

**IMPLICACIÓN FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN
BMP2-p.Ser987Phe EN LA ETIOLOGÍA DE LA
INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA NO SINDRÓMICA**

DANIEL FELIPE SILGADO GUZMÁN

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR NUESTRA SEÑORA DEL
ROSARIO**

**FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ, D.C. DICIEMBRE DE 2017**

**IMPLICACIÓN FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN
BMP2-p.Ser987Phe EN LA ETIOLOGÍA DE LA
INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA NO SINDRÓMICA**

DANIEL FELIPE SILGADO GUZMÁN

TRABAJO DE GRADO

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

DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD, HDR

CO-DIRECTOR

LILIANA PATIÑO MSc, PhD (c)

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR NUESTRA SEÑORA DEL
ROSARIO**

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C. DICIEMBRE DE 2017

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Nota de Aceptación

Director

Co-Director

Jurado

Jurado

Bogotá, D.C. Diciembre de 2017

Agradecimientos

Principalmente a Dios por acompañarme y bendecirme durante este camino.

A toda mi familia que me acompañó y apoyó en este proceso, especialmente a mi papá, mamá, hermana, abuelita y Capi, infinitas gracias.

Al grupo CIGGUR y al Doctor Paul por permitirme hacer parte de esta experiencia académica, formativa e investigativa, para poder aportar un grano arena a la ciencia con el desarrollo de la presente tesis.

A Liliana Patiño por ser quien me acompañó mano a mano durante la realización de la presente tesis y compartió sus conocimientos y sus experiencias conmigo.

A mis queridas amigas del alma de quienes siempre recibí su genuino apoyo, cariño y amistad durante este camino y para siempre.

A la Universidad del Rosario por ser la institución que me abrió sus puertas y me brindó la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación.

Tabla de contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1 Foliculogénesis	3
3.1.1 Etapas del desarrollo folicular	3
3.1.2 Regulación de la función ovárica	6
3.1.3 Aspectos moleculares de la foliculogénesis	9
3.2 Insuficiencia ovárica primaria (IOP)	12
3.2.1 Definición	12
3.2.2 Epidemiología	12
3.2.3 Etiología	13
3.2.3.1 Causas iatrogénicas	13
3.2.3.2 Causas autoinmunes	14
3.2.3.3 Causas infecciosas	15
3.2.3.4 Causas genéticas	15
3.2.3.4.1 IOP sindrómica	16
3.2.3.4.2 IOP no sindrómica: Genes etiológicos	20
3.3 BMPR2	27
3.3.1 Genómica y proteómica	27
3.3.2 Funciones de BMPR2 y la vía de señalización BMP/SMAD	29
3.3.3 Mutaciones en <i>BMPR2</i>	31
4. Preguntas de investigación	36
5. Objetivos de la investigación	37
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos específicos	37
6. Materiales y métodos	38

6.1 Estudio de la localización subcelular de BMPR2	38
6.1.1 Plásmidos	38
6.1.2 Cultivo celular y transfecciones	38
6.1.3 Montaje de láminas y ensayo de localización con la GFP	39
6.2 Evaluación del potencial efecto dominante negativo de la mutación p.Ser987Phe de BMPR2	41
6.3 Ensayo de doble híbrido en levaduras para la identificación de proteínas de interacción (<i>partners</i>) con BMPR2	41
7. Resultados	45
7.1 Localización subcelular de BMPR2	45
7.2 Ensayo de doble híbrido en levaduras	46
8. Discusión	49
9. Conclusiones y perspectivas	53
10. Bibliografía	54
11. Anexo 1	84

Figuras

Figura 1. Dominios funcionales de BMPR-II	28
Figura 2. Vía de señalización TGF- β /BMP canónica y no canónica para BMPRII	30
Figura 3. Procesos celulares/moleculares asociados a los dominios funcionales de BMPRII	31
Figura 4. Pedigrí de la mujer afectada por IOP, portadora de las mutaciones <i>BMPR2</i> : c.2960C>T (parte derecha en negrilla) y <i>LHCGR</i> : c.296A>G (parte izquierda en negrilla)	34
Figura 5. Esquema del sistema de doble híbrido Y2H (<i>Hybrigenics</i>)	42
Figura 6. Fragmento del <i>bait</i> de la región C-ter de <i>Bmpr2</i> (<i>Hybrigenics</i>)	43
Figura 7. Transfección de las construcciones BMPR2-Ser987Phe-GFP o BMPR2-WT-GFP en las células CHO	45
Figura 8. SID de las proteínas de interacción categoría A con <i>Bmpr2</i> de ratón (<i>Hybrigenics</i>)	48

Tablas

Tabla 1. Cálculos de transfección para 6 réplicas (n=6)	39
Tabla 2. Categorías de interacción proteína-proteína, según el PBS global	44
Tabla 3. Resultados del ensayo Y2H de las interacciones categoría A (PBS) de los cuatro <i>partners</i>	47

Anexos

Anexo 1: Artículo. **A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency.** Patiño Liliana; Silgado Daniel; Laissue Paul. Systems biology in reproductive medicine. Marzo 17 de 2017.

1. Resumen

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) es una enfermedad frecuente que se caracteriza por amenorrea antes de los 40 años y niveles elevados de gonadotropinas. En un estudio previo, efectuado mediante secuenciación de siguiente generación (NGS) en 70 genes candidatos, se identificó la mutación c.2960C>T (p.Ser987Phe) en el gen que codifica el receptor tipo 2 de las proteínas morfogénicas óseas (*BMPR2*). La mutación estaba localizada en el dominio C-terminal, lo que podría modificar su plegamiento y su interacción con otras proteínas. Por lo tanto, se evaluó el potencial efecto patogénico de la mutación *BMPR2*-p.Ser987Phe a nivel de la localización subcelular. Las formas silvestre y mutante de *BMPR2*, clonadas en fase con GFP en un plásmido de expresión, fueron transfectadas en las células CHO. Las células fueron tratadas con un marcador de localización del retículo endoplásmico (RE) y visualizadas en un microscopio de fluorescencia para su caracterización y conteo. El conteo celular permitió observar en las células transfectadas con la versión mutante, un aumento estadísticamente significativo de agregados localizados en el RE, evidenciando un patrón diferencial de retención perinuclear. La falta de biodisponibilidad potencial de *BMPR2* en la membrana celular, debido a la retención proteica producida por la mutación p.Ser987Phe, podría perturbar las vías de señalización intracelular. Por lo tanto, se propuso una relación funcional entre la mutación c.2960C>T y la etiología de la IOP. Además, se realizó un tamizaje de las potenciales proteínas de interacción con *BMPR2*, mediante el ensayo de doble híbrido en levaduras (Y2H), utilizando una librería de ovario de ratón. Se identificaron cuatro proteínas con una muy alta probabilidad de interacción: *Limk1*, *Ctnnd1*, *Fasn* y *Fn1*. Se deben realizar estudios funcionales para validar estas interacciones con proteínas humanas y para evaluar el potencial efecto de la mutación p.Ser987Phe en la perturbación de las interacciones.

2. Introducción

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) es una enfermedad frecuente que causa infertilidad en 1% al 2% de las mujeres menores de 40 años. Aproximadamente el 80% de los casos son idiopáticos, lo cual sugiere una etiología genética. BMPR2 es un receptor quinasa tipo II de la proteína morfogénica ósea, miembro de la superfamilia de receptores de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β). Está involucrado en varios procesos celulares como la diferenciación y la proliferación celular, la osteogénesis, la homeostasis y la apoptosis. En un contexto ovárico BMPR2 se expresa en las células de la granulosa y participa en la vía de señalización BMP/SMAD, a través de la unión de los ligandos BMP15 y GDF9 con el complejo BMPR2-ALK4/5/7-ALK6. Considerando que mutaciones identificadas en *BMP15* se han relacionado con la IOP, se hipotetizó que una mutación de *BMPR2*, descrita previamente por nuestro grupo, podría causar la enfermedad.

En la presente tesis se evaluó el impacto funcional de la mutación p.Ser987Phe de BMPR2. Se realizó un ensayo de localización subcelular utilizando la proteína de marcaje GFP. También se identificaron proteínas de interacción que podrían estar relacionadas con BMPR2 en la fisiología del ovario.

3. Marco teórico

3.1. Foliculogénesis

3.1.1 Etapas del desarrollo folicular

El folículo es la unidad funcional básica del ovario el cual consiste en un oocito rodeado por células de la granulosa y de la teca (Elvin & Matzuk, 1998). Durante la embriogénesis (semana 4 de la gestación en los humanos) los folículos son producidos a partir de un 'pool' de células germinales primordiales que migran hacia la gónada en formación para constituir las oogonias. En la semana 20 de gestación se estima un número aproximado de 7 millones de oogonias en el ovario en desarrollo (Persani et al., 2010). Estas estructuras sufren posteriormente sucesivas divisiones mitóticas antes de entrar en meiosis I, progresando hasta la fase diploteno de profase I, ya como oocitos, cuando ocurre un arresto meiótico (Grive & Freiman, 2015).

Muchos de los oocitos sufren muerte celular por apoptosis, en tanto los restantes son rodeados por una capa de células somáticas de la pre-granulosa, constituyendo así un 'pool' de folículos primordiales (Cohen & Holloway, 2010). Este 'pool' se ve drásticamente disminuido por atresia desde el nacimiento. En ese momento la reserva ovárica consta alrededor de 1 millón de folículos primordiales. En la pubertad el número de folículos se reduce hasta 300.000 de los cuales únicamente 400-500 son ovulados antes de la menopausia (Persani et al., 2010).

Los folículos se desarrollan en diferentes etapas cambiando su morfología y el número y el tipo de células que los componen (McGee & Hsueh, 2000). Este proceso puede resumirse en cuatro etapas: iniciación del crecimiento folicular, crecimiento folicular basal, selección de un folículo a partir de un 'pool' y maduración del folículo pre-ovulatorio (Gougeon, 2010). Una vez que se establece la reserva ovárica después del nacimiento, un pequeño grupo de folículos es susceptible de iniciar la fase de crecimiento que finalizará con la ovulación y la

fertilización. Este proceso continúa a lo largo de la vida de la mujer hasta la menopausia, cuando la reserva ovárica se extingue, cesando de esa forma la foliculogénesis y la ovulación (Hutt & Albertini, 2007).

Durante la fase inicial del crecimiento folicular, también conocida como fase pre-antral, el oocito experimenta un incremento en su volumen junto con la proliferación de células de la granulosa (CG). El intercambio bidireccional de moléculas de señalización entre esta capa de células y el oocito es esencial para el adecuado crecimiento y desarrollo del folículo después del nacimiento (Grive & Freiman, 2015). Sin embargo, el oocito por si solo también cumple con una función activa en cuanto a dirigir el desarrollo folicular, a través de la síntesis de moléculas que regulan la proliferación y la diferenciación de las CG. Además, participan en el reclutamiento de las células de la teca (CT) y en la secreción de componentes de la matriz extracelular (Eppig et al., 2002; Hussein et al., 2005; Hutt & Albertini, 2007).

El crecimiento folicular pre-antral es independiente del estímulo hormonal y su regulación involucra principalmente la comunicación paracrina entre la granulosa y el oocito, así como la producción local de factores de crecimiento tales como el factor 9 de diferenciación del crecimiento (GDF9) y la proteína morfogénica ósea 15 (BMP15) (Edson et al., 2009; Gougeon, 2010; Hanrahan et al., 2004). En esta etapa del desarrollo se forma la zona pelúcida en los folículos primordiales y las CG cambian su morfología de plana a cuboide, dando lugar a los folículos primarios (Wassarman et al., 1996). Estas estructuras progresan hacia folículos secundarios al rodearse de dos o más capas de CG. En este punto del desarrollo, células diferenciadas del estroma se alinean paralelamente entre sí cerca de la lámina basal para constituir la capa de CT. El folículo aumenta aún más de tamaño y la capa de la teca se estratifica y diferencia en dos grupos: células de la teca externa e interna. Las células de la teca interna toman una forma parecida a las células epiteliales, siendo referidas como células epiteloides. En este momento

el folículo secundario es definido como pre-antral. Cuando se desarrolla una cavidad llena de fluido (conocido como líquido folicular) el folículo evoluciona hacia la etapa antral temprana. Desde este momento las CG que rodean el oocito constituyen el cúmulo oóforo (Gougeon, 2010).

Durante el desarrollo folicular antral hay un aumento en la vascularización y la permeabilización de los vasos sanguíneos lo que intensifica la producción de líquido folicular. Esto permite que el fluido antral sirva como fuente importante de sustancias reguladoras derivadas de la sangre o de secreciones de las células foliculares como las gonadotropinas, los esteroides, las enzimas y los factores de crecimiento (Van Den Hurk & Zhao, 2005). La progresión hacia el desarrollo del folículo antral es dependiente de la hormona folículo estimulante (FSH), secretada por la glándula hipófisis. Se observa el cese del crecimiento oocitario y la proliferación y la diferenciación de las CG así como la adquisición de la competencia para completar la meiosis (Hutt & Albertini, 2007). Aparecen entonces dos poblaciones de CG: las células murales de la granulosa, que son críticas para la esteroidogénesis y la ovulación, y las células del cúmulo que rodean el oocito (Edson et al., 2009). La FSH es un regulador clave en la interacción entre las células del cúmulo y el oocito para que transcurra y se complete el desarrollo folicular antral (Hutt & Albertini, 2007).

Durante las etapas folicular antral y pre-ovulatoria existe un reclutamiento de los folículos antrales que continuarán con su desarrollo hasta la selección de un folículo dominante, el cual estará destinado a ovular, a expensas de la cohorte de folículos restantes que sufrirán atresia. Precisamente la sobrevivencia del 'pool' de folículos antrales y finalmente del folículo dominante recae en gran medida en la FSH al prevenir su atresia espontánea. En efecto, la hormona luteinizante (LH) por sí sola no puede hacerlo (Markström et al., 2002). El paso a la fase folicular pre-ovulatoria para la selección del folículo dominante está caracterizado por una disminución en los niveles de FSH y por un pico de secreción de la LH, conocida como la fase lútea. Esta condición es determinante para la inducción de la

ovulación. Los folículos antrales deben estar en capacidad de responder ante tal estímulo por lo que hay un aumento en la expresión de los receptores para la LH (Baerwald et al., 2012; Gougeon, 2010).

3.1.2 Regulación de la función ovárica

Desde el nacimiento cuando el oocito inicia el arresto en profase de la primera división meiótica, se rodea de células somáticas para constituir los folículos primordiales. Durante las siguientes etapas de la foliculogénesis se genera una asociación estrecha entre el oocito y esta capa de células circundantes para producir un oocito competente para la fertilización. La acción de las gonadotropinas es esencial para regular este proceso (Eppig, 1991; Eppig et al., 2002). La regulación involucra mecanismos paracrinos, autocrinos (intrínsecos del ovario) y endocrinos originados en la secreción hormonal de la hipófisis. El estadio folicular pre-antral se caracteriza por responder (y no depender) de la acción de las gonadotropinas e involucra principalmente la producción de factores solubles por parte del oocito, las CG y las CT. Por su parte, los estadios folicular antral y preovulatorio son dependientes de la secreción de gonadotropinas (Hutt & Albertini, 2007; McGee & Hsueh, 2000; Orisaka et al., 2009).

Tanto en la proliferación de los folículos primordiales como durante el desarrollo folicular temprano hay una estrecha comunicación entre el oocito y las células que lo rodean. Uno de los sistemas observados en esta comunicación es el KIT/KIT-ligando (KITL). KIT es un receptor tipo tirosina-quinasa localizado en la membrana del oocito, mientras que KITL es un factor de crecimiento expresado por las CG (Edson et al., 2009; Hutt, 2006). Esta interacción permite la formación, la proliferación y el reclutamiento inicial de los folículos primordiales, al igual que promueve la supervivencia y el crecimiento oocitario. Por lo tanto, es esencial para la iniciación de la fase de crecimiento folicular a partir del 'pool' primordial (Driancourt et al., 2000; Gosden, 2002; Matzuk, 2002).

En respuesta a la estimulación por KITL los oocitos expresan proteínas implicadas en el desarrollo folicular pre-antral como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y dos miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformante (TGF- β): el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogénica ósea 15 (BMP15). En la transición de folículo primario a secundario la síntesis de FGFs promueve la proliferación y la diferenciación de las CG, a lo cual contribuye GDF9 y BMP15 (Emori & Sugiura, 2014). Se ha sugerido que GDF9 es un factor importante, no solamente para la proliferación de las CG, sino también para el reclutamiento de las CT (Carabatsos et al., 1998; Gilchrist et al., 2004; Vitt et al., 2000). Además, la acelerada tasa de crecimiento observada en los oocitos de animales deficientes en GDF9 permitió postular que este factor puede estar implicado en una vía de retroalimentación negativa para regular el crecimiento oocitario (Combelles & Albertini, 2003). Un mecanismo que explica este efecto plantea a GDF9 como regulador negativo de la expresión de KITL en las CG (Joyce et al., 1999). BMP15 por su parte estimula la expresión de KITL mientras que KITL, regula negativamente la expresión de BMP15 creando un circuito de retroalimentación negativa paracrina entre las CG y el oocito (Otsuka & Shimasaki, 2002).

Además de la síntesis de los factores de crecimiento locales en el ovario que regulan de manera paracrina y autocrina el desarrollo folicular pre-antral, es de vital importancia la comunicación física entre el oocito y su entorno (Hutt & Albertini, 2007). Esto es posible a través de canales intercelulares denominados uniones comunicantes (*gap junctions*) los cuales están conformados, entre otros, por conexinas que constituyen una vía directa entre el citoplasma de las CG y el oocito. De este modo se facilita el transporte de moléculas y factores como los ya mencionados para facilitar el desarrollo folicular (Kidder & Mhawi, 2002).

Como resultado de estos eventos los folículos adquieren las características fenotípicas definitivas al final del estadio secundario y responder a la secreción

cíclica de las gonadotropinas circulantes (FSH y LH) y ejercer la transición a los estadios folicular antral y pre-ovulatorio. En el estadio folicular secundario las CG ya han expresado en su membrana los receptores para la FSH (FSHR) que son importantes para la proliferación promoviendo la producción creciente de estrógenos (Senbon et al., 2003). Las activinas estimulan la expresión de los FSHR en las CG e inhiben la expresión de los receptores para la LH (LHCGR) en las CT, de tal manera que la unión de la FSH a su receptor promueve la aromatización de los andrógenos a estrógenos. A medida que las CG continúan la proliferación y la diferenciación durante el estadio folicular antral, prosigue la formación del antro junto con la producción de líquido folicular, lo cual está acompañado por la acción sinérgica de la FSH y los estrógenos (de Kretser et al., 2002; Hillier, 2009). El líquido folicular proporciona el medio necesario para la maduración y el desarrollo folicular, puesto que es rico en nutrientes, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, siendo en esta fase los estrógenos la hormona esteroidea dominante (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

Al final de este estadio del desarrollo cuando las concentraciones de estrógenos son elevadas se induce la expresión de inhibinas y de folistatina cuyo efecto inmediato es la disminución de las concentraciones de las activinas en el folículo antral. Esto permite la expresión de los LHCGR en las CT que en contacto con la LH circulante promueve la expresión de andrógenos a partir del colesterol, generando así un mecanismo de retroalimentación positiva entre las CG y las CT (Hillier, 2009; Knight et al., 2012). Según la teoría “dos células dos gonadotropinas” la comunicación paracrina entre estos dos tipos celulares permite que se regule la síntesis de estrógenos, ya que los andrógenos producidos en respuesta a la LH en las CT pueden convertirse en estrógenos en las CG, a través de la aromatización inducida por la FSH (Howles, 2000).

La función de supervivencia de la FSH se asocia a la estimulación del reclutamiento de un grupo de folículos antrales los cuales escapan a la apoptosis. El reclutamiento es cíclico y se inicia a partir de la pubertad durante cada ciclo

reproductivo. Dentro de esta cohorte únicamente un folículo será elegido como dominante para ser ovulado (McGee & Hsueh, 2000). Este producirá mayores niveles de estrógenos e inhibinas generando así un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de la FSH. De esta forma habrá una selección negativa sobre los demás folículos subordinados de la cohorte llevándolos a atresia, mientras que el folículo dominante prosigue su desarrollo pre-ovulatorio (Gougeon, 2010; Hillier, 2009; Markström et al., 2002).

Paralelamente, el folículo dominante produce elevados niveles de factores de crecimiento, tanto paracrinos como autocrinos, para estimular el incremento en la vascularización y en la respuesta a la FSH. Consecuentemente, aumenta la expresión de FSHR y LHCGR en las CG del folículo seleccionado, asegurando el desarrollo y la supervivencia del mismo para una eventual ovulación. Ante la presencia de LHCGR en las CG, el folículo pre-ovulatorio puede responder al pico de secreción de la LH en la fase lútea, resultando en un oocito detenido en metafase II con capacidad de ser fertilizado (McGee & Hsueh, 2000). Al término de la ovulación el remanente del folículo dominante es estimulado por la LH para diferenciarse en el cuerpo lúteo, cuya producción de esteroides (especialmente progesterona), desempeña funciones importantes en los estadios iniciales del embarazo como la preparación del endometrio, como medio de soporte y de alimentación del embrión (Devoto et al., 2009).

3.1.3 Aspectos moleculares de la foliculogénesis

Los modelos de ratón *knockout* (KO) han permitido definir genes clave en varias etapas del desarrollo folicular. Por ejemplo, el gen *NOBOX* codifica para un factor de transcripción específico de las células germinales oocitarias, cuya función es esencial en la etapa inicial de la foliculogénesis. Hay evidencia de que *NOBOX* regula directa o indirectamente la expresión de otros genes, ya que en modelos KO se ha evidenciado la sub-regulación de la expresión de varios genes

preferencialmente expresados en el ovario como *Gdf9*, *Bmp15*, *Mos* y *Oct4* (Choi & Rajkovic, 2006).

La hormona antimulleriana (AMH) también interviene en el inicio del desarrollo folicular, ya que ejerce un rol inhibitorio en la transición de folículo primordial a primario. AMH es miembro de la super-familia de factores de crecimiento transformante β (TGF β). Está presente en las células de la granulosa de folículos primarios y de folículos en crecimiento en los ovarios de ratón (Durlinger et al., 2002; Weenen et al., 2004). Se ha propuesto que la AMH tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento folicular, atenuando la sensibilidad de los folículos a la FSH. Esto se asocia a la disminución del número de folículos reclutados en cada ciclo (Durlinger et al., 2001). En humanos no se conocen aún los mecanismos moleculares exactos de la AMH. Sin embargo, se cree que puede tener un efecto dominante negativo sobre alguna proteína de la cascada TGFB (Choi & Rajkovic, 2006).

Forkhead box L2 (FOXL2) es un miembro de la familia de factores de transcripción con un dominio *forkhead* de unión al ADN, localizado en el promotor de genes blanco importantes en el desarrollo folicular (Kaestner et al., 2000; Lehmann et al., 2003). FOXL2 se expresa en las células de la pre-granulosa de los folículos primordiales siendo esencial para su diferenciación y para el mantenimiento del ovario (Schmidt, 2004). Además, FOXL2 reprime la actividad del promotor del gen regulador esteroideogénico (*Star*), encargado de la movilización y transporte de precursores de colesterol en la membrana interna mitocondrial, esenciales para la síntesis de hormonas esteroideas con importante función en la foliculogénesis. FOXL2 se expresa durante todo el desarrollo folicular hasta la edad adulta (Laissue, 2017).

Las neurotrofinas y sus receptores tienen varias funciones en la diferenciación y la supervivencia de las neuronas del sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, también se expresan en otros tejidos donde ejercen diferentes

funciones. En el ovario tienen una función importante en la diferenciación y en la proliferación de las células somáticas que rodean el oocito, durante el desarrollo temprano de la foliculogénesis. Estas funciones han sido evaluadas en modelos de ratones *knockout* (Ojeda et al., 2000). En el ovario se expresa el factor de crecimiento del nervio (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4/5 (NT4/5), y sus respectivos receptores (P75NTR, TRKA, TRKB y TRKC). La vía de señalización NGF-TRKA, junto con la interacción de GDF9 y KITL, es necesaria para el desarrollo de los folículos primordiales. Por su parte la respuesta generada por NT4/5 y BDNF a través de su receptor TRKB permite la proliferación de las células de la granulosa, siendo claves en las etapas foliculares tempranas (Choi & Rajkovic, 2006).

Los miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) como FGF2 y FGF7 también desempeñan funciones mitogénicas y angiogénicas en múltiples tejidos y órganos, incluido el ovario. FGF2 se expresa en folículos primordiales y en crecimiento, al igual que en las células de la granulosa regulando una gran variedad de funciones ováricas incluyendo crecimiento celular, desarrollo de los folículos primordiales y estabilización del folículo (Obara et al., 2005; Ortega et al., 1998). Por su parte, la expresión de FGF7 se ha detectado en células de la teca estimulando la proliferación de las células de la granulosa durante el desarrollo folicular. Ambos factores de crecimiento inducen la expresión de KITL amplificando sus efectos en el crecimiento oocitario (Kezele et al., 2005; Parrott et al., 1994).

El factor inhibitorio de la leucemia (LIF) es otro producto génico cuya función es muy importante en la función ovárica. Se trata de una glicoproteína citoquina multifuncional expresada en varios tejidos incluidos el útero, el pulmón y la hipófisis, entre otros. Este factor es secretado al líquido folicular y su concentración aumenta a medida que avanza el desarrollo folicular (Humaidan et al., 2011; Ozornek et al., 1999). En el ovario de ratón se ha detectado su presencia en células de la granulosa de folículos primordiales y primarios, y como

sucede con FGF2/7, promueve el incremento de los niveles de mRNA de KitL en cultivos de células de granulosa. Sin embargo, LIF no induce la proliferación de estas células, sugiriendo su participación indirecta en la transición folicular mediante la expresión de KITL (Richter, 2008; Stewart & Cullinan, 1997).

Las primeras etapas de la foliculogénesis son críticas para la maduración y selección del folículo dominante en cada ciclo. Muchos de los genes involucrados en el ovario son expresados en la foliculogénesis temprana formando una red compleja de mecanismos moleculares y celulares. Identificar estos genes para aproximarse a la comprensión de estos mecanismos, ha sido posible gracias a los modelos *knockout* realizados en ratón/rata y a los análisis de transcriptómica en ovarios de ratón recién nacido/gónadas embrionarias, así como el uso de las tecnologías de secuenciación masiva de siguiente generación (NGS) (Matzuk & Lamb, 2008).

3.2 Insuficiencia ovárica primaria (IOP)

3.2.1 Definición

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) es una de las causas más frecuentes de la infertilidad femenina, dado el deterioro progresivo de la función ovárica antes de los 40 años de edad, afectando aproximadamente al 1.5% de las mujeres a nivel mundial (Luborsky et al., 2003). La IOP se define como el cese de la menstruación durante al menos 4 meses, con hipoestrogenismo y niveles elevados de FSH (>25 UI) y de LH (Fortuño & Labarta, 2014; Laissue, 2017; Qin et al., 2015).

3.2.2 Epidemiología

La IOP es una enfermedad frecuente y su prevalencia aumenta con la edad, afectando aproximadamente 1 de cada 10000 mujeres antes de los 20 años de edad (0,01%), 1 de cada 1000 mujeres menores de 30 años (0,1%) y 1 de cada 100 mujeres menores de 40 años (1%) (Fortuño & Labarta, 2014). Se estima que

para mujeres con amenorrea primaria la prevalencia es del 10% al 28% y para mujeres con amenorrea secundaria del 4% al 18% (Ebrahimi & Asbagh, 2011; D. Goswami & Conway, 2005). La IOP puede clasificarse en esporádica y familiar, siendo la mayoría de casos de aparición esporádica. Sin embargo, aproximadamente del 10% al 15% presentan un familiar afectado en primer grado (Qin et al., 2015).

3.2.3 Etiología

La IOP puede originarse según diferentes mecanismos que involucran defectos en la fisiología del ovario. Puede ser causado por la disminución inicial en el pool de folículos primordiales, por un proceso acelerado de atresia folicular o por una alteración en el reclutamiento o la maduración de los folículos primordiales (Persani et al., 2010). Las causas de la IOP son heterogéneas e incluyen factores iatrogénicos, autoinmunes, infecciosos, cromosómicos y genéticos. Sin embargo, más del 50% de los casos son idiopáticos (D. Goswami & Conway, 2005). Los mecanismos moleculares involucrados en la función ovárica son complejos, muchos de los cuales no se han explorado y son regulados por una gran cantidad de genes, lo cual puede explicar una parte de los casos sin etiología conocida.

3.2.3.1 Causas iatrogénicas

Las principales causas iatrogénicas relacionadas con la IOP son la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía pélvica. El tratamiento contra condiciones neoplásicas reduce significativamente la función ovárica, induciendo apoptosis de los folículos maduros. Así mismo, la estructura y la función de las células de la granulosa y de los oocitos son afectadas por los agentes quimioterapéuticos (D. Goswami & Conway, 2005). Los agentes alquilantes son los que generan un mayor riesgo y citotoxicidad, incluso si el ovario se encuentra en estado de reposo. La tasa de atresia folicular depende tanto del nivel de exposición y la dosis como de la edad

(Ebrahimi & Asbagh, 2011). Los agentes empleados en la quimioterapia conllevan a la IOP en aproximadamente el 40% de las mujeres (Cox & Liu, 2014).

El efecto de la radioterapia depende de la edad y el tiempo de exposición. La radiación directa en la pelvis de la mujer acelera el proceso de atresia folicular, incluso con protección del área tratada (Kokcu, 2010). El ovario prepuberal es relativamente resistente a este tipo de efecto gonadotóxico (Beerendonk & Braat, 2005). La mayoría de las cirugías pélvicas tienen el potencial de afectar la función ovárica, debido a la disminución del suministro sanguíneo o causando inflamación en el área (D. Goswami & Conway, 2005).

3.2.3.2 Causas autoinmunes

Las causas autoinmunes relacionadas con IOP se deben probablemente a factores ambientales o genéticos que inician, entre otras, la respuesta inmune e involucran el complejo mayor de histocompatibilidad, las citoquinas, la inmunidad celular y la inmunidad humoral. Los mecanismos autoinmunes explican la patogénesis del 4 al 30% de los casos (Bakalov et al., 2005; Ebrahimi & Asbagh, 2011). Para la identificación de la etiología autoinmune de la IOP se debe tener en cuenta la presencia de ooforitis linfocitaria, la presencia de anticuerpos contra el ovario y los desórdenes autoinmunes asociados (Bakalov et al., 2005; Hoek et al., 1997).

La IOP también está relacionada con diferentes enfermedades autoinmunes tanto endocrinas como no endocrinas. Los trastornos endocrinos incluyen el hipotiroidismo (25%), la enfermedad de Addison (3%) y la diabetes mellitus (3%), entre otros. En cuanto a los desórdenes no endocrinos asociados a la IOP se encuentran la enfermedad de Chron, el vitiligo, la anemia perniciosa, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la miastenia gravis y la trombocitopenia purpura, entre otros (Dragojevic-Dikic et al., 2010; Goswami & Conway, 2007).

Aproximadamente el 3% de las mujeres con IOP tienen disfunción endocrina asociada conocida también como síndrome poli-glandular autoinmune (SPA) tipo I y II. El síndrome tipo I es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva caracterizado por autoinmunidad múltiple de órganos específicos, secundaria a anti-anticuerpos dirigidos contra enzimas intracelulares claves en el mecanismo inmune. La IOP en la forma de amenorrea primaria se desarrolla en el 60% de los casos de SPA tipo I. Por su parte, SPA tipo II es un desorden autosómico dominante asociado con falla gonadal en el 4% de los pacientes. La enfermedad de Addison es un componente de ambos tipos de SPA y aproximadamente el 10% de las mujeres con esta enfermedad tienen IOP (Ebrahimi & Asbagh, 2011; Lebovic & Naz, 2004; Russell & Robboy, 2004).

3.2.3.3 Causas infecciosas

La parotiditis se ha asociado directamente con la IOP, aunque la incidencia es desconocida. En la mayoría de los casos después de recuperarse de la parotiditis, la función ovárica retorna a la normalidad (D. Goswami & Conway, 2005). Adicionalmente hay reportes de infecciones causadas por agentes virales y microbianos, tales como la tuberculosis, la varicela, el citomegalovirus, la malaria y la shigella, asociadas a la IOP (Ebrahimi & Asbagh, 2011; Panay & Kalu, 2009).

3.2.3.4 Causas genéticas

Aproximadamente del 50% al 80% de los casos de IOP son idiopáticos, lo cual sugiere la participación de factores genéticos (Conway, 2000; D. Goswami & Conway, 2007). Se han identificado diferentes causas genéticas en los autosomas y en el cromosoma X, que incluyen anomalías cromosómicas (numéricas y estructurales) y variantes de secuencia que pueden originar IOP sindrómica o no sindrómica (Chapman et al., 2015; Lacombe et al., 2006; Laissue, 2015, 2017; Laissue et al., 2008; Persani et al., 2010). Aprovechando herramientas como el análisis de ligamiento en familias, ha sido posible identificar varios genes

candidatos que podrían explicar el origen de la IOP. Mutaciones detectadas en estos genes han sido luego validadas funcionalmente (Chapman et al., 2015; Fortuño & Labarta, 2014; Jin et al., 2012; Laissue, 2015, 2017). Los genes cuya función es importante en la fisiología ovárica son particularmente interesantes, ya que las mutaciones identificadas en ellos pueden contribuir a la etiología de la IOP (Laissue, 2017).

3.2.3.4.1 IOP sindrómica

Síndrome de Turner (ST)

La pérdida parcial o completa del cromosoma X es el principal defecto cromosómico en humanos. Esta monosomía, la única compatible con la vida, se asocia a IOP y se caracteriza principalmente por disgenesia ovárica, estatura baja, cuello corto y alado, entre otras anormalidades propias de la enfermedad (Ebrahimi & Asbagh, 2011). En el 50% de los casos el cariotipo es 45,X y se produce con una frecuencia aproximada de 1:2500 mujeres nacidas vivas (Hook & Warburton, 2014; Persani et al., 2010; Sybert & McCauley, 2004).

En mujeres con ST la pérdida oocitaria ocurre principalmente en las etapas tempranas de la profase meiótica y del desarrollo ovárico, resultando en una disgenesia ovárica y amenorrea primaria con elevados niveles de FSH, desde la infancia (Fechner et al., 2006). El fenotipo de esta monosomía puede explicarse por la haploinsuficiencia de los genes involucrados en la función ovárica, que escapan a la inactivación del cromosoma X (Laissue, 2015; Persani et al., 2010; Zinn & Ross, 1998).

Otras anomalías del cromosoma X

Los defectos relacionados al cromosoma X han sido ampliamente reconocidos como una causa frecuente de varias formas de IOP familiar y esporádica. Defectos estructurales en el cromosoma X involucran deleciones, isocromosomas y

translocaciones balanceadas (R. Goswami et al., 2003). Se han identificado regiones en el brazo largo del cromosoma X, críticas para la función ovárica, las cuales están asociadas con deleciones intersticiales (IOP1: Xq23-Xq27) y con puntos de ruptura de translocaciones balanceadas (IOP2: Xq13-Xq21) (Tharapel et al., 1993; Toniolo, 2006). Se ha propuesto que la región IOP2 gobierna las regulaciones epigenéticas que reducen o anulan la expresión de los genes autosómicos en los oocitos durante la maduración folicular (Rizzolio et al., 2006; Rizzolio et al., 2007).

Casi todas las deleciones distales que se originan en la región Xq13 están asociadas con amenorrea primaria, falta de desarrollo de la glándula mamaria y falla ovárica completa (Simpson, 2008). Por el contrario, las deleciones en las regiones Xq25 y Xq26 (IOP1) se caracterizan generalmente por causar el fenotipo clásico de IOP (Simpson & Rajkovic, 1999). Múltiples genes en el cromosoma X han sido identificados por los puntos de ruptura en eventos de translocaciones X-autosoma, lo cual genera la disrupción de loci relevantes que contienen genes cuya expresión está alterada. Algunos de estos genes son *DIAPH2* (Xq22), *XPNPEP2* (Xq25), *DACH2* (Xq21.3), *POF1B* (Xq21.1), *CHM* (Xq21.1), *COL4A6* (Xq22.3) y *BMP15* (Xp11.2), entre otros (Qin et al., 2015).

Síndrome del X frágil

Este síndrome es un trastorno de herencia dominante ligado al cromosoma X con penetrancia incompleta y una prevalencia de 1/4000 en hombres y 1/6000 en mujeres. Es la causa hereditaria más común de retraso mental y retraso del desarrollo (Biancalana et al., 2004). Esta enfermedad es causada por la expansión de más de 200 repeticiones del trinucleótido CGG en la región 5' UTR del gen *FMR1* (*Fragile X mental retardation 1*), el cual se localiza en la región Xq27.3. La expansión de trinucleótidos por fuera del rango normal, conduce al silenciamiento del gen *FMR1* mediante su metilación. Los alelos premutados, definidos entre 50 y 200 repeticiones, tienen un alto riesgo de expandirse en la próxima generación convirtiéndose en una mutación patogénica. La prevalencia de mujeres portadoras

de premutaciones en *FMR1* en la población general es 1/100 (Hagerman & Hagerman, 2002; Van Esch, 2006) y aproximadamente del 16% al 26% de portadoras desarrollan IOP (Sullivan et al., 2005; Wittenberger et al., 2007).

La proteína FMR1 se ha identificado en las células germinales ováricas del feto, al igual que en las células de la granulosa de folículos en maduración (Hergersberg et al., 1995; Mientjes et al., 2006). La asociación de la premutación de *FMR1* e IOP se puede explicar por el efecto supresor de la transcripción que ejerce la proteína FMR1 al unirse a diferentes ARNm. Por lo tanto, su sobreexpresión puede afectar la expresión de genes implicados en el desarrollo del oocito, lo cual resulta en una disminución del tamaño del pool folicular inicial (Cordts et al., 2011; Dixit et al., 2010). Otra hipótesis se refiere a la acumulación de ARNm de FMR1 mutado que puede tener un efecto tóxico prolongado en el ovario y atresia folicular excesiva (Wood & Rajkovic, 2013).

Galactosemia

La galactosemia es una enfermedad autosómica recesiva rara que ocurre debido a la deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), la cual es importante para la función normal del ovario. La prevalencia de IOP en pacientes con galactosemia es del 60% al 70% (Laml et al., 2002). Entre el 80% y el 90% de pacientes con mutaciones homocigotas en *GALT* que reducen o eliminan su función, muestran un fenotipo severo con IOP (Rubio-Gozalbo et al., 2010). Más de 150 mutaciones han sido identificadas, siendo las más comunes p.Gln188Arg y p.Lys285Asn (Calderon et al., 2007). La relación entre esta enfermedad e IOP no es clara. Sin embargo, puede ser debida al efecto tóxico de la galactosa que se acumula en las estructuras foliculares, produciendo atresia (Banerjee et al., 2012).

Síndrome de BPES

Blefarofimosis-Ptosis-Epicanto inverso (BPES) es un síndrome pleiotrópico de carácter autosómico dominante, caracterizado principalmente por anomalías palpebrales y craneofaciales. Cuando esta condición está asociada con IOP, se

considera BPES tipo I, en tanto cuando no se asocia y la función ovárica y fertilidad son normales, se considera BPES tipo II (Crisponi et al., 2001). El gen *FOXL2* (*forkhead transcription factor L2*) codifica para una proteína nuclear miembro de la familia de factores de transcripción *forkhead*. *FOXL2* está compuesto por un dominio de unión al ADN tipo hélice y por un dominio con un tracto de poli-alanina de 14 residuos, el cual es esencial para la actividad represora de la proteína (Persani et al., 2010). Modelos murinos *knockout Foxl2^{-/-}* han demostrado la importancia de este gen en la función ovárica, ya que se expresa en las células de la granulosa y promueve su diferenciación, así como el mantenimiento post-natal del ovario (Schmidt, 2004; Uda et al., 2004).

Más de 260 mutaciones en *FOXL2* son conocidas por estar asociadas con ambos tipos de BPES, lo cual evidencia el efecto pleiotrópico del gen. Aproximadamente el 80% de las mutaciones identificadas en *FOXL2* son intragénicas y están relacionadas con BPES tipo I. Se han identificado mutaciones tipo *missense*, *nonsense*, *frameshift*, deleciones *inframe* y duplicaciones. Las mutaciones que generan expansiones en el tracto de alaninas están preferencialmente asociadas con BPES tipo II (Persani et al., 2010).

Se evidenció también que el gen regulador esteroideogénico agudo (*STAR*), cuyo producto proteico es un marcador de la diferenciación de las células de la granulosa (CG), es el blanco directo de *FOXL2*, el cual reprime la expresión de *STAR*. Mutaciones en *FOXL2* que producen una proteína truncada sin la cola poli-A, afectan su actividad represora, lo cual conduce a BPES y a disfunción ovárica, debido a la aceleración de la diferenciación de las CG y a una depleción del *pool* de folículos primordiales (Pisarska et al., 2004). A pesar de la asociación de *FOXL2* con BPES, también se ha sugerido como gen candidato para IOP no sindrómico. Se han identificado varias mutaciones en casos de IOP sin BPES (Baere et al., 2001; Gersak et al., 2004; Harris et al., 2002; Laissue et al., 2009; Pisarska et al., 2004). En un estudio se analizaron 70 mujeres originarias de Nueva Zelanda y Eslovenia en busca de mutaciones en el gen *FOXL2*. Se

identificó la variante c.661_690del (p.Ala221_Ala230del) que remueve 10 de las 14 alaninas encontradas en el tracto poli-A y la variante c.772T>A (p.Tyr258Asn) en dos pacientes con IOP idiopática. Ninguna de las dos variantes se identificó en 200 cromosoma control (Gersak, Harris et al., 2004; Harris et al., 2002). En otro estudio se identificó la variante heterocigota c.560G>A (p.Gly187Asp) en un caso con IOP sin BPES. A pesar de que la localización subcelular de FOXL2 mutado fue normal, un ensayo de luciferasa evidenció la disminución de su capacidad de transactivación en comparación con la de FOXL2 normal, lo que validó funcionalmente su causalidad (Laissue et al., 2009, 2015).

3.2.3.4.2 IOP no sindrómica: genes etiológicos

Mediante estudios de ligamiento, de caso control y la identificación de genes relacionados funcionalmente con la fisiología del ovario, ha sido posible identificar varios genes relacionados con casos aislados de IOP. Sin embargo, solo unas pocas mutaciones en genes relevantes como *FOXO4*, *MSH5*, *FSHB*, *LHB*, *FSHR*, *LHCGR*, *NR5A1*, *NOBOX*, *FOXL2*, *FIGLA*, *BMP15*, *MSH4*, *NANOS3* y *STAG3*, entre otros, han sido identificadas y validadas formalmente como causales de IOP no sindrómica (Di Pasquale et al., 2004; Doherty et al., 2002; Laissue, 2015, 2017; Laissue et al., 2008). Esto puede ser secundario a la complejidad de los mecanismos moleculares involucrados en la reproducción (Laissue, 2015). Los genes descritos a continuación pueden clasificarse en tres grupos: genes que codifican para los receptores de gonadotropinas, genes que codifican para factores de transcripción (FT) y otro tipo de genes (Laissue et al., 2015).

Receptores de gonadotropinas

FSHR* y *LHCGR

El receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR) y el receptor de la hormona luteinizante y de la coriogonadotropina (LHCGR) pertenecen a la familia de

receptores unidos a la proteína G (Ascoli et al., 2002; Vassart et al., 2004). Junto con sus respectivos ligandos, la FSH y la LH, son esenciales para las etapas del desarrollo y el crecimiento folicular dependiente de gonadotropinas (Chapman et al., 2015). La FSH y la LH son secretadas por la glándula hipófisis en respuesta al estímulo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que es secretada desde el hipotálamo (Chapman et al., 2015; Mohiyiddeen et al., 2012). La función de la FSH unida a su receptor, el cual está localizado en las células de la granulosa de los folículos antrales, involucra la producción de estrógenos y el reclutamiento, el crecimiento y la maduración folicular (Chapman et al., 2015; Dias et al., 2002). Por su parte, la unión de la LH a su receptor involucra la maduración oocitaria, la promoción de la ovulación y la esteroidogénesis (Ascoli et al., 2002; Dias et al., 2002).

El gen *FSHR* tiene la particularidad de ser el primer gen en el que se identificaron mutaciones relacionadas con la etiología de IOP. Un estudio previo en el que se efectuó un análisis de ligamiento en 6 familias con IOP, permitió identificar una región relacionada con la enfermedad denominado locus de disgenesia ovárica hipergonadotrópica (ODG1), en el cromosoma 2p21. En esta región se encontraron los genes *FSHR* y *LHCGR* (Aittomaki et al., 1995). En el gen *FSHR* se identificó la mutación homocigota c.566C>T (p.Ala189Val) en aproximadamente el 30% de pacientes de población finlandesa. Ensayos funcionales evidenciaron que esta mutación reducía la capacidad del receptor de unirse a su ligando y la transducción de la señal (Aittomaki et al., 1995). Desde entonces algunas mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas, han sido identificadas en mujeres afectadas por IOP (Allen et al., 2003; Beau et al., 1998; Doherty et al., 2002; Kuechler et al., 2010; Laissue, 2015; Meduri et al., 2003; Touraine et al., 1999).

La primera mutación causal homocigota identificada en el gen *LHCGR* fue c.1660T>C (p.Arg554*), en una familia con miembros afectados de ambos

géneros, por amenorrea o hipoplasia en las células de Leydig (Latronico et al., 1996). Otras mutaciones han sido identificadas en mujeres con oligomenorrea e infertilidad, las cuales han sido validadas funcionalmente. En algunas familias con mujeres afectadas se han identificado conjuntamente individuos 46,XY que cursan disfunción del desarrollo sexual, específicamente en las células de Leydig (Bruysters et al., 2008; Laissue, 2015; Latronico et al., 1996; Qiao et al., 2009; Toledo et al., 1996). En dos modelos *knockout* murinos de *Lgchr* se reprodujeron fenotipos compatibles con infertilidad en humanos (Laissue, 2015).

Factores de transcripción (FT)

NR5A1

El gen *NR5A1*, también conocido como factor esteroideogénico 1 (*SF1*), codifica para el receptor nuclear del miembro 1 del grupo A de la subfamilia 5, un factor de transcripción (FT) regulador de varios genes involucrados en la diferenciación gonadal y en la modulación de la esteroideogénesis en el eje hipotálamico-hipofisario-esteroideogénico (Laissue, 2015; Lalli et al., 2013; Lourenço et al., 2009). *NR5A1* se expresa en la hipófisis, en el hipotálamo, en el ovario (células de la granulosa y la teca, cuerpo lúteo), en la corteza adrenal y en las células de Sertoli y de Leydig de los testículos, entre otros (Laissue, 2015; Lourenço et al., 2009; Schimmer & White, 2010).

Las primeras mutaciones causales de IOP no sindrómica fueron de tipo *missense* y *frameshift*, identificadas por Lourenço et al. (2009) en mujeres con amenorrea primaria o secundaria. A partir de este estudio, en varios otros se han descrito mutaciones en *NR5A1* en mujeres con IOP (Camats et al., 2012; Janse et al., 2012; Jiao et al., 2013; Laissue, 2015; Bisma Lakhal et al., 2012; Lourenço et al., 2009). En individuos pertenecientes a cuatro familias que padecían anomalías del desarrollo sexual e IOP, se identificaron mediante secuenciación directa dos deleciones heterocigotas (c.390delG y c.666delC), una mutación *missense*

heterocigota (c.3G>A) y otra homocigota (c.877G>A). Varias mutaciones han sido descritas en mujeres con IOP y han estado ausentes en un número significativo de controles, siendo relacionadas con la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, solo algunas mutaciones heterocigotas como c.13T>G (p.Tyr5Asp), c.704C>T (p.Pro235Leu), c.763C>T (p.Arg255Cys) y c.768delC (p.Asp257fs), han sido formalmente validadas a través de ensayos funcionales que expliquen la etiología de IOP, ya que dada su localización en la región N-terminal de la proteína y en el dominio de unión al ligando, se ha evidenciado una disminución de la transactivación en los promotores de los genes que son regulados por NR5A1 (Camats et al., 2012; Jiao et al., 2013; Laissue, 2015).

NOBOX

El gen *Newborn ovary homeobox* (*NOBOX*) codifica para un regulador transcripcional específico del oocito, que pertenece a la familia *homeobox*. Su función es importante en las etapas iniciales de la foliculogénesis (Chapman et al., 2015; Rajkovic, 2004). Los modelos murinos *knockout* han sido una herramienta útil para proponer genes que puedan ser regulados por Nobox. Se ha propuesto que la deficiencia de Nobox altera la expresión de genes específicos del oocito involucrados en la foliculogénesis temprana del ratón, ya que se han observado perfiles de expresión diferenciales respecto a los animales *wild type* (WT), en genes relevantes para la reproducción femenina tales como *Gdf9*, *Bmp15*, *Pou5f1*, *Zar1*, *c-Mos*, *Oog1*, *Pad6*, entre otros (Laissue, 2015; Rajkovic, 2004).

Se ha observado que la deficiente expresión de *Nobox* en ratones KO causa una acelerada pérdida de oocitos después del nacimiento, de manera similar a la IOP no sindrómica en humanos (Persani et al., 2010; Rajkovic, 2004). Lechowska et al. (2011) demostraron que la infertilidad de los ratones KO podía deberse a una falla de la señalización entre células de la línea germinal y somática durante la embriogénesis (Lechowska et al., 2011). La mutación c.1064G>A (p.Arg355His) en *NOBOX* fue la primera identificada y validada como causante de IOP en

humanos (Qin et al., 2007). En dos estudios se identificaron varias mutaciones en pacientes caucásicas con IOP, las cuales no estaban presentes en los controles poblacionales. Posteriores análisis funcionales validaron las mutaciones revelando una significativa disminución de la actividad de unión al ADN de NOBOX (Bouilly et al., 2011; Qin et al., 2007).

FIGLA

Este gen codifica para un factor de transcripción tipo *básico hélice-loop-hélice* (*bHLH*), cuya función es importante en la formación de los folículos primordiales y en la regulación de la expresión de genes de la zona pelúcida (Chapman et al., 2015; Laissue, 2015; Qin, Jiao et al., 2015). Se ha demostrado que *Figla* es específico del oocito y regula funciones críticas durante la foliculogénesis temprana en el ratón (Liang et al., 1997; Soyal et al., 2000). En un estudio desarrollado por Zhao et al. (2008) se analizó una cohorte de 100 mujeres chinas con IOP e identificaron tres variantes: la mutación *missense* p.Ala4Glu en dos mujeres, la delección p.Gly6fs en otra paciente, esta última causante del corrimiento del marco de lectura con la generación de un codón de parada prematuro y de una proteína truncada. Esta mutación se asoció a haploinsuficiencia. También se identificó la delección p.Asn140del en otra mujer. Análisis funcionales a través del ensayo de doble híbrido demostraron que la mutación p.Asn140del afectaba la unión con el factor de transcripción 3 (TCF3), causando IOP, probablemente debido a un efecto dominante negativo o a la disminución de la biodisponibilidad de heterodímeros (Qin et al., 2015; Zhao et al., 2008).

Otros genes causales de IOP no sindrómica

BMP15

Este gen también conocido como *GDF9B*, codifica para la proteína morfogénica ósea 15, la cual es miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformante- β (TGF- β). En los mamíferos, *BMP15* se expresa exclusivamente

en los oocitos y su función está involucrada en el desarrollo folicular como un regulador de la proliferación de las células de la granulosa (CG) (Shimasaki et al., 2004; Tiotiu et al., 2010). Como otros miembros de la familia TGF- β , BMP15 es sintetizada como un precursor inactivo (pre-proteína), el cual está compuesto por tres dominios: un péptido señal localizado en la región N- terminal, un prodominio o propéptido y un péptido maduro en la región C-terminal (Chang et al., 2002).

La proteína precursora pasa por procesos post-traduccionales que incluyen su dimerización y un clivaje proteolítico, los cuales están regulados principalmente por el prodominio (Shi et al., 2011). Luego de la remoción del péptido señal y el clivaje del péptido maduro, BMP15 maduro (proproteína) es secretado extracelularmente para unirse a los receptores de tipo serina/treonina quinasa de clase I y II localizados en las CG, tales como ALK6 (tipo I) y BMPR2 (tipo II) (Patiño et al., 2017). La unión del ligando BMP15 con su receptor conduce a la activación de la vía de señalización SMAD, en la cual factores de transcripción se translocan al núcleo y regulan la expresión de varios genes diana (Chang et al., 2002; Laissue, 2015; Rossetti et al., 2009; Shi & Massagué, 2003).

BMP15 puede formar homodímeros (BMP15:BMP15) o heterodímeros (BMP15:GDF9) con su homólogo el factor 9 de diferenciación de crecimiento (GDF9). Se ha demostrado que el heterodímero es funcionalmente activo en ratones y en humanos, interactuando con el receptor 2 de las proteínas morfogénicas del hueso (BMPR2), con los receptores ALK4/5/7 (serina/treonina quinasa tipo I) y con el co-receptor ALK6 (Patiño et al., 2017). Ensayos funcionales evidenciaron la mayor bioactividad del heterodímero BMP15:GDF9 respecto al homodímero BMP15:BMP15 (Laissue, 2015; Peng et al., 2013).

En modelos animales se evidenció inicialmente la relación de *BMP15* con la patogénesis de la IOP. En la oveja se identificaron mutaciones heterocigotas y homocigotas en *Bmp15*, observando hiperfertilidad e infertilidad, respectivamente (Galloway et al., 2000; Qin et al., 2015). Modelos murinos *knockout* para *Bmp15*^{-/-} demostraron un fenotipo subfétil debido a un defecto en la ovulación, en tanto que

el modelo *Gdf9*^{-/-} resultó en infertilidad completa (Laissue, 2015; Tiotiu et al., 2010; Yan et al., 2001). En humanos, la primera mutación en *BMP15* relacionada con IOP fue identificada por Di Pasquale et al (2004) en dos hermanas que presentaban amenorrea primaria. Se trata de la mutación *missense* heterocigota c.704A>G (p. Tyr235Cys) que causa un efecto dominante negativo. Ensayos funcionales evidenciaron que *BMP15* mutante está asociado con una disminución en la proliferación de las CG (Di Pasquale et al., 2004). Varias mutaciones han sido identificadas y validadas funcionalmente (Laissue, 2015, 2017; Laissue et al., 2006; Patiño et al., 2017).

NANOS3

El gen *Nanos C2HC-type zinc finger 3 (NANOS3)* es miembro de la familia de genes *NANOS*, los cuales son conservados durante la evolución. Se expresan en las gónadas masculinas y femeninas, y son importantes para el desarrollo y el mantenimiento de las células germinales primordiales (CPG) (Qin et al., 2015; Tsuda, 2003). Existen tres homólogos: *NANOS1*, *NANOS2* y *NANOS3*. En el ratón, la delección de *Nanos1* no afectó el desarrollo germinal, pero el *knockout* de *Nanos2* causó infertilidad masculina. El modelo KO *Nanos3*^{-/-} causó infertilidad en ambos géneros, debido al reducido tamaño de las gónadas como consecuencia de la disminución de las CGP (Suzuki & Saga, 2008; Tsuda, 2003).

En un estudio caso control que involucró 100 pacientes chinas con IOP, se identificó una mutación heterocigota nueva en *NANOS3* (c.457C>T; p.Arg153Trp). Ensayos funcionales comprobaron que esta mutación produce una proteína funcionalmente inestable (Wu et al., 2013). En otro estudio que incluyó 85 mujeres brasileras con IOP, se describió la mutación homocigota c.358C>A (p.Glu120Lys). Estudios *in vitro* e *in silico* demostraron que esta mutación afectaba la capacidad de *NANOS3* de prevenir la apoptosis, lo cual sugiere su implicación con la IOP debido al incremento de la apoptosis de las CGP durante la migración celular embrionaria (Qin et al., 2015; Santos et al., 2014).

STAG3

El gen *stromal antigen 3* (*STAG3*) codifica para la subunidad de una cohesina, una proteína esencial para el correcto apareamiento y la segregación de los cromosomas durante la meiosis (Caburet et al., 2014). Mediante la secuenciación del exoma se identificó la delección homocigota c.968delC (p.Phe187fs) en una familia con alta consanguinidad. La región cromosómica implicada había sido previamente mapeada en el cromosoma 7 (Caburet et al., 2012). La mutación *frameshift* generó una proteína truncada que afectaba el dominio STAG, ya que se perdió el dominio de interacción tipo armadillo (ARM) (Caburet et al., 2014). Ensayos funcionales en el ratón permitieron evidenciar su efecto patogénico y su relación con la IOP. El modelo KO *Stag3*^{-/-} permitió observar disgenesia gonadal severa en los ratones hembra, incluida la falta de oocitos y folículos. Además, en los oocitos fetales se observaron defectos en la cohesión de los centrómeros de las cromátides hermanas y en el arresto meiótico durante la etapa leptotene de la profase I (Caburet et al., 2014).

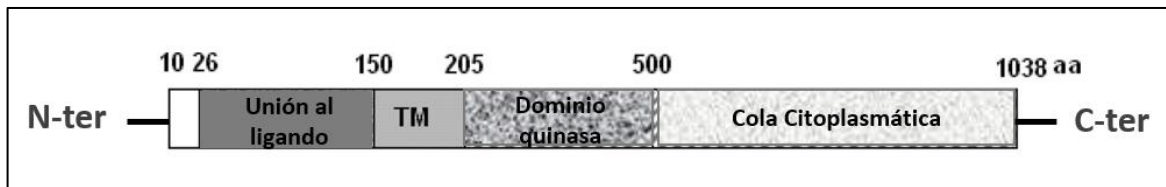
3.3 BMPR2

3.3.1 Genómica y proteómica

Los receptores de las proteínas morfogénicas óseas (BMPRs) son receptores transmembranales serina/treonina quinasa que pertenecen a la superfamilia de receptores de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) y consisten en proteínas de tipo I y II (Foletta et al., 2003). El gen *BMPR2* es miembro de la superfamilia TGF- β y codifica para el receptor tipo II (*BMPR2*) que reconoce específicamente las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) (Liu et al., 1995; Patiño et al., 2017b). *BMPR2* se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q33-q34) (MIM*600799), está conformado por 13 exones codificantes y tiene una longitud de 11461pb.

La proteína codificada por *BMPR2* tiene un peso molecular de 70kDa a 80kDa, una longitud de 1038 aminoácidos y está compuesta por cuatro dominios funcionales: un dominio extracelular de unión a ligandos, un dominio transmembranal, un dominio quinasa altamente conservado y una cola intracitoplasmática en la región C-terminal con 530 residuos, única por su extensa longitud (Liu et al., 1995; Miyazono et al., 2010; Wang et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1. Dominios funcionales de *BMPR2* (modificado de (Jiang et al., 2011))



Mediante estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, se demostró la expresión de *Bmpr2* en folículos primordiales, específicamente en las células de la granulosa de roedores (Cameron et al., 1994; Drummond et al., 2002; Erickson & Shimasaki, 2003) y la oveja (Souza et al., 2002; Wilson et al., 2001). Hay evidencia de que el desarrollo de folículos dominantes en mamíferos está acompañado de la expresión tejido-específica de ligandos BMPs, de receptores asociados al sistema BMP y de proteínas de unión (Shimasaki et al., 2004). Ensayos de *Northern Blot* realizados mediante la hibridación de sondas de *BMPR2* con transcritos de diferentes tejidos humanos fetales y adultos, permitieron evidenciar la amplia expresión del ARNm de *BMPR2* en diferentes tejidos y órganos. Entre ellos se encuentran el cerebro, la placenta, la médula ósea, el corazón, el hígado, el riñón, el pulmón (células del músculo liso y endoteliales), la próstata, los testículos, el músculo esquelético y los ovarios, entre otros (Rosenzweig et al., 1995). En un contexto ovárico *BMPR2* se expresa principalmente en las células de la granulosa (Shimasaki et al., 2004).

3.3.2 Funciones de BMPR2 y la vía de señalización BMP/SMAD

Las funciones biológicas de BMPR2 así como de los ligandos BMPs, están asociados con el desarrollo embrionario, la diferenciación y la proliferación celular, en procesos como la remodelación de los vasos sanguíneos, el desarrollo de la placenta materna, el desarrollo del cerebro, la regulación positiva de la mineralización del hueso, la regulación positiva de la migración y la proliferación endotelial, la apoptosis, la homeostasis, la regulación de la presión arterial del pulmón y el desarrollo del oocito (Massague, 2012; Miyazono et al., 2010; Miyazono et al., 2005; Shimasaki et al., 2004).

A nivel molecular la función de BMPR2 se ha asociado a la vía de señalización BMP/SMAD. Por lo tanto, la perturbación de la señalización BMP puede causar enfermedades esqueléticas, enfermedades vasculares y cáncer, entre otras (Nicholas W. Morrell et al., 2015). La relación de este receptor tipo II con sus ligandos es de exclusividad para las moléculas BMPs, incluidas BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP15, GDF5 y GDF9 (Shimasaki et al., 2004). La unión del ligando BMP con BMPR2 causa su heterodimerización con el receptor tipo I (BMPR1A (ALK3) o BMPR1B (ALK6)), al cual fosforila en el dominio rico en glicina-serina (GS) causando su activación, para que este a su vez inicie una cascada de transducción de señales que involucran la fosforilación de una familia de proteínas de señalización conocidas como SMADS (Massagué et al., 2005; Miyazono et al., 2000).

El receptor tipo I transfosforila y activa, a través de su función quinasa serina/treonina, las proteínas R-SMAD, las cuales son proteínas SMAD cuya actividad depende específicamente de la fosforilación por parte de los receptores tipo I (Fessel et al., 2011; Massagué & Chen, 2000; Miyazono et al., 2000; Shimasaki et al., 2004). Las R-SMADS incluyen a SMAD 1, 2, 3, 5 y 8, que cuando se activan interactúan con SMAD4, también denominada Co-SMAD (Fessel et al., 2011; Miyazono et al., 2010). El complejo SMAD formado se transloca luego al

núcleo para interactuar con factores de transcripción específicos que regulan la transcripción de genes diana (Fessel et al., 2011; Shimasaki et al., 2004).

La transducción de señales en la vía BMP/SMAD se efectúa fundamentalmente a través de la fosforilación que confiere el dominio quinasa serina/treonina de los receptores BMPR tipo I y II, y poco se sabe sobre la función de la cola larga intracitoplasmática característica de BMPRII (Foletta et al., 2003; Nishihara et al., 2002). Sin embargo, se piensa que puede participar en la señalización independiente de SMAD (no canónica) (Figura 2), y se ha demostrado su interacción con diferentes proteínas como Tctex-1, XIAP (regulador negativo de la apoptosis), p38 MAPK, c-Src, RACK-1 y LIMK1 (involucrada en la regulación de la dinámica de la actina del citoesqueleto) (Figura 3) (Fessel et al., 2011; Foletta et al., 2003; Hassel et al., 2004; Machado et al., 2003; Rudarakanchana et al., 2002).

Figura 2. Vía de señalización TGF- β /BMP canónica y no canónica para BMPRII (modificado de (Fessel et al., 2011))

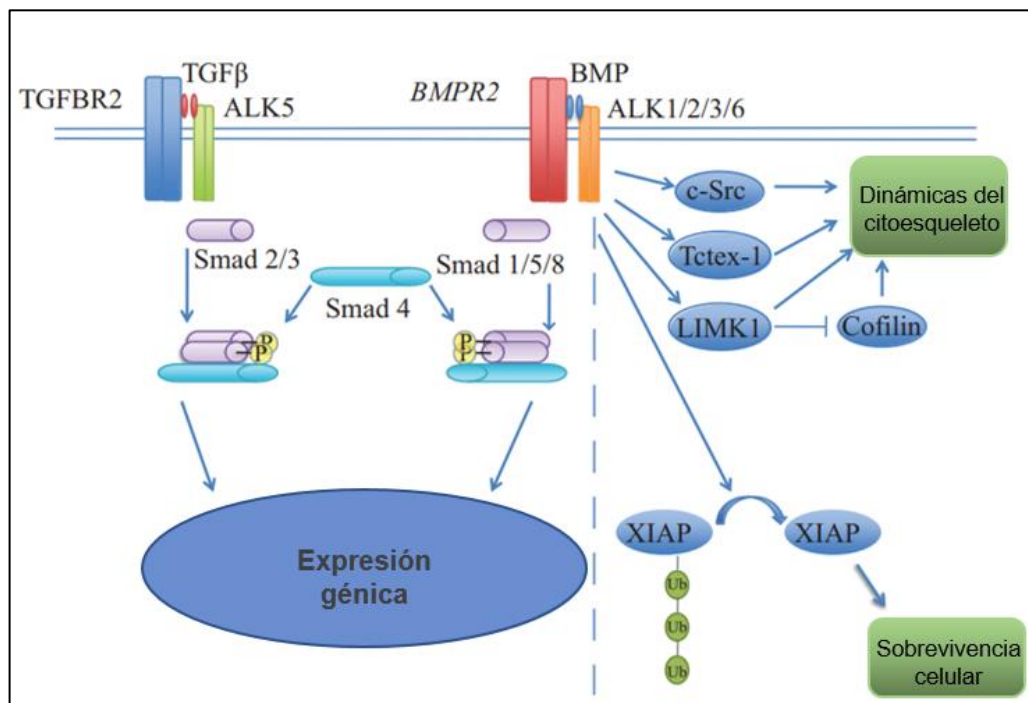
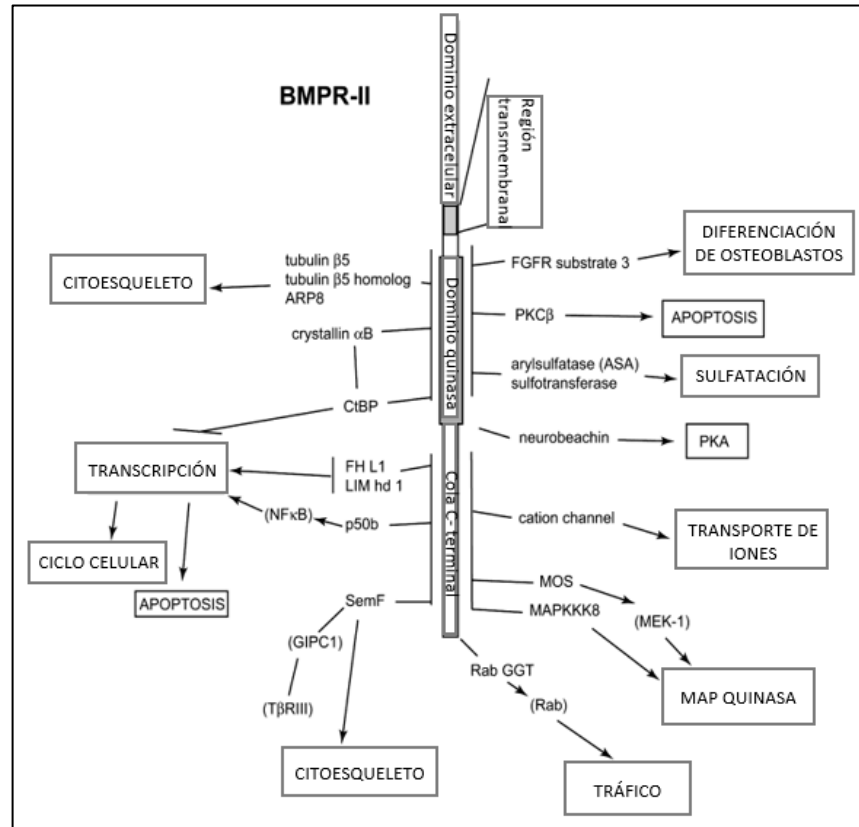


Figura 3. Procesos celulares/moleculares asociados a los dominios funcionales de BMPRII (modificado de (Hassel et al., 2004))



3.3.3 Mutaciones en *BMPR2*

La principal función de *BMPR2* es inhibir la proliferación de las células del músculo liso vascular. Por lo tanto, las mutaciones identificadas en este gen se han relacionado principalmente con hipertensión pulmonar arterial primaria (HPA), un desorden de herencia autosómica dominante y con penetrancia incompleta (20% a 30%) (Miyazono et al., 2010). Esta enfermedad se caracteriza por la proliferación de las células endoteliales y del músculo liso de las arterias pulmonares, lo que causa la oclusión de los vasos pulmonares y el incremento de la presión sanguínea (Foletta et al., 2003; Morrell et al., 2001). Más de 400 mutaciones relacionadas con HPA se han identificado en *BMPR2*. Se han detectado en el 70%

de casos familiares y entre el 10% y el 40% de los pacientes con HPA idiopática (Deng et al., 2000; Lane et al., 2000).

Aproximadamente el 30% de las mutaciones son de tipo *missense* y ocurren en sitios conservados, lo cual puede perturbar la unión receptor-ligando o afectar los dominios funcionales del receptor. La mayoría de las mutaciones que han sido identificadas son de tipo *frameshift* y *nonsense* (Cogan et al., 2006). En este tipo de mutaciones se predice la aparición de un codón de parada prematuro que puede activar el sistema de degradación del ARNm mediado por mutaciones terminadoras (*NMD: Nonsense mediated decay*) (Khajavi et al., 2006).

La mayoría de las mutaciones identificadas se localizan en el dominio extracelular de la unión al ligando (codificado por los exones 2 y 3) y en el dominio quinasa (codificado por los exones 6-9, 11) (Machado et al., 2015). Las sustituciones del aminoácido cisteína comprenden la mayoría de las mutaciones *missense* localizadas en el dominio extracelular, en 9 de los 10 residuos conservados que lo componen, los cuales son esenciales para la integridad de su estructura terciaria (Greenwald et al., 1999; Machado et al., 2015). La mayoría de las mutaciones en el dominio quinasa de *BMPR2* han sido validadas mediante ensayos funcionales de luciferasa en la vía *BMP/SMAD*, evidenciando la abolición de su función catalítica (Machado et al., 2015). Por el contrario, la importancia de las mutaciones identificadas en la cola intracitoplasmática no es clara aún, ya que se demostró experimentalmente que la transducción de señales *downstream* en la vía *SMAD* permanece inalterada (Girerd et al., 2015). Sin embargo, estas mutaciones parecen afectar la vía no canónica *SMAD* que incluye la señalización a través de los factores asociados al citoesqueleto *LIMK1* y *TCTEX1* (Foletta et al., 2003; Machado et al., 2003).

Mutaciones en *BMPR2* están principalmente asociadas a HPA. Sin embargo, las funciones de este receptor involucran también un contexto ovárico. Por su expresión en las células de la granulosa, tanto de humano como de ratón, y su relación con los ligandos *BMP15* y *GDF9*, los cuales son factores claves en la

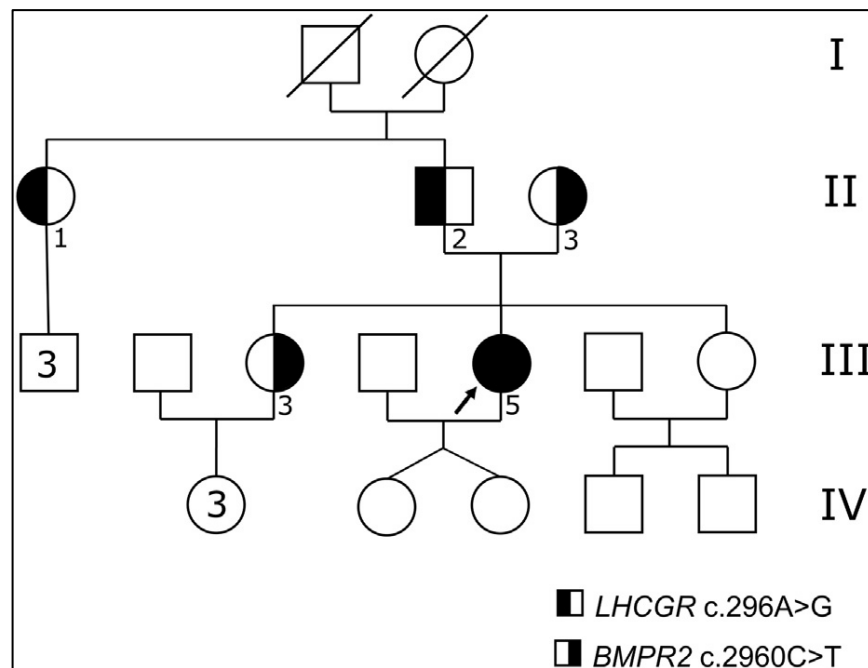
fisiología del ovario, fue posible hipotetizar una relación entre *BMPR2* y la IOP (Fonseca et al., 2015; Moore et al., 2003; Peng et al., 2013; Pulkki et al., 2012). Como previamente se describió, en los oocitos los heterodímeros entre estos dos ligandos son más bioactivos que los homodímeros y se demostró que el heterodímero BMP15:GDF9 interactúa con el complejo de receptores BMPR2-ALK4/5/7-ALK6 en la vía SMAD (Peng et al., 2013). Puesto que mutaciones en *BMP15* han sido relacionadas con la etiología de la IOP, fue posible proponer que mutaciones en *BMPR2* podrían ocasionar la enfermedad (Fonseca et al., 2015; Laissue, 2015; Laissue et al., 2006; Laissue et al., 2008; Rossetti et al., 2009).

En un estudio realizado por Fonseca et al. (2015) se secuenciaron las regiones codificantes completas de 70 genes candidatos mediante NGS en 12 mujeres con IOP no sindrómica. Se identificaron mutaciones en tres genes potencialmente relacionados con la etiología de IOP, siendo uno de ellos *BMPR2*. En este gen se detectó la mutación heterocigota c.2960C>T (p.Ser987Phe), la cual se encuentra localizada en la cola larga intracitoplasmática (C-terminal), involucrada en la modulación y la dinámica del citoesqueleto, y en el tráfico intracelular. Se consideró como una variante potencialmente patogénica, ya que no se identificó en la población control, su frecuencia alélica mínima es menor del 1% (MAF<0,01) (dbSNP: rs150642992) y el análisis bioinformático demostró que el aminoácido serina se encuentra conservado en la evolución (Dora Janeth Fonseca et al., 2015). Por lo tanto, en las células de la granulosa, la mutación descrita en esta región podría afectar la señalización SMAD al interferir con la transducción de señales *downstream* de BMP15, lo cual podría contribuir a la etiología de IOP. Además, es posible que exista una deslocalización subcelular secundaria a un plegamiento anormal de la proteína (Fonseca et al., 2015; Patiño et al., 2017b).

En la misma mujer afectada con la mutación *BMPR2*: c.2960C>T, se identificó la mutación heterocigota c.296A>G (p.Asn99Ser) en el gen *LHCGR*. Miembros de la familia de la paciente son portadores sanos de una de las dos mutaciones, en tanto ella es la única afectada con ambas mutaciones (Figura 4) (Dora Janeth

Fonseca et al., 2015). Por lo tanto, considerando que la IOP es una patología compleja, las mutaciones *LHCGR*: c.296A>G y *BMPR2*: c.2960C>T podrían contribuir a su etiología con el efecto aditivo de cada una de ellas o mediante interacción epistática, marcando la naturaleza poligénica de la IOP (Bouilly et al., 2016; Laissue, 2015, 2017; Patiño et al., 2017b).

Figura 4. Pedigrí de la mujer afectada por IOP, portadora de las mutaciones *BMPR2*: c.2960C>T (parte derecha en negrilla) y *LHCGR*: c.296A>G (parte izquierda en negrilla) (Tomado de (Dora Janeth Fonseca et al., 2015)).



Por último, es importante señalar que numerosas publicaciones del grupo fundamentan y complementan los abordajes teóricos y experimentales citados en el marco teórico presentado (Caburet et al., 2012; Carlosama et al., 2017; Castro et al., 2013; Diggle et al., 2012; Ducat et al., 2016; Fonseca et al., 2013; Fonseca et al., 2015; Fonseca et al., 2012; Fonseca et al., 2012; Fonseca et al., 2012; Fonseca et al., 2014; Forero et al., 2016; L'Hôte et al., 2010; Laissue et al., 2009;

Laissue, 2015, 2017; Laissue et al., 2016; Laissue et al., 2017; Laissue et al., 2009; Laissue et al., 2009; Lakhal et al., 2008; Lakhal et al., 2009, 2010; Mateus et al., 2017; Mitropoulos et al., 2015; Niño et al., 2013; Ojeda et al., 2011; Ortega-Recalde et al., 2015; Ortega-Recalde et al., 2015; Ortega-Recalde et al., 2016; Ortega-Recalde et al., 2013; Ortega-Recalde et al., 2013; Patiño et al., 2017; Patiño; et al., 2017b; Patiño et al., 2014, 2017; Prada & Laissue, 2014; Quintero-Ronderos et al., 2017; Vatin et al., 2012; Vatin et al., 2013).

4. Preguntas de investigación

- En un contexto ovárico, ¿cuáles son las proteínas que interactúan con BMPR2?
- La mutación p.Ser987Phe en BMPR2 puede afectar la localización subcelular de BMPR2, contribuyendo a la etiología de la IOP?

5. Objetivos

5.1 Objetivos generales

- Determinar si la mutación p.Ser987Phe puede relacionarse con el fenotipo IOP.
- Identificar las proteínas de interacción (*partners*) de BMPR2 en un contexto ovárico.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar si la mutación p.Ser987Phe afecta la localización subcelular de BMPR2.
- Efectuar un tamizaje de proteínas de interacción potencial con BMPR2.

6. Materiales y métodos

6.1 Estudio de la localización subcelular de BMPR2

La posible evaluación del efecto deletéreo de la mutación p.Ser987Phe en BMPR2 a nivel de su localización subcelular, se realizó mediante el marcaje de BMPR2 con la proteína verde fluorescente (GFP) y la tinción *ER-Tracker Red* (tinción del retículo endoplasmático).

6.1.1 Plásmidos

La construcción plasmídica pEGFP-N1-BMPR2, que contiene la región codificante completa de *BMPR2 wild type* (WT), fue proporcionada por el profesor Nicholas Morrel (Cambridge, UK) (Rudarakanchana et al., 2002). Este plásmido denominado BMPR2-WT-GFP para el presente ensayo, permite la expresión de la proteína fusión GFP con BMPR2, en su región N-terminal. La mutación p.Ser987Phe localizada en la región C-terminal de *BMPR2* fue insertada con el kit GeneArt® (Thermo Fisher) mediante el sistema de mutagénesis dirigida, obteniendo la construcción denominada BMPR2-Ser987Phe-GFP.

6.1.2 Cultivo celular y transfecciones

Las células CHO (*Chinese hamster ovary*) fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO₂ en el medio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina. El cultivo celular se tripsinizó y se sembraron 50.000 células/pozo sobre laminillas estériles depositadas en cajas de cultivo de 24 pozos. Las células se dejaron a 37°C durante 24 horas previamente a la transfección.

Después de alcanzar una confluencia celular por pozo de aproximadamente el 70%, se transfectaron 300ng de los constructos WT (BMPR2-WT-GFP) y mutante (BMPR2-Ser987Phe-GFP) usando FuGENE®6 *Transfection reagent* (Promega). Los cálculos para la transfección se realizaron manteniendo una proporción de 1:3 entre la cantidad de ADN (µg) y el volumen del reactivo FuGENE (µl). Se empleó

el medio OptiMEM (Thermo Fischer Scientific) el cual está libre de SFB, ya que este reactivo inhibe la transfección. Para cada condición se realizaron 6 réplicas (transfecciones: n=6) en 3 ensayos independientes (Tabla 1).

Tabla1. Cálculos de transfección para 6 réplicas (n=6)

Condición	Cantidad de ADN (ng)	Volumen de ADN (μl)	Volumen de FuGENE (μl)	Volumen de OptiMEM (μl)
BMPR2-WT-GFP	300	21	6, 3	60,2
BMPR2-Ser987Phe-GFP	300	21	6, 3	60,2

En los cálculos se tuvo en cuenta una réplica más para evitar volúmenes incompletos por errores de pipeteo. Con los volúmenes definidos se realizó la mezcla de OptiMEM (60,2μl) y de FuGENE (6,3μl) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. En seguida, se agregó la alícuota de ADN (21μl) incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante el tiempo de incubación se retiró el medio DMEM-F12 en el cual estaban las células y a cada pozo se agregaron 600μl de OptiMEM precalentado. Cumplido el tiempo de incubación, se agregó de manera uniforme una alícuota de 25 μl de la mezcla de transfección a cada pozo. Como control negativo se emplearon células no transfectadas (NT) en tres pozos (n=3). La caja de cultivo se dejó incubando a 37°C durante 48 horas.

6.1.3 Montaje de láminas y ensayo de GFP

Transcurrido el tiempo de incubación necesario para la síntesis proteica, se realizó el montaje de las células mediante la tinción del retículo endoplasmático (ER) con el reactivo *ER-Tracker Red* (Thermo Fischer Scientific). La solución de tinción se diluyó en la solución de sales balanceadas de Hank's (HBSS) para tener una concentración de 0.5 μM. La tinción y montaje de las células se realizó de la siguiente forma. Se precalentó la solución de tinción (0.5 μM) a 37°C durante 30 minutos. Luego se removió el medio de cultivo OptiMEM y se realizó un lavado

con la solución de Hank's. Se agregó a cada pozo 300 μ l de la solución de tinción precalentada y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego de retirar la solución de tinción y de hacer un lavado con la solución de Hank's, se fijaron las células agregando a cada pozo 300 μ l de paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego de incubar a 37°C durante 2 minutos, se retiró el PFA y se realizaron dos lavados con la solución de Hank's

Se transfirieron las laminillas boca abajo sobre láminas portaobjetos, sobre los cuales se agregó previamente una alícuota de 5 μ l del líquido de montaje *UltraCruz[®] Mounting Medium* (Santa Cruz Biotechnology Inc), el cual incluye el marcador fluorescente DAPI para la tinción nuclear. Los montajes fueron sellados posteriormente con esmalte para evitar deslices durante la visualización en el microscopio de fluorescencia y se almacenaron a 4°C protegidos de la luz.

La visualización de los montajes se realizó en el microscopio de fluorescencia *Nikon Eclipse NiE* y las imágenes fueron capturadas con la cámara digital fotométrica (Coolnap EZ), usando el *software NIS-Elements Advanced Research* (Waltham, MA, USA). Se realizaron tres ensayos independientes contando un total de 670 células, 350 células en la condición WT y 320 células en la condición mutante. Se establecieron principalmente dos categorías fenotípicas dependiendo de la observación de patrones similares a agregación (ER+) o no agregación perinuclear (ER-) localizada en el retículo endoplasmático (ER), las cuales se compararon entre las condiciones WT y mutante.

Se utilizó la prueba exacta de Fisher como método estadístico para establecer si había diferencias estadísticamente significativas de los conteos entre ambas condiciones. Otros ensayos independientes fueron realizados bajo las mismas condiciones y parámetros previamente descritos, con diferentes cantidades de ADN: 200ng, 600ng y 1 μ g de plásmido WT y mutante, para evaluar la aparición de potenciales artefactos de agregación, debido a las cantidades variables de ADN transfectado.

6.2 Evaluación del potencial efecto dominante negativo de la mutación p.Ser987Phe de BMPR2

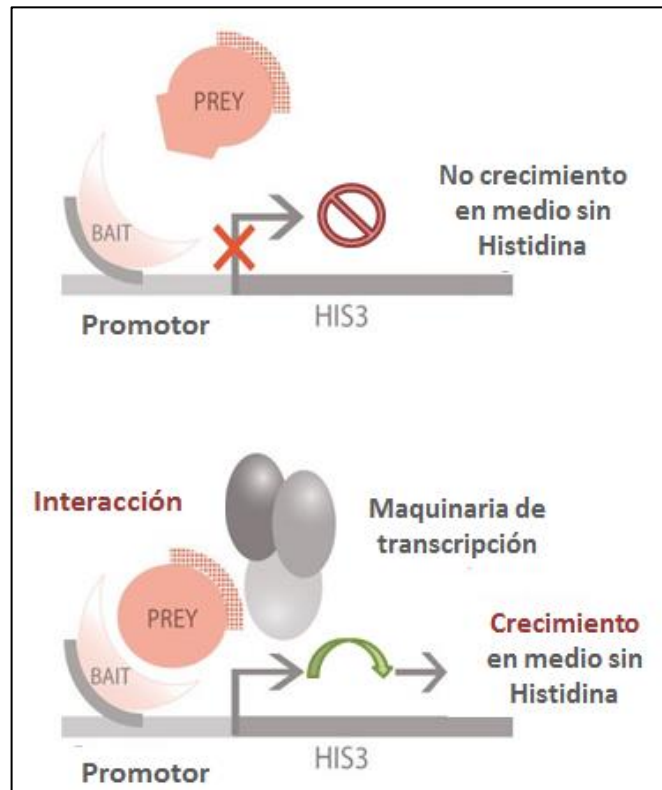
Debido a que la mutación p.Ser987Phe se encontró en estado heterocigoto en la paciente con IOP analizada por NGS (Fonseca et al., 2015), se diseñó un experimento adicional para evaluar el potencial efecto dominante negativo. Para esto, se clonó la versión mutante de BMPR2 en el vector pcDNA3.1_Zeo(+), el cual no expresa la proteína GFP (BMPR2-S978F-3.1). Posteriormente, en las células CHO se realizó la co-transfección de los constructos WT (pEGFP-N1-BMPR2) y mutante (BMPR2-S978F-3.1) en cantidades equimolares (300ng cada uno). El protocolo de transfección, el montaje de las láminas y su lectura se realizaron de manera similar a la metodología descrita en las secciones 8.1.2 y 8.1.3.

6.3 Ensayo de doble híbrido en levaduras para la identificación de proteínas de interacción (*partners*) con BMPR2.

El sistema de doble híbrido (Y2H) es una técnica empleada para detectar interacciones proteína-proteína y fue aplicada por primera vez por Fields y Song en 1989. Se basa en la recreación de un factor de transcripción (FT), el cual tiene dos dominios funcionales básicos: un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de activación de la maquinaria de transcripción (AD). La unión de ambos dominios activa la función del FT y permite la expresión de un gen reportero en células de levadura genéticamente modificadas (Fields & Song, 1989). Dos genes reporteros son comúnmente empleados en este tipo de ensayo: *His3* el cual codifica para una proteína involucrada en la biosíntesis de la histidina, permitiendo el crecimiento selectivo de colonias en un medio de cultivo carente de histidina, y *LacZ* que permite identificar las colonias positivas mediante un ensayo colorimétrico. El ADN plasmídico de las colonias de levadura positivas es secuenciado y analizado para identificar la proteína de interacción (Fields & Song, 1989).

Para recrear la función del FT se producen dos proteínas fusión denominadas *prey* y *bait*. El *bait* se define como la proteína de interés unida al dominio de unión al ADN (DBD) del FT. El *prey* consiste en el dominio de activación de la transcripción (AD) unido a la proteína con la que se quiere evaluar la interacción. Si hay interacción entre ambas proteínas, el FT ejerce su función completa para la expresión del gen reportero. Usualmente los dominios DBD y AD son del FT Gal4 de la levadura, aunque también se usa la proteína bacteriana LexA como DBD (Figura 5).

Figura 5. Esquema del sistema de doble híbrido Y2H (*Hybrigenics*)

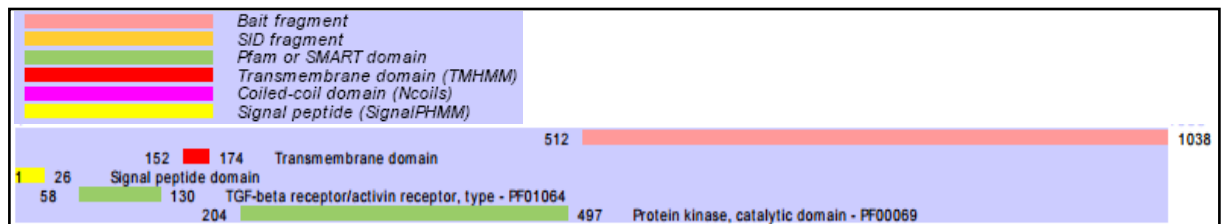


El ensayo de Y2H puede ser usado como una técnica para evaluar la interacción entre dos proteínas específicas o para identificar múltiples proteínas de interacción sobre una proteína de interés. Este último enfoque permite usar la proteína de

interés como *bait* para hacer un tamizaje con una librería de ADNc a partir del tejido o línea celular de elección, para identificar los *partners* asociados.

El ensayo de Y2H fue realizado en el laboratorio *Hybrigenics* en Paris, Francia (www.hybrigenics.com). El *bait* que contiene el dominio de unión al ADN (DBD) fue clonado en el plásmido pB27 (N-LexA-Bmpr2-C fusión) y en el plásmido pB66 (Nter-Gal4-Bmpr2-Cter). La proteína fusión incluía una parte del dominio C-terminal de Bmpr2 ratón (mBmpr2), que a nivel del ADNc corresponde a los exones 11, 12 y 13, desde 1534pb hasta 3117pb (1583pb de longitud) y a nivel de la proteína contiene 527 aminoácidos (del residuo 512 al 1038) (Figura 6). Es una región homóloga al dominio humano de BMPR2, donde se encuentra localizada la mutación p.Ser987Phe identificada en la paciente con FOP que fue analizada por NGS (Fonseca et al. 2015).

Figura 6. Fragmento del *bait* de la región C-ter de Bmpr2 (*Hybrigenics*)



Las proteínas *prey* fusionadas al dominio de activación de la transcripción (AD), fueron producidas a partir de una librería de ADNc de ovario de *Mus musculus* en los plásmidos p27 y pB66. Se procesaron 318 clones y se llevaron a cabo un total de 70.1 millones de interacciones. Después del crecimiento de los clones positivos en un medio selectivo sin histidina (H-), se amplificaron por PCR los fragmentos correspondientes al *prey* y se secuenciaron en sus extremos 3' y 5'. Las interacciones fueron clasificadas según 6 categorías (A-F) que miden la confianza estadística de la interacción según el Puntaje Biológico Predictivo (PBS), donde la categoría A expresa la mayor probabilidad de la interacción (Tabla 2). La

interacción proteína-proteína en este sistema de *screening* Y2H, permite determinar la secuencia proteica mínima del *prey* necesaria para interactuar con el *bait*, la cual corresponde al SID (*Selection Interaction Domain*).

Tabla 2. Categorías de interacción proteína-proteína, según el PBS global

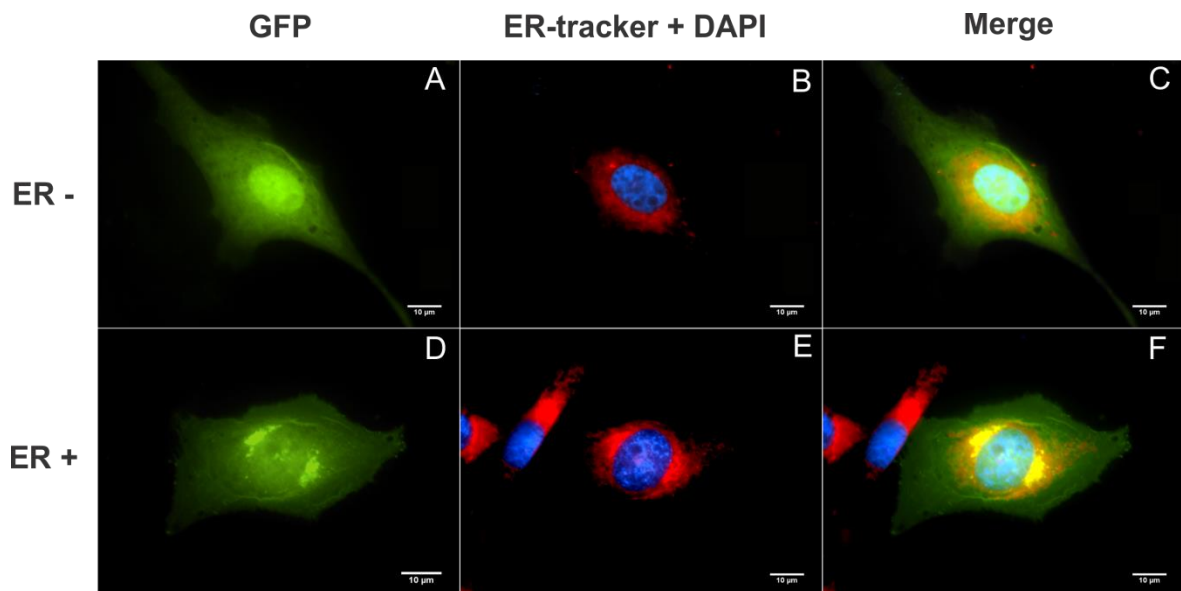
Categoría	Interpretación
A	Muy alta confiabilidad de la interacción
B	Alta confiabilidad de la interacción
C	Buena confiabilidad de la interacción
D	Moderada confiabilidad de la interacción
E	Baja confiabilidad de la interacción
F	Artefactos técnicos experimentalmente probados

7. Resultados

7.1 Localización subcelular de BMPR2

Mediante el marcaje de BMPR2 con la proteína verde fluorescente (GFP) y la transfección de las células CHO con BMPR2-GFP en su versión WT (BMPR2-WT-GFP) y mutante (BMPR2-S987F-GFP), se visualizaron señales de fluorescencia homogéneas en el núcleo y el citoplasma. La tinción del retículo endoplasmático (ER-Tracker) permitió observar patrones similares a agregación proteica en esta localización subcelular (ER+GFP), en ambas condiciones (Figura 7).

Figura 7. Transfección de las construcciones BMPR2-Ser987Phe-GFP o BMPR2-WT-GFP en las células CHO. **(A-C)** Células transfectadas con la construcción BMPR2-WT-GFP. **(D-F)** Células transfectadas con la construcción BMPR2-Ser987Phe-GFP. **(A y D)** Tinción GFP. **(B y E)** Tinción con DAPI (azul) y ER (rojo). **(C y F)** Mezcla de fluorescencias. **ER+ y ER-** Hace referencia a la presencia y a la ausencia del patrón de agregación en el retículo endoplasmático.



A partir del conteo de células transfectadas con cada una de las condiciones (WT: n=350 y mutante: n=320) se encontró que las células transfectadas con la versión mutante tenían un incremento estadísticamente significativo de los patrones similares a agregación perinuclear (71.9%) con respecto a las células transfectadas con la versión WT (48.6%) ($p=7.05 \times 10^{-10}$). Resultados similares se encontraron al transfectar diferentes cantidades de cada construcción (200ng, 600ng y 1000 ng).

En el ensayo de localización subcelular realizado para evaluar el potencial efecto dominante negativo de la mutación p.Ser987Phe, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el fenotipo ER+ entre las células co-transfectadas con las construcciones BMPR2-Ser978Phe-3.1/BMPR2- WT-GFP (8,1%) y BMPR2-WT-GFP (12,4%) ($p=0.1005$).

7.2 Ensayo de doble híbrido en levaduras

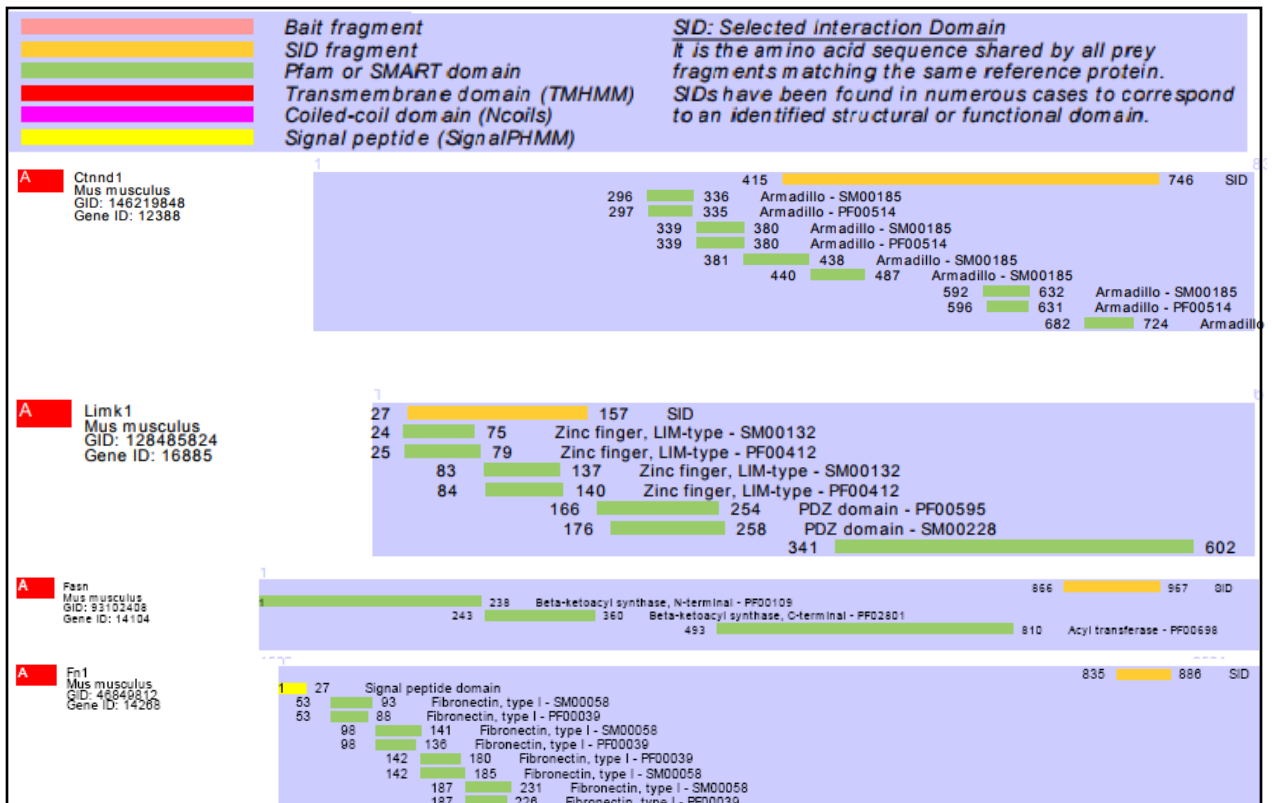
El tamizaje Y2H realizado a partir de la librería de ADNc de ovario de ratón, permitió identificar cuatro proteínas cuya interacción con la región C-terminal de Bmpr2, fue de muy alto porcentaje de probabilidad (categoría A según el *Global* PBS). Las proteínas con interacción en la categoría A fueron: Limk1 (16 clones positivos), Ctnnd1 (28 clones positivos), Fn1 (9 clones positivos) y Fasn (9 clones positivos) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del ensayo Y2H de las interacciones categoría A (PBS) de los cuatro *partners* (Modificado de *Hybrigenics*).

ID del clon	Tipo de secuencia	Nombre del gen	Inicio-Parada (nt)	Marco de lectura	PBS
pB27_C-213	3p	Mus musculus - Ctnnd1	..2240	??	99.2 A
pB27_C-310	3p	Mus musculus - Ctnnd1	..2408	??	97.8 A
pB27_C-367	3p	Mus musculus - Ctnnd1	..2637	??	97.7 A
pB27_C-308	5p	Mus musculus - Ctnnd1	1077	IF	99.7 A
pB27_C-199	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	99.5 99.9 A
pB27_C-86	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	97.3 100.0 A
pB27_C-122	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	98.5 98.0 A
pB27_C-297	5p	Mus musculus - Ctnnd1	1086	IF	97.8 A
pB27_C-372	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	96.4 98.4 A
pB27_C-360	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	96.6 98.8 A
pB27_C-2	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1098..2716	IF	96.1 88.4 A
pB27_C-90	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1098..2716	IF	97.3 90.1 A
pB27_C-353	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1098..2716	IF	96.5 84.1 A
pB27_C-148	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	99.7 98.9 A
pB27_C-136	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	99.3 99.0 A
pB27_C-163	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	99.3 82.4 A
pB27_C-198	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	99.3 99.0 A
pB27_C-78	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	91.8 87.1 A
pB27_C-336	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	99.7 98.6 A
pB27_C-325	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	99.7 97.6 A
pB27_C-318	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	94.1 95.8 A
pB27_C-376	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	98.5 98.1 A
pB27_C-346	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	98.7 98.6 A
pB27_C-338	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	IF	93.4 95.4 A
pB27_C-160	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1125..2723	IF	99.9 99.6 A
pB27_C-74	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1125..2716	IF	98.4 98.8 A
pB27_C-98	5p	Mus musculus - Ctnnd1	1185	IF	96.5 A
pB27_C-305	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1242..2263	IF	98.6 100.0 A
pB27_C-237	3p	Mus musculus - Fasn	..3165	??	92.1 A
pB27_C-364	5p/3p	Mus musculus - Fasn	1905..2901	IF	91.9 99.0 A
pB27_C-83	5p	Mus musculus - Fasn	2331	IF	98.7 A
pB27_C-103	5p	Mus musculus - Fasn	2532	IF	97.2 A
pB27_C-69	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2532..3263	IF	99.4 96.7 A
pB27_C-275	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2541..3129	IF	100.0 99.5 A
pB27_C-46	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2571..3159	IF	99.8 99.7 A
pB27_C-317	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2571..3155	IF	98.6 99.8 A
pB27_C-260	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2595..3165	IF	100.0 99.6 A
pB27_C-170	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2229..2658	IF	100.0 100.0 A
pB27_C-91	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2310..2673	IF	100.0 100.0 A
pB27_C-44	5p	Mus musculus - Fn1	2310	IF	87.6 A
pB27_C-61	5p	Mus musculus - Fn1	2397..2658	IF	100.0 A
pB27_C-246	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2397..2658	IF	100.0 100.0 A
pB27_C-218	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2397..2658	IF	100.0 100.0 A
pB27_C-324	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2442..3433	IF	97.5 97.2 A
pB27_C-256	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2502..3612	IF	95.0 95.0 A
pB27_C-202	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2502..3612	IF	97.4 98.0 A
pB27_C-184	5p/3p	Mus musculus - Limk1	-29..473	OOF2	100.0 100.0 A
pB27_C-10	5p/3p	Mus musculus - Limk1	-29..473	OOF2	100.0 100.0 A
pB27_C-82	5p	Mus musculus - Limk1	-29..473	OOF2	100.0 A
pB27_C-245	3p	Mus musculus - Limk1	10..549	OOF1	100.0 A
pB27_C-35	5p/3p	Mus musculus - Limk1	10..549	OOF1	100.0 100.0 A
pB27_C-286	5p/3p	Mus musculus - Limk1	13..730	OOF1	98.8 99.3 A
pB27_C-73	5p/3p	Mus musculus - Limk1	13..730	OOF1	98.6 98.8 A
pB27_C-169	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 99.4 A
pB27_C-101	5p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 A
pB27_C-133	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 99.4 A
pB27_C-195	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 99.4 A
pB27_C-293	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 99.4 A
pB27_C-307	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 99.4 A
pB27_C-1	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 99.4 A
pB27_C-70	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 99.4 A
pB27_C-79	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	99.4 88.2 A
pB27_C-374	5p/3p	Mus musculus - Limk1	77..911	OOF2	98.5 97.8 A

El análisis de la secuencia de los clones positivos mediante alineamientos y análisis bioinformático, permitió identificar la región mínima de interacción (SID: *Selected Interaction Domain*) de Limk1, Ctnnd1, Fasn y Fn1 con Bmpr2. El SID de Limk1 estaba comprendido entre el aminoácido 27 y el 127. El SID de Ctnnd1 se encontró entre el aminoácido 415 y el 746, el de Fasn entre el residuo 866 y el 967, y el de Fn1 comprendía los aminoácidos 835 a 886 (Figura 8).

Figura 8. SID de las proteínas de interacción categoría A con Bmpr2 de ratón (*Hybrigenics*)



8. Discusión

En el presente trabajo de tesis se estudió funcionalmente la mutación BMPR2-p.Ser987Phe, para evaluar su potencial contribución al fenotipo de la paciente (Fonseca et al., 2015). Se evaluó la localización subcelular de BMPR2 marcado con la GFP, en células de ovario de hámster chino (CHO). La observación de patrones similares a agregación perinuclear en un número estadísticamente significativo de células transfectadas con la construcción BMPR2-Mut-GFP, pudo deberse al mal plegamiento de la proteína causado por la mutación p.Ser987Phe en la región C-terminal.

Sin embargo, también se observaron patrones similares a agregación en las células transfectadas con la construcción BMPR2-WT-GFP, aunque en una menor proporción estadísticamente significativa, respecto a las células transfectadas con la versión mutante. Esto pudo deberse a un fenómeno de sobreexpresión proteica, ya que las células CHO expresan endógenamente a BMPR2 (Patiño et al., 2017). Por lo tanto, al observar en los montajes una distribución homogénea del receptor en la membrana celular, es posible que haya ocurrido una competencia por la localización transmembranal, entre la proteína endógena y la proteína fusionada con la GFP. De esta forma, las proteínas que no lograron anclarse a la membrana podrían haber quedado retenidas en el RE. Este fenómeno de agregación en las células transfectadas con la versión WT de BMPR2, pudo deberse también a las diferencias del proteoma entre el ratón y el humano.

Otra posibilidad es el efecto que podría desempeñar la GFP en la deslocalización subcelular. Esta proteína se encuentra fusionada a la región C-terminal de BMPR2. Considerando su tamaño (27kDa), es posible hipotetizar que tenga un efecto deletéreo, ya sea por la alteración del correcto plegamiento de la proteína o por el enmascaramiento de la señal de localización ubicada en C-terminal, lo que causaría la retención en el RE (John et al., 2015; Pousada et al., 2017; Rudarakanchana et al., 2002; Wang et al., 2014).

El resultado obtenido a partir de la co-transfección de BMPR2-WT-GFP y BMPR2-Mut-GFP, no evidenció un efecto dominante negativo. Esto supone que la proteína mutante probablemente no afecta la localización de la proteína WT, a través de la formación de co-agregados proteicos como consecuencia del secuestro de BMPR2 WT, lo cual afectaría su función normal. Sin embargo, estos resultados negativos no desestiman los resultados descritos en el ensayo anterior, ya que es evidente el efecto de la mutación p.Ser987Phe en la localización subcelular de BMPR2 (Patiño et al., 2017)

La dominancia negativa causada por mutaciones en BMPR2, principalmente en el dominio extracelular y el dominio quinasa, ha sido documentada ampliamente en pacientes con hipertensión pulmonar primaria (HPP), una enfermedad autosómica dominante con baja penetrancia (20%-30%) (Austin et al., 2009; Li et al., 2010). Sin embargo, el principal mecanismo molecular propuesto para explicar la etiología de HPP es la haploinsuficiencia, en el cual las mutaciones *nonsense*, que pueden generar proteínas truncadas, activan el sistema *nonsense-mediated decay* (NMD). De esta forma los transcritos mutados son degradados y la dosis alélica, que produce la proteína normal, se reduce a la mitad. Los transcritos mutantes que escapan al sistema NMD, traducen proteínas cuya función anormal puede tener un efecto deletéreo sobre la función de la proteína normal (Austin et al., 2009; Khajavi et al., 2006; Pouliot et al., 2003).

Las mutaciones *missense* son las principales causantes del efecto dominante negativo. Estas han sido evaluadas previamente mediante ensayos funcionales *in vitro* y han permitido observar una significativa retención proteica en el RE, junto con la disrupción de la cascada de señalización BMP/SMAD. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones identificadas en la cola intracitoplasmática de BMPR2 que han sido evaluadas funcionalmente, no han tenido este mismo efecto (Austin et al., 2009; Sobolewski et al., 2008).

Excepcionalmente la mutación p.Ser863Asn generó la deslocalización subcelular de BMPR2 mutante, con un ligero patrón de agregación en el citoplasma y en el núcleo de las células del endotelio microvascular pulmonar (HLMVE) (Machado et al., 2015; Rudarakanchana et al., 2002; Wang et al., 2014). Estos resultados difieren de los obtenidos en la presente tesis, probablemente debido a las diferencias de la maquinaria celular entre las células HLMVE y CHO (Laissue, 2017; Patiño et al., 2017). Aun así, en ambos casos se evidencia el efecto deletéreo de las mutaciones en la región C-terminal de BMPR2, que comprometen su correcta localización y su disponibilidad en la membrana celular, y consecuentemente su función como receptor. De hecho, considerando que la IOP es una patología compleja y es de origen poligénico, la mutación p.Ser987Phe podría contribuir al fenotipo con un efecto aditivo, junto con la mutación heterocigota c.296A>G (p.Asn99Ser) en el gen *LHCGR*, la cual fue identificada en la misma paciente (Bouilly et al., 2016; Fonseca et al., 2015; Laissue, 2015, 2017; Patiño et al., 2017).

Nuestros resultados permitieron establecer una relación funcional entre la mutación p.Ser987Phe de BMPR2 y la IOP. Sin embargo esta variante podría, teóricamente, contribuir a modificaciones de la interacción proteína/proteína. Se utilizó el ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H) como método de *screening*, para determinar proteínas que interactuaran con Bmpr2 en su región C-terminal. El ensayo se realizó en un contexto ovárico, a partir de una librería de ADNc de ovario de *Mus musculus* (*Hybrigenics*). Se identificaron cuatro proteínas con una alta probabilidad de interacción (PBS: categoría A): Limk1 cuya interacción ya había sido previamente identificada y validada (Foletta et al., 2003), Ctnnd1, Fasn y Fn1. Las últimas tres proteínas son nuevos *partners* de interacción cuya relación con la fisiología del ovario y con la IOP, debe evaluarse mediante ensayos funcionales.

Finalmente, puesto que las mutaciones en *BMPR2* se han relacionado principalmente con HPP, se debe destacar que la paciente afectada con IOP no ha

presentado síntomas de HPP, lo cual puede ser explicado por la baja penetrancia de la enfermedad (Austin et al., 2009). Los mecanismos de haploinsuficiencia y dominancia negativa previamente descritos, así como las vías de señalización independientes de SMAD que pueden ser activadas por BMPR2, pueden explicar en parte la baja penetrancia. Esta depende también de otros factores como la edad, por lo que la paciente con 39 años de edad, aún puede desarrollar la patología (Austin et al., 2009; Pousada et al., 2017). De ser así, se podría establecer la mutación c.2960C>T (p.Ser987Phe) en *BMPR2*, como una causa genética sindrómica para la IOP.

9. Conclusiones y perspectivas

Los resultados del ensayo de localización subcelular de BMPR2, indican que la mutación genera la deslocalización y la retención de la proteína en el RE, afectando su función normal, como receptor transmembranal, para la activación de la vía de señalización SMAD. Por lo tanto, se propone una relación funcional entre la mutación c.2960C>T y la etiología de la IOP.

Los resultados del Y2H screening son preliminares y las interacciones se deben validar entre las proteínas humanas, mediante el sistema CheckMate en células eucariotas. Se recomienda evaluar mediante ensayos funcionales de Co-inmunoprecipitación y/o Pull-down el efecto de la mutación p.Ser987Phe con cada interacción proteica identificada. De esta forma, se podrá hipotetizar sobre la alteración de las vías de señalización intracelulares de cada proteína, para establecer una relación con la fisiología del ovario y la IOP.

Para evidenciar si la interacción proteica está acompañada de la co-localización de BMPR2 y su *partner*, y si la mutación afecta esta co-localización, se propone realizar un ensayo de inmunofluorescencia (IFI). Se recomienda emplear las células CHO como modelo celular para direccionar anticuerpos contra las proteínas expresadas endógenamente y evaluar la co-localización en un contexto netamente ovárico en ratón. También se propone co-transfectar las construcciones de la versión WT o mutante de BMPR2 con cada construcción del *partner*.

También sería interesante diseñar un modelo murino *knock-in* (KI) condicional para *Bmpr2*, de tal forma que se inserte la mutación humana en la región C-terminal conservada y observar el fenotipo en el tejido ovárico. Finalmente, se podría ampliar el número de casos de IOP y analizar un mayor número de genes, incluido BMPR2, para la detección de la mutación c.2960C>T en más pacientes y la identificación de nuevas variantes potenciales relacionadas con la IOP.

10. Bibliografía

- Aittomaki, K., Lucena, J. L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J., ... de la Chapelle, A. (1995). Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, 82(6), 959–968.
- Allen, L. A., Achermann, J. C., Pakarinen, P., Kotlar, T. J., Huhtaniemi, I. T., Jameson, J. L., ... Ball, S. G. (2003). A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotropic hypogonadism: Clinical and molecular characteristics. *Human Reproduction*, 18(2), 251–256. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg046>
- Ascoli, M., Fanelli, F., & Segaloff, D. L. (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.23.2.141>
- Austin, E. D., Phillips, J. A., Cogan, J. D., Hamid, R., Yu, C., Stanton, K. C., ... Loyd, J. E. (2009). Truncating and missense BMPR2 mutations differentially affect the severity of heritable pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Research*, 10(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-87>
- Baere, E. De, Dixon, M. J., Small, K. W., Jabs, E. W., Leroy, B. P., Devriendt, K., ... Messiaen, L. (2001). Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype – phenotype correlation. *Human Molecular Genetics*, 10(15), 1591–1600.
- Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2012). Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: A review. *Human Reproduction Update*, 18(1), 73–91. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>
- Bakalov, V. K., Anasti, J. N., Calis, K. A., Vanderhoof, V. H., Premkumar, A., Chen, S., ... Nelson, L. M. (2005). Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 84(4), 958–965.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.04.060>

- Beau, I., Touraine, P., Meduri, G., Gougeon, A., Desroches, A., Matuchansky, C., ... Misrahi, M. (1998). A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 102(7), 1352–1359. <https://doi.org/10.1172/JCI3795>
- Beerendonk, C. C., & Braat, D. D. (2005). Present and future options for the preservation of fertility in female adolescents with cancer. *Endocrine Development*, 8, 166–175.
- Biancalana, V., Beldjord, C., Taillandier, A., Szpiro-Tapia, S., Cusin, V., Gerson, F., ... Vincent, M. C. (2004). Five years of molecular diagnosis of fragile X syndrome (1997-2001): A collaborative study reporting 95% of the activity in France. *American Journal of Medical Genetics*, 129 A(3), 218–224. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30237>
- Bouilly, J., Bachelot, A., Broutin, I., Touraine, P., & Binart, N. (2011). Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Human Mutation*, 32(10), 1108–1113. <https://doi.org/10.1002/humu.21543>
- Bouilly, J., Beau, I., Barraud, S., Bernard, V., Azibi, K., Fagart, J., ... Binart, N. (2016). Identification of Multiple Gene Mutations Accounts for a new Genetic Architecture of Primary Ovarian Insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(12), 4541–4550. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2152>
- Bruysters, M., Christin-Maitre, S., Verhoef-Post, M., Sultan, C., Auger, J., Faugeron, I., ... Bouchard, P. (2008). A new LH receptor splice mutation responsible for male hypogonadism with subnormal sperm production in the propositus, and infertility with regular cycles in an affected sister. *Human Reproduction*, 23(8), 1917–1923. <https://doi.org/10.1093/humrep/den180>
- Caburet, S., Arboleda, V. A., Llano, E., Overbeek, P. A., Barbero, J. L., Oka, K., ... Vilain, E. (2014). Mutant Cohesin in Premature Ovarian Failure. *New England Journal of Medicine*, 370(10), 943–949.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309635>

- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033412>
- Calderon, F. R. O., Phansalkar, A. R., Crockett, D. K., Miller, M., & Mao, R. (2007). Mutation database for the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.20544>
- Camats, N., Pandey, A. V., Fernández-Cancio, M., Andaluz, P., Janner, M., Torán, N., ... Flück, C. E. (2012). Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(7). <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3169>
- Cameron, V. A., Nishimura, E., Mathews, L. S., Lewis, K. A., Sawchenko, P. E., & Vale, W. W. (1994). Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology*, 134(2), 799–808. <https://doi.org/10.1210/endo.134.2.8299574>
- Carabatsos, M. J., Elvin, J., Matzuk, M. M., & Albertini, D. F. (1998). Characterization of Oocyte and Follicle Development in Growth Differentiation Factor-9-Deficient Mice. *Developmental Biology*, 204(2), 373–384. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9087>
- Carlosama, C., Elzaiat, M., Patiño, 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. *Human Molecular Genetics*, 26(16), 3161–3166. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx199>
- 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. *Neurological Sciences*, 34(12), 2219–2222. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1569-4>

- Chang, H., Brown, C. W., & Matzuk, M. M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocrine Reviews*, 23(6), 787–823. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0003>
- Chapman, C., Cree, L., & Shelling, A. N. (2015). The genetics of premature ovarian failure: Current perspectives. *International Journal of Women's Health*, 7, 799–810. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S64024>
- Choi, Y., & Rajkovic, A. (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5394-7>
- Cogan, J. D., Pauciulo, M. W., Batchman, A. P., Prince, M. A., Robbins, I. M., Hedges, L. K., ... Nichols, W. C. (2006). High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(5), 590–598. <https://doi.org/10.1164/rccm.200602-165OC>
- Cohen, P. E., & Holloway, J. K. (2010). Predicting gene networks in human oocyte meiosis. *Biology of Reproduction*, 82(December 2009), 469–472. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.083014>
- Combelles, C. M. H., & Albertini, D. F. (2003). Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. *Biology of Reproduction*, 68(November 2002), 812–821. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.008656>
- Conway, G. S. (2000). Premature ovarian failure. *British Medical Bulletin*, 56(3), 643–9. <https://doi.org/10.1258/0007142001903445>
- Cordts, E. B., Christofolini, D. M., Dos Santos, A. A., Bianco, B., & Barbosa, C. P. (2011). Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 283(3), 635–643. <https://doi.org/10.1007/s00404-010-1815-4>
- Cox, L., & Liu, J. H. (2014). Primary ovarian insufficiency: An update. *International Journal of Women's Health*, 6(1), 235–243. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S37636>

- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., ... Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*, 27(february), 159–166. <https://doi.org/10.1038/84781>
- de Kretser, D. M., Hedger, M. P., Loveland, K. L., & Phillips, D. J. (2002). Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Human Reproduction Update*, 8(6), 529–541. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.6.529>
- Deng, Z., Morse, J. H., Slager, S. L., Cuervo, N., Moore, K. J., Venetos, G., ... Knowles, J. A. (2000). Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *American Journal of Human Genetics*, 67(3), 737–44. <https://doi.org/10.1086/303059>
- Devoto, L., Fuentes, A., Kohen, P., Céspedes, P., Palomino, A., Pommer, R., ... Strauss, J. F. (2009). The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertility and Sterility*, 92(3), 1067–1079. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1745>
- Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P., & Persani, L. (2004). Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *American Journal of Human Genetics*, 75(1), 106–11. <https://doi.org/10.1086/422103>
- Dias, J. A., Cohen, B. D., Lindau-Shepard, B., Nechamen, C. A., Peterson, A. J., & Schmidt, A. (2002). Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor. *Vitamins and Hormones*, 64, 249–322. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(02\)64008-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(02)64008-7)
- 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. *Human Mutation*, 33(8), 1175–1181. <https://doi.org/10.1002/humu.22111>
- Dixit, H., Rao, L., Padmalatha, V., Raseswari, T., Kapu, A. K., Panda, B., ... Singh, L. (2010). Genes governing premature ovarian failure. *Reproductive*

BioMedicine Online. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.02.018>

- Doherty, E., Pakarinen, P., Tiitinen, A., Kiilavuori, A., Huhtaniemi, I., Forrest, S., & Aittomäki, K. (2002). A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(3), 1151–1155. <https://doi.org/10.1210/jc.87.3.1151>
- Dragojevic-Dikic, S., Marisavljevic, D., Mitrovic, A., Dikic, S., Jovanovic, T., & Jankovic-Raznatovic, S. (2010). An immunological insight into premature ovarian failure (POF). *Autoimmunity Reviews*, 9(11), 771–774. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.06.008>
- Driancourt, M. a, Reynaud, K., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2000). Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of Reproduction*, 5, 143–152. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050143>
- Drummond, A. E., Minh Tan, L. E., Ethier, J. F., Dyson, M., & Findlay, J. K. (2002). Expression and localization of activin receptors, Smads, and β glycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology*, 143(4), 1423–1433. <https://doi.org/10.1210/en.143.4.1423>
- Ducat, A., Doridot, L., Calicchio, R., Méhats, C., Vilotte, J.-L., Castille, J., ... Vaiman, D. (2016). Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Scientific Reports*, 6(1), 19196. <https://doi.org/10.1038/srep19196>
- Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., ... Themmen, A. P. N. (2002). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143(3), 1076–1084. <https://doi.org/10.1210/en.143.3.1076>
- Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., ... Themmen, A. P. N. (2001). Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142(11), 4891–4899. <https://doi.org/10.1210/en.142.11.4891>
- Ebrahimi, M., & Asbagh, F. A. (2011). Pathogenesis and causes of premature

- ovarian failure: An update. *International Journal of Fertility and Sterility*, 5(2), 54–65.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, 30(6), 624–712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>
- Elvin, J., & Matzuk, M. (1998). Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod*, 3, 183–195.
- Emori, C., & Sugiura, K. (2014). Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Animal Science Journal*, 85(6), 627–633. <https://doi.org/10.1111/asj.12200>
- Eppig, J. J. (1991). Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.950131105>
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829–838. <https://doi.org/10.1530/reprod/122.6.829>
- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., & Pendola, F. L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2890–2894. <https://doi.org/10.1073/pnas.052658699>
- Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2003). The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 1, 9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-9>
- Fechner, P. Y., Davenport, M. L., Qualy, R. L., Ross, J. L., Gunther, D. F., Eugster, E. A., ... Quigley, C. A. (2006). Differences in follicle-stimulating hormone secretion between 45,X monosomy Turner syndrome and 45,X/46,XX mosaicism are evident at an early age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(12), 4896–4902. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1157>
- Fessel, J. P., Loyd, J. E., & Austin, E. D. (2011). The genetics of pulmonary arterial hypertension in the post-BMPR2 era. *Pulm.Circ.*, 1, 305–319.

<https://doi.org/10.4103/2045-8932.87293>

- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, *340*(6230), 245–246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>
- Foletta, V. C., Lim, M. A., Soosairajah, J., Kelly, A. P., Stanley, E. G., Shannon, M., ... Bernard, O. (2003). Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *Journal of Cell Biology*, *162*(6), 1089–1098. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212060>
- Fonseca, D. J., Garzón, E., Lakhal, B., Braham, R., Ojeda, D., Elghezal, H., ... Laissue, P. (2012). Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients. *Reproductive BioMedicine Online*, *24*(3), 339–341. <https://doi.org/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. *Translational Research*, *160*(5), 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.006>
- Fonseca, D. J., Ortega-Recalde, O., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Patiño, L. C., Bermúdez, O. M., ... Laissue, P. (2014). BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reproductive BioMedicine Online*, *29*(5), 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.018>
- Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Suárez, Y. C., De Jesús Rodríguez, A., Mateus, H. E., Jiménez, K. M., ... Laissue, P. (2015). Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertility and Sterility*, *104*(1), 154–162.e2. <https://doi.org/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. *American Journal of Medical Genetics, Part A*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35215>

- Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Vergara, J. I., Ríos, X., Uribe, C., Chávez, L., ... Laissue, P. (2013). A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth-Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene. *British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11181.x>
- Forero, D. A., Wonkam, A., Wang, W., Laissue, P., López-Correa, C., Fernández-López, J. C., ... Perry, G. (2016). Current needs for human and medical genomics research infrastructure in low and middle income countries: Table 1. *Journal of Medical Genetics*, 53(7), 438–440. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103631>
- Fortuño, C., & Labarta, E. (2014). Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(12), 1573–1585. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0342-9>
- Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., ... Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/77033>
- Gersak, K., Harris, S. E., Smale, W. J., & Shelling, A. N. (2004). A novel 30 bp deletion in the FOXL2 gene in a phenotypically normal woman with primary amenorrhoea: Case report. *Human Reproduction*, 19(12), 2767–2770. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh496>
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., Cranfield, M., Jeffery, L. A., Amato, F., Scott, S. J., ... Ritvos, O. (2004). Immunoneutralization of growth differentiation factor 9 reveals it partially accounts for mouse oocyte mitogenic activity. *Biol Reprod*, 71(3), 732–739. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028852>
- Girerd, B., Coulet, F., Jais, X., Eyries, M., Van Der Bruggen, C., De Man, F., ... Montani, D. (2015). Characteristics of pulmonary arterial hypertension in affected carriers of a mutation located in the cytoplasmic tail of bone morphogenetic protein receptor type 2. *Chest*, 147(5), 1385–1394. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0880>
- Gosden, R. G. (2002). Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular*

- and Cellular Endocrinology*, 186(2), 149–153. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00683-9](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00683-9)
- Goswami, D., & Conway, G. S. (2005). Premature ovarian failure. *Human Reproduction Update*, 11(4), 391–410. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi012>
- Goswami, D., & Conway, G. S. (2007). Premature ovarian failure. *Hormone Research*, 68(4), 196–202. <https://doi.org/10.1159/000102537>
- Goswami, R., Goswami, D., Kabra, M., Gupta, N., Dubey, S., & Dadhwal, V. (2003). Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders. *Fertility and Sterility*, 80(4), 1052–1054. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)01121-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)01121-X)
- Gougeon, a. (2010). Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Annales D'endocrinologie*, 71(3), 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.021>
- Greenwald, J., Fischer, W. H., Vale, W. W., & Choe, S. (1999). Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. *Nature Structural Biology*, 6(1), 18–22. <https://doi.org/10.1038/4887>
- Grive, K. J., & Freiman, R. N. (2015). The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development*, 142(15), 2554–2563. <https://doi.org/10.1242/dev.125211>
- Hagerman, R. J., & Hagerman, P. J. (2002). The fragile X premutation: Into the phenotypic fold. *Current Opinion in Genetics and Development*. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00299-X](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00299-X)
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (2004). Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*)¹. *Biology of Reproduction*, 70(4), 900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Harris, S. E., Chand, A. L., Winship, I. M., Gersak, K., Aittoma, K., & Shelling, A. N.

- (2002). Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Molecular Human Reproduction*, 8(8), 729–733.
- Hassel, S., Eichner, A., Yakymovych, M., Hellman, U., Knaus, P., & Souchelnytskyi, S. (2004). Proteins associated with type II bone morphogenetic protein receptor (BMPR-II) and identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4(5), 1346–1358. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300770>
- Hergersberg, M., Matsuo, K., Gassmann, M., Schaffner, W., Lüscher, B., Rüllicke, T., & Aguzzi, a. (1995). Tissue-specific expression of a FMR1/beta-galactosidase fusion gene in transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, 4(3), 359–366. <https://doi.org/citeulike-article-id:2637267> <https://doi.org/10.1093/hmg/4.3.359>
- Hillier, S. G. (2009). Paracrine support of ovarian stimulation. *Molecular Human Reproduction*, 15(12), 843–850. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap086>
- Hoek, A., Schoemaker, J., & Drexhage, H. A. (1997). Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocrine Reviews*, 18(1), 107–134. <https://doi.org/10.1210/er.18.1.107>
- Hook, E. B., & Warburton, D. (2014). Turner syndrome revisited: Review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. *Human Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1420-x>
- Howles, C. M. (2000). Role of LH and FSH in ovarian function. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 161, pp. 25–30). [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00219-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00219-1)
- Humaidan, P., Westergaard, L. G., Mikkelsen, A. L., Fukuda, M., & Yding Andersen, C. (2011). Levels of the epidermal growth factor-like peptide amphiregulin in follicular fluid reflect the mode of triggering ovulation: A comparison between gonadotrophin-releasing hormone agonist and urinary human chorionic gonadotrophin. *Fertility and Sterility*, 95(6), 2034–2038. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.02.013>

- Hussein, T. S., Froiland, D. a, Amato, F., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 22), 5257–5268. <https://doi.org/10.1242/jcs.02644>
- Hutt, K. J. (2006). KIT/KIT Ligand in Mammalian Oogenesis and Folliculogenesis: Roles in Rabbit and Murine Ovarian Follicle Activation and Oocyte Growth. *Biology of Reproduction*, 75(3), 421–433. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.051516>
- Hutt, K. J., & Albertini, D. F. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online*, 14(6), 758–64. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60679-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60679-7)
- Janse, F., De With, L. M., Duran, K. J., Kloosterman, W. P., Goverde, A. J., Lambalk, C. B., ... Giltay, J. C. (2012). Limited contribution of NR5A1 (SF-1) mutations in women with primary ovarian insufficiency (POI). *Fertility and Sterility*, 97(1). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.10.032>
- Jiang, Y., Nohe, A., Bragdon, B., Tian, C., Rudarakanchana, N., Morrell, N. W., & Petersen, N. O. (2011). Trapping of BMP receptors in distinct membrane domains inhibits their function in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(2), L218-27. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00300.2010>
- Jiao, X., Qin, Y., Li, G., Zhao, S., You, L., Ma, J., ... Chen, Z. J. (2013). Novel NR5A1 Missense Mutation in Premature Ovarian Failure: Detection in Han Chinese Indicates Causation in Different Ethnic Groups. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074759>
- Jin, M., Yu, Y., & Huang, H. (2012). An update on primary ovarian insufficiency. *Science China Life Sciences*, 55(8), 677–686. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4355-2>
- John, A., Kizhakkedath, P., Al-Gazali, L., & Ali, B. R. (2015). Defective cellular trafficking of the bone morphogenetic protein receptor type II by mutations underlying familial pulmonary arterial hypertension. *Gene*, 561(1), 148–156.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.038>

- Joyce, I. M., Pendola, F. L., Wigglesworth, K., & Eppig, J. J. (1999). Oocyte Regulation of Kit Ligand Expression in Mouse Ovarian Follicles. *Developmental Biology*, 214(2), 342–353. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9437>
- Kaestner, K. H., Knöchel, W., & Martínez, D. E. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.142>
- Kezele, P., Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (2005). Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod*, 73(5), 967–973. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043117>
- Khajavi, M., Inoue, K., & Lupski, J. R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 14(10), 1074–1081. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201649>
- Kidder, G. M., & Mhawi, A. A. (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, 123(5), 613–620. <https://doi.org/10.1530/reprod/123.5.613>
- Knight, P. G., Satchell, L., & Glister, C. (2012). Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 359(1–2), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.024>
- Kokcu, A. (2010). Premature ovarian failure from current perspective. *Gynecological Endocrinology*, 26, 555–562.
- Kuechler, A., Hauffa, B. P., Königer, A., Kleinau, G., Albrecht, B., Horsthemke, B., & Gromoll, J. (2010). An unbalanced translocation unmasks a recessive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene and causes FSH resistance. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 18(6), 656–61. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.244>
- L'Hôte, 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*. <https://doi.org/10.1002/bies.200900027>

- Lacombe, A., Lee, H., Zahed, L., Choucair, M., Muller, J.-M., Nelson, S. F., ... Vilain, E. (2006). Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *American Journal of Human Genetics*, 79(1), 113–9. <https://doi.org/10.1086/505406>
- Laissue, P. (2015). Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.005>
- Laissue, P. (2017). The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.021>
- Laissue, P., Burgio, G., l'Hôte, 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. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(4), 623–629. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082613pl>
- Laissue, P., Christin-Maitre, S., Touraine, P., Kuttann, F., Ritvos, O., Aittomaki, K., ... Veitia, R. A. (2006). Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology*, 154(5), 739–744. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02135>
- Laissue, P., L'hôte, D., Serres, C., & Vaiman, D. (2009). Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 3(1), 55–71. <https://doi.org/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. *Journal of Medical Genetics*, 46(7), 455–7. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.065086>
- Laissue, P., Lakhal, B., Benayoun, B., 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 . *Journal of Medical Genetics*, 46(7), 455–457.
- 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 Biology*, 6(10), 160109. <https://doi.org/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. *GENETICS in MEDICINE*, 1–2. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.62>
- Laissue, P., Vinci, G., Veitia, R. A., & Fellous, M. (2008). Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 282(1–2), 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.005>
- Lakhal, B., Ben-Hadj-Khalifa, S., Bouali, N., Philipert, P., Audran, F., Braham, R., ... Saad, A. (2012). Mutational screening of SF1 and WNT4 in Tunisian women with premature ovarian failure. *Gene*, 509(2), 298–301. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.08.007>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saâd, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2009). A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03571.x>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saâd, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2010). BMP15 and premature ovarian failure: Causal mutations, variants, polymorphisms? *Clinical Endocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03651.x>
- Lakhal, B., Laissue, P., Elghèzal, H., & Fellous, M. (2008). Genetic analysis of premature ovarian failure: role of forkhead and TGF-beta genes. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, 36(9), 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.07.002>

- Lalli, E., Doghman, M., Latre de Late, P., El Wakil, A., & Mus-Veteau, I. (2013). Beyond steroidogenesis: Novel target genes for SF-1 discovered by genomics. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.11.005>
- Laml, T., Preyer, O., Umek, W., Hengstschlager, M., & Hanzal, H. (2002). Genetic disorders in premature ovarian failure. *Human Reproduction Update*, 8(5), 483–491.
- Lane, K. B., Machado, R. D., Pauciulo, M. W., Thomson, J. R., Phillips, J. a, Loyd, J. E., ... Trembath, R. C. (2000). Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nature Genetics*, 26(september), 81–84. <https://doi.org/10.1038/79226>
- Latronico, A. C., Anasti, J., Arnhold, I. J. P., Rapaport, R., Mendonca, B. B., Bloise, W., ... Chrousos, G. P. (1996). Testicular and Ovarian Resistance to Luteinizing Hormone Caused by Inactivating Mutations of the Luteinizing Hormone–Receptor Gene. *New England Journal of Medicine*, 334(8), 507–512. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602223340805>
- Lebovic, D. I., & Naz, R. (2004). Premature ovarian failure: Think “autoimmune disorder.” *Sexuality, Reproduction and Menopause*, 2(4), 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.sram.2004.11.010>
- Lechowska, A., Bilinski, S., Choi, Y., Shin, Y., Kloc, M., & Rajkovic, A. (2011). Premature ovarian failure in nobox-deficient mice is caused by defects in somatic cell invasion and germ cell cyst breakdown. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(7), 583–589. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9553-5>
- Lehmann, O. J., Sowden, J. C., Carlsson, P., Jordan, T., & Bhattacharya, S. S. (2003). Fox’s in development and disease. *Trends in Genetics*. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00111-2)
- Li, W., Dunmore, B. J., & Morrell, N. W. (2010). Bone morphogenetic protein type II receptor mutations causing protein misfolding in heritable pulmonary arterial

- hypertension. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(6), 395–398.
<https://doi.org/10.1513/pats.201002-024AW>
- Liang, L., Soyal, S. M., & Dean, J. (1997). FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development (Cambridge, England)*, 124, 4939–47.
- Liu, F., Ventura, F., Doody, J., & Massagué, J. (1995). Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Molecular and Cellular Biology*, 15(7), 3479–86.
<https://doi.org/10.1128/MCB.15.7.3479>
- Lourenço, D., Brauner, R., Lin, L., De Perdigo, A., Weryha, G., Muresan, M., ... Bashamboo, A. (2009). Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *The New England Journal of Medicine*, 360(12), 1200–10.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0806228>
- Luborsky, J. L., Meyer, P., Sowers, M. F., Gold, E. B., & Santoro, N. (2003). Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Human Reproduction*, 18(1), 199–206.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deg005>
- Machado, R. D., Rudarakanchana, N., Atkinson, C., Flanagan, J. A., Harrison, R., Morrell, N. W., & Trembath, R. C. (2003). Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Human Molecular Genetics*, 12(24), 3277–3286. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg365>
- Machado, R. D., Southgate, L., Eichstaedt, C. A., Aldred, M. A., Austin, E. D., Best, D. H., ... Grünig, E. (2015). Pulmonary Arterial Hypertension: A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.22904>
- Markström, E., Svensson, E. C., Shao, R., Svanberg, B., & Billig, H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis - Dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123(1), 23–30.
<https://doi.org/10.1530/reprod/123.1.23>

- Massague, J. (2012). TGF beta signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Massagué, J., & Chen, Y. G. (2000). Controlling TGF- β signaling. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.14.6.627>
- Massagué, J., Seoane, J., & Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1350705>
- Mateus, H. E., Pérez, A. M., Mesa, M. L., Escobar, G., Gálvez, J. M., Montaña, J. I., ... Laissue, P. (2017). A first description of the Colombian national registry for rare diseases. *BMC Research Notes*, 10(1), 514. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2840-1>
- Matzuk, M. M. (2002). Intercellular Communication in the Mammalian Ovary: Oocytes Carry the Conversation. *Science*, 296(5576), 2178–2180. <https://doi.org/10.1126/science.1071965>
- Matzuk, M. M., & Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med*, 14(11), 1197–1213. <https://doi.org/nm.f.1895> [pii]r10.1038/nm.f.1895
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.21.2.200>
- Meduri, G., Touraine, P., Beau, I., Lahuna, O., Desroches, a, Vacher-Lavenu, M. C., ... Misrahi, M. (2003). Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(8), 3491–8. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030217>
- MH, O., Bielfeld, P., JS, K., Hirchenhain, J., RS, J., & Koldovsky, U. (1999). Epidermal growth factor and leukemia inhibitory factor levels in follicular fluid. Association with in vitro fertilization outcome. *The Journal of Reproductive Medicine*, 44(4), 367–369.
- Mientjes, E. J., Nieuwenhuizen, I., Kirkpatrick, L., Zu, T., Hoogeveen-Westerveld, M., Severijnen, L., ... Oostra, B. A. (2006). The generation of a conditional

- Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. *Neurobiology of Disease*, 21(3), 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.08.019>
- 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. *Human Genomics*, 9(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0033-3>
- Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp148>
- Miyazono, K., Maeda, S., & Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.009>
- Miyazono, K., ten Dijke, P., & Heldin, C. H. (2000). TGF-beta signaling by Smad proteins. *Advances in Immunology*, 75, 115–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10879283>
- Mohiyiddeen, L., Newman, W. G., McBurney, H., Mulugeta, B., Roberts, S. A., & Nardo, L. G. (2012). Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers. *Fertil Steril*, 97(3), 677–681. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.040> \nS0015-0282(11)02924-4 [pii]
- Moore, R. K., Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2003). Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 304–310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207362200>
- Morrell, N. W., Bloch, D. B., ten Dijke, P., Goumans, M.-J. T. H., Hata, A., Smith, J., ... Bloch, K. D. (2015). Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia. *Nature Reviews Cardiology*, 13(2), 106–120. <https://doi.org/10.1038/hrcardio.2015.156>
- Morrell, N. W., Yang, X., Upton, P. D., Jourdan, K. B., Morgan, N., Sheares, K. K., & Trembath, R. C. (2001). Altered Growth Responses of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells From Patients With Primary Pulmonary Hypertension to

- Transforming Growth Factor- 1 and Bone Morphogenetic Proteins. *Circulation*, 104(7), 790–795. <https://doi.org/10.1161/hc3201.094152>
- Niño, M. Y., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Kroos, M. A., Ospina, S. Y., Mejía, J. F., ... Laissue, P. (2013). Identification and Functional Characterization of GAA Mutations in Colombian Patients Affected by Pompe Disease. *JIMD Reports*, 7, 39–48. https://doi.org/10.1007/8904_2012_138
- Nishihara, A., Watabe, T., Imamura, T., & Miyazono, K. (2002). Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Molecular Biology of the Cell*, 13(9), 3055–63. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0063>
- Obara, K., Ishihara, M., Fujita, M., Kanatani, Y., Hattori, H., Matsui, T., ... Maehara, T. (2005). Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2. *Wound Repair and Regeneration*, 13(4), 390–397. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2005.130406.x>
- 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. *Fertility and Sterility*, 95(8), 2658–2661. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.045>
- Ojeda, S. R., Romero, C., Tapia, V., & Dissen, G. A. (2000). Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00242-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00242-7)
- Orisaka, M., Tajima, K., Tsang, B. K., & Kotsuji, F. (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-2-9>
- Ortega-Recalde, O., Beltrán, O. I., Gálvez, 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. *Clinical Genetics*, 88(4), e1–e3. <https://doi.org/10.1111/cge.12634>

- Ortega-Recalde, O., Fonseca, D. J., Patiño, 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. <https://doi.org/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. *Clinical and Experimental Dermatology*, *40*(7), 757–760. <https://doi.org/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. *British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/bjd.14969>
- Ortega-Recalde, O., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Ríos, X., Mosquera, H., Bermúdez, O. M., ... Laissue, P. (2013). Whole-Exome Sequencing Enables Rapid Determination of Xeroderma Pigmentosum Molecular Etiology. *PLoS ONE*, *8*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064692>
- Ortega, S., Iltmann, M., Tsang, S. H., Ehrlich, M., & Basilico, C. (1998). Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(10), 5672–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5672>
- Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2002). A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(12), 8060–8065. <https://doi.org/10.1073/pnas.122066899>
- Panay, N., & Kalu, E. (2009). Management of premature ovarian failure. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *23*(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2008.10.008>
- Parrott, J. A., Vigne, J. L., Chu, B. Z., & Skinner, M. K. (1994). Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and

- hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology*, 135(2), 569–575. <https://doi.org/10.1210/endo.135.2.8033804>
- 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(3), 1009–1019. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3503>
- Patiño, L. C., Silgado, D., & Laissue, P. (2017a). A potential functional association between mutant BMP2 and primary ovarian insufficiency. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(3), 145–149. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1291767>
- Patiño, L. C., Silgado, D., & Laissue, P. (2017b). A potential functional association between mutant BMP2 and primary ovarian insufficiency. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(3), 145–149. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1291767>
- Patiño, 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109576>
- Patiño, L. C., Beau, I., Carlosama, C., Buitrago, J. C., González, R., Suárez, C. F., ... Laissue, P. (2017). New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Human Reproduction*, 32(7), 1512–1520. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex089>
- Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R. T., ... Matzuk, M. M. (2013). Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), E776–E785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218020110>
- Persani, L., Rossetti, R., & Cacciatore, C. (2010). Genes involved in human

- premature ovarian failure. *Journal of Molecular Endocrinology*.
<https://doi.org/10.1677/JME-10-0070>
- Pisarska, M. D., Bae, J., Klein, C., & Hsueh, A. J. W. (2004). Forkhead L2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology*, *145*(7), 3424–3433.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1141>
- Pouliot, F., Blais, a, & Labrie, C. (2003). Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res*, *63*(2), 277–281. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12543773
- Pousada, G., Lupo, V., Cástro-Sánchez, S., Álvarez-Satta, M., Sánchez-Monteagudo, A., Balóira, A., ... Valverde, D. (2017). Molecular and functional characterization of the BMPR2 gene in Pulmonary Arterial Hypertension. *Scientific Reports*, *7*(1), 1923. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02074-8>
- Prada, C. F., & Laissue, P. (2014). A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics. *Mammalian Genome*, *25*(11–12), 618–635. <https://doi.org/10.1007/s00335-014-9537-8>
- Pulkki, M. M., Mottershead, D. G., Pasternack, A. H., Muggalla, P., Ludlow, H., Van Dinther, M., ... Ritvos, O. (2012). A covalently dimerized recombinant human bone morphogenetic protein-15 variant identifies bone morphogenetic protein receptor type 1B as a key cell surface receptor on ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, *153*(3), 1509–1518. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1390>
- Qiao, J., Han, B., Liu, B. L., Chen, X., Ru, Y., Cheng, K. X., ... Song, H. D. (2009). A splice site mutation combined with a novel missense mutation of LHCGR cause male pseudohermaphroditism. *Human Mutation*, *30*(9).
<https://doi.org/10.1002/humu.21072>
- Qin, Y., Choi, Y., Zhao, H., Simpson, J. L., Chen, Z.-J., & Rajkovic, A. (2007). NOBOX Homeobox Mutation Causes Premature Ovarian Failure. *The*

- American Journal of Human Genetics*, 81(3), 576–581.
<https://doi.org/10.1086/519496>
- Qin, Y., Jiao, X., Simpson, J. L., & Chen, Z. J. (2015). Genetics of primary ovarian insufficiency: New developments and opportunities. *Human Reproduction Update*, 21(6), 787–808. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv036>
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Fukuda, M., Suarez, C., Gonzalez, R., Patarroyo, M., ... Laissue, P. (2017). Novel genes and mutations in patients affected by recurrent spontaneous abortion. *PLoS ONE*, Submitted, 1–14.
- Rajkovic, A. (2004). NOBOX Deficiency Disrupts Early Folliculogenesis and Oocyte-Specific Gene Expression. *Science*, 305(5687), 1157–1159. <https://doi.org/10.1126/science.1099755>
- Richter, K. S. (2008). The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 20(3), 292–304. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e3282fe743b>
- Rizzolio, F., Bione, S., Sala, C., Goegan, M., Gentile, M., Gregato, G., ... Toniolo, D. (2006). Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature. *Hum.Reprod.*, 21(6), 1477–1483.
- Rizzolio, F., Sala, C., Alboresi, S., Bione, S., Gilli, S., Goegan, M., ... Toniolo, D. (2007). Epigenetic control of the critical region for premature ovarian failure on autosomal genes translocated to the X chromosome: A hypothesis. *Human Genetics*, 121(3–4), 441–450. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0329-z>
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., ... Miyazono, K. (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), 7632–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7632>
- Rossetti, R., Pasquale, E. Di, Marozzi, A., Bione, S., Toniolo, D., Grammatico, P., ... Persani, L. (2009). BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Human*

- Mutation*, 30(5), 804–810. <https://doi.org/10.1002/humu.20961>
- Rubio-Gozalbo, M. E., Gubbels, C. S., Bakker, J. a, Menheere, P. P. C. a, Wodzig, W. K. W. H., & Land, J. a. (2010). Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Human Reproduction Update*, 16(2), 177–88. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp038>
- Rudarakanchana, N., Flanagan, J. A., Chen, H., Upton, P. D., Machado, R., Patel, D., ... Morrell, N. W. (2002). Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Human Molecular Genetics*, 11(13), 1517–25.
- Russell, P., & Robboy, S. J. (2004). Premature Ovarian Failure Associated with Autoimmune Polyglandular Syndrome: Pathophysiological Mechanisms and Future Fertility. <https://doi.org/10.1089/154099903766651649>. Published
- Santos, M. G., Machado, A. Z., Martins, C. N., Domenice, S., Costa, E. M. F., Nishi, M. Y., ... Mendonca, B. B. (2014). Homozygous inactivating mutation in NANOS3 in two sisters with primary ovarian insufficiency. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/787465>
- Schimmer, B. P., & White, P. C. (2010). Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(7), 1322–1337. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0519>
- Schmidt, D. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131(4), 933–942. <https://doi.org/10.1242/dev.00969>
- Senbon, S., Hirao, Y., & Miyano, T. (2003). Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *The Journal of Reproduction and Development*, 49(4), 259–269. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.259>
- Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., & Springer, T. A. (2011). Latent TGF- β structure and activation. *Nature*, 474(7351), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature10152>
- Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell

- membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X)
- Shimasaki, S., Moore, R. K., Otsuka, F., & Erickson, G. F. (2004). The Bone Morphogenetic Protein System in Mammalian Reproduction. *Endocrine Reviews*, 25(1), 72–101. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0007>
- Simpson, J. L. (2008). Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: Overview of selected candidate genes. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1135, pp. 146–154). <https://doi.org/10.1196/annals.1429.019>
- Simpson, J. L., & Rajkovic, A. (1999). Ovarian differentiation and gonadal failure. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19991229\)89:4<186::AID-AJMG3>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19991229)89:4<186::AID-AJMG3>3.0.CO;2-5)
- Sobolewski, A., Rudarakanchana, N., Upton, P. D., Yang, J., Crilley, T. K., Trembath, R. C., & Morrell, N. W. (2008). Failure of bone morphogenetic protein receptor trafficking in pulmonary arterial hypertension: Potential for rescue. *Human Molecular Genetics*, 17(20), 3180–3190. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn214>
- Souza, C. J. H., Campbell, B. K., McNeilly, A. S., & Baird, D. T. (2002). Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction*, 123(3), 363–369. <https://doi.org/10.1530/reprod/123.3.363>
- Soyal, S. M., Amleh, A., & Dean, J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, 127, 4645–4654.
- Stewart, C. L., & Cullinan, E. B. (1997). Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Developmental Genetics*, 21(1), 91–101. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1997\)21:1<91::AID-DVG11>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1997)21:1<91::AID-DVG11>3.0.CO;2-D)
- Sullivan, A. K., Marcus, M., Epstein, M. P., Allen, E. G., Anido, A. E., Paquin, J. J.,

- ... Sherman, S. L. (2005). Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Human Reproduction*, 20(2), 402–412. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh635>
- Suzuki, A., & Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes and Development*, 22(4), 430–435. <https://doi.org/10.1101/gad.1612708>
- Sybert, V. P., & McCauley, E. (2004). Turner's Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 351(12), 1227–1238. <https://doi.org/10.1056/NEJMra030360>
- Tharapel, A. T., Anderson, K. P., Simpson, J. L., Martens, P. R., Wilroy, R. S., Llerena, J. C., & Schwartz, C. E. (1993). Deletion (X)(Q26.1-JQ28) in a Proband and Her Mother - Molecular Characterization and Phenotypic-Karyotypic Deductions. *American Journal of Human Genetics*, 52(3), 463–471.
- Tiotiu, D., Alvaro Mercadal, B., Imbert, R., Verbist, J., Demeestere, I., De Leener, A., ... Delbaere, A. (2010). Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Human Reproduction*, 25(6), 1581–1587. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq073>
- Toledo, S. P. A., Brunner, H. G., Kraaij, R., Post, M., Dahia, P. L. M., Hayashida, C. Y., ... Themmen, A. P. N. (1996). An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(11), 3850–3854. <https://doi.org/10.1210/jc.81.11.3850>
- Toniolo, D. (2006). X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(3), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.04.005>
- Touraine, P., Beau, I., Gougeon, a, Meduri, G., Desroches, a, Pichard, C., ... Misrahi, M. (1999). New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(11), 1844–54. <https://doi.org/10.1210/mend.13.11.0370>
- Tsuda, M. (2003). Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development.

- Science*, 301(5637), 1239–1241. <https://doi.org/10.1126/science.1085222>
- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., ... Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1171–1181. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh124>
- Van Den Hurk, R., & Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63(6), 1717–1751. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>
- Van Esch, H. (2006). The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *European Journal of Medical Genetics*, 49(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2005.11.001>
- Vassart, G., Pardo, L., & Costagliola, S. (2004). A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.01.006>
- Vatin, M., Bouvier, S., Bellazi, L., Montagutelli, X., & Laissue, P. (2013). Polymorphisms of Human Placental Alkaline Phosphatase Are Associated with in Vitro Fertilization Success and Recurrent Pregnancy Loss. *The American Journal of Pathology*, (December).
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043356>
- Vitt, U. A., McGee, E. A., Hayashi, M., & Hsueh, A. J. W. (2000). In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, 141(10), 3814–3820. <https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7732>
- Wang, H., Ji, R., Meng, J., Cui, Q., Zou, W., Li, L., ... Penny, D. J. (2014). Functional changes in pulmonary arterial endothelial cells associated with BMPR2 mutations. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106703>

- Wassarman, P. M., Liu, C., & Litscher, E. S. (1996). Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *Journal of Cell Science*, 109 (Pt 8(1996), 2001–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8856495>
- Weenen, C., Laven, J. S. E., von Bergh, A. R. M., Cranfield, M., Groome, N. P., Visser, J. A., ... Themmen, A. P. N. (2004). Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction*, 10(2), 77–83. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah015>
- Wilson, T., Wu, X. Y., Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. a, ... Montgomery, G. W. (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1225–1235. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.4.1225>
- Wittenberger, M. D., Hagerman, R. J., Sherman, S. L., McConkie-Rosell, A., Welt, C. K., Rebar, R. W., ... Nelson, L. M. (2007). The FMR1 premutation and reproduction. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.09.004>
- Wood, M. A., & Rajkovic, A. (2013). Genomic markers of ovarian reserve. *Seminars in Reproductive Medicine*, 31(6), 399–415. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1356476>
- Wu, X., Wang, B., Dong, Z., Zhou, S., Liu, Z., Shi, G., ... Xu, Y. (2013). A NANOS3 mutation linked to protein degradation causes premature ovarian insufficiency. *Cell Death and Disease*, 4(10), e825. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.368>
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. a, Carino, C., ... Matzuk, M. M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15(6), 854–866. <https://doi.org/10.1210/mend.15.6.0662>
- Yang, D. Z., Yang, W., Li, Y., & He, Z. (2013). Progress in understanding human ovarian folliculogenesis and its implications in assisted reproduction. *Journal*

of Assisted Reproduction and Genetics, 30(2), 213–219.
<https://doi.org/10.1007/s10815-013-9944-x>

Zhao, H., Chen, Z.-J., Qin, Y., Shi, Y., Wang, S., Choi, Y., ... Rajkovic, A. (2008). Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *American Journal of Human Genetics*, 82(6), 1342–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.04.018>

Zinn, A. R., & Ross, J. L. (1998). Turner syndrome and haploinsufficiency. *Current Opinion in Genetics and Development*. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80089-0](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80089-0)

11. Anexo 1

Articulo: **A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency.**

Patiño Liliana; Silgado Daniel; Laissue Paul.

Revista: Systems biology in reproductive medicine. Marzo 17 de 2017