

**ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA MUTACIÓN
THBD - p.Trp153Gly IDENTIFICADA EN PACIENTES CON ABORTO
ESPONTÁNEO RECURRENTE**

DIANA CAROLINA SIERRA-DÍAZ

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ, D.C., 2018**

**ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA MUTACIÓN
THBD - p.Trp153Gly IDENTIFICADA EN PACIENTES CON ABORTO
ESPONTÁNEO RECURRENTE**

DIANA CAROLINA SIERRA – DÍAZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar al título
MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA**

DIRECTOR

PAUL LAISSUE HORMAZA MD., MSc., PhD.

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ D.C., 2018**

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“La Universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

**ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA MUTACIÓN
THBD - p.Trp153Gly IDENTIFICADA EN PACIENTES CON ABORTO
ESPONTÁNEO RECURRENTE**

DIANA CAROLINA SIERRA – DÍAZ

APROBADO

PAUL LAISSUE HORMAZA MD., MSc., PhD.

DIRECTOR

JURADO

JURADO

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y a Pablo por su compañía, paciencia y apoyo. Sin ellos cumplir este logro no habría sido posible.

A la vida por darme la oportunidad de realizar la maestría.

A la Dra. Dora Fonseca por sus enseñanzas y consejos, tanto académicos como personales durante todo el proceso.

Al Dr. Paul Laissue por su asesoría y apoyo, por su exigencia que forma el carácter.

A mis profesores de la maestría por sus enseñanzas y por ser personas ejemplares.

A mis amigas que siempre fueron incondicionales y me apoyaron para lograr este objetivo.

Tabla de contenido

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 El aborto espontáneo recurrente	4
2.1.1 Etiología	4
2.2 Fisiología de la implantación embrionaria	7
2.3 Aproximaciones para la identificación de genes y mutaciones etiológicas de enfermedades monogénicas, poligénicas y multifactoriales	9
2.3.1 El Análisis de ligamiento	10
2.3.2 El estudio de asociación del genoma completo (Genome Wide Association Studies - GWAS)	12
2.3.4 Identificación de loci de rasgos cuantitativos (<i>Quantitative Trait Loci</i> – QTL)..	13
2.3.5 La secuenciación de siguiente generación (Next Generation Sequencing - NGS)	18
2.4 THBD (trombomodulina).....	20
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivo específico	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Análisis de la localización subcelular de THBD.....	27
5.1.1 Amplificación por PCR de la región codificante del gen <i>THBD</i>	27
5.1.2 Clonaje en vector de expresión pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO y transformación en bacterias <i>E. coli</i> quimiocompetentes (One Shot Top 10 - Invitrogen)	28
5.1.3 Cultivo celular y transfección.....	30
5.1.4 Fijación de las láminas y ensayo GFP	31
6. RESULTADOS.....	33
6.1 Localización subcelular de THBD.....	33

7. DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	38
9. REFERENCIAS	39
10. ANEXO 1.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias en el protocolo de cruce que conduce a la generación de RIS y RCS	15
Figura 2. Esquema de los dominios y las regiones de THBD.	20
Figura 3. Transfección de la línea celular CHO con las construcciones THBD WT – GFP y THBD p.Trp153Gly – GFP	33
Figura 4. Fenotipos observados y conteo celular THBD WT – GFP	34
Figura 5. Fenotipos observados y conteo celular THBD p.Trp153Gly - GFP.....	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers de amplificación del ORF de <i>THBD</i>	27
Tabla 2. Condiciones de la PCR para la amplificación del ORF de <i>THBD</i>	28
Tabla 3. Mezcla del clonaje.....	28
Tabla 4. Primers PCR de colonia THBD - GFP.....	29
Tabla 5. Condiciones PCR de colonia THBD - GFP.....	29
Tabla 6. Primers secuenciación THBD - GFP	30
Tabla 7. Cálculos para la transfección para 6 réplicas	31

ANEXOS

ANEXO 1: Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. Laissue P, Lakhal B, Vatin M, Batista F, Burgio G, Mercier E, Santos ED, Buffat C, Sierra-Diaz DC, Renault G, Montagutelli X, Salmon J, Monget P, Veitia RA, Méhats C, Fellous M, Gris JC, Cocquet J, Vaiman D. Open Biology. Octubre 19 de 2016.

RESUMEN

El AER es una patología compleja caracterizada por la pérdida de dos o más embarazos de manera consecutiva antes de la semana 24 de gestación. Constituye una de las complicaciones más frecuentes del primer trimestre del embarazo.

En un estudio previo (2017) de nuestro grupo, mediante NGS fue identificada la variante c.457T>G (p.Trp153Gly) en el gen *THBD*, en estado heterocigoto, en una paciente colombiana con AER. Este gen codifica para una proteína que se localiza en la membrana citoplasmática de las células endoteliales, y se encuentra involucrada en la regulación de la coagulación mediante la interacción con la trombina, y en la inmunomodulación a través del dominio lectina – like (aminoácido 31 – aminoácido 169), el cual interactúa con la proteína HMGB1 y el carbohidrato de Lewis.

Con el objetivo de evaluar el potencial efecto de la variante c.457T>G (p.Trp153Gly) en la función de THBD, se realizó un ensayo *in vitro* de localización subcelular en células CHO, por medio de la expresión de las proteínas *wild type* (WT) y mutante, marcadas con GFP en el extremo C - terminal. Se encontraron diferencias en la localización subcelular. La proteína WT se localizó de manera predominante en la membrana citoplasmática, mientras que la mutante se localizó perinuclearmente. De acuerdo con los resultados obtenidos, esta diferencia en la localización subcelular podría afectar el adecuado funcionamiento de la proteína, ya que se encontró mayoritariamente en un compartimento celular diferente a la membrana citoplasmática, evitando la interacción con las proteínas HMGB1 y el carbohidrato de Lewis.

1. INTRODUCCIÓN

El AER es una patología caracterizada por la pérdida de dos/tres o más embarazos de manera consecutiva antes de la semana 24 de gestación (definición de la Sociedad Americana para Medicina Reproductiva, y de ESHRE y RCOG) (Diejomaoh et al., 2015; Perez et al., 2016). Afecta entre el 1% y el 5% de las parejas activamente reproductivas, y constituye una de las complicaciones más frecuentemente desarrolladas en el primer trimestre del embarazo (Diejomaoh et al., 2015; Labarrere et al., 1992). El AER se ha asociado a diversos factores etiológicos como las anomalías anatómicas uterinas, endocrinas, autoinmunes y las alteraciones genéticas. Sin embargo, entre un 40% y un 60% de los casos son de causa desconocida. Algunos de ellos podrían ser explicados por alteraciones en genes relacionados con procesos biológicos necesarios para el desarrollo normal del embarazo (Diejomaoh et al., 2015; Vaiman et al., 2015).

En el año 2017, nuestro grupo identificó una variante en el gen *THBD* en una paciente colombiana con AER (Quintero-Ronderos et al., 2017). Este gen codifica para una proteína que se localiza en la membrana citoplasmática de las células endoteliales, y se encuentra involucrada en la regulación de la coagulación mediante la interacción con la trombina, y en la inmunomodulación a través del dominio lectina – like (aminoácido 31 – aminoácido 169), el cual interactúa con la proteína HMGB1 y el carbohidrato de Lewis. Previamente, en el año 2014 fueron descritos diversos modelos murinos con deficiencias en la función de este gen. Los fenotipos observados fueron hipercoagulabilidad y letalidad embrionaria temprana (Weiler, 2004; Weiler-Guettler et al., 1998).

En el presente trabajo de tesis se evaluó el efecto de la variante c.457T>G (p.Trp153Gly) en la función de THBD. Se realizó un ensayo *in vitro* de localización subcelular en células CHO, por medio de la expresión de las proteínas *wild type* (WT) y mutante, marcadas con GFP en el extremo C - terminal. Se encontraron diferencias en la localización subcelular. La proteína WT se localizó de manera predominante en la membrana citoplasmática, mientras que la proteína mutante se localizó perinuclearmente. De acuerdo con los resultados obtenidos, esta diferencia en la localización subcelular podría afectar el

adecuado funcionamiento de la proteína, ya que se localizó mayoritariamente en un compartimiento celular diferente a la membrana citoplasmática.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El aborto espontáneo recurrente

El aborto espontáneo recurrente (AER) se ha definido clínicamente de distintas formas. La Sociedad Europea para la Reproducción Humana y Embriología (European Society for Human Reproduction and Embryology – ESHRE) y el Colegio Real de Ginecólogos y Obstetras (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists – RCOG) lo definen como tres o más abortos espontáneos consecutivos, mientras que la Sociedad Americana para Medicina Reproductiva (American Society for Reproductive Medicine) lo define como dos o más abortos espontáneos (Diejomaoh et al., 2015; Pereza et al., 2016). El AER adicionalmente se clasifica como temprano cuando sucede antes de la semana 10 de gestación, lo cual ocurre en la mayoría de casos de AER, y es definido como tardío cuando tiene lugar después de la semana 10 de gestación, principalmente antes de la semana 15 a 16 de gestación. (Branch et al., 2010).

La definición que se va a tener en cuenta en este trabajo identifica al AER como la pérdida del embarazo que ocurre antes de la semana 24 de gestación en dos o más ocasiones (Pereza et al., 2016). El AER afecta entre el 1% y el 5% de las parejas activamente reproductivas, y constituye una de las complicaciones más frecuentemente desarrolladas en el primer trimestre del embarazo. El AER no sólo genera un efecto físico en la mujer que sufre el aborto sino también un efecto emocional (Diejomaoh et al., 2015; Labarrere et al., 1992).

2.1.1 Etiología

El AER es una patología en la que se han asociado diferentes factores etiológicos identificables. Sin embargo, entre un 40% y un 60% de los casos son de causa desconocida (Diejomaoh et al., 2015). Los factores etiológicos principales son las anomalías anatómicas uterinas, endocrinas, autoinmunes y las alteraciones genéticas. Algunos de los casos de causa desconocida podrían ser explicados por alteraciones en genes relacionados con

procesos biológicos necesarios para el desarrollo normal del embarazo (Vaiman et al., 2015).

Las alteraciones anatómicas uterinas (También denominadas anomalías Müllerianas) ocurren como consecuencia de la formación o fusión fallida de los conductos Müllerianos durante el proceso de embriogénesis (Sadro et al., 2015). La incidencia de estos defectos en la población general es del 2% al 3%. Las mujeres que sufren AER durante el primer trimestre de gestación tienen una incidencia de defectos uterinos entre el 5% y el 10%, y la incidencia es de hasta el 25% cuando el AER sucede en el segundo trimestre de la gestación (Reichman et al., 2010).

Las anomalías Müllerianas se clasifican en: el útero bicorne ocasionado por la fusión incompleta de los conductos müllerianos, el útero unicornio (el cual representa un defecto en la fusión lateral), el útero septado que sucede cuando hay una falla en la resorción del septo interno entre las cavidades uterinas, y el útero didelfo en el que hay una falla completa en la fusión de los dos conductos Müllerianos resultando en la duplicación del cérvix (Buttram et al., 1979). Todas estas anomalías uterinas afectan el proceso de implantación del embrión produciendo la pérdida del embarazo. Sin embargo, la anomalía más frecuentemente encontrada en pacientes con AER es el útero septado, el cual es susceptible de manejo quirúrgico (Sadro et al., 2015).

Los factores etiológicos endocrinos hacen referencia a desequilibrios o alteraciones en la regulación de procesos metabólicos asociados al desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus o el hipotiroidismo, las cuales, cuando no se encuentran bajo control farmacológico, se asocian con el AER (Diejomaoh et al., 2015). Durante el embarazo ocurren diversos cambios en la regulación del metabolismo. Por ejemplo, la función tiroidea principalmente se encuentra regulada por el suministro de yodo. Por otra parte, durante la gestación la regulación de la función tiroidea depende de la hormona gonadotropina coriónica humana (hGC) producida por el embrión en desarrollo, la cual regula los niveles de la hormona T4 maternos y fetales (Crawford et al., 2016).

La hGC se une a los receptores de la hormona luteínizante en el cuerpo lúteo, lo que implica un incremento en la producción de estradiol. Posteriormente, el estradiol estimula

la síntesis de Globulina Fijadora de Tiroxina (GFT) en el hígado, generando, un aumento de 1.5 a 2 veces los niveles durante el embarazo. La GFT se une a la hormona T4 produciendo una disminución en los niveles de T4 libre biológicamente activa. La hGC tiene homología estructural con la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), permitiendo su unión a los receptores de TSH en las células epiteliales tiroideas maternas y estimulando la producción de T4. Mujeres con antecedentes de hipotiroidismo, son incapaces de compensar los requerimientos de hormona tiroidea necesarios durante la gestación. Por este motivo, se deben aumentar las dosis de hormona tiroidea suplementaria en estas pacientes para lograr mantener un nivel adecuado de TSH (Crawford et al., 2016).

Además de los cambios en el metabolismo de las hormonas tiroideas durante el embarazo, se ha demostrado que la hormona T4 materna atraviesa la barrera placentaria. El incremento en los niveles de esta hormona durante el primer trimestre de gestación, son importantes para el proceso de implantación y desarrollo del embrión, ya que la hormona T4 estimula la producción de Factor de Crecimiento Epidérmico por parte del trofoblasto, lo cual regula el crecimiento placentario (Contempre et al., 1993; Matsuo et al., 1993). Esto explica que las mujeres con alteraciones en la función tiroidea presenten de manera frecuente AER.

Dentro de las enfermedades autoinmunes asociadas con AER encontramos el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y el síndrome antifosfolípido, entre otras. En general estas enfermedades se caracterizan por la producción de auto-anticuerpos y por lo tanto pueden afectar la fertilidad en general (Carp et al., 2012). El Síndrome Antifosfolípido, se caracteriza por la producción de auto-anticuerpos en contra de los fosfolípidos cargados negativamente, como los anticuerpos anticardiolipina y el anticoagulante lúpico. Las manifestaciones clínicas de este síndrome son los eventos tromboembólicos, la trombocitopenia y el AER (Shurtz-Swirski et al., 1993). Estos auto-anticuerpos pueden afectar procesos de adhesión entre el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto debido a que las células del citotrofoblasto expresan fosfolípidos. Además, pueden lesionar el trofoblasto independientemente de la presencia de trombosis, mediante la formación de un complejo IgG (auto-anticuerpo) – β 2GP1 (Cofactor), el cual activa la producción de citoquinas (Carp et al., 2012).

Las alteraciones genéticas que ocasionan AER involucran cambios en el material genético materno, paterno y fetal. Los cambios genéticos paternos (padre y madre, los cuales pueden ser *de novo* o heredados) se asocian con cambios en el cariotipo, representados por las alteraciones estructurales como translocaciones recíprocas y Robertsonianas balanceadas, inversiones y la presencia de heterocromatina en el cromosoma 9. Las alteraciones cromosómicas estructurales se desarrollan frecuentemente durante el proceso de espermatogénesis. También pueden presentar estado de portador de enfermedades autosómicas recesivas o estar afectados por enfermedades de herencia autosómica dominante y por la presencia de variantes que afectan la función de genes relacionados con procesos fisiológicos como la coagulación o el metabolismo de los folatos.

En los embriones o fetos las alteraciones genéticas pueden ser *de novo* (mayoría de los casos) o heredadas, al igual que sucede con las causas genéticas paternas. Dentro de las alteraciones genéticas se encuentran las alteraciones cromosómicas. Se estima que ocasionan un 50% de las pérdidas del embarazo durante el primer trimestre. Las alteraciones cromosómicas numéricas (86% de AER ocasionados por alteraciones cromosómicas), como las aneuploidías, son la consecuencia de errores disyuncionales durante la ovogénesis en mujeres de edad avanzada (mayores de 40 años). Otra causa de alteraciones cromosómicas numéricas son los errores en la fecundación (digamia, dispermia y diandria) que producen poliploidías. Las alteraciones cromosómicas estructurales (8% de AER ocasionados por alteraciones cromosómicas) como las translocaciones recíprocas y Robertsonianas desbalanceadas y los mosaicismos cromosómicos (6% de AER ocasionados por alteraciones cromosómicas) también generan AER (Caseiro et al., 2015; Kacprzak et al., 2016; Stephenson et al., 2006).

2.2 Fisiología de la implantación embrionaria

El embarazo es un proceso complejo e irreversible en el que suceden eventos como la implantación, la decidualización, la placentación y finalmente el nacimiento. (Atwood et al., 2016; Cha et al., 2012). La probabilidad de concepción en cada ciclo menstrual es de aproximadamente el 30%, y solo entre el 50% y el 60% de las concepciones superan la

semana 20 de gestación. De las gestaciones que terminan en aborto, el 75% están ocasionados por fallas en la implantación (Norwitz et al., 2001).

La fertilización sucede en la trompa de Falopio 24 – 48 horas después de la ovulación. Los estadios iniciales del desarrollo (Cigoto a mórula) se desarrollan durante esta etapa. La mórula ingresa a la cavidad uterina 2 – 3 días después de la fertilización. La transformación de mórula a blastocisto involucra diversas modificaciones como la aparición de la cavidad interna en la masa celular, la diferenciación celular en donde las células de la superficie dan origen al trofoblasto (citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto) a partir del cual se van a formar estructuras extraembrionarias, incluyendo la placenta, y la masa celular interna que da origen al embrión (Norwitz et al., 2001).

La implantación embrionaria es el proceso mediante el cual el embrión se orienta, se adhiere e invade el tejido endometrial materno. Este proceso inicia 6 a 7 días después de la fertilización. Para que se desarrolle la implantación se requiere un endometrio receptivo, un blastocisto funcionalmente normal y una adecuada comunicación entre ellos (Valles et al., 2006). El endometrio es receptivo a la implantación embrionaria solo por un periodo de tiempo específico, día 6 – día 10 después de la ovulación. Adicionalmente se requiere sincronía entre éste y el desarrollo del blastocisto (Cha et al., 2012). La receptividad endometrial evidencia cambios histológicos como por ejemplo el aumento en la vasculatura, en el edema, en la actividad secretora de las glándulas endometriales y el desarrollo de pinopodios en la superficie luminal del epitelio.

Adicionalmente, se requieren modificaciones en la expresión hormonal para que el endometrio adquiera la capacidad de ser receptivo. Durante la fase preovulatoria se incrementa la secreción de 17β – estradiol favoreciendo la proliferación y diferenciación de las células epiteliales uterinas. El cuerpo lúteo produce progesterona estimulando la proliferación y diferenciación de las células estromales (Norwitz et al., 2001). Posteriormente, se expresan en el endometrio moléculas de adhesión como las integrinas, las selectinas, glicoproteínas (MUC1), factores de crecimiento, citoquinas y factores inflamatorios que favorecen el proceso de aposición (Staun-Ram et al., 2005).

El embrión humano ingresa en la cavidad uterina como un blastocisto no eclosionado. Mas adelante eclosiona (pérdida de la zona pelúcida), la masa celular interna se localiza hacia el sitio de adhesión ubicado en el fondo uterino y se genera una adhesión inestable entre el blastocisto y la cavidad uterina (aposición). En el siguiente estadio, se observa adhesión estable que ocurre en los días 6 – 7 después de la ovulación (ventana de implantación), se incrementan las interacciones físicas entre el blastocisto y el epitelio uterino por medio del aumento en la expresión de moléculas como las selectinas, la trofinina, las cadherinas, entre otras, cuyo objetivo es favorecer la interacción célula - célula. Inmediatamente después, por medio de la secreción de metaloproteinasas y la expresión de sus receptores, adicional a las moléculas previamente mencionadas y con la activación de la apoptosis de las células endometriales maternas por medio de la vía FASL (Expresado por las células del trofoblasto) y FAS (Expresado por las células epiteliales endometriales), el sincitiotrofoblasto invade el epitelio uterino (Fukuda et al., 2012; Norwitz et al., 2001; Staun-Ram et al., 2005; van den Brule et al., 2005).

2.3 Aproximaciones para la identificación de genes y mutaciones etiológicas de enfermedades monogénicas, poligénicas y multifactoriales

Las enfermedades de origen genético pueden ser clasificadas como cromosómicas, monogénicas, poligénicas y multifactoriales (combinación de factores genéticos y ambientales – Enfermedades complejas) (Scriver et al., 1999). La causa de las enfermedades cromosómicas, ya fue descrita previamente en el contexto de la etiología del AER, por esta razón a continuación se describirán brevemente las enfermedades monogénicas y multifactoriales.

Las enfermedades monogénicas también son denominadas clásicamente como mendelianas debido a que su tipo de herencia se fundamenta en las leyes de segregación descritas por Mendel. La primera ley de Mendel formula que “el cruce entre dos organismos homocigotos para dos alelos en un locus conduce a una descendencia (generación F1) genéticamente idéntica, heterocigota para este alelo. No importa cual de los dos homocigotos es macho o hembra (Ley de la uniformidad y reciprocidad)”. La segunda ley

de Mendel es denominada ley de la segregación y de la pureza de los gametos. “Cuando los heterocigotos F1 se cruzan entre ellos, se segregan varios genotipos. La mitad de ellos son heterocigotos y un cuarto son homocigotos para cada alelo parental”. En la tercera ley de Mendel se describe que “cuando se cruzan dos organismos que difieren en más de un par de genes, cada par de genes se segrega de manera independiente. La proporción de la segregación resultante sigue la ley estadística de la segregación independiente” (Voguel & Motulsky et al., 2009).

Las enfermedades monogénicas son causadas por disfunciones (e.g. mutaciones) en un único gen. Son clasificadas como dominantes cuando hay una mutación en un alelo presentando el fenotipo y recesivas cuando la mutación se encuentra en ambos alelos presentando el fenotipo. Se han identificado eventos que modifican la herencia mendeliana como la penetrancia incompleta, la heterogeneidad genética, la expresividad variable y los genes modificadores, entre otros (Voguel & Motulsky et al., 2009).

Las enfermedades genéticas multifactoriales se definen como patologías en las que se presenta el efecto de múltiples genes y variantes, y adicionalmente se evidencia un efecto ambiental. Generalmente no existe una segregación alélica y fenotípica predicha por las leyes de Mendel. Ambos factores, genético y ambiental, contribuyen a la expresión del fenotipo. En la etiología del AER, en algunos casos esta patología puede ser considerada como multifactorial de rasgos cuantitativos (Rowe et al., 2012; Womack et al., 2012).

Es fundamental identificar los loci asociados a las enfermedades complejas, para posteriormente, mediante el mapeo fino de la región cromosómica, poder identificar los genes asociados al fenotipo. Se han realizado diversas aproximaciones como por ejemplo, los análisis de ligamiento especialmente en familias, los estudios de asociación del genoma completo (Genome Wide Association Studies - GWAS) y el mapeo de QTLs (Quantitative Trait Loci - QTL) (Rowe et al., 2012; Womack et al., 2012).

2.3.1 El Análisis de ligamiento

Esta aproximación se define como la observación de la cosegregación de marcadores genéticos que están en desequilibrio de ligamiento con las regiones donde se encuentran los

genes asociados a un fenotipo. Los marcadores genéticos se localizan en diferentes cromosomas, permitiendo la identificación de una región particular del genoma, loci, donde se ubican los genes asociados a un rasgo de interés.

Se fundamenta en un modelo de herencia de genotipos y fenotipos observados en un pedigree. Este es uno de los métodos que permite realizar el mapeo genético mediante la obtención de distancias génicas expresadas en unidades de recombinación (centiMorgan – cM. Un cM corresponde a un millón de pares de bases en la especie humana) (Lander et al., 1994; Pulst, 1999; Voguel & Motulsky et al., 2009).

El desequilibrio de ligamiento (DL) se refiere a la combinación no aleatoria de alelos en diferentes loci en un cromosoma, que sucede con una frecuencia mayor a la esperada por el azar (Ott et al., 2011; Pulst, 1999). Por ejemplo, alelos que se encuentran en un mismo cromosoma, pero en diferentes loci, pueden no cumplir la ley de la segregación independiente, tampoco sufrir el proceso de recombinación (observado en las diferentes generaciones de las familias estudiadas en el análisis de ligamiento) y ser segregados conjuntamente durante el proceso de meiosis. Esto sucede por la cercanía física que hay entre ellos. En este caso, estos alelos se encuentran en desequilibrio de ligamiento (Ferreira, 2004; McEwan et al., 2009; Ott et al., 2011; Pulst, 1999; Voguel & Motulsky et al., 2009).

La probabilidad de DL es medida mediante la fracción de recombinación en términos logarítmicos, también denominada LOD score (Logarithm of the Odds –LOD score). El cálculo del LOD score es el logaritmo de la probabilidad de que los loci estén ligados, dividido por la probabilidad de que los loci no estén ligados. Por convención, un LOD score mayor de 3 evidencia ligamiento cuando se han evaluado entre 100 – 300 marcadores genéticos polimórficos. Para realizar el análisis de LOD score es necesario tener variables genéticas conocidas, como la penetrancia de la enfermedad, la frecuencia de las variables implicadas y una adecuada fenotipificación de los individuos afectados vs los no afectados. De lo contrario, el LOD score y por consiguiente el cálculo de la localización del gen asociado a la enfermedad, resultarán alterados (Pulst, 1999).

La genotipificación de los individuos estudiados en los análisis de ligamiento se realiza por medio de los marcadores genéticos (polimorfismos que ocurren de manera natural en la

secuencia del ADN) como los RFLPs (restriction fragment length polymorphisms – RFLPs), los microsatélites o STRs (Short Tandem Repeats – STRs) o los SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms – SNPs). Actualmente los marcadores genéticos más utilizados en este tipo de análisis son los STRs y los SNPs. Estos marcadores cumplen con ciertas características que permiten su uso en el análisis de ligamiento.

Los STRs son multialélicos, esto aumenta la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto y por lo tanto, se pueda discriminar si el marcador fue heredado del padre o de la madre. Sin embargo, factores como la tasa de mutación del marcador pueden influenciar el poder de detección del DL. Los SNPs representan el polimorfismo más frecuente del genoma. Son altamente heterocigotos y su detección se puede realizar de forma automatizada (Altshuler et al., 2008; Jorde, 2000; Pulst, 1999; Voguel & Motulsky et al., 2009).

Se han descrito casos de AER hereditarios, los cuales pueden cursar con un modo de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al cromosoma X.

Se efectuó un análisis de ligamiento en una familia con 5 generaciones, perteneciente a la población Mashhad, en donde se presentaron 9 casos de AER (Shekouhi et al., 2013). Como marcadores genéticos se utilizaron microsatélites (STRs) ubicados en el cromosoma X. Se encontró ligamiento con dos STRs, DXS7133 y DXS101 con un LOD Score de 3,12 y 1,60 respectivamente.

2.3.2 El estudio de asociación del genoma completo (Genome Wide Association Studies - GWAS)

El GWAS es un estudio de asociación fundamentado en la hipótesis que propone que los polimorfismos comunes (clásicamente definidos como aquellos con frecuencia alélica mínima, Minor Allele Frequency – MAF, mayor al 1%) pueden contribuir al desarrollo de las enfermedades comunes (Altshuler et al., 2008). En el GWAS se realiza la genotipificación de SNPs distribuidos a lo largo del genoma, con el objetivo de encontrar variantes genéticas frecuentes relacionadas con un fenotipo o variantes relacionadas con rasgos cuantitativos heredables (Hirschhorn et al., 2005).

A diferencia de los análisis de ligamiento, en el GWAS se estudian casos y controles no emparentados de una población particular. El tamaño de la muestra de estudio, y el número de SNPs evaluados, es importante ya que influye en el poder de detección de los polimorfismos relacionados con la enfermedad. Adicionalmente, se debe evitar la estratificación poblacional en los casos, definida como la presencia de múltiples subgrupos en una población que difieren en la prevalencia de la enfermedad. Esto puede conducir a una sobrerrepresentación de un subgrupo poblacional en el que la frecuencia del marcador genético sea diferente, conduciendo a una falsa asociación (Hirschhorn et al., 2005).

Un SNP con una frecuencia mayor en casos que en controles se relaciona con el fenotipo de estudio. Esta asociación es directa cuando el SNP es la variante implicada con el rasgo, e indirecta cuando el SNP se encuentra en desequilibrio de ligamiento con un locus donde se localizan los genes asociados (Kraft et al., 2008; Wang et al., 2005).

En un estudio GWAS realizado en 44 pacientes con AER idiopático y en 44 mujeres sanas con al menos un embarazo exitoso y sin antecedentes de aborto, (ambos grupos pertenecientes a la población China Han), se utilizaron 400 STRs distribuidos en los cromosomas autosómicos y 30 STRs localizados en el cromosoma X (Li et al., 2010). Para optimizar la eficiencia del mapeo, se efectuó una aproximación en dos etapas. La primera etapa consistió en la generación de un pool de DNA tanto de casos como de controles. En esta etapa se identificaron 17 marcadores diferenciales. Posteriormente, se realizó la genotipificación individual, en la que se identificaron 3 loci con una frecuencia alélica y una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los casos y los controles: 6q27 (D6S446, $p = 0.028$), 9q33.1 (D9S1776, $p = 0.037$) y Xp22.11 (DXS1226, $p = 0.008$). Después se realizó un estudio de la función biológica en las bases de datos para los genes localizados en estos loci, obteniendo como resultado 6 genes relacionados con procesos biológicos del AER: *MLLT4*, *KIF25*, *TNFSF15*, *TNFSF8*, *EIF1AX* y *RPS6KA3*.

2.3.4 Identificación de loci de rasgos cuantitativos (*Quantitative Trait Loci* – QTL)

Un rasgo cuantitativo es el que tiene una variación fenotípica medible (valores discretos o continuos). Algunos rasgos cuantitativos requieren que se sobrepase un umbral para que se produzca la expresión del mismo. Este fenómeno es común en las enfermedades complejas.

La variación fenotípica de los rasgos cuantitativos se encuentra influenciada por factores genéticos y ambientales. Los QTL son regiones cromosómicas asociadas a un fenotipo complejo cuantificable (Abiola et al., 2003).

Los QTL pueden tener un efecto particular dependiendo del contexto, puesto que, pueden estar influenciados por el fondo genético, por el ambiente y por el género (macho vs hembra). Los efectos dependientes del contexto se pueden clasificar como interacciones genotipo – genotipo (epistasia), interacciones genotipo - ambiente (Genotype by Environment Interactions - GEIs) e interacciones genotipo – sexo (Genotype by Sex Interactions - GSIs) (Mackay et al., 2009). Las interacciones epistáticas hacen referencia a redes que afectan los rasgos complejos, y las GEIs y las GSIs son mecanismos que mantienen la variación genética de los rasgos cuantitativos en una población.

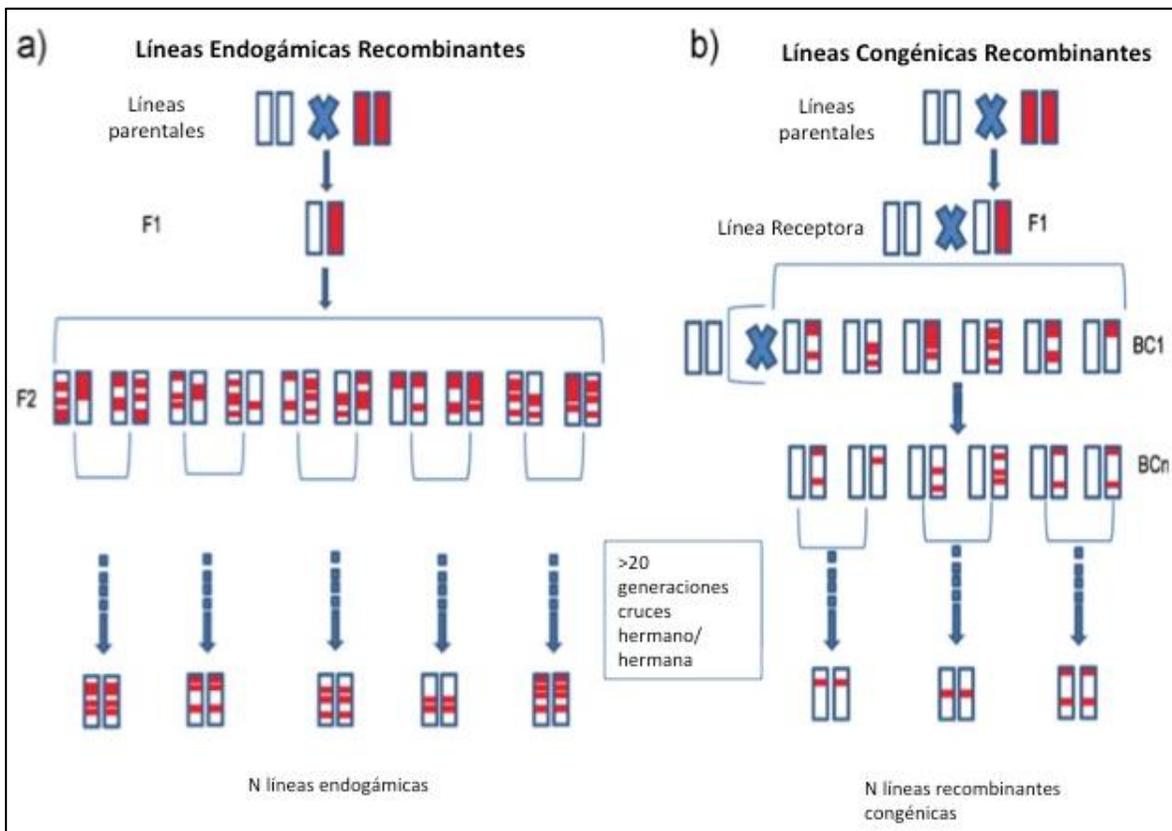
Los QTL pueden ser clasificados de acuerdo a los fundamentos moleculares que modifican el rasgo. Por ejemplo, una variante de secuencia en un gen perteneciente a un QTL se denomina QTN (Quantitative Trait Nucleotide - QTN), cuando se evalúan los niveles de expresión se habla de eQTL (expression Quantitative Loci – eQTL) y la correlación entre el nivel de expresión génica y un fenotipo cuantificable hace referencia al QTT (Quantitative Trait Transcript – QTT). En los eQTL existen variantes reguladoras de la expresión. Esto sucede de dos maneras, en *cis* cuando la regulación se da en el mismo cromosoma, y regulación en *trans* cuando sucede en un cromosoma diferente (Mackay et al., 2009; Nica et al., 2013).

Existen diferentes técnicas para realizar el mapeo de los QTL: El mapeo de único marcador, el mapeo por intervalos, el mapeo por intervalos compuestos y el mapeo de rasgos múltiples. En general, una muestra considerable de individuos debe ser recolectada para representar el total de la población, y de esta manera obtener un número observable de recombinantes y permitir una evaluación rigurosa del rasgo (Doerge, 2002).

El mapeo de QTL también se puede realizar en poblaciones experimentales (animales y plantas) que permiten tener líneas completamente homocigotas, en las que luego de realizar varios cruces (backcrosses e intercrosses) se evalúa la magnitud del efecto del QTL sobre un rasgo particular. Existen dos maneras para generar mezclas inter – genoma en las

poblaciones experimentales. En animales se denominan las líneas endogámicas recombinantes (Recombinant Inbred Strains – RIS), las cuales son las homocigotas y tienen en promedio 50% de cada genoma parental, y las líneas congénicas recombinantes (Recombinant Congenic Strains – RCS) las cuales solamente tienen una fracción menor del genoma “donador” en un genoma “receptor”, como se muestra en la figura 1 (L'Hôte et al., 2010).

Figura 1. Diferencias en el protocolo de cruce que conduce a la generación de RIS (a), y RCS (b): Inicialmente se realiza el cruce de dos líneas homocigotas evolutivamente distantes, generando un background genético compuesto (F1). Posteriormente, el fragmento genómico de una línea relativa a la otra (Fragmentos rojos) es reducida mediante backcrosses seriados (BC1 y BCn). Finalmente, se realizan cruces hermano/hermana para crear líneas homocigotas (N líneas recombinantes congénicas). Mediante genotipificación se puede definir la localización de los fragmentos insertados en el background genético. Figura modificada de L'Hôte et al., 2010.



Luego de la generación de las líneas RIS o RCS, se comparan los fenotipos con los individuos parentales para evidenciar la variación en el rasgo dependiente de los fragmentos del genoma “donante” (L'Hôte et al., 2010).

Utilizando la línea IRCS (Interespecific Recombinant Congenic Strain – IRCS), generada en el Instituto Pasteur (Paris), mediante el cruce de las especies *Mus musculus* y *Mus spretus* (las líneas IRCS contienen en promedio un 2% de *M. spretus* en un fondo genético de *M. musculus*), se publicó en 2009 un estudio con el objetivo de identificar QTL asociados con el fenotipo de letalidad y la subsecuente reabsorción embrionaria (Laisue et al., 2009). Este fenotipo fué evaluado mediante ultrasonografía de alta frecuencia (desde E8.5 hasta E14.5) en hembras IRCS cruzadas con machos C57BL/6J (*M. musculus*). Se identificaron 3 QTL localizados en MMU1, MMU13 y MMU18 (en la línea 66H de IRCS) relacionados con el fenotipo. Posteriormente, se realizó el mapeo de los QTL, encontrando en la línea 66H-MMU13 31 genes, entre ellos los factores de transcripción *Btf3*, *Polk* y *Foxd1*.

Posteriormente, en el año 2016 se publicó un estudio en el cual se realizó un análisis transcryptómico comparativo entre el endometrio y la placenta, de la línea 66H-MMU13 vs la línea C57BL/6J (Laisue et al., 2016). El análisis del tejido uterino evidenció que el 6.8% y el 4.5% de los genes estaban sobre- y sub-expresados, respectivamente. En el tejido placentario, el 3.6% de los genes estaban sobre-expresados y el 7.2% estaban sub-expresados. Adicionalmente, el 2.3% de los genes estaban simultáneamente y sistemáticamente sobre-expresados en el útero y sub-expresados en la placenta, evidenciando una correlación negativa entre la desregulación de los genes en la placenta comparada con la desregulación en el útero. En este mismo estudio, se realizó una búsqueda del enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados en la placenta y en el útero (utilizando Gene Set Enrichment Analysis - GSEA). En el caso de la placenta, los genes sobre-expresados con expresión diferencial hacían parte de dos procesos biológicos, la vía de señalización WNT beta – catenina y la superficie apical. Los genes sub-expresados con expresión diferencial se identificaron en los procesos de coagulación y fosforilación oxidativa. En el útero los genes sobre-expresados enriquecían el proceso biológico denominado “células beta del páncreas”. Los genes sub-expresados pertenecían a

procesos como la respuesta inflamatoria, la respuesta a interferón gamma, la vía de señalización TNFA – NF-kB, la vía de señalización IL2 – STAT5, entre otras. En resumen, la línea 66H-MMU13 estaba caracterizada por una fuerte sub-regulación de los genes responsables de procesos inflamatorios e inmunes (Laissue et al., 2016).

Posteriormente, se efectuó un análisis bioinformático con el programa Genomatix, de los probables TFBS (Transcription Factor Binding Sites – TFBS) localizados en los 50 promotores de los genes más significativamente desregulados. El objetivo de este abordaje fue identificar TFBS en los que se pudieran unir TFs (Transcription Factors) de origen *spretus*, localizados en el cromosoma 13 de la línea 66H-MMU13. Se encontraron sobrerrepresentados los sitios de unión de los factores de transcripción pertenecientes a la familia *forkhead*. La línea 66H-MMU13 sólo contiene un gen que codifica para un factor de transcripción de esta familia (Foxd1), lo que hace que sea un candidato para explicar la desregulación transcriptómica asociada al fenotipo de reabsorción embrionaria en esta línea murina.

El paso siguiente consistió en secuenciar la región codificante de *Foxd1* de 66H-MMU13 y de *M. spretus*. Se evidenciaron 5 variantes no sinónimas. Una de ellas (p.Thr152A la, con una predicción deletérea en la proteína por el programa SIFT), se encontraba en el dominio de unión al ADN. Adicionalmente, esta treonina estaba altamente conservada durante la evolución de los vertebrados. Luego se realizó un ensayo de gen reportero luciferasa (en células COS7 y KGN), para evaluar el efecto funcional de la mutación P.Thr152A la sobre la transactivación de las regiones promotoras de algunos de los genes desregulados en 66H-MMU13 en la placenta y en el útero: *Pgf* (placental growth factor – *Pgf*) y *C3* (*M. musculus* vs *M. spretus*). Estos genes fueron seleccionados ya que previamente había sido descrita su función en el desarrollo adecuado de la implantación embrionaria (Girardi et al., 2004; Tayade et al., 2007; H. Zhang et al., 2003). Los resultados obtenidos demostraron que la variante en Foxd1 afectaba la transactivación del promotor de *Pgf*. Por el contrario, esta variante no generó resultados diferentes en la transactivación del pormotor de *C3* comparada con el control (*Foxd1* WT).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el modelo murino y en los ensayos *in vitro*, se realizó la secuenciación de la región codificante de *FOXD1* en 556 mujeres con AER y en 271 con fertilidad normal. Se encontraron 27 variantes: 9 presentes tanto en las paciente como en los controles, 18 variantes (10 no sinónimas heterocigotas) únicamente en las pacientes, y una variante exclusiva de los controles. Se realizó un test de chi-cuadrado con las variantes exclusivas de las pacientes, demostrando un riesgo relativo de 10.3 (IC 95%). La significancia estadística se logró con la variante p.Ala429_430insAlaAla (variante exclusiva de las pacientes).

Adicionalmente, se efectuaron ensayos de gen reportero de luciferasa con algunas de las variantes encontradas en las pacientes (p.Ala356Gly, p.Ala429_430insAlaAla y p.Ile364Met) y la versión WT, sobre los promotores de *PGF* y *C3*. Las variantes p.Ala356Gly y p.Ala429_430insAlaAla no activaron el promotor de *PGF*, mientras que la variante p.Ile364Met presentó una transactivación similar a la versión WT. En el caso del promotor de *C3*, la variante p.Ala356Gly no produjo su activación, mientras que las variantes p.429AlaAla y p.Ile364Met condujeron a una transactivación de 3 y 6 veces mayor, en comparación con *FOXD1* WT.

Finalmente, se propuso que la variante p.Ala429_430insAlaAla de *FOXD1* podría ser considerada un marcador molecular del AER, y ser evaluada fácilmente mediante PCR y secuenciación de Sanger.

A pesar de no constituir el tema central de mi tesis contribuí con los análisis bioinformáticos del artículo y soy coautora de la publicación (Anexo 1).

2.3.5 La secuenciación de siguiente generación (Next Generation Sequencing - NGS)

El AER es una patología compleja, en la que previamente se había evidenciado una etiología multigénica. Debido a esto, la identificación a gran escala de las variantes en los genes implicados en su fisiopatología es difícil de conseguir mediante métodos de secuenciación directa (secuenciación de Sanger). Sin embargo, se ha sugerido que cada variante de secuencia encontrada mediante NGS, debería ser confirmada con secuenciación de Sanger (Normand et al., 2018).

El desarrollo de la tecnología de NGS ha permitido la genotipificación de numerosos genes de manera simultánea con una alta resolución, lo que es ideal para el estudio de enfermedades como el AER. Mediante NGS se puede realizar secuenciación del genoma completo (Whole Genome Sequencing - WGS), secuenciación del exoma completo (Whole Exome Sequencing – WES) y secuenciación de un número particular de genes asociados a fenotipos específicos (páneos) (Normand et al., 2018).

Como se mencionó previamente, los GWAS se fundamentan en la identificación de variantes comunes asociadas a un fenotipo complejo particular. Sin embargo, estas patologías también están influenciadas por variantes genéticas de baja frecuencia (MAF del 1% al 5%) y variantes raras (MAF menor al 1%). En este caso la hipótesis es, que este tipo de variantes, en especial las variantes de las regiones codificantes, tienen un mayor efecto en la enfermedad, ya que pueden influir en el funcionamiento proteico (Majewski et al., 2011).

En el año 2017 fue publicado un estudio en el que se realizó WES en 49 mujeres caucásicas no emparentadas con AER idiopático (43 francesas y 6 colombianas) (Quintero-Ronderos et al., 2017). Se identificaron 15944 variantes de secuencia, de las cuales 249 eran nuevas. El (51%) de las nuevas inducían un cambio proteico. Todas ellas estaban en estado heterocigoto. De estas variantes, 39 se localizaban en residuos conservados evolutivamente. Luego, se realizó la confirmación de las variantes mediante secuenciación de Sanger, donde se verificaron 27 variantes que adicionalmente estaban relacionadas con la etiología molecular del AER. Adicionalmente, estas variantes fueron analizadas con 4 predictores bioinformáticos para establecer el potencial efecto deletéreo.

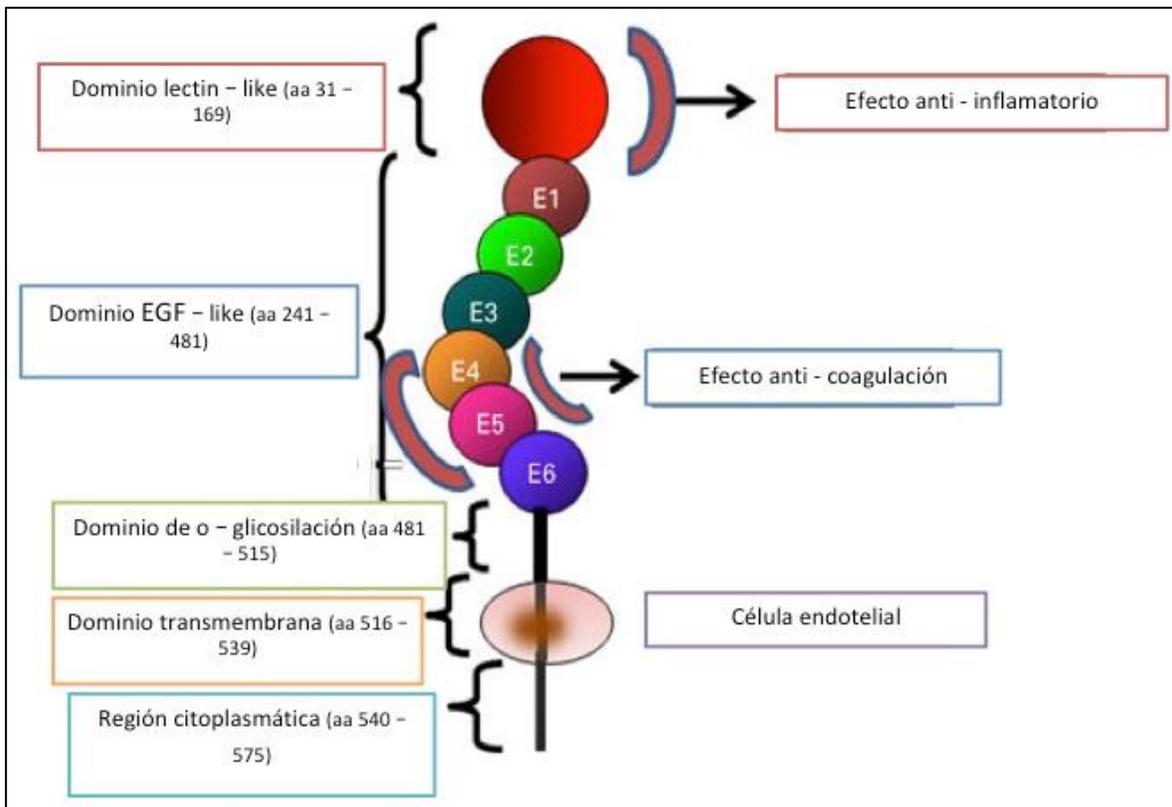
Uno de los genes identificado en este estudio fue *THBD*, portador de una mutación candidata. Este gen ha sido relacionado con el proceso de la coagulación. En este estudio una paciente colombiana presentó la variante c.457T>G (p.Trp153Gly). Todos los predictores bioinformáticos fueron positivos para un potencial efecto deletéreo (SIFT, PolyPhen, Mutation Taster y Mutpred).

2.4 THBD (trombomodulina)

La trombomodulina es un receptor (proteoglicano) transmembrana, la cual tiene propiedades anti-trombogénicas en la superficie del endotelio vascular. Fue descubierta por Emson y Owen en 1981, mientras investigaban sobre el cofactor responsable de la activación de la Proteína C mediante la trombina. El gen que codifica para la trombomodulina se encuentra localizado en el cromosoma 20 (20p11.21) y es monoexónico (1728 pares de bases). La proteína es muy estable y compacta debido a los puentes disulfuro que genera en su estructura.

THBD tiene un péptido señal (aminoácidos 1 – 18), el cual sufre un proceso de clivaje. El dominio extracelular de THBD (región N-terminal, aminoácidos 19 – 515), está conformado por: un dominio lectina – tipo C (aminoácidos 31 – 169) necesario para la endocitosis, participa en la regulación del crecimiento tumoral y regula la función endotelial durante la inflamación. Un dominio con 6 repeticiones EGF – like (aminoácidos 241 – 481) requeridas para la activación de la Proteína C inducida por la trombina. Contiene un dominio rico en serina – treonina (aminoácidos 481 – 515), región donde se pueden producir glicosilaciones con condroitin sulfato, permitiendo la unión de una segunda molécula de trombina. Tiene un dominio transmembrana (aminoácidos 516 – 539), y una cola citoplasmática (aminoácidos 540 – 575) (figura 2) (Boffa et al., 1998; Weiler, 2004).

Figura 2. Esquema de los dominios y las regiones de THBD. Aminoácidos – aa. Figura modificada de (Ikezoe et al., 2017).



El mecanismo de acción de THBD en el endotelio vascular, en el proceso de coagulación, se describe a continuación: la trombina interactúa con THBD a nivel de la membrana citoplasmática. La formación del complejo trombina – trombomodulina conduce a la activación de la Proteína C quien esta unida a EPCR (endotelial protein c receptor – EPCR). La Proteína C activa, junto con la proteína S, realizan el clivaje de los factores V y VIII activados, inhibiendo de esta manera la coagulación.

El complejo THBD – trombina además de inhibir la conversión de fibrinógeno en fibrina, también puede activar al inhibidor latente de la fibrinólisis - TAFI, el cual posteriormente va a inhibir la interacción de la fibrina con las enzimas fibrinolíticas mediante la remoción de los residuos de lisina. También se ha evidenciado una inactivación de los factores del complemento C3a y C5a, osteopontina y bradiquinina, demostrando que TAFI cumple una función en la modulación de la inflamación (Morser, 2012; Weiler, 2004).

Se han descrito una serie de líneas murinas con deficiencia en la función de Thbd (Weiler, 2004). Dos de ellas tienen una pérdida completa de la función en estado heterocigoto, ya que el ratón mutante homocigoto presentó un fenotipo de letalidad embrionaria temprana. Las otras líneas fueron creadas como un knockout (knockout – KO) condicional, en el que el alelo puede inactivarse en un tejido específico, o controlarse temporalmente mediante la recombinasa Cre. Estas líneas no desarrollaron fenotipo alguno de manera espontánea. Existe otra línea que contiene una mutación puntual en *Thbd* (p.Glu404Pro) (Weiler-Guettler et al., 1998), que disminuye de manera significativa la activación de la Proteína C. Estos ratones desarrollaron un estado de hipercoagulabilidad.

Los mecanismos por los cuales los embriones murinos *Thbd*^{-/-} desarrollaron el fenotipo de letalidad embrionaria son los siguientes: primero, la generación de trombina favoreció la conversión de fibrinógeno en fibrina, y consecuente producción de los productos de ruptura de la fibrina ocasionaron la muerte de las células gigantes del trofoblasto. La trombosmodulina además de inhibir la coagulación, inhibió la degradación de la fibrina favoreciendo la activación de la carboxipeptidasa U plasmática y al inhibidor de la fibrinólisis activada por trombina (TAFI). Thbd de esta manera previno la lesión placentaria. Segundo, los ratones KO para Thbd mostraron un defecto en el crecimiento no relacionado con el fibrinógeno o la fibrina, pero si como resultado del compromiso de los receptores activadores de proteasa (Protease Activated Receptors – PAR), PAR-2 y PAR – 4. Esta situación fue soportada por la evidencia de que la Proteína C activada, activaba a PAR-1, y que los embriones con deficiencia de PAR-1 presentaron retardo en el crecimiento. Por lo tanto, el complejo trombosmodulina – Proteína C se asoció a la protección de la integridad placentaria controlando la activación de PAR (Isermann et al., 2003).

Previamente se describieron casos de pacientes con AER idiopático con variantes en genes relacionados con el proceso de homeostasis, entre ellos THBD (Cao et al., 2013). La paciente del estudio de Quintero – Ronderos et al., 2017, presentó una variante en el dominio lectina - tipo C. Este dominio se ha relacionado con la inactivación de la vía clásica del complemento y de las lectinas, mostrando inmunomodulación de la trombosmodulina. Se han identificado dos ligandos que se unen al dominio lectina: la

proteína HMGB1 (High Mobility Group Box 1 protein – HMGB1), y el carbohidrato Lewis. HMGB1 es una proteína nuclear, de unión al ADN, del tipo no histona. Es una alarmina que activa la respuesta inmune innata cuando interactúa con el receptor RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts – RAGE). El dominio lectina de THBD actúa como un antagonista de HMGB1, evitando que interactúe con RAGE, y por lo tanto, inhibiendo los efectos corriente abajo. Adicionalmente, el dominio lectina inhibe la adhesión de los monocitos y los neutrófilos con las células endoteliales (Andersson et al., 2018; Morser, 2012).

La trombomodulina también puede ser internalizada en algunos tipos celulares como las células endoteliales y la línea celular A549 (cáncer epitelial de pulmón). Para realizar este proceso es necesario el dominio de lectina. No es claro cual es el fin de la internalización de la trombomodulina (Morser, 2012).

En un estudio reciente, también de nuestro equipo, se realizó la secuenciación del ORF del THBD en 262 pacientes con AER (233 eran francesas y 23 colombianas). Se encontraron dos variantes de tipo missense, c.457T>G (p.Trp153Gly) y c.1418C>T (p.Ala473Val) (Quintero-Ronderos et al., 2017). Estas variantes tenían un MAF, en la base de datos de SNP de Ensembl, de 0.00 y 0.16, respectivamente. La variante p.Trp153Gly solamente fue encontrada en las pacientes colombianas, en estado homocigoto y heterocigoto. Los predictores bioinformáticos (SIFT y PolyPhen) establecieron un potencial efecto deletéreo en la proteína. Adicionalmente, con esta variante se evidenció una diferencia con significancia estadística en las frecuencias alélicas entre casos y controles del mismo origen étnico ($p = 9 \times 10^{-6}$). Se considera que esta variante puede ser un marcador molecular relevante para el AER en la población colombiana. Debido a que la variante se encuentra en el dominio tipo lectina de THBD, se considera que su disfunción se relacione con un aumento en la susceptibilidad al desarrollo de procesos inflamatorios y a alteraciones en la adhesión trofoblasto – endometrio (Quintero-Ronderos et al., 2017).

Por último, es importante señalar que numerosas publicaciones del grupo fundamentan y complementan los abordajes teóricos y experimentales citados en el trabajo presentado (Caburet et al., 2012; Carlosama et al., 2017; Castro et al., 2013; Diggle et al., 2012; Ducat

et al., 2016; Fonseca et al., 2012; Fonseca et al., 2012; Fonseca et al., 2014; Fonseca et al., 2015; Fonseca et al., 2012; Fonseca et al., 2013; Forero et al., 2016; L'Hôte et al., 2010; Laissie, 2015, 2018; Laissie et al., 2009; Laissie et al., 2009; Laissie et al., 2009; Laissie et al., 2016; Laissie et al., 2017; Lakhal et al., 2009, 2010; Lakhal et al., 2008; Mateus et al., 2017; Mitropoulos et al., 2015; Nino et al., 2013; Ojeda et al., 2011; Ortega-Recalde et al., 2015; Ortega-Recalde et al., 2013; Ortega-Recalde et al., 2015; Ortega-Recalde et al., 2016; Ortega-Recalde et al., 2014; Patino et al., 2014; Patino et al., 2017; Patino et al., 2017; Patino et al., 2017; Prada et al., 2014; Quintero-Ronderos et al., 2017; Quintero-Ronderos et al., 2017; Valero-Rubio et al., 2018; Vatin et al., 2014; Vatin et al., 2012)

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Afecta la localización subcelular de la proteína la variante THBD-p.Trp153Gly?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto celular de la variante p.Trp153Gly de THBD.

4.2 Objetivo específico

Comparar la localización subcelular de la proteína THBD silvestre con respecto a la proteína THBD mutante, en el contexto de la línea celular inmortalizada CHO (Chinese Hamster Ovary – CHO).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Análisis de la localización subcelular de THBD

Se estudió el efecto de la variante p.Trp153Gly sobre la localización subcelular de THBD, mediante la expresión de THBD con la proteína GFP (Green Fluorescence Protein – GFP) en la línea celular CHO (Chinese Hamster Ovary – CHO).

5.1.1 Amplificación por PCR de la región codificante del gen *THBD*

La amplificación de la región codificante (Open Reading Frame – ORF) del gen *THBD* fue realizada a partir del DNA genómico de la paciente colombiana (descrita en el estudio de Quintero – Ronderos et al., 2017), quien es portadora de la variante heterocigota c.457T>G - p.Trp153Gly. Los oligonucleótidos de amplificación fueron diseñados manualmente, teniendo como molde la secuencia curada del gen (NM_000361.2), y fueron denominados alfa y omega – GFP. Este último tiene una modificación en el codón de parada TGA. Se eliminaron los nucleótidos adenina y guanina y se cambió la timina por una adenina. De esta manera cuando se realizara el clonaje en el vector de expresión pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen) el fragmento clonado quedaría en fase con la secuencia codificante del gen reportero GFP. Las secuencias de los oligonucleótidos se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Primers de amplificación del ORF de *THBD*

Región	Secuencia del primer	
ORF <i>THBD</i> (1728 pb)	HuTHBD -a	5'ATGCTTGGGGTCCTGGTCCTTGG 3'
	HuTHBD-omGFP	5' TGAGTCTCTGCGGCGTCCGCTC 3'

El ORF de *THBD* fue amplificado mediante PCR (Polymerase Chain Reaction – PCR). La mezcla realizada tenía un volumen final de 25 μ l. La mezcla de la reacción estaba compuesta por 100ng de ADN, 12.5 μ l de Master Mix (Promega) y 0.8 μ M de cada uno de los primers. Se completó el volumen final con agua libre de nucleasas. Las condiciones de la PCR se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la PCR para la amplificación del ORF de *THBD*

Fases de la PCR		Duración	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	40 segundos	25
Anillamiento	67°C	40 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

La confirmación de la amplificación fue realizada mediante la electroforesis del producto de PCR en un gel de agarosa al 1% , en buffer TBE 1X. Se verificó el tamaño del fragmento obtenido por medio de la comparación con el patrón de peso molecular 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

5.1.2 Clonaje en vector de expresión pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO y transformación en bacterias *E. coli* quimiocompetentes (One Shot Top 10 - Invitrogen)

Se realizó el clonaje del producto de PCR del ORF de *THBD* en el vector pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen), el cual es portador del gen de resistencia a la ampicilina. La mezcla realizada para el clonaje se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Mezcla del clonaje

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	2 µl
Solución de sales	1 µl
Agua estéril	1 µl
Vector	1 µl
Volumen final 5 µl	

Luego de realizada la mezcla, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó el proceso de transformación en las bacterias *E. coli* quimiocompetente (One Shot Top 10 – Invitrogen) de la siguiente forma: primero, se agregaron 2 µl del producto de clonaje a un vial de 25 µl de las bacterias quimiocompetentes y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Luego, se realizó el choque

térmico en el baño serológico, previamente precalentado a 42°C, durante 30 segundos. Inmediatamente después el vial fue incubado en hielo durante 2 minutos. Después, se agregaron 125 µl del medio revitalizante SOC al vial y se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación horizontal a 225 rpm (revoluciones por minuto – rpm).

Se sembraron 80 µl y 100 µl del producto de la transformación en placas con LB agar con ampicilina (Luria-Bertani - LB), permitiendo la selección de las bacterias que han sido transformadas con el plásmido que les confiere resistencia a este antibiótico. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas. A continuación, las colonias fueron cultivadas en medio LB líquido con ampicilina a 37°C en agitación (225 rpm) durante 16 horas. Luego se realizó la PCR de confirmación del clonaje y de la direccionalidad del inserto, ya que debido al sistema que se utilizó algunos de los fragmentos pueden estar clonados en sentido 5´ - 3´y otros en el sentido contrario. En la tabla 4 se describen los primers utilizados para la PCR de colonia y en la tabla 5 las condiciones de la PCR.

Tabla 4. Primers PCR de colonia THBD - GFP

Región	Secuencia del primer	
<i>THBD - GFP</i> (1162 pb)	T7 Forward	5´ TAATACGACTCACTATAGGG 3´
	hu_THBD_e02R	5´ CAGGTCGTAGTTAGGGTAGCAGT 3´

Tabla 5. Condiciones PCR de colonia THBD - GFP

Fases de la PCR		Duración	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	40 segundos	30
Anillamiento	57°C	40 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

La amplificación se verificó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBS 1X, el tamaño del amplicón fue confirmado mediante comparación con el patrón de peso molecular 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Finalmente, se extrajo el ADN plasmídico de las colonias positivas para el clonaje y fueron enviadas a secuenciación de Sanger para

verificar que la Taq polimerasa no haya introducido alguna variante en la secuencia. Los primers de secuenciación se encuentran en la tabla 6.

Tabla 6. Primers secuenciación THBD - GFP

Secuencia del primer	
GFP Reverse	5' GGGTAAGCTTTCCGTATGTAGC 3'
hu_THBD_e02R	5' CAGGTCGTAGTTAGGGTAGCAGT 3'
hu_THBD_e01s3F	5' GCTTGCTCATAGGCATCTCCATC 3'
hu_THBD_e01s4R	5' CTGACTGGCATTGAGGAAGGTC 3'

Luego de la verificación de la integridad de la secuencia, se realizó extracción de ADN plasmídico a partir de midicultivo con el kit Qiagen plasmid midi prep.

5.1.3 Cultivo celular y transfección

Las células CHO fueron cultivadas a 37°C con CO₂ al 5% en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM, Thermo Fisher Scientific) suplementado al 10% con suero fetal bovino, y al 1% con penicilina/estreptomicina. Se sembraron 40.000 células/pozo sobre laminillas estériles depositadas en la caja de cultivo de 24 pozos. Las células continuaron en cultivo durante 24 horas.

Luego de las 24 horas posteriores a la siembra, las células alcanzaron una confluencia aproximada del 70%. Se procedió a realizar la transfección de las construcciones (THBD WT – GFP y THBD p.Trp153Gly – GFP) con FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega). Los cálculos de la transfección fueron realizados teniendo como parámetro la relación 1:3, entre la cantidad molar de ADN (µg) y el volumen de FuGENE (µl). El medio utilizado para la transfección fue optiMEM (Thermo Fisher Scientific), el cual contiene 50% menos de suero que el DMEM. Esto favorece la transfección con el reactivo FuGENE. Para cada condición se realizaron 6 réplicas (n = 6) en 3 ensayos independientes, como se muestra en la tabla 7. Como control negativo se emplearon células CHO no transfectadas (n = 3).

Tabla 7. Cálculos para la transfección para 6 réplicas

Construcción	Cantidad ADN (ng)	Volumen ADN (µl)	Volumen FuGENE (µl)	Volumen OptiMEM (µl)
THBD WT - GFP	300	7	6.3	161.7
THBD p.Trp153Gly - GFP	300	7	6.3	161.7

Los cálculos fueron realizados con una réplica adicional para garantizar que el volumen fuera suficiente teniendo en cuenta posibles errores de pipeteo. De acuerdo a los volúmenes obtenidos el protocolo de transfección fue el siguiente: en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se mezcló el volumen de OptiMEM (161.7 µl) con el de FuGENE (6.3 µl) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se agregó a la mezcla el ADN (7 µl) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante este último periodo de incubación se retiró el medio DMEM suplementado a las células CHO, y se agregaron 600 µl/pozo de optiMEM previamente precalentado, y se adicionaron 25 µl de la mezcla a cada pozo. La caja se dejó en cultivo a 37°C con CO₂ al 5% durante 48 horas.

5.1.4 Fijación de las láminas y ensayo GFP

Luego de transcurridas 48 horas post – transfección, necesarias para que se realice la síntesis proteica, se realizó la fijación y el montaje de las laminillas, de la siguiente manera. Se retiró el optiMEM de cada pozo y se realizó un lavado con 500 µl/pozo de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline - PBS) durante 5 minutos en agitación suave, se retiró el PBS 1X de cada pozo y se fijaron las laminillas con 300 µl/pozo de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y evitando la exposición a la luz. Posteriormente se retiró el paraformaldehído y se realizaron 3 lavados con 300 µl/pozo de PBS 1X. Se retiró el PBS 1X y se agregaron 300 µl/pozo de agua destilada.

Las laminillas fueron transferidas boca abajo a las láminas portaobjetos, sobre las cuales se había agregado previamente 5 µl de medio de montaje Ultra Cruz Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology), el cual tiene el marcador fluorescente DAPI para el núcleo celular. Las laminillas fueron selladas sobre la lámina porta objetos con esmalte

transparente, para evitar deslizamientos durante la visualización en el microscopio de fluorescencia. Las láminas fueron almacenadas a 4°C protegidas de la luz.

La visualización del montaje fue realizada en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse NiE y las imágenes fueron capturadas con la cámara digital fotométrica (Coolnap EZ), utilizando el software NIS- Elements Advanced Research (Waltham, MA, USA). Se realizaron 3 ensayos independientes, en los cuales se contaron 302 células en total, 151 células WT y 151 células mutantes. Las categorías fenotípicas establecidas para el conteo celular fueron: la presencia o la ausencia de membrana citoplasmática delimitada (MD+ y MD-, respectivamente), la presencia o ausencia de agregados – like proteicos perinucleares (P+ y P-, respectivamente), la presencia o ausencia de agregados - like citoplasmáticos, y la clasificación de los agregados – like en condensados o punteados.

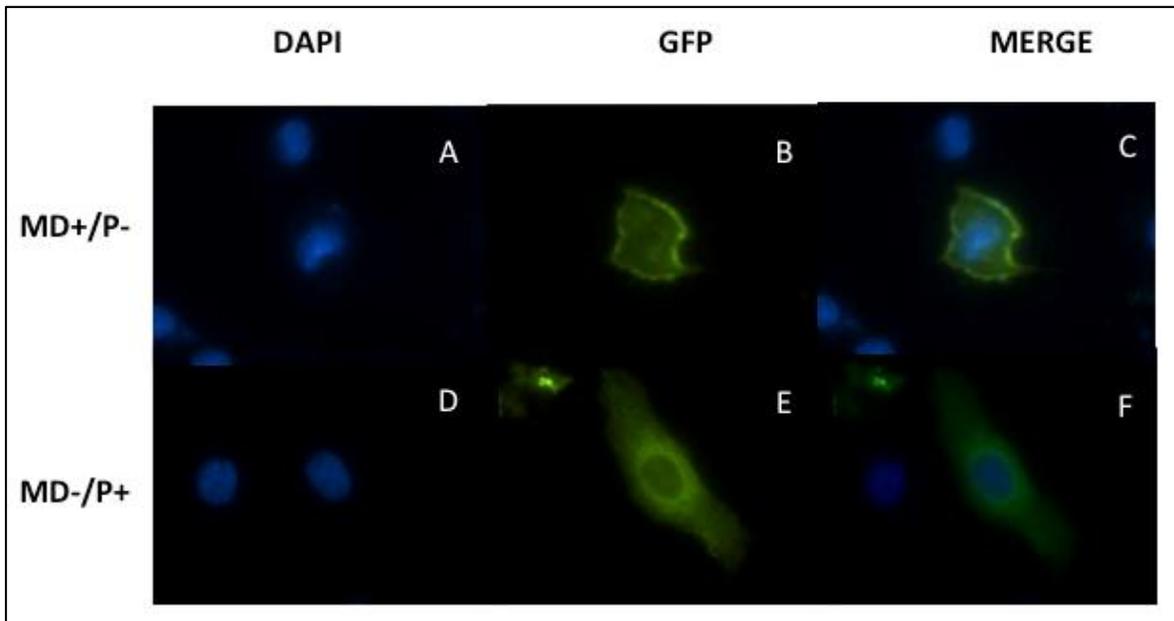
Se utilizó la prueba de chi – cuadrado como método estadístico para determinar si había diferencias con significancia estadística entre las categorías fenotípicas (proteína WT vs la proteína mutante).

6. RESULTADOS

6.1 Localización subcelular de THBD

Mediante la transfección de *THBD* – GFP en las versiones WT y mutante (p.Trp153Gly), en la línea celular CHO, se observaron señales de fluorescencia en el citoplasma y en la membrana plasmática (figura 3).

Figura 3. Transfección de la línea celular CHO con las construcciones THBD WT – GFP y THBD p.Trp153Gly – GFP. A – C, células transfectadas con THBD WT – GFP. D – E, células transfectadas con THBD p.Trp153Gly – GFP. A y D, tinción con DAPI (azul). B y E tinción con GFP. C y F, mezcla de fluorescencias. MD+ y MD-, hace referencia a la presencia o ausencia de la membrana plasmática delimitada, respectivamente. P+ y P-, hace referencia a la presencia o ausencia de agregados – like proteicos perinucleares, respectivamente.



Luego de observar un patrón de localización subcelular diferencial entre las versiones transfectadas, se realizó un conteo celular, de 151 células con la proteína WT y 151 células con la proteína mutante, observando diferentes fenotipos: presencia o ausencia de la membrana plasmática delimitada (MD+ o MD-, respectivamente), presencia o ausencia de agregados – like proteicos perinucleares (P+ o P-, respectivamente). En las figuras 4 y 5 se incluyen los fenotipos de membrana plasmática delimitada, agregados – like perinucleares, sus combinaciones y los conteo celulares (WT y mutante, respectivamente).

Figura 4. Fenotipos observados y conteo celular THBD WT – GFP.

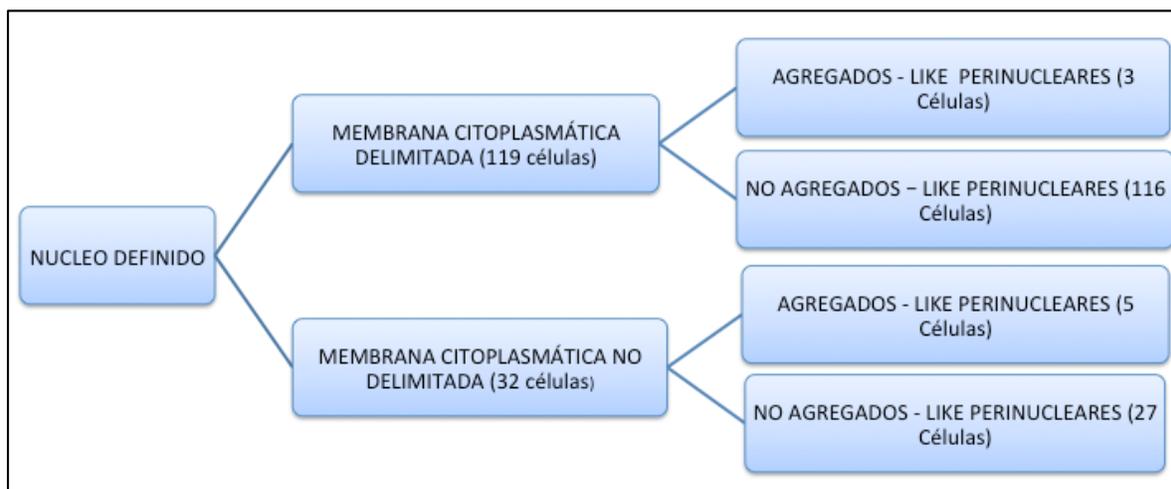
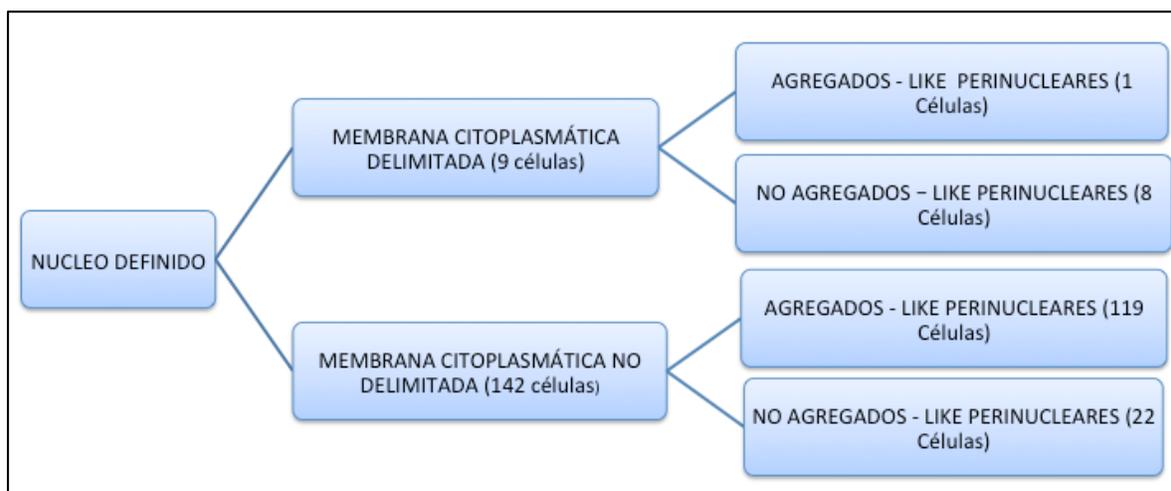


Figura 5. Fenotipos observados y conteo celular THBD p.Trp153Gly - GFP



Se encontró una diferencia con significancia estadística en los fenotipos MD+/P-: WT (116 células, 77%) y mutante (8 células, 5%), con un valor $p < 3.1 \cdot 10^{-22}$. En el fenotipo MD-/P+ también se encontró una diferencia con significancia estadística: WT (5 células, 3%) y mutante (119 células, 79% células), con un valor $p < 8.2 \cdot 10^{-25}$.

Estos resultados sugieren que THBD WT – GFP se localizó de manera predominante en la membrana plasmática, mientras que, THBD p.Trp153Gly – GFP se ubicó perinuclearmente.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó un análisis comparativo de la localización subcelular entre las proteínas WT *vs* mutante en la línea celular CHO, mediante el marcaje con el gen reportero GFP (en el extremo C – Terminal de la proteína). Se establecieron diferentes fenotipos a evaluar, se realizó un conteo celular y posteriormente un análisis estadístico para determinar si habían diferencias entre los fenotipos evaluados tanto en las células transfectadas con la proteína WT y la proteína mutante. Se evidenció que la proteína WT tenía una localización predominante en la membrana plasmática, mientras que la proteína mutante perinuclearmente.

La diferencia en la localización subcelular entre las proteínas pudo ser ocasionada por varios factores. Uno de ellos es el cambio de un aminoácido aromático por uno pequeño lo que podría alterar el plegamiento proteico generando estrés a nivel del retículo endoplásmico, y por consiguiente desencadenando la respuesta a las proteínas mal plegadas, las cuales inicialmente son retenidas en este organelo y posteriormente son degradadas por proteólisis mediada por ubiquitinación (Stolz & Wolf, 2010). Esa retención inicial podría explicar la localización perinuclear de la proteína mutante. Otro factor que podría afectar la localización subcelular es la co-expresión de la proteína de origen humano y la proteína producida de manera endógena por la línea celular (Kremkow et al., 2015). Además, se ha demostrado que las líneas celulares sufren modificaciones en procesos como el crecimiento celular, la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la transcripción, la traducción y la glicosilación a medida que van sufriendo fases celulares. Todo esto sucede como mecanismo de adaptación para sobrevivir de manera adecuada, y también como consecuencia de alteraciones en la expresión genética dependiente de modificaciones epigenéticas y alteraciones cromosómicas, entre otras (Beckmann et al., 2012; Xu et al., 2017). Estas modificaciones pueden alterar el procesamiento y la localización subcelular de las proteínas, generando resultados como los observados en este trabajo.

La localización diferencial entre las versiones proteicas (WT y mutante) también podría estar relacionada con la proteína GFP ubicada en el extremo C - terminal de las mismas. Previamente, se han reportado diversos efectos deletéreos en las células que expresan este

gen reportero. Por ejemplo, se ha evidenciado alteraciones en el plegamiento proteico, el aumento de la expresión de proteínas de shock térmico y de prostaglandinas, la presencia de apoptosis en estas células y alteraciones en el perfil transcripcional (Badrian et al., 2007; Baens et al., 2006; Coumans et al., 2014; Liu et al., 1999; F. Zhang et al., 2003). De acuerdo a lo mencionado previamente, es posible que el procesamiento proteico no se realice de la misma manera para las proteínas marcadas con GFP en comparación con las proteínas que no están marcadas con una proteína fusión, llevando a una localización diferencial en los compartimientos celulares.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La variante c.457T>G (p.Trp153Gly) afecta la localización subcelular de la proteína THBD - GFP en el modelo celular CHO, probablemente contribuyendo a que no realice su función adecuadamente en la membrana plasmática. Esto puede estar relacionado con el fenotipo de AER.

Para confirmar los resultados obtenidos, se propone lo siguiente:

- Realizar un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células CHO, utilizando un anticuerpo dirigido contra un tag.
- Determinar si la proteína mutante está siendo retenida en el retículo endoplásmico mediante IFI (marcaje del RE).
- Evaluar la interacción de THBD (WT *vs* mutante) con HMGB1 por medio de ensayos de interacción proteína – proteína como co-inmunoprecipitación, técnicas de microscopia de fluorescencia y de microscopia confocal (Fluorescence Recovery After Photobleaching – FRAP y Förster Resonance Energy Transfer – FRET, respectivamente).
- Evaluar la interacción de THBD (WT *vs* mutante) con el carbohidrato de Lewis mediante ensayos de adhesión célula – célula.
- Realizar un modelo murino *knock – in* (KI) condicional con la variante p.Trp153Gly en *Thbd*.

9. REFERENCIAS

- Abiola, O., Angel, J. M., Avner, P., Bachmanov, A. A., Belknap, J. K., Bennett, B., . . . Zou, F. (2003). The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet*, 4(11), 911-916. doi:10.1038/nrg1206
- Altshuler, D., Daly, M. J., & Lander, E. S. (2008). Genetic mapping in human disease. *Science*, 322(5903), 881-888. doi:10.1126/science.1156409
- Andersson, U., Yang, H., & Harris, H. (2018). High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Semin Immunol*. doi:10.1016/j.smim.2018.02.011
- 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. doi:10.1016/j.mce.2016.03.039
- Badrian, B., & Bogoyevitch, M. A. (2007). Changes in the transcriptional profile of cardiac myocytes following green fluorescent protein expression. *DNA Cell Biol*, 26(10), 727-736. doi:10.1089/dna.2007.0604
- Baens, M., Noels, H., Broeckx, V., Hagens, S., Fevery, S., Billiau, A. D., . . . Marynen, P. (2006). The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS One*, 1, e54. doi:10.1371/journal.pone.0000054
- Beckmann, T. F., Kramer, O., Klausning, S., Heinrich, C., Thute, T., Bunttemeyer, H., . . . Noll, T. (2012). Effects of high passage cultivation on CHO cells: a global analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94(3), 659-671. doi:10.1007/s00253-011-3806-1
- Boffa, M. C., & Karmochkine, M. (1998). Thrombomodulin: an overview and potential implications in vascular disorders. *Lupus*, 7 Suppl 2, S120-125.
- Branch, D. W., Gibson, M., & Silver, R. M. (2010). Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med*, 363(18), 1740-1747. doi:10.1056/NEJMcp1005330
- Buttram, V. C., Jr., & Gibbons, W. E. (1979). Mullerian anomalies: a proposed classification. (An analysis of 144 cases). *Fertil Steril*, 32(1), 40-46.
- Caburet, S., Zavadakova, P., Ben-Neriah, Z., Bouhali, K., Dipietromaria, A., Charon, C., . . . Fellous, M. (2012). Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial Premature Ovarian Failure. *PLoS One*, 7(3), e33412. doi:10.1371/journal.pone.0033412
- Cao, Y., Zhang, Z., Xu, J., Yuan, W., Wang, J., Huang, X., . . . Du, J. (2013). The association of idiopathic recurrent pregnancy loss with polymorphisms in hemostasis-related genes. *Gene*, 530(2), 248-252. doi:10.1016/j.gene.2013.07.080
- Carlosama, C., Elzaiat, M., Patino, L. C., Mateus, H. E., Veitia, R. A., & Laissue, P. (2017). A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*, 26(16), 3161-3166. doi:10.1093/hmg/ddx199
- Carp, H. J., Selmi, C., & Shoenfeld, Y. (2012). The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun*, 38(2-3), J266-274. doi:10.1016/j.jaut.2011.11.016
- Caseiro, A. L., Regalo, A., Pereira, E., Esteves, T., Fernandes, F., & Carvalho, J. (2015). Implication of sperm chromosomal abnormalities in recurrent abortion and multiple

- implantation failure. *Reprod Biomed Online*, 31(4), 481-485. doi:10.1016/j.rbmo.2015.07.001
- Castro, T., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Forero, D., Restrepo, C. M., Talero, C., . . . Laissue, P. (2013). Sequence analysis of the ADRA2A coding region in children affected by attention deficit hyperactivity disorder. *Neurol Sci*, 34(12), 2219-2222. doi:10.1007/s10072-013-1569-4
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*, 18(12), 1754-1767. doi:10.1038/nm.3012
- Contempre, B., Jauniaux, E., Calvo, R., Jurkovic, D., Campbell, S., & de Escobar, G. M. (1993). Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 77(6), 1719-1722. doi:10.1210/jcem.77.6.8263162
- Coumans, J. V., Gau, D., Poljak, A., Wasinger, V., Roy, P., & Moens, P. (2014). Green fluorescent protein expression triggers proteome changes in breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 320(1), 33-45. doi:10.1016/j.yexcr.2013.07.019
- Crawford, N. M., & Steiner, A. Z. (2016). Thyroid Autoimmunity and Reproductive Function. *Semin Reprod Med*, 34(6), 343-350. doi:10.1055/s-0036-1593485
- Diejomaoh, M. F. (2015). Recurrent spontaneous miscarriage is still a challenging diagnostic and therapeutic quagmire. *Med Princ Pract*, 24 Suppl 1, 38-55. doi:10.1159/000365973
- Diggle, C. P., Parry, D. A., Logan, C. V., Laissue, P., Rivera, C., Restrepo, C. M., . . . Bonthron, D. T. (2012). Prostaglandin transporter mutations cause pachydermoperiostosis with myelofibrosis. *Hum Mutat*, 33(8), 1175-1181. doi:10.1002/humu.22111
- Doerge, R. W. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet*, 3(1), 43-52. doi:10.1038/nrg703
- Ducat, A., Doridot, L., Calicchio, R., Mehats, C., Vilotte, J. L., Castille, J., . . . Vaiman, D. (2016). Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci Rep*, 6, 19196. doi:10.1038/srep19196
- Ferreira, M. A. (2004). Linkage analysis: principles and methods for the analysis of human quantitative traits. *Twin Res*, 7(5), 513-530. doi:10.1375/1369052042335223
- Fonseca, D. J., Garzon, E., Lakhal, B., Braham, R., Ojeda, D., Elghezal, H., . . . Laissue, P. (2012). Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients. *Reprod Biomed Online*, 24(3), 339-341. doi:10.1016/j.rbmo.2011.11.017
- Fonseca, D. J., Ojeda, D., Lakhal, B., Braham, R., Eggers, S., Turbitt, E., . . . Laissue, P. (2012). CITED2 mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure. *Transl Res*, 160(5), 384-388. doi:10.1016/j.trsl.2012.05.006
- Fonseca, D. J., Ortega-Recalde, O., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Patino, L. C., Bermudez, O. M., . . . Laissue, P. (2014). BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online*, 29(5), 627-633. doi:10.1016/j.rbmo.2014.07.018
- Fonseca, D. J., Patino, L. C., Suarez, Y. C., de Jesus Rodriguez, A., Mateus, H. E., Jimenez, K. M., . . . Laissue, P. (2015). Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertil Steril*, 104(1), 154-162.e152. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.04.016

- Fonseca, D. J., Prada, C. F., Siza, L. M., Angel, D., Gomez, Y. M., Restrepo, C. M., . . . Laissue, P. (2012). A de novo 14q12q13.3 interstitial deletion in a patient affected by a severe neurodevelopmental disorder of unknown origin. *Am J Med Genet A*, *158a*(3), 689-693. doi:10.1002/ajmg.a.35215
- Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Vergara, J. I., Rios, X., Uribe, C., Chavez, L., . . . Laissue, P. (2013). A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth-Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene. *Br J Dermatol*, *168*(2), 456-458. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11181.x
- Forero, D. A., Wonkam, A., Wang, W., Laissue, P., Lopez-Correa, C., Fernandez-Lopez, J. C., . . . Perry, G. (2016). Current needs for human and medical genomics research infrastructure in low and middle income countries. *J Med Genet*, *53*(7), 438-440. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103631
- Fukuda, M. N., & Sugihara, K. (2012). Cell adhesion molecules in human embryo implantation. *Sheng Li Xue Bao*, *64*(3), 247-258.
- Girardi, G., Redecha, P., & Salmon, J. E. (2004). Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med*, *10*(11), 1222-1226. doi:10.1038/nm1121
- Hirschhorn, J. N., & Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*, *6*(2), 95-108. doi:10.1038/nrg1521
- Ikezo, T., Yang, J., Nishioka, C., Pan, B., Xu, K., Furihata, M., . . . Yokoyama, A. (2017). The fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin exerts cytoprotective function and prevents SOS in a murine model. *Bone Marrow Transplant*, *52*(1), 73-79. doi:10.1038/bmt.2016.195
- Isermann, B., Sood, R., Pawlinski, R., Zogg, M., Kalloway, S., Degen, J. L., . . . Weiler, H. (2003). The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy. *Nat Med*, *9*(3), 331-337. doi:10.1038/nm825
- Jorde, L. B. (2000). Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res*, *10*(10), 1435-1444.
- Kacprzak, M., Chrzanowska, M., Skoczylas, B., Moczulska, H., Borowiec, M., & Sieroszewski, P. (2016). Genetic causes of recurrent miscarriages. *Ginek Pol*, *87*(10), 722-726. doi:10.5603/gp.2016.0075
- Kraft, P., & Cox, D. G. (2008). Study designs for genome-wide association studies. *Adv Genet*, *60*, 465-504. doi:10.1016/s0065-2660(07)00417-8
- Kremkow, B. G., Baik, J. Y., MacDonald, M. L., & Lee, K. H. (2015). CHOgenome.org 2.0: Genome resources and website updates. *Biotechnol J*, *10*(7), 931-938. doi:10.1002/biot.201400646
- L'Hote, D., Laissue, P., Serres, C., Montagutelli, X., Veitia, R. A., & Vaiman, D. (2010). Interspecific resources: a major tool for quantitative trait locus cloning and speciation research. *Bioessays*, *32*(2), 132-142. doi:10.1002/bies.200900027
- Labarrere, C. A., & Faulk, W. P. (1992). Fetal stem vessel endothelial changes in placentae from normal and abnormal pregnancies. *Am J Reprod Immunol*, *27*(3-4), 97-100.
- Laissue, P. (2015). Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol*, *411*, 243-257. doi:10.1016/j.mce.2015.05.005

- Laissue, P. (2018). The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Mol Cell Endocrinol*, 460, 170-180. doi:10.1016/j.mce.2017.07.021
- Laissue, P., Burgio, G., l'Hote, D., Renault, G., Marchiol-Fournigault, C., Fradelizi, D., . . . Vaiman, D. (2009). Identification of Quantitative Trait Loci responsible for embryonic lethality in mice assessed by ultrasonography. *Int J Dev Biol*, 53(4), 623-629. doi:10.1387/ijdb.082613pl
- Laissue, P., L'Hote, D., Serres, C., & Vaiman, D. (2009). Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. *Animal*, 3(1), 55-71. doi:10.1017/s1751731108003315
- Laissue, P., Lakhal, B., Benayoun, B. A., Dipietromaria, A., Braham, R., Elghezal, H., . . . Veitia, R. A. (2009). Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet*, 46(7), 455-457. doi:10.1136/jmg.2008.065086
- Laissue, P., Lakhal, B., Vatin, M., Batista, F., Burgio, G., Mercier, E., . . . Vaiman, D. (2016). Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. *Open Biol*, 6(10). doi:10.1098/rsob.160109
- Laissue, P., Restrepo, C. M., & Ortiz, A. M. (2017). Improving the evaluation of milestones for students completing a clinical genetics elective. *Genet Med*, 19(12). doi:10.1038/gim.2017.62
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saad, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2009). A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure. In *Clin Endocrinol (Oxf)* (Vol. 71, pp. 752-753). England.
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saad, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2010). BMP15 and premature ovarian failure: causal mutations, variants, polymorphisms? In *Clin Endocrinol (Oxf)* (Vol. 72, pp. 425-426). England.
- Lakhal, B., Laissue, P., Elghezal, H., & Fellous, M. (2008). [Genetic analysis of premature ovarian failure: role of forkhead and TGF-beta genes]. *Gynecol Obstet Fertil*, 36(9), 862-871. doi:10.1016/j.gyobfe.2008.07.002
- Lander, E. S., & Schork, N. J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science*, 265(5181), 2037-2048.
- Li, W., Zeng Chan, W., Cui, X., Xiao Feng, L., & Mao Sheng, Y. (2010). Genome-wide screening for risk loci of idiopathic recurrent miscarriage in a Han Chinese population: a pilot study. *Reprod Sci*, 17(6), 578-584. doi:10.1177/1933719110364248
- Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H., & Ke, N. J. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun*, 260(3), 712-717. doi:10.1006/bbrc.1999.0954
- Mackay, T. F., Stone, E. A., & Ayroles, J. F. (2009). The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nat Rev Genet*, 10(8), 565-577. doi:10.1038/nrg2612
- Majewski, J., Schwartzentruber, J., Lalonde, E., Montpetit, A., & Jabado, N. (2011). What can exome sequencing do for you? *J Med Genet*, 48(9), 580-589. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100223

- Mateus, H. E., Perez, A. M., Mesa, M. L., Escobar, G., Galvez, J. M., Montano, J. I., . . . Laissue, P. (2017). A first description of the Colombian national registry for rare diseases. *BMC Res Notes*, *10*(1), 514. doi:10.1186/s13104-017-2840-1
- Matsuo, H., Maruo, T., Murata, K., & Mochizuki, M. (1993). Human early placental trophoblasts produce an epidermal growth factor-like substance in synergy with thyroid hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)*, *128*(3), 225-229.
- McEwan, M., Lins, R. J., Munro, S. K., Vincent, Z. L., Ponnampalam, A. P., & Mitchell, M. D. (2009). Cytokine regulation during the formation of the fetal-maternal interface: focus on cell-cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix. *Cytokine Growth Factor Rev*, *20*(3), 241-249. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.05.004
- Mitropoulos, K., Al Jaibaji, H., Forero, D. A., Laissue, P., Wonkam, A., Lopez-Correa, C., . . . Patrinos, G. P. (2015). Success stories in genomic medicine from resource-limited countries. *Hum Genomics*, *9*, 11. doi:10.1186/s40246-015-0033-3
- Morser, J. (2012). Thrombomodulin links coagulation to inflammation and immunity. *Curr Drug Targets*, *13*(3), 421-431.
- Nica, A. C., & Dermitzakis, E. T. (2013). Expression quantitative trait loci: present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *368*(1620), 20120362. doi:10.1098/rstb.2012.0362
- Nino, M. Y., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Kroos, M. A., Ospina, S. Y., Mejia, J. F., . . . Laissue, P. (2013). Identification and Functional Characterization of GAA Mutations in Colombian Patients Affected by Pompe Disease. *JIMD Rep*, *7*, 39-48. doi:10.1007/8904_2012_138
- Normand, E. A., Alaimo, J. T., & Van den Veyver, I. B. (2018). Exome and genome sequencing in reproductive medicine. *Fertil Steril*, *109*(2), 213-220. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.12.010
- Norwitz, E. R., Schust, D. J., & Fisher, S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*, *345*(19), 1400-1408. doi:10.1056/NEJMra000763
- Ojeda, D., Lakhal, B., Fonseca, D. J., Braham, R., Landolsi, H., Mateus, H. E., . . . Laissue, P. (2011). Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. *Fertil Steril*, *95*(8), 2658-2660.e2651. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.04.045
- Ortega-Recalde, O., Beltran, O. I., Galvez, J. M., Palma-Montero, A., Restrepo, C. M., Mateus, H. E., & Laissue, P. (2015). Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability. *Clin Genet*, *88*(4), e1-3. doi:10.1111/cge.12634
- Ortega-Recalde, O., Fonseca, D. J., Patino, L. C., Atuesta, J. J., Rivera-Nieto, C., Restrepo, C. M., . . . Laissue, P. (2013). A novel familial case of diffuse leukodystrophy related to NDUFV1 compound heterozygous mutations. *Mitochondrion*, *13*(6), 749-754. doi:10.1016/j.mito.2013.03.010
- Ortega-Recalde, O., Moreno, M. B., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Mosquera, H., . . . Laissue, P. (2015). A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Clin Exp Dermatol*, *40*(7), 757-760. doi:10.1111/ced.12627
- Ortega-Recalde, O., Silgado, D., Fetiva, C., Fonseca, D. J., & Laissue, P. (2016). Transcriptomic analysis of skin in a case of ichthyosis Curth-Macklin caused by a KRT1 mutation. *Br J Dermatol*, *175*(6), 1372-1375. doi:10.1111/bjd.14969

- Ortega-Recalde, O., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Rios, X., Mosquera, H., Bermudez, O. M., . . . Laissue, P. (2014). Whole-exome sequencing enables rapid determination of xeroderma pigmentosum molecular etiology. *PLoS One*, *8*(6), e64692. doi:10.1371/journal.pone.0064692
- Ott, J., Kamatani, Y., & Lathrop, M. (2011). Family-based designs for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*, *12*(7), 465-474. doi:10.1038/nrg2989
- Patino, L. C., Battu, R., Ortega-Recalde, O., Nallathambi, J., Anandula, V. R., Renukaradhya, U., & Laissue, P. (2014). Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PLoS One*, *9*(10), e109576. doi:10.1371/journal.pone.0109576
- Patino, L. C., Beau, I., Carlosama, C., Buitrago, J. C., Gonzalez, R., Suarez, C. F., . . . Laissue, P. (2017). New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Hum Reprod*, *32*(7), 1512-1520. doi:10.1093/humrep/dex089
- Patino, L. C., Silgado, D., & Laissue, P. (2017). A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Syst Biol Reprod Med*, *63*(3), 145-149. doi:10.1080/19396368.2017.1291767
- Patino, L. C., Walton, K. L., Mueller, T. D., Johnson, K. E., Stocker, W., Richani, D., . . . Harrison, C. A. (2017). BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *J Clin Endocrinol Metab*, *102*(3), 1009-1019. doi:10.1210/jc.2016-3503
- Pereza, N., Ostojic, S., Kapovic, M., & Peterlin, B. (2016). Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.007
- Prada, C. F., & Laissue, P. (2014). A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics. *Mamm Genome*, *25*(11-12), 618-635. doi:10.1007/s00335-014-9537-8
- Pulst, S. M. (1999). Genetic linkage analysis. *Arch Neurol*, *56*(6), 667-672.
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Fukuda, M., Gonzalez, R., Suarez, C. F., Patarroyo, M. A., . . . Laissue, P. (2017). Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. *PLoS One*, *12*(10), e0186149. doi:10.1371/journal.pone.0186149
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Gris, J. C., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Fonseca, D. J., . . . Laissue, P. (2017). THBD sequence variants potentially related to recurrent pregnancy loss. *Reprod Biol Endocrinol*, *15*(1), 92. doi:10.1186/s12958-017-0311-0
- Reichman, D. E., & Laufer, M. R. (2010). Congenital uterine anomalies affecting reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, *24*(2), 193-208. doi:10.1016/j.bpobgyn.2009.09.006
- Rowe, S. J., & Tenesa, A. (2012). Human complex trait genetics: lifting the lid of the genomics toolbox - from pathways to prediction. *Curr Genomics*, *13*(3), 213-224. doi:10.2174/138920212800543101
- Sadro, C. T. (2015). Pictorial Review of Complications of Uterine Anomalies. *Can Assoc Radiol J*, *66*(4), 368-376. doi:10.1016/j.carj.2015.08.006
- Scriver, C. R., & Waters, P. J. (1999). Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet*, *15*(7), 267-272.

- Shekouhi, S., Baghbani, F., Hasanzadeh Nazar-Abadi, M., Hamzehloie, T., Abbaszadegan, M. R., Saghafi, N., . . . Mojarrad, M. (2013). Identification of Xq22.1-23 as a region linked with hereditary recurrent spontaneous abortion in a family. *Iran J Reprod Med*, 11(8), 659-664.
- Shurtz-Swirski, R., Inbar, O., Blank, M., Cohen, J., Bakimer, R., Barnea, E. R., & Shoenfeld, Y. (1993). In vitro effect of anticardiolipin autoantibodies upon total and pulsatile placental hCG secretion during early pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 29(4), 206-210.
- Staun-Ram, E., & Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 56. doi:10.1186/1477-7827-3-56
- Stephenson, M. D., & Sierra, S. (2006). Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod*, 21(4), 1076-1082. doi:10.1093/humrep/dei417
- Stolz, A., & Wolf, D. H. (2010). Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta*, 1803(6), 694-705. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.02.005
- Tayade, C., Hilchie, D., He, H., Fang, Y., Moons, L., Carmeliet, P., . . . Croy, B. A. (2007). Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *J Immunol*, 178(7), 4267-4275.
- Vaiman, D. (2015). Genetic regulation of recurrent spontaneous abortion in humans. *Biomed J*, 38(1), 11-24. doi:10.4103/2319-4170.133777
- Valero-Rubio, D., Jimenez, K. M., Fonseca, D. J., Payan-Gomez, C., & Laissue, P. (2018). Transcriptomic analysis of FUCA1 knockdown in keratinocytes reveals new insights in the pathogenesis of fucosidosis skin lesions. *Exp Dermatol*. doi:10.1111/exd.13532
- Valles, C. S., & Dominguez, F. (2006). Embryo-endometrial interaction. *Chang Gung Med J*, 29(1), 9-14.
- van den Brule, F., Berndt, S., Simon, N., Coulon, C., Le Goarant, J., Munaut, C., . . . Foidart, J. M. (2005). Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chem Immunol Allergy*, 88, 163-180. doi:10.1159/000087833
- Vatin, M., Bouvier, S., Bellazi, L., Montagutelli, X., Laissue, P., Ziyat, A., . . . Gris, J. C. (2014). Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss. *Am J Pathol*, 184(2), 362-368. doi:10.1016/j.ajpath.2013.10.024
- Vatin, M., Burgio, G., Renault, G., Laissue, P., Firlej, V., Mondon, F., . . . Ziyat, A. (2012). Refined mapping of a quantitative trait locus on chromosome 1 responsible for mouse embryonic death. *PLoS One*, 7(8), e43356. doi:10.1371/journal.pone.0043356
- Voguel, & Motulsky. (2009). *Voguel and Motulsky's Human Genetics Problems and approaches* (4 ed.). Berlin Heidelberg Springer.
- Wang, W. Y., Barratt, B. J., Clayton, D. G., & Todd, J. A. (2005). Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*, 6(2), 109-118. doi:10.1038/nrg1522

- Weiler, H. (2004). Mouse models of thrombosis: thrombomodulin. *Thromb Haemost*, 92(3), 467-477. doi:10.1160/th04-05-0307
- Weiler-Guettler, H., Christie, P. D., Beeler, D. L., Healy, A. M., Hancock, W. W., Rayburn, H., . . . Rosenberg, R. D. (1998). A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *J Clin Invest*, 101(9), 1983-1991. doi:10.1172/jci2006
- Womack, J. E., Jang, H. J., & Lee, M. O. (2012). Genomics of complex traits. *Ann N Y Acad Sci*, 1271, 33-36. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06733.x
- Xu, N., Ma, C., Ou, J., Sun, W. W., Zhou, L., Hu, H., & Liu, X. M. (2017). Comparative Proteomic Analysis of Three Chinese Hamster Ovary (CHO) Host Cells. *Biochem Eng J*, 124, 122-129. doi:10.1016/j.bej.2017.05.007
- Zhang, F., Hackett, N. R., Lam, G., Cheng, J., Pergolizzi, R., Luo, L., . . . Rafii, S. (2003). Green fluorescent protein selectively induces HSP70-mediated up-regulation of COX-2 expression in endothelial cells. *Blood*, 102(6), 2115-2121. doi:10.1182/blood-2003-01-0049
- Zhang, H., Palmer, R., Gao, X., Kreidberg, J., Gerald, W., Hsiao, L., . . . Haber, D. A. (2003). Transcriptional activation of placental growth factor by the forkhead/winged helix transcription factor FoxD1. *Curr Biol*, 13(18), 1625-1629.

10. ANEXO 1

Artículo: **Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans.**

Laissue P, Lakhal B, Vatin M, Batista F, Burgio G, Mercier E, Santos ED, Buffat C, Sierra-Diaz DC, Renault G, Montagutelli X, Salmon J, Monget P, Veitia RA, Méhats C, Fellous M, Gris JC, Cocquet J, Vaiman D

Revista: Open Biology. Octubre 19 de 2016.