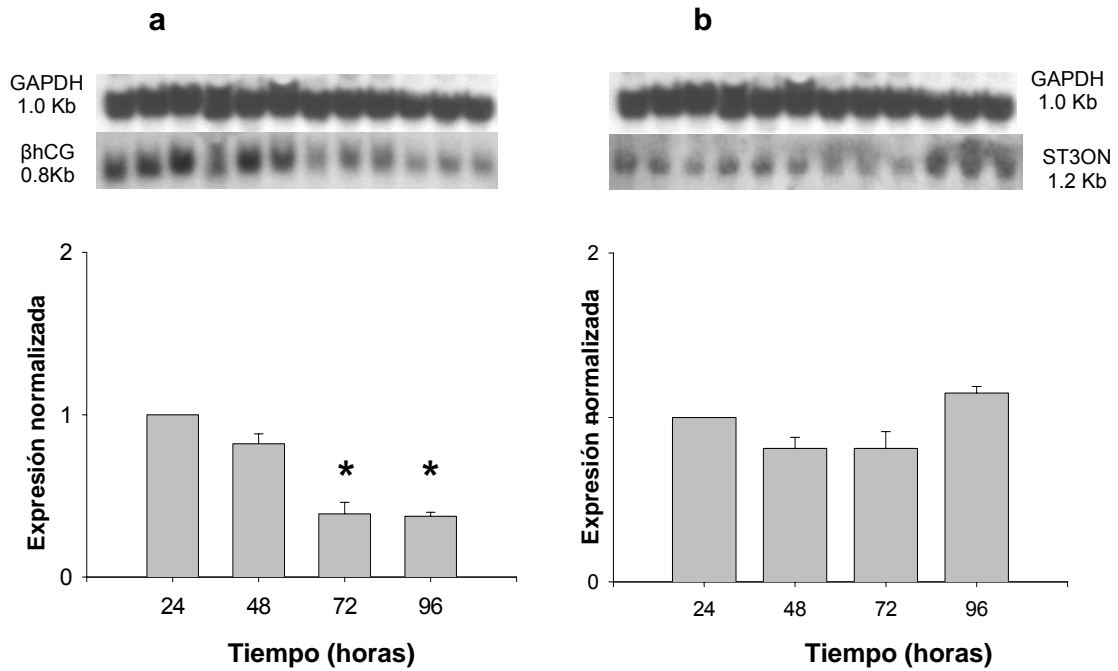


Figura 9. Expresión de la subunidad β hCG (a) y de ST3-ON (b) en células BeWo durante condiciones basales. Panel superior Northern blot representativo. Los niveles del ARNm fueron cuantificados y normalizados como se indica en la sección de material y métodos. Cada barra representa la media \pm EE de 3 diferentes experimentos realizados por triplicado. La prueba de Dunnnett mostró diferencia significativa (* $p < 0.05$), con respecto a las 24 horas.

EFEECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 8Br-AMPc EN LA PRODUCCIÓN DE hCG Y EN LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA β hCG y ST3-ON POR LAS CÉLULAS BeWo

Los resultados de la estimulación de células BeWo con 8Br-AMPc mostraron aumento estadísticamente significativo en la producción de la hCG con respecto a los controles. Este incremento fue dosis dependiente y alcanzó un máximo con 0.5 mM de 8Br-AMPc (Fig. 10).

En lo referente a la expresión de la β hCG y la ST3-ON se observó un incremento significativo en forma dosis dependiente. En ambos casos el máximo incremento se obtuvo con la dosis de 1.0 mM del 8Br-AMPc (Fig. 11).

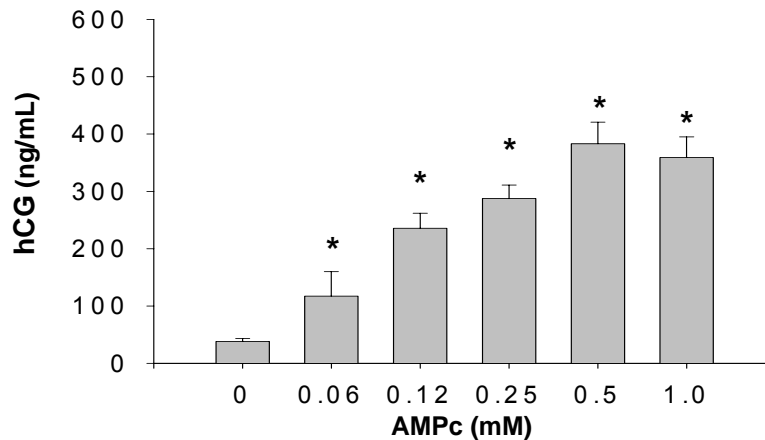


Figura 10. Secreción de la hCG al medio de cultivo a partir de células BeWo incubadas en presencia de 8Br-AMPc durante 48 horas. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.05$, con respecto al control 0 mM.

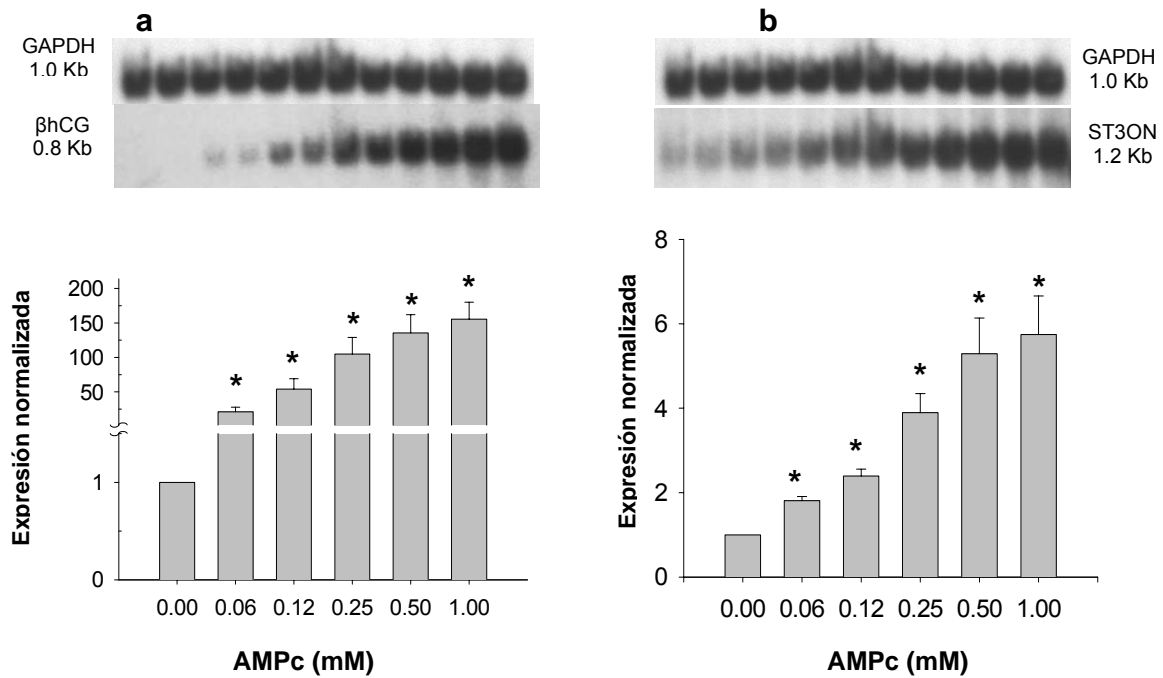


Figura 11. Expresión de la subunidad β hCG (a) y de ST3-O/N (b) en células BeWo incubadas en presencia de 8Br-AMPC durante 48 horas. Panel superior Northern blot representativo. Los niveles del ARNm fueron cuantificados y normalizados como se indica en la sección de material y métodos. Cada barra representa la media \pm EE de 3 diferentes experimentos realizados por duplicado. La prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunnett mostró diferencia significativa (* $p < 0.05$) con respecto al control 0 mM).

EFFECTO DEL 8Br-AMPC SOBRE LA SECRECIÓN DE LA hCG Y LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA β hCG y ST3-O/N EN CÉLULAS BeWo A DIFERENTES TIEMPOS.

La síntesis y secreción de la hCG en las células que no fueron estimuladas presentó un incremento similar al observado en condiciones basales. La producción de la hormona fue mayor en las células que se incubaron en presencia de 0.75 mM 8Br-AMPC con respecto al control de cada tiempo (Fig. 12).

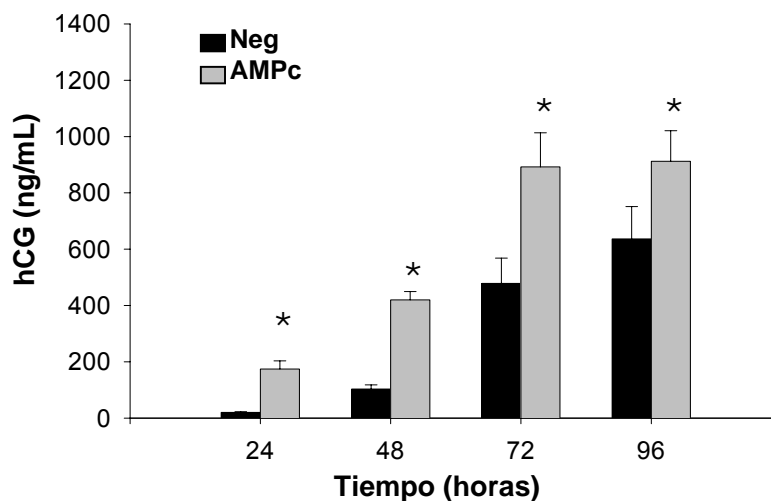


Figura 12. Secreción de hCG al medio de cultivo a partir de células BeWo incubadas en presencia y ausencia de 0.75 mM 8Br-AMPC durante 96 horas. Cada barra representa la media \pm EE de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.05$ con respecto a cada control.

Los resultados de la estimulación de células BeWo con 0.75 mM de 8Br-AMPC mostraron aumento significativo en la expresión de la β hCG y la ST3-O/N con respecto a sus controles de cada tiempo. En el caso de la β hCG la respuesta

máxima fue a las 48 horas de cultivo (Fig. 13a), mientras que para la ST3-O/N el incremento máximo fue a las 24 horas de cultivo (Fig. 13b).

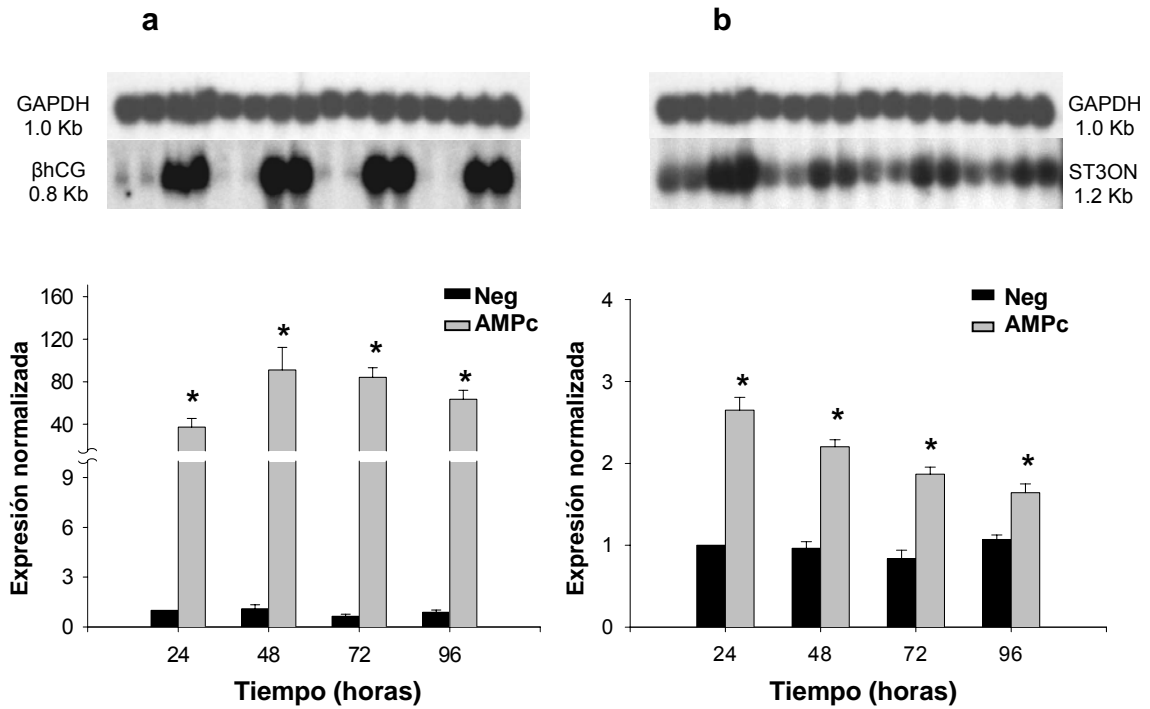


Figura 13. Expresión de la subunidad β de la hCG (a) y de ST3-O/N (b) en células BeWo incubadas en presencia y ausencia de 0.75 mM 8Br-AMPC durante 96 horas. Panel superior Northern blot representativo. Los niveles del ARNm de cada molécula fueron cuantificados y normalizados como se indica en la sección de material y métodos. Cada barra representa la media ± EE de 3 diferentes experimentos realizados por duplicado. La prueba de Mann-Whitney mostró diferencia significativa (* $p < 0.05$) con respecto a cada control.

DISCUSIÓN

Estudios previos empleando un sistema de cultivo de trofoblastos humanos *in vitro*, en el cual se pueden reproducir los eventos citoplasmáticos y funcionales que ocurren durante la gestación temprana, se ha demostrado que estas células secretan diferentes formas de la hCG durante su diferenciación morfológica y funcional [55], es decir, que las moléculas de la hCG más sializadas y por lo tanto más ácidas son detectadas en etapas tempranas del embarazo y durante la diferenciación morfológica y funcional del trofoblasto, mientras que por el contrario, en etapas tardías, la gonadotropina coriónica está menos glicosilada y el contenido de ácido siálico es menor. Estas observaciones indican que las isoformas de la hCG identificadas en muestras de suero y orina de mujeres con embarazos normales pueden deberse a cambios en los patrones de glicosilación de la gonadotropina coriónica conforme el proceso de gestación progresa [53, 60].

Actualmente, las líneas celulares provenientes de trofoblastos humanos constituyen un buen modelo para el estudio *in vitro* de la regulación de la expresión de genes que están involucrados en la glicosilación de las gonadotropinas, como la hCG. El uso de estas células inmortalizadas evita muchas de las dificultades que se tienen al aislar un tipo celular específico del tejido placentario y permite experimentar en el cultivo primario. Entre las líneas celulares provenientes de coriocarcinomas se encuentran las células BeWo, que además de presentar la característica fenotípica de formación de sincicios, producen una hCG similar a la sintetizada por trofoblastos normales [49]. Además, se ha demostrado que estas células responden de manera similar a los cultivos

primarios de trofoblastos humanos y de explantes placentarios a la estimulación con análogos del AMPc, incrementando la síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica humana así como el proceso de diferenciación funcional [3, 61]. Una de las características importantes por la que se eligió a la línea celular BeWo, es la hiperglicosilación de la hCG sintetizada por estas células. Actualmente, ya se ha determinado la estructura de los oligosacáridos N-unidos de las subunidades α y β de la hCG proveniente de trofoblastos normales los cuales poseen una estructura de monoantena y biantena mientras que los oligosacáridos de la hCG provenientes de células de un coriocarcinoma además de las estructuras anteriores se encuentran ramificaciones del tipo triantena. [7, 49, 51]. Las razones anteriores hacen a las células BeWo un modelo excelente que permite determinar la influencia del AMPc en la regulación de la expresión de la sialiltransferasa ST3-O/N que adiciona residuos de AS a los oligosacáridos N-unidos de esta hormona, así como la expresión de la subunidad β de la hCG y la secreción de la gonadotropina sintetizada por el trofoblasto,.

La diferenciación del trofoblasto a sinciotrofoblasto se ha asociado a la síntesis y secreción de diversas hormonas, incluyendo la hCG [62]. Aunque a la fecha se conoce el patrón de glicosilación/sialización de esta hormona durante la gestación y las enzimas principales que transfieren los carbohidratos a la estructura proteica [63], aun se desconocen los mecanismos moleculares que regulan de manera diferencial tanto la expresión de la hormona como de las enzimas que la sializan. En este sentido se ha postulado que es la sialiltransferasa

ST3-O/N, la que principalmente se encarga de incorporar residuos de AS a la estructura glicoprotéica de la hormona, evento que ocasiona en gran medida parte de las modificaciones post-traduccionales de la gonadotropina. También se sabe que la expresión de la hCG en el trofoblasto durante la gestación puede ser inducida por diferentes señales fisiológicas que regulan la expresión de la ST3-O/N, lo que incrementa la complejidad para el entendimiento de los procesos de síntesis, modificaciones post-traduccionales y secreción de la glicoproteína [4, 43].

En trabajos previos, se informó de la capacidad de citotrofoblastos aislados de placentas humanas para sincicializarse y sintetizar la hCG de manera espontánea después de 48 horas de cultivo [64]. Además, al coestimular los citotrofoblastos con hCG y el oligodeoxinucleótido antisentido para el receptor de hCG/LH, resultó en una inhibición de la diferenciación de manera tiempo y dosis-dependiente [62]. Los resultados del presente trabajo mostraron que de igual manera las células BeWo son capaces de producir a la hCG en condiciones basales. Esta producción se incrementa con el tiempo, sugiriendo un mecanismo autocrino regulado por la misma hormona para favorecer la sincicialización de estas células.. Por otra parte, resalta de manera interesante que la expresión basal de la subunidad β en células BeWo disminuyó con respecto al tiempo. Estos datos se pueden interpretar como la regulación autocrina negativa a concentraciones elevadas de la hCG, en donde la misma hCG desestabiliza los transcritos de su subunidad β hCG, y por lo tanto ocasiona una disminución de la expresión de su mRNA [16].

Los mecanismos o factores que regulan la expresión tanto de la hCG como de la ST3-O/N en el trofoblasto humano son hasta el momento desconocidos. Las variaciones en la glicosilación que ocurren a lo largo del embarazo así como en condiciones *in vitro*, sugieren la existencia de un mecanismo de regulación fino de la expresión y síntesis de esta gonadotropina y de las enzimas que la sializan, el cual podría estar influido por una o varias de las hormonas secretadas por la placenta, la madre o el feto durante diferentes estadios de gestación. En cuanto a las vías intracelulares de señalización que podrían estar utilizando estos reguladores, resaltan de manera importante aquellas que son dependientes del incremento de AMPc, ya que se ha demostrado que esta molécula estimula la producción de la hCG en cultivos primarios de trofoblasto humanos [61].

Los resultados de este trabajo mostraron que el estímulo con AMPc promueve la diferenciación celular y el aumento en la expresión del ARNm de la β hCG, así como la síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica humana en células BeWo, de manera similar a lo observado en estudios previos y en trofoblastos humanos normales [3, 61, 65]. Sin embargo, nuestros datos sugieren, que un aumento en la expresión de la ST3-O/N precede al aumento en la expresión y síntesis de la hCG. Esta propuesta es apoyada por los experimentos en donde se estudió el efecto del 8Br-AMPc a diferentes tiempos, observándose que el incremento del ARNm de la enzima antecedió por 24 horas a la expresión de la β hCG. Esta relación temporal es de importancia para la correcta síntesis y secreción de la hormona, ya que la sialiltransferasa ST3-O/N adiciona residuos de

ácido siálico a la porción terminal no reductora de un oligosacárido siendo un evento postraducciona l que forma parte de la última modificación de la gonadotropina antes de su secreción [59]. Esta modificación influye sobre características importantes de la hCG las cuales dependen de la secuencia, estructura, conformación y grado de sialización de sus oligosacáridos, ya que es conocido que desde etapas tempranas en el proceso de modificaciones co- y postraduccionales de la cadena peptídica, el correcto ensamblaje de las cadenas de oligosacáridos dictará en gran parte, la asociación con chaperonas, el tránsito a través del retículo endoplásmico, el correcto plegamiento tridimensional, la formación de puentes disulfuro y la unión no covalente de las dos subunidades [9, 66-69]. Más aún, esta relación temporal entre la expresión de la ST3-O/N y la β hCG tiene efectos importantes en la secreción de la hormona, dado que se ha demostrado que una glicosilación/sialización deficiente permite acumular intracelularmente formas no maduras que son susceptibles a la endo β -hexosaminidasa H, la cual degrada la cadena de oligosacáridos [63].

A pesar de que en los resultados descritos en este trabajo generaron información importante acerca de la regulación en la expresión temporal de la ST3-O/N y la β hCG en las células BeWo, pero aun quedan incógnitas que deben ser contestadas. Tal es el caso de los factores endocrinos y/o paracrinos capaces de inducir el mismo efecto que el AMPc, los cuales aún no han sido descritos. Por otra parte, el estudio de los mecanismos que controlan la expresión diferencial y temporal de la hCG y de la ST3-O/N, permitirá un mejor entendimiento del

significado fisiológico de las modificaciones postraduccionales de la hormona durante la gestación.

CONCLUSIÓN

Las líneas celulares de trofoblastos derivadas de coriocarcinomas proveen un excelente modelo *in vitro*, para el estudio de la función endocrina de células de la placenta humana.

En la línea celular BeWo, el AMPc incrementa la expresión del ARNm de la sialiltransferasa ST3-O/N. Además, la expresión de la subunidad β de la hCG también aumenta en respuesta al análogo del AMPc. Por otro lado y en respuesta a la estimulación con AMPc, las células BeWo secretan mayor cantidad de la gonadotropina coriónica humana.

Por todo lo anterior, podemos decir que el AMPc juega un papel muy importante en la regulación de la expresión de la sialiltransferasa ST3-O/N así como en la subunidad β de la hCG en la línea celular BeWo, además el comportamiento endocrino de estas células fue similar a un trofoblasto normal. Por lo que los resultados obtenidos en este trabajo pueden proporcionar información valiosa de lo que sucede en los trofoblastos humanos durante el transcurso del embarazo.

REFERENCIAS

1. Carlson BM. Embriología humana y biología del desarrollo. Madrid, España: Harcourt, S.A.; 2000.
2. Loke AW, King A. Human implantation: cell biology and Immunol. Great Britain: Cambridge University Press; 1995.
3. Ringler G, Strauss III JF. *In vitro* systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr. Rev.* 1990; 11: 105-123.
4. Ogren L, Talamantes F. The placenta as an endocrine organ: polypeptides. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reprod.*, vol. 2, segunda ed. New York, USA: Raven Press, Ltd; 1994: 875-945.
5. Hay DL. Discordant and variable production of human chorionic gonadotropin and its free α - and β -subunits in early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1985; 61: 1195-1200.
6. Bonduelle ML, Dodd R, Liebaers I, Van Steirteghem A, Williamson R, Akhurst R. Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod* 1988; 3: 909-914.
7. Amano J, Nishimura R. Comparative study of the mucin-type sugar chains of human chorionic gonadotropin present in the urine of patients with trophoblastic diseases and healthy pregnant women. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 1157-1165.
8. Sugahara T, Pixley MR, Fares F, Boime I. Characterization of the O-glycosylation sites in the chorionic gonadotropin β subunit *in vivo* using site-directed mutagenesis and gene transfer. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 20797-20804.
9. Matzuk MM, Keene JL, Boimé I. Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 2409-2414.
10. Willey K. An elusive role for glycosylation in the structure and function of reproductive hormones. *Hum. Reprod. Update* 1999; 5: 330-355.
11. Cole LA, Khanlian SA, Sutton JM, Davies S, Stephens ND. Hyperglycosylated hCG (Invasive Trophoblast Antigen, ITA) a key antigen for early pregnancy detection. *Clin Biochem.* 2003; 36: 647-655.

12. Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, Ozaki N, Sauer M, Lindheim S, Cohen M, Kelly A, Schlatterer J, O'Connor JF. Differential expression of human chorionic gonadotropin (hCG) glycosylation isoforms in failing and continuing pregnancies: preliminary characterization of the hyperglycosylated hCG epitope. *J Endocrinol.* 2002 172: 497-506.
13. Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, O'Connor JF. Early pregnancy human chorionic gonadotropin (hCG) isoforms measured by an immunometric assay for choriocarcinoma-like hCG. *J Endocrinol.* 1999; 161: 99-106.
14. Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. Biophys. Acta* 1988; 947: 287-306.
15. Falcone T, Little AB. Placental Polypeptides. In: Tulchinsky D, Little AB (eds.), *Maternal-Fetal Endocrinology*, segunda ed. Philadelphia, U.S.A.: W.B. Saunders Company; 1994.
16. Licht P, Cao H, Lei Z, Rao CV, Merz W. Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology* 1993; 133: 3014-3025.
17. Helenius A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. of the Cell* 1994; 5: 253-265.
18. Kleene R, Berger EG. The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim. et Biophys. Acta* 1993; 1154: 283-325.
19. Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reprod Biomed Online* 2000; 1: 48-62.
20. Paulson JC, Colley KJ. Glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 17615-11768.
21. Bousfield GR, Perry WM, Ward DN. Gonadotropins: Chem. and biosynthesis. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reprod.*, vol. 2, Segunda ed. New York: Raven Press L.T.D.; 1994: 1749-1792.
22. Smith PL, Kaetzel D. The sialylated oligosaccharides of recombinant bovine lutropin modulated hormone bioactivity. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 874-881.
23. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of Follicle-Stimulating hormone. *Endocrine* 1999; 11: 205-215.

24. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, Nayudu P. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 379-389.
25. Ulloa-Aguirre A, Midgley AJ, Beitins I, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev.* 1995; 16: 765-787.
26. Wen DX, Livingston BD, Medsihradzky KF, Kelm S, Burlingame AL, Paulson JC. Primary structure of Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3 sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 21011-21019.
27. Jeanneau C, Chazalet V, Soumpasis DM, Harduin-Lepers A, Delannoy P, Imberty A, Breton C. Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 13461-13468.
28. Datta AK, Paulson JC. The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 1497-1500.
29. Datta AK, Sinha A, Paulson JC. Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 9608-9614.
30. Gillespie W, Kelm S, Paulson JC. Cloning and expression of the Gal β 1,3GalNAc α 2,3 sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 21004-21010.
31. Kitagawa H, Mattei M-G, Paulson JC. Genomic organization and chromosomal mapping of the Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1,4NAcGlc α 2,3-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 931-938.
32. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi M-A, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 2001; 83: 727-737.
33. Kitagawa H, Paulson JC. Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 17872-17878.
34. Maguire TM, Coughland CM, Seckl JR, Breen KC. The effect of corticosteroids on serum sialyltransferase enzyme activities in the rat. *Biochim. et Biophys. Acta* 1998; 1379: 23-28.

35. Taniguchi A, Morishima T, Tsujita A, Matsumoto A, Matsumoto K. Genomic structure, expression and transcriptional regulation of human Gal β 1,3 GalNAc α 2,3 sialyltransferase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 300: 570-576.
36. Kang N-A, Park A-D, Choi H-J, Kim K-S, Lee A-C, Kim C-H. Regulatory elements involved in transcription of the human NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α 2,6-sialyltransferase. *Mol. Cells* 2004; 18: 157-162.
37. Taniguchi A, Matsumoto K. Epithelial-cell-specific transcriptional regulation of human Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1,4GlcNAc α 2,3 sialyltransferase (hST3Gal IV) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 257: 516-522.
38. Vandamme V, Pierce A, Verbert A, Delannoy P. Transcriptional induction of beta-galactoside alpha-2,6- sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone. *Eur. J. Biochem.* 1993; 211: 135-140.
39. Wang X, Smith T, Lau J. Transcriptional regulation of the liver beta-galactoside alpha 2,6- sialyltransferase by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 17849-17853.
40. Damian-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernandez C, Timossi C, Ulloa-Aguirre A. Oestrogen regulate pituitary α 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J. Mol. Endocrinol.* 1999; 23: 153-165.
41. Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damian-Matsumura P, Timossi C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch. Med. Res.* 2001; 32: 520-532.
42. Hamr A, Delannoy P, Verbert A, Kolinska J. The hydrocortisone-induced transcriptional down-regulation of beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase in the small intestine of suckling rats is suppressed by mifepristone (RU-38.486). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997; 60: 59-66.
43. Peyrat J-P, Recchi M-A, Hebbar M, Pawlowski V, Hornez L, Dong-Lebouhris X, Hondermarck H, Harduin-Lepers A, Delannoy P. Regulation of sialyltransferase expression by estradiol and 4-OH-tamoxifen in the human breast cancer cells MCF-7. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2000; 3: 48-52.
44. Georgopoulou N, Breen KC. Retinoic acid induction of sialyltransferase activity in neuroblastoma cells of differing sialylation potentials. *Glycoconj. J* 2000; 17: 781-786.

45. Taniguchi A, Hioki M, Matsumoto K. Transcriptional regulation of human Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1,4GlcNAc α 2,3-sialyltransferase (hST3Gal IV) gene in testis and ovary cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 301: 764-768.
46. Wang P-H, Li AF, Juang C-M, Lee A-R, Chao H-T, Tsai A-C, Yuan C-C. Altered mRNA expression of sialyltransferases in squamous cell carcinomas of the cervix. *Gynecol. Oncol.* 2001; 83: 121-127.
47. Okabe A, Tawara A, Masa T, Oka T, Machida A, Tanaka T, Matsuhashi H, Shiosaka S, Kato K. Differential expression of mRNAs for sialyltransferase isoenzymes induced in the hippocampus of mouse following kindled seizures. *J. Neurochem.* 2001; 77: 1185-1197.
48. Ellies LG, Ditto D, Levy GG, Wahrembrock M, Ginsburg D, Varki A, Le DT. Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 10042-10047.
49. Mizouchi T, Nishimura R, Derappe C, Taniguchi T, Hamamoto T, Mochizuki M, Kobata A. Structures of the Asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin produced in choriocarcinoma. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 14126-14129.
50. Mock P, Kovalevskaya G, O'Connor JF, Campana A. Choriocarcinoma-like human chorionic gonadotropin (hCG) and hCG bioactivity during the first trimester of pregnancy. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 2209-2214.
51. Elliot MM, Kardana A, Lustbader JW, Cole LA. Carbohydrate and peptide structure of the α - and β -subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine* 1997; 7: 15-32.
52. Diaz-Cueto L, Mendez J, Barrios de Tomassi J, Lee J-A, Wide L, Veldhuis J, Ulloa-Aguirre A. Amplitude regulation of episodic release *in vitro* Biol. to immunological ratio and median charge of human chorionic gonadotropin in pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 78: 890-897.
53. Diaz-Cueto L, Barrios de Tomassi J, Timossi C, Mendez JP, Ulloa-Aguirre A. More *in-vitro* bioactive, shorter-lived human chorionic gonadotropin charge isoforms increase at the end of the first and during the third trimesters of gestation. *Mol. Hum. Reprod.* 1996; 2: 643-650.
54. Wide L, Lee J-A, Rasmussen C. A change in the isoforms of human chorionic gonadotropin occurs around the 13th week of gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 78: 1419-1423.

55. Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Cravioto A, Grotjan E, Damian-Matsumura P, Espinoza R. Studies of the microheterogeneity of chorionic gonadotropin secreted by the human cytotrophoblast in cultures. *Hum. Reprod.* 1990; 5: 661-669.
56. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Mendez J. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? I. Gonadotrophins are synthesized and released in multiple molecular forms. A matter of fact. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 599-604.
57. Sufi SB, Donalson A, Jeffcoate SL. World health organization special programme of research development and research training in human reproduction. Programme for the prevention of matched reagents for radioimmunoassays of hormones in reproductive physiology. Geneva, Switzerland: WHO; 1986.
58. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ^{131}I labeled human growth of high specific radioactivity. *Biochem. J* 1963; 89: 114.
59. Kitagawa H, Paulson JC. Cloning of a novel $\alpha 2,3$ sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 1394-1401.
60. Skarulis MC, Wehmann RE, Nisula BC, Blithe DL. Glycosylation changes in human chorionic gonadotropin and free alpha subunit as gestation progresses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 75: 91-96.
61. Feinman MA, Kliman HJ, Caltabiano S, Strauss III JF. 8-bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblast in culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986; 63: 1211-1217.
62. Yang M, Lei ZM, Rao CV. The central role of Human Chorionic Gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 2003; 144: 1108-1120.
63. Hanover JA, Elting J, Mintz GR, Lennarz WJ. Temporal aspects of the *N*- and *O*-glycosylation of human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 10172-10177.
64. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss III JF. Purification, characterization and in vitro differentiation of cytotrophoblast from human term placentae. *Endocrinology* 1986; 118: 1567-1582.
65. Burton W, David M, Hans G, Schwartz AL. Modulators of cyclic AMP Metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp. Cell. Res.* 1990; 186: 306-316.

66. Datta AK, Chammas R, Paulson JC. Conserved cysteines in the sialyltransferases sialylmotifs form an essential disulfide bond. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 15200-15207.
67. Xia H, Puett D. Identification of conserved aminoacids residues in the β subunit of human choriogonadotropin important in holoprotein formation. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 17944-17953.
68. Feng W, Matzuk MM, Mountjoy K, Bedows E, Ruddon RW, Boime I. The asparagine-linked oligosaccharides of the human chorionic gonadotropin β subunit facilitate correct disulfide bond pairing. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 11851-11859.
69. Blithe DL. *N*-Linked oligosaccharides on free α interfere with its ability to combine with human chorionic gonadotropin β -subunit. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 21951-21956.