BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN *FOXO4* EN PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA NO-SINDRÓMICA

ELIANA DEL PILAR GARZON VENEGAS

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ, D.C.

BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN *FOXO4* EN PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA NO-SINDRÓMICA

ELIANA DEL PILAR GARZON VENEGAS

TRABAJO DE GRADO

Para optar al título de

MAGISTER EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA

DIRECTOR

DORA JANETH FONSECA, MSc, PhD (c)

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ, D.C.

BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN *FOXO4* EN PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA NO-SINDRÓMICA

ELIANA DEL PILAR GARZON VENEGAS

APROBADO

_____

DORA JANETH FONSECA, MSc, PhD (c)
DIRECTOR

_____ _____

HEIDI ELIANA MATEUS,MD,MSc,
JURADO

JUBBY MARCELA GALVEZ ,MD,MSc,
JURADO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ, D.C.

Dedico el esfuerzo y el haber culminado esta atapa de mi vida académica a mi familia, en especial a mi padre quien siempre tiene la palabra adecuada, la ternura y la sabiduría necesaria para impulsarme a ser mejor y a mi hijo el cual me ha enseñado lo maravilloso que es sonreírle a la vida.

Eliana del Pilar Garzón Venegas

AGRADECIMIENTOS

A Nicolás y Estebitan por su apoyo en esta etapa de mi vida, por su amor incondicional.

A mis padres y hermanos por sus consejos, apoyo, solidaridad y amor.

A la unidad de Genética Humana de la facultad de medicina de la Universidad del Rosario y al Dr Paul Laissue por permitirme la realización de este trabajo, por todo el apoyo y conocimientos brindados.

Un agradecimiento especial a la Dra Dora por todo su apoyo, conocimiento, y sabiduría, por su amor a la ciencia que inspira a querer y valorar la investigación.

Al Dr Restrepo y el equipo de trabajo de Genética Molecular LTDA quienes en todo momento me brindaron su apoyo y ayuda para poder culminar satisfactoriamente este trabajo.

A los amigos que conocí en la maestría con los cuales compartimos experiencias de vida muy valiosas, quienes me brindaron su ayuda y amistad incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 1
2. MARCO TEÓRICO 2
2.1 DETERMINACIÓN SEXUAL –GENERALIDADES………............................... 2
2.1.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL-GENERALIDADES... 3
2.1.1.1 DETERMINACIÓN DEL SEXO GENÉTICO……… 4
2.2 LOS GENES DETERMINANTES DEL TESTÍCULO 5
2.2.1*SRY*……..………………………………………………….............................. 5
2.2.2*SOX9*…………………………………………...7
2.2.3*SF1*……………………………………………………………….........................9
2.2.4*FGF9*………………….……………….. 10
2.2.5*DAX1*…………………………………………………………........................... 11
2.3 LOS GENES DETERMINANTES DEOVARIO……………….......................... 12
2.3.1*WNT4*……………………………………….. 12
2.3.2RSPO1.. 13
2.3.3*CTNNB1*... 14
2.3.4*FOXL2*...14
2.4DETERMINACIÓN DEL SEXO HORMONAL.. 15
2.4.1ESTRÓGENO……….. 16
2.4.2TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA... 16
2.4.3 HORMONA ANTIMULLERIANA……………..……….……..……......…17
2.4.4GONADOTROPINAS………………………………………………..……..…....17
2.5 EL OVARIO. …..…..……..………………...…………………………….…......18
2.5.1OVOGÉNESIS……………..…………………………………............................19
2.5.2 FASE PRE-FOLICULAR……….………………………..…...………………19
2.5.3FOLICULOGÉNESIS…………………………………………..…………....20
2.6 FALLA OVARICA PREMATURA (FOP)……………………………...……..…23
2.6.1EPIDEMIOLOGÍA DE LA FOP……………………….…………..…...……23
2.6.2 SÍNTOMAS DE LA FOP…………………..……………………….……..…….23
2.6.3 DIAGNÓSTICO DE LA FOP……………………………………………...23
2.6.4 ETIOLOGÍA DE LA FALLA OVARÌCA PREMATURA................................ 24
2.6.5 CAUSAS IATROGÉNICAS……………………………………………….…..25
2.6.6 CAUSAS AUTOINMUNES………………………………………….………..25
2.6.7 CAUSAS GENÉTICAS……………………………….. 26
2.6.8 CAUSAS SINDRÓMICAS…………………………………….......................... 27
2.6.8.1 SÍNDROME TURNER……….. 27
2.6.8.2 GALACTOSEMIA……... 28
2.6.8.3 BPES……………………….. 28
2.6.8.4 SÍNDROME DEL X FRAGIL………..………………………......………….…29
2.6.9 CAUSAS NO SINDRÓMICAS DE FOP…... 29
2.6.9.1 BMP15…………………….. 29
2.6.9.2 GDF9………………… 31
2.6.9.3 INHIBINAS……………..32

2.6.9.4 NR5A1……..……32
2.6.9.5 *NOBOX*…….. 32
2.6.9.6 *FIGLA* ……..... 33
2.7 FACTORES DE TRANSCRIPCION FORKHEAD…….....34
2.7.1 LA SUBFAMILIA FOXO……..... 35
2.7.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA SUBFAMILIA FOXO..... 37
2.7.3 REGULACIÓN DE LOS FACTORES DE TRASCRIPCIÓN FOXO..……37
2.7.3.1 LA FOSFORILACIÒN……..…38
2.7.3.2 LA ACETILACIÓN……..... 39
2.7.3.3 LA UBIQUITINACIÓN……..... 40
2.7.3.4 LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT…….. 41
2.7.3.5 MIEMBROS DE LA SUBFAMILIA FOXO ……..……42
2.7.3.5.1 *FOXO3A*……..…..42
2.7.3.5.2 *FOXO1*……..…..43
2.7.3.5.3 *FOXO4*……..…..44
3. HIPOTESIS ……..……49
4.OBJETIVOS DE INVESTIGACIÒN…….……..50
4.1 OBJETIVO GENERAL ……..…50
4.2 OBJETIVOS ESPECÌFICOS…….....50
5. MATERIALES Y MÈTODOS……..…...51
5.1 POBLACIÒN DE ESTUDIO ……..…..51
5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÒN ……..…51
5.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN GRUPO DE CASOS (FOP)……..…51
5.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA EL GRUPO DE CONTROLES…….....51
5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN ……..…...51
5.4 COMITÉ DE ÉTICA ……..…....51
5.5 EXTRACCIÓN DE ADN ……..……52
5.6 DISEÑO DE PRIMERS ……..…..52
5.7 AMPLIFICACIÓN DEL ADN ……..…....53
5.8 DETECCIÓN AMPLIFICACIÓN DEL ADN ……..…54
5.9 SECUENCIACIÓN DIRECTA.....54
5.10 HERRAMIENTAS BIOINFORMÀTICAS.....54
6. RESULTADOS …….. 55
6.1 DISCUSION ……..57
6.2 CONCLUSIÓN…….....59
6.3 PERSPECTIVAS……..... 59
7. ANEXO 60
8. REFERENCIAS .....….64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación sexual……...……...…….……4
Figura 2. Dominios conservados de las proteínas *SOX9* de ratón y humano…...……9
Figura 3. Estructura de la proteína RSPO1……...……..……...…14
Figura 4. Estructura del ovario……..…….....……18
Figura 5. Foliculogénesis……...…..……..22
Figura 6. Fases de la foliculogénesis.posibles mecanismos de FOP…….....24
Figura 7. Alineamiento de los miembros de la familia Foxo murinos……..…...…..36
Figura 8. Estructura de las proteínas FOXO…….....37
Figura 9. Fosforilación de proteínas FOXO…..…….....39
Figura 10. Modificaciones post-traduccionales de FOXOS…….….40
Figura 11. Dominio de unión al ADN (DBD) de FOXO4…….....45
Figura 12. Cromatograma de la variante IVS2+41G>T…….55
Figura 13 Resultado predicción in silico IVS2+4G>T (Human Splicing Finder……...56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers *FOXO4*…….53
Tabla 2. Programa de PCR *FOXO4*……*54*
Tabla 3. Análisis de secuencia del gen FOXO4, frecuancias alélicas de la variante IVS2+41G>T……...55

1. INTRODUCCIÓN

La infertilidad se define como la incapacidad para concebir después de un año de relaciones sexuales regulares sin protección. La infertilidad afecta entre 60 millones y 168 millones de personas en todo el mundo; generalmente uno de cada diez parejas son infértiles (Vayena et al. 2002). Se estima que un promedio del 15% de las parejas en todo el mundo no tienen hijos a causa de la infertilidad representando un problema de salud pública, (Matzuk y Lamb 2002). Una de las causas femeninas de infertilidad, es la falla ovárica prematura (FOP) afecta a alrededor del 1% de las mujeres menores de 40 años de edad (Coulam et al. 1986, Conway et al. 2000). La FOP se define clínicamente como la presentación de seis meses de amenorrea asociada con concentraciones plasmáticas elevadas de FSH (> 40 UI/l). Varias etiologías se han relacionado con la patogénesis de la FOP como agentes infecciosos, enfermedades autoinmunes y lesiones iatrogénicas. Sin embargo, la mayoría de los casos de la FOP se consideran como idiopáticos, indicando la participación de factores genéticos. Estudios de ligamiento genético, estudios de asociación de genoma completo, y modelos animales han planteado una cantidad significativa de genes candidatos para la FOP, que conllevan a una mejor comprensión de la función reproductiva femenina. Dentro de estos genes se propone como gen candidato a *FOXO4*, el cual se expresa en células de la granulosa en ratones y humanos, su función se ha asociado a procesos de longevidad y envejecimiento. Su papel en la vía molecular PI3K/Akt/Cdkn1b, sugiere un papel importante durante la fisiología ovárica (Pisarska et al. 2009, Rajareddy et al. 2007 , Richards et al.2002).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DETERMINACIÓN SEXUAL-GENERALIDADES

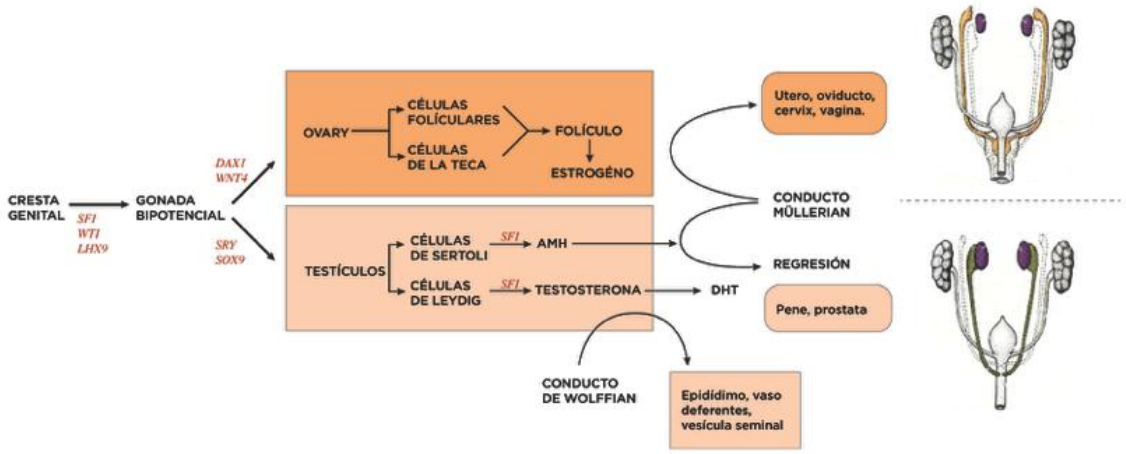
La determinación del sexo de un individuo se ha estudiado desde la antigüedad. Una de las primeras teorías sobre la determinación sexual fue la propuesta por Aristóteles, quien planteó que las mujeres serían hombres en los cuales el desarrollo de sus estructuras (sobre todo los genitales) se detuvo muy temprano. La mujer seria "un hombre mutilado", en quien el desarrollo se habría detenido, porque el frío del vientre de la madre habría predominado sobre el calor del semen paterno. Postuló que el sexo era determinado por el calor de la pasión del progenitor masculino durante el coito. En Grecia (siglo V A.C) la medicina postulaba que los niños se formaban del lado derecho del útero y las niñas del lado izquierdo. En la edad media se creía que para la concepción de un varón, la madre debía tomar antes de tener relaciones, una bebida hecha con vino y sangre de león (Álvarez et al. 2002). En 1889, Gedder y Thomson, propusieron que la determinación sexual esta ligada a aspectos netamente ambientales factores como la constitución física, la edad, la nutrición y el medio ambiente de los padres. La acumulación de energía y de nutrientes induciría a tener descendencia femenina, mientras que los factores que favorecían la utilización de la energía y de nutrientes influían para tener descendencia masculina. A partir del descubrimiento de los cromosomas sexuales, se postuló que existía un componente nuclear específico responsable directo del fenómeno del desarrollo sexual y de la determinación sexual. (Brigdes 1916 y Gilbert.2000).

La determinación sexual se fundamenta en la orientación de gónadas primitivas hacia la formación de testículos u ovarios. En los humanos y otros mamíferos la presencia del cromosoma Y determina si las gónadas primitivas se desarrollarán en un hombre o en una mujer. En los hombres 46,XY, la expresión del gen *SRY* en el cromosoma Y determina que la gónada indiferenciada se convierta en un testículo a partir de la expresión de una serie de genes pro-testiculares. En las mujeres 46,XX, la ausencia del gen *SRY* ocasiona que la gónada indiferenciada se convierta en un ovario a partir de la expresión de un conjunto de genes pro-ováricos que permiten la activación de una serie de estructuras que finalmente se desarrollaran en un ovocito.

2.1.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL-GENERALIDADES

El desarrollo de los órganos genitales internos y externos en sentido masculino o femenino depende de la presencia de las hormonas testiculares (Goodfellow y Lovell-Badge 1993). Con la presencia del testículo fetal se secretan dos hormonas importantes, la hormona anti-Mülleriana (AMH) y la testosterona. La primera, participa en la involución del conducto de Müller mientras que la testosterona estimula la formación del pene, del escroto y de otras partes de la anatomía masculina. En las mujeres los ovarios producen estrógeno que permite el desarrollo del conducto de Müller y estimula la formación del útero, los oviductos y del extremo superior de la vagina (Gilbert et al. 2000) (**Figura 1**).

Figura 1. Diferenciación sexual. Modificado de Gilbert.2000.



2.1.1.1 DETERMINACIÓN DEL SEXO GENÉTICO

El primer avance en la comprensión de la determinación molecular del sexo fue el descubrimiento en 1916 por Brigdes, quien describió los cromosomas sexuales de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). La mayoría de los cromosomas estaban presentes en igual número en hembras y en machos, había uno o dos cromosomas adicionales de manera desigual en los dos sexos. En la *Drosophila*, el sexo se determina por el cromosoma X y por la relación cuantitativa entre el cromosoma X y los autosomas (Cline y Meyer, 1996). Las moscas hembra son XX, XXY, y XXYY mientras que los machos son XY y XO.

En 1959, se identificó la presencia del cromosoma Y como el principal factor de la determinación sexual masculina. En el hombre el cromosoma Y porta un gen que codifica para un factor determinante del testículo que establece el desarrollo testicular. El cromosoma Y tiene una pequeña región pseudoautosómica en donde se generan procesos de recombinación entre los cromosomas X e Y durante la meiosis. Se puede

producir en regiones adyacentes no-homólogas a la región pseudoautosómica, generando el intercambio de ADN específico del cromosoma Y dentro del cromosoma X. Entre la región pseudoautosómica y el centrómero, se describió inicialmente una región portadora del Factor de Determinación Testicular (TDF) que contiene el gen *Sex Determining Region, Y* (*SRY*). Este gen codifica para la proteína SRY central en el inicio del desarrollo de los testículos a partir de una gónada bipotencial indiferenciada (Sinclair et al. 1991, Gubbay et al.1990).

2.2 LOS GENES DETERMINANTES DEL TESTÍCULO

2.2.1 *SRY*

El gen *SRY* es el principal iniciador de la cascada que determina el desarrollo del testículo a partir de una gónada bipotencial. Este gen se ubica en el brazo corto del cromosoma Y (Yp11.3) y está compuesto por 825 pares de bases (bp). Codifica para una proteína de 204 aminoácidos. La proteína SRY es un miembro de una gran familia de factores de transcripción caracterizados por un dominio de unión al ADN conocido como High Mobility Group (HMG). El dominio HMG de la proteína SRY, reconoce la secuencia nucleotídica AACAATG en los promotores de genes blanco en humanos, mientras que en ratones Sry reconoce la secuencia CATTGTT (Harley et al. 1994). La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína SRY en el dominio HMG humano con la de otras especies de mamíferos revela una identidad del 70%. En contraste, no hay conservación de la secuencia de SRY fuera del dominio HMG. En el

ratón Sry contiene una región rica en glutamina ausente en otras especies de mamíferos y en algunas subespecies del ratón (Harley et al. 2003).

Las mutaciones en el gen *SRY* se asocian con reversión sexual. Los pacientes femeninos con cariotipo XY con mutaciones en *SRY* muestran disgenesia gonadal completa coherente con un rol clave de *SRY* en la formación de los testículos (Hawkins et al.1992). Aunque las mutaciones de codón de parada se encuentran dispersas en el gen *SRY*, mutaciones que cambian aminoácidos altamente conservados en la evolución en un lugar funcional de la proteína, tienden a agruparse en la región central del gen que codifica para el dominio HMG.

En ratones transgénicos, fragmentos de 14 kb de ADN genómico conteniendo la secuencia del *Sry*, fueron suficientes para dirigir la diferenciación testicular generando la reversión sexual en ratones XX, desarrollando testículos, glándulas accesorias del aparato reproductor masculino y pene (Koopman *et al*.1991). Este experimento junto con otros estudios murinos demostró de manera concluyente que el gen *Sry* correspondía al factor determinante de testículo (FDT).

En el modelo murino los transcritos de *Sry* se detectan a los 10.5 días post-coito (dpc) observándose el pico de mayor expresión a los 11.5 dpc. La expresión decrece a los 12.5 dpc (Hacker et al. 1995). En los humanos *SRY* se detecta a los 41 días en los embriones XY, observándose un pico de expresión a los 44 días cuando los cordones testiculares ya están formados (Hanley et al.2000).

SRY puede tener más de un modo de acción en el desarrollo testicular desencadenando la vía de expresión de diversos genes, induciendo la diferenciación de las células de Sertoli, contribuyendo la migración de las células del mesonefros hacia las crestas

genitales y mediante estimulación de la proliferación de las células en las crestas genitales (Burgoyne et al.1988, Buehr et al. 1993, Martineau et al.1997, Merchant-Larios et al.1993 y Schmahl et al. 2000).

2.2.2 *SOX9*

El gen *SOX9* participa en la determinación sexual. Este gen se ubica en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23), está compuesto por 3935 bp y codifica para una proteína de 509 aminoácidos. La proteína SOX9 es miembro de una familia de factores de transcripción caracterizados por un dominio de unión al ADN conocido como High Mobility Group (HMG). Comparte un 70% de aminoácidos con la secuencia de HMG de SRY. La proteína SOX9, a diferencia de SRY está muy conservada a través de la evolución de los vertebrados (Gilbert.2000).

La proteína Sox9 posee dos dominios de activación transcripcional. El primero, es rico en residuos prolina-glutamina-serina (dominio PQS) y es indispensable para la actividad transcripcional, mientras que el segundo es rico en residuos prolina-glutamina-alanina (dominio PQA) y es necesario para mantener la actividad de transcripción. Mutaciones en este dominio disminuyen la capacidad de transactivación de Sox9 (Harley *et al*. 2003) (**figura 2**).

Varios genes son regulados después de la expresión de SOX9 y por lo tanto, se consideran blancos potenciales de éste. La proteína SOX9 se expresa durante la condrogénesis actuando en la diferenciación de los condrocitos y junto al factor

esteroidogénico (SF1) regula la transcripción de la hormona anti-Mülleriana (AMH). De manera específica, se conoce que Sox9 es capaz de unirse al promotor y activar la transcripción de la AMH *in vitro* e *in vivo*. (De Santa Barbara et al. 1998). Mutaciones cerca del dominio de unión de Sox9 en la región promotora de AMH en ratones XY genera el desarrollo de trastorno ovotesticular del desarrollo sexual (Arango et al.1999). SOX9 juega un papel importante en la diferenciación y en la función de las células de Sertoli. *SOX9* activa a *FGF9,* y participa en el inicio del desarrollo de los cordones testiculares y de mitosis de las células de Sertoli (Kim et al. 2006).

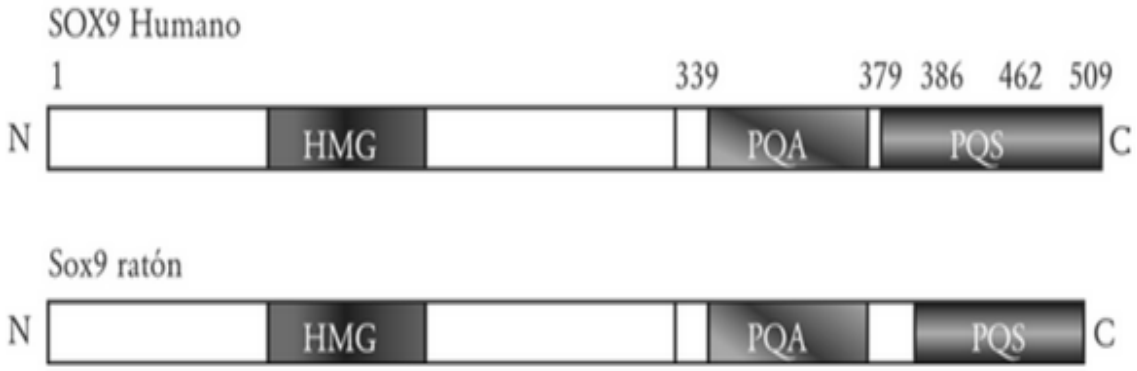
Las mutaciones en *SOX9* se han localizado en todo el marco abierto de lectura (ORF), a diferencia de las mutaciones en SRY que generalmente se producen en el dominio de HMG. Las mutaciones de *SOX9* en humanos han sido asociadas a la displasia campomélica. El 75% de pacientes con esta patología y cariotipo XY presentan reversión sexual, lo que sugiere que SOX9 es necesaria para regular la determinación testicular (Foster *et al.* 1994).

SOX9 regulado por SRY y SF1, inicia la diferenciación de células pre-sertoli a células de sertoli (Ieuan A.2001).

Sox9 tiene un elemento regulador de 3.2 kb, responsable de la expresión específica de en el testículo. Esta región se denomina TES (*testis-specificenhancer of Sox9*) y se encuentra ubicada a 13 Kb *upstream* del sitio de inicio de la transcripción (Sekido et al. 2008). Dentro de TES se encuentra una región de 1.4 kb altamente conservada entre el ratón, el perro y la especie humana denominada TESCO. *Sry* y *Sf1* actúan de manera

sinérgica sobre TESCO para regular positivamente la expresión de *Sox9*. (Sekido y Lovell-Badge. 2008).

Figura 2. Dominios conservados de las proteínas SOX9 de ratón y humano. Modificada de Harley et al. 2003.



2.2.3 *SF1*

El gen *SF1* (factor esteroidogénico), se ubica en el brazo largo del cromosoma 9 (9q33), está compuesto por 3104 bp y codifica para una proteína de 461 aminoácidos. *SF1* se identificó por primera vez como un activador de genes implicados en la biosíntesis de esteroides (Ikeda *et al.* 1993). SF1 tiene un dominio de unión al ADN compuesto por dos dedos de zinc que son altamente conservados entre los mamíferos. Estudios de expresión en ratones mostraron que *Sf1* está presente durante el desarrollo del embrión en las regiones asociadas con la función endocrina, en las gónadas, las glándulas suprarrenales, la hipófisis y el hipotálamo (Hatano et al. 1994).Los ratones *Knockout* (KO) para el gen *Sf1*, muestran desarrollo gonadal por un corto tiempo (Schmahl J et al.2000).

Mutaciones heterocigotas en el gen *SF1* se han asociado con reversión sexual e insuficiencia suprarrenal, lo que sugiere que *SF1* regula la regresión de los conductos de Müller (Achermann JC et al. 1999). Mutaciones en MISRE1 (dominio de unión de *SF1*en la región promotora del gen *AMH*) causan una disminución parcial en los niveles de AMH y regresión parcial de los conductos de Müller, lo que indica que *SF1* es indispensable en su regulación (Arango *et al*.1999).

2.2.4 *FGF9*

El gen *FGF9* (Factor de crecimiento de fibroblastos 9), se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q11-q12) y está compuesto de 4220 bp que codifican para una proteína de 208 aminoácidos. *Fgf9* está implicado en la proliferación y determinación de las células de Sertoli. Se expresa en el embrión de ratón durante el desarrollo gonadal (Colvin JS et al.2009). Se puede detectar a partir de 11.5 dpc en ambos sexos y posteriormente se detecta en la formación de los cordones testiculares en ratones XY mientras que no se expresa en la gónada de ratones XX. Los ratones XY $Fgf9^{-/-}$ muestran reversión sexual con alteración de la diferenciación de las células pre-Sertoli, lo que sugiere que *Fgf9* tiene un papel importante en la formación testicular durante la embriogénesis (Schmahl et al.2003, Schmahl et al.2004). *SOX9* establece un ciclo de regulación positiva con *FGF9* y *PGD2*, lo cual permite la expresión de éstos genes durante el desarrollo del testículo (Wilhelm et al. 2007 y Kim et al. 2006).

2.2.5 *DAX1*

El gen *DAX1*, se ubica en el brazo corto del cromosoma X (Xp21.3) y codifica para la proteína DAX1 que pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas. En el extremo N-terminal de la proteína se encuentra la secuencia de aminoácidos LXXLL que media la interacción proteína-proteína, (Suzuki et al. 2003, Zanaria et al. 1994, Zhang et al. 2000), mientras que en el extremo C- terminal, se ha descrito un dominio de transrepresión (Ito et al. 1997, Zazopoulos et al. 1997). El modelo principal de acción molecular de DAX1 es la interacción con otros receptores nucleares como SF1 (Lalli etal.1997, Nachtigal et al.1998, Suzuki et l.2003), el receptor de estrógeno ERα y ERβ, (Zhang et al. 2000), el receptor de andrógenos y el receptor de progesterona (Agoulnik et al.2003, Holteretal.2002).

Dax1 se expresa en la glándula suprarrenal en desarrollo, en las gónadas, el hipotálamo y la hopófisis (Hanleyet al.2000, Ikeda et al. 1996, Ikeda et al. 2001). Durante el desarrollo testicular, *Dax1* se expresa en las células somáticas antes de la expresión de *Sry*, con una fuerte expresión en las células de Sertoli a los 12.5 dpc. *Dax1* continúa expresándose en el ovario en desarrollo hasta por lo menos los 14.5 dpc (Ikeda et al. 2001). En un principio se postuló a Dax1 como factor determinante del ovario, basado en el fenotipo de reversión sexual en individuos XY con doble copia de *Dax1* (Bardoni et al.1994).La función de *Dax1* en el desarrollo testicular temprano y en la regulación de la *Amh* es claro.*Dax1* es necesario para el desarrollo testicular, inhibiendo la interacción sinérgica de Sf1 con Wt1, por lo que funciona como un antagonista de la producción de Amh (Yu et al. 1998, Niakan y McCabe 2005).

2.3 LOS GENES DETERMINANTES DE OVARIO

2.3.1 *WNT4*

El gen *WNT4* es uno de los principales iniciadores de la cascada de interacciones de genes que determinan el desarrollo del ovario a partir de una gónada bipotencial. Este gen se ubica en el brazo corto del cromosoma 1(1p36.12) y está compuesto por 3845 bp que codifican para una proteína de 351 aminoácidos. *Wnt4* se expresa en la gónada embrionaria en ratones de ambos sexos en las primeras etapas del desarrollo, y después de la acción de *Sry* en la gónada XY su expresión se convierte en específica del ovario (Vainio et al. 1999). Los ratones XX *Wnt4*$^{-/-}$ presentan reversión sexual. En humanos, las mutaciones de *WNT4* generan un inicio tardío de la determinación sexual lo que se asocia a una reversión parcial similar al fenotipo observado en el ratón.

Wnt4 tiene diferentes funciones durante la diferenciación sexual. Se requiere para la morfogénesis del conducto de Müller y para la inhibición de la formación de la vascularización específica, señala la supresión de la producción de las células de Leydig, activa y regula la expresión de *Dax1* en la vía WNT/β-catenina (Mizusaki et al.2003).

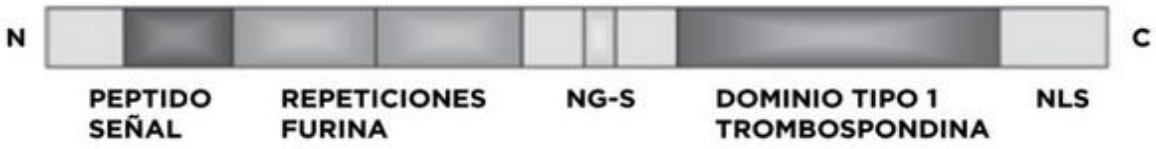
WNT4 se expresa en las células de la granulosa y en los cuerpos lúteos (Hsieh et al. 2002). El factor WNT4 es un importante regulador del desarrollo folicular, coordinando diversas funciones de las células de la granulosa durante las etapas finales de la maduración del folículo y la ovulación. WNT4 actúa en la regulación de la expresión

de genes involucrados en una serie de procesos foliculares cruciales, incluyendo la esteroidogénesis, la biosíntesis de prostaglandinas y la angiogénesis (Boyer et al. 2010).

2.3.2 *RSPO1*

RSPO1 se ubica en el brazo corto del cromosoma 1(1p34.3) y está compuesto por 2985 pb que codifican para una proteína de 263 aminoácidos. La estructura de la proteína RSPO1 está compuesta por un péptido señal ubicado en el extremo N-terminal, dos dominios furina, un dominio trombospondina 1 y una región de aminoácidos cargados positivamente ubicados en la región C-terminal que, a su vez, contiene una región de señalización de localización nuclear (**Figura 3**). Los dominios furina están involucrados en diversas vías moleculares como reguladores del desarrollo del ovario a través de la modulación de la vía WNT4/β-CATENINA (Kazanskaya et al. 2004).Los ratones XX *Rspo1* $^{-/-}$ muestran una formación de tejido testicular en el ovario (ovotestis) y androgenización parcial de los animales hembra, con una disminución de la señalización de β-catenina y reducción de la expresión de *Wnt4*. El fenotipo de los ratones XX*Rspo1* $^{-/-}$ y XX *Wnt4*$^{-/-}$ es muy similar, lo que sugiere que estos genes actúan en la misma vía molecular. Con el fin de probar esta hipótesis se estudió el nivel de expresión de *Wnt4* en ratones XX *Rspo1*$^{-/-}$, observándose un bajo nivel de expresión de *Wnt4* (Chassot et al. 2008). En humanos, mutaciones en *RSPO1* generan un fenotipo de mujeres con genitales masculinos, con hipospadias, hipogenitalismo grave o ambigüedad de los genitales externos (Tomaselli et al. 2008). Estos hallazgos junto con los modelos murinos en *Rspo1* indican que este gen actúa como un activador de la vía molecular en el desarrollo ovárico.

Figura 3. Estructura de la proteína RSPO1.



2.3.3 *CTNNB1* (β-catenina)

El gen *CTNNB1* (β-catenina) se ubica en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21) y está compuesto por 3729 bp que codifican para una proteína de 781aminoácidos. *Ctnnb1* es un efector de la vía de *Wnt4.*Actúa como mediador intracelular de *Rspo1* que estimula la expresión de *Wnt4* en el ovario fetal, interviniendo en el mantenimiento de la supervivencia de las células germinales femeninas (Yao et al 2004). Los ratones XX *Ctnnb1* $^{-/}$ presentan una disminución de la expresión génica de los reguladores esenciales del desarrollo ovárico (*Fst*, *Wnt4* y *Foxl2)* y una disminución de las células somáticas en los ovarios (Manuylov et al.2008).

2.3.4 *FOXL2*

El gen *FOXL2* se ubica en el brazo largo del cromosoma 3 (3q23) y está compuesto por 2917 bp que codifica para una proteína de 376 aminoácidos. Este gen codifica para un factor de transcripción de la familia *forkhead*. *FOXL2* es esencial en la diferenciación y el mantenimiento ovárico. Se expresa inicialmente en el ovario en el momento de la determinación del sexo (Crisponi et al. 2001). Este perfil de expresión se observa a

través de diferentes especies, lo que sugiere un papel conservado de *FOXL2* en el desarrollo ovárico en vertebrados (Wang et al. 2004). La expresión de *Foxl2* en ratones XX se inicia a los 12.5 dpc en las células de la pre-granulosa (Schmidt et al. 2004). Mutaciones en *FOXL2* en humanos causan el síndrome de Blefarofimosis, Ptosis, Epicantus-Inversus (BPES), que se caracteriza por anormalidades en los párpados y está asociado a falla ovárica prematura (FOP) pero no con reversión sexual (Crisponi et al. 2001). En cabras, las mutaciones en *FOXL2* conducen al síndrome de intersexualidad PIS (Polled Intersex Syndrome), que se caracteriza por reversión sexual. En ratones la invalidación homocigota *Foxl2*$^{-/-}$ afecta la diferenciación de células de la granulosa, los folículos son ausentes, un crecimiento anormal de los ovocitos y las hembras son estériles (Uda et al. 2004, Schmidt et al. 2004). Mediante estudios murinos la supresión de los genes *Wnt4* y *Foxl2* generó reversión sexual en los ratones XX permitiendo la expresión de *Sox9* y de *Amh*.

2.4 DETERMINACIÓN DEL SEXO HORMONAL

La diferenciación sexual primaria, implica la formación de un ovario de un testículo a partir de una gónada bipotencial. Posterior a esta etapa, es posible observar un estadio de diferenciación sexual secundario, caracterizado por el desarrollo de genitales tanto internos como externos, dependiente de una sutil y regulada expresión hormonal orquestada por las gónadas femeninas (ovarios) o por las gónadas masculinas (testículos). En este segundo estadio fetal, es necesario resaltar dos momentos: el primero referente a la regulación hormonal derivada de la organogénesis en la etapa embrionaria y el segundo a la regulación hormonal en la etapa de la pubertad. Se ha demostrado que para el desarrollo de un fenotipo femenino, es necesaria la secreción de estrógenos, los cuales permiten el adecuado desarrollo de los conductos de Müller y de Wolf. En el desarrollo del fenotipo masculino es indispensable la secreción de dos hormonas testiculares, la hormona antimülleriana (AMH) producida por las células de Sertoli y la testosterona, secretada por las células de Leydig cuya función genera que el

conducto de Wolf se diferencie en el epidídimo, los conductos deferentes y las vesículas seminales (Gilbert et al. 2000).

2.4.1 ESTRÓGENO

En los mamíferos, el estrógeno es necesario para la fertilidad de los machos y de las hembras. En las hembras esta molécula es secretada inicialmente a partir del ovario fetal induciendo la diferenciación del conducto de Müller, de los oviductos y del cuello uterino. En los machos, el estrógeno regula la absorción de agua que se efectúa en los conductos deferentes concentrando el semen. Los estrógenos median su acción principalmente a través de los receptores de estrógeno (ER). Se han determinado en la especie humana de dos isoformas ERs, la isoforma alfa (Erα) y la isoforma beta (Erβ) que están codificadas por los genes *ESR1* y *ESR2*, respectivamente.

En modelos murinos knockout (KO) para los ERs se evidenció infertilidad tanto en hembras como en machos. Adicionalmente, este modelo permitió determinar en las hembras que la insensibilidad de estrógenos generaba diferentes fenotipos de acuerdo al receptor no-expresado. En las hembras KO para el $ER\alpha^{-/-}$ se observó una inadecuada maduración del aparato reproductor femenino. Por otro lado, las hembras KO para el $Er\beta^{-/-}$ presentaron muerte de las células germinales y de la células de la granulosa, con diferenciación parcial de las células de Sertoli. En el caso de los machos, se observó infertilidad ante la ausencia de las dos isoformas $ER\alpha^{-/-}$ ó $ER\beta^{-/-}$, lo que permitió señalar su función en el tracto reproductor masculino (Carreau et al. 2012 y Couse y Korach 1999).

2.4.2 TESTOSTERONA Y DIHIDROTESTOSTERONA

Las dos hormonas masculinizantes primarias son la testosterona y la dihidrotestosterona. La testosterona promueve la formación de las estructuras masculinas reproductoras como son el epidídimo, las vesículas seminales y los conductos deferentes. La dihidrotestosterona (DHT), durante la embriogénesis, promueve la formación de la uretra, la próstata, el pene y el escroto.

2.4.3 HORMONA ANTIMÜLLERIANA

La AMH, es una proteína de la familia de los factores de crecimiento (TGFβ) secretada por las células de Sertoli que tiene como función, entre otras, ocasionar la degeneración del conducto de Müller. Su expresión es detectable desde la infancia y la adultez en hombres. Sin embargo, en las mujeres no es detectada sino hasta la pubertad, es producida por las células granulosas de los folículos preantrales (primarios y secundarios) y antrales pequeños. Actúa inhibiendo el reclutamiento de los folículos primordiales, así como también durante la fase de crecimiento folicular dependiente de FSH. Hembras de un modelo murino, para el gen *Amh* presentaron un desarrollo folicular tres veces mayor en contraste a las hembras WT. Este aumento en la tasa folicular condujo a un agotamiento prematuro del *pool* de folículos primordiales en este modelo. Estos datos son coherentes y permitieron sugerir el uso de este marcador para evaluar la cantidad y la calidad del *pool* de folículos en el ovario (Lane y Donahue 1998, Durlinger et al. 1999 y Ebner et al.2006).

2.4.4 GONADOTROPINAS

Las gonadotropinas son hormonas secretadas por la hipófisis, por acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que están implicadas en la regulación de la reproducción. Son esenciales para la diferenciación sexual masculina y femenina (Hughes, 2001).

Dentro de este grupo se encuentran tres moléculas:

- Hormona luteinizante (LH): Controla la maduración de los folículos, la ovulación, la iniciación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona. En el varón regula la secreción de testosterona.

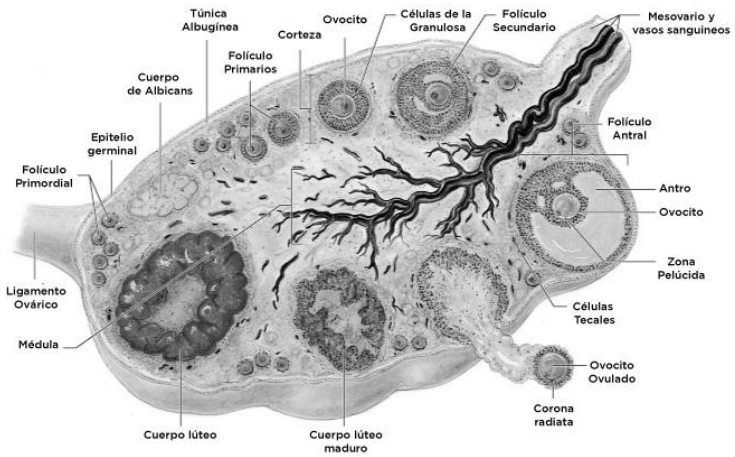
- Hormona estimulante del folículo (FSH): Su función consiste en estimular el crecimiento del folículo ovárico. En el varón su función es esencial para la espermatogénesis.

- Gonadotropina coriónica humana (HCG): Su función principal en las hembras es la maduración del ovocito. En los varones estimula la producción de la testosterona.

2.5 EL OVARIO

El ovario es la gónada femenina productora y secretora de ovocitos y de hormonas sexuales. Mide aproximadamente 4 centímetros de largo y 2 centímetros de ancho en la especie humana. Está compuesto por dos zonas. la corteza ovárica, la cual contiene los ovocitos y está constituida por estroma y parénquima, y la médula ovárica constituida por tejido conectivo laxo compuesto por fibroblastos y una matriz extracelular que forman una red de fibras de colágeno tipo I con presencia de fibras elásticas y de algunas células musculares lisas. El ovario contiene y mantiene a los ovocitos, cuyo desarrollo implica varios procesos regulados incluyendo la ovogénesis, la prefoliculogénesis y la foliculogénesis (**Figura 5**). El ovocito y las células circundantes del folículo constituyen la unidad reproductiva fundamental del ovario. El ovario promueve la secreción de hormonas para la maduración folicular y el desarrollo de las características sexuales secundarias femeninas (Eynard et al.2008).

Figura 4. Estructura del ovario (Modificado de Cummings, 2011).



2.5.1 OVOGÉNESIS

La ovogénesis es el proceso de maduración de las células germinales femeninas desde su diferenciación en ovogonia hasta su maduración en ovocito. La mayor parte de las etapas del desarrollo de los gametos femeninos se fundamentan en divisiones mitóticas en las que se produce un gran número de células diploides (ovogonias). Al final del proceso se genera una cantidad limitada de divisiones meióticas (ovocito secundario) cuya finalidad es la unión con el gameto masculino para la formación final de un nuevo individuo. La ovogénesis consiste en la conversión de ovogonias en ovocitos primordiales, un proceso que se realiza durante la gestación. En los seres humanos aproximadamente 7 millones de ovocitos inmaduros se producen. La mayoría se someten a un proceso selectivo de apoptosis. Se estima que al momento del nacimiento una mujer posee aproximadamente 2 millones de ovocitos. Posteriormente en la pubertad, se pueden observar alrededor de 400.000 ovocitos inmaduros.

Este proceso se inicia a partir de células germinales que se originan a partir del ectodermo embrionario y migran hacia el pliegue gonadal (futuro ovario) mediante movimientos ameboides utilizando moléculas de reconocimiento en la matriz extracelular. En promedio, existen 1.700 células germinales antes de iniciar la migración hacia el borde genital duplicándose el número celular durante el proceso de migración. Al llegar a su destino, las células germinales primordiales se diferencian en ovogonias. En las 11-12 semanas de gestación, los ovocitos primordiales sufren nuevamente repetidas divisiones mitóticas y antes del nacimiento, entran en meiosis transformándose en ovocitos primarios. Los ovocitos primarios permanecen en reposo meiótico por el resto de la vida intrauterina (Faddy et al. 1992, Faddy, 2000, Goldfien et al. 1998, y Stenzel et al. 1998).

2.5.2 FASE PRE-FOLICULAR

La fase pre-folicular es un breve periodo en la organogénesis ovárica antes del inicio de la foliculogénesis. En esta fase son evidentes los cordones sexuales que están constituidos por ovogonias y por células epiteliales delimitadas por una membrana basal.

2.5.3 FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis comprende el crecimiento del folículo y su desarrollo a través de los distintos estadios de desarrollo, desde el momento en que surge del *pool* de folículos formado durante la ovogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia (regresión o muerte del folículo). Este proceso se lleva a cabo en la corteza del ovario.

La foliculogénesis implica dos procesos principales: el reclutamiento del folículo en un *pool* de crecimiento y la proliferación seguida por la diferenciación de las células de la granulosa y de la teca. El reclutamiento del folículo se regula por señales paracrinas y autocrinas producidas en el ovario. En el humano, la foliculogénesis empieza aproximadamente entre la semana 11 a 12 de la gestación. El primero en formarse es el folículo primordial que representa la unidad funcional del ovario de los mamíferos. Los folículos primordiales están compuestos por un ovocito en crecimiento, que mide de 25 μm a 35 μm de diámetro, rodeado por células epiteliales poco diferenciadas de las células de la pre-granulosa que ejercen un efecto inhibidor sobre la meiosis y el crecimiento del ovocito (**Figura 5B**). En la pubertad 5 a 15 folículos primordiales comienzan a tener un crecimiento basal lento con cada ciclo ovárico, mediante el control de factores de crecimiento, citocinas, esteroides y constituyentes de la matriz extracelular. Estos folículos son reclutados en un *pool* cada vez mayor y las células de la granulosa proliferan, rodeando el ovocito. Las células de la granulosa comienzan a expresar marcadores de proliferación. En esta fase inicia la expresión del gen (*FSHR*) (Picton et al.2001, Hirshfield, 1989, Wandji et al.1996 y Wandji et al. 1997).

Posteriormente los folículos primordiales abandonan el *pool* para convertirse en folículos primarios que tienen un tamaño aproximado de 60 μm de diámetro (**Figura 5C**). Esta transición implica modificaciones citológicas en el ovocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte inicialmente en una capa de células cúbicas y cilindrícas, y mediante mitosis origina las células de la granulosa que

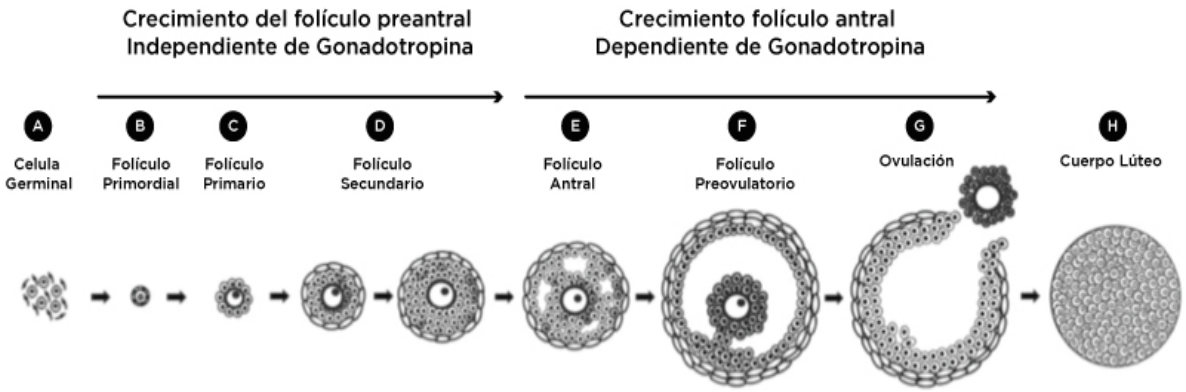
formarán posteriormente un epitelio estratificado. Las células de la granulosa segregan mucopolisacáridos entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes, originando espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida (ZP), la cual es una cubierta extracelular glicoproteíca que rodea a los ovocitos. Cuando se alcanza esta etapa de folículo primario, las células de la pre-granulosa no ejercen ningún efecto inhibidor sobre el crecimiento del ovocito pero sí sobre la meiosis. A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza ovárica. A través de sucesivas divisiones mitóticas de células de la granulosa, el folículo primario unilaminar pasa a un estadio preantral, multilaminado, denominado folículo secundario o folículo preantral (**Figura 5D**). Estos folículos poseen una o dos arteriolas que terminan en una red vascular fuera de la lámina basal, y por lo tanto, el folículo entra en contacto directo con factores que se encuentran en la circulación. En este estadio las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la FSH y las hormonas esteroideas. La FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa y aumenta el número de *FSHR* expresados en su superficie. Durante la etapa final del crecimiento del folículo preantral, las células de la granulosa y de la teca cambian progresivamente y son más sensibles a la estimulación por las gonadotropinas. Las células de la granulosa se diferencian en dos grupos: las que revisten la pared del folículo y que forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal, y aquellas que se diferencian en células del *cumulus oophorus* formando varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito. Estas últimas tienen como función proteger el ovocito y coordinar la maduración y el desarrollo folicular. Cuando las células de la granulosa alcanzan un número elevado se forman cavidades en el espacio extracelular llenas de un fluido denominado fluido folicular. La cantidad de líquido folicular aumenta formando el antro, lleno de líquido es un rasgo característico de un folículo maduro, y es conocido como folículo antral o terciario (**Figura 5E**). Se forma, entonces, una cavidad central, el antro folicular, rodeado de células de la granulosa murales localizadas en la periferia. El folículo antral está tapizado por un epitelio estratificado de células de la granulosa que presentan un engrosamiento localizado en uno de sus lados llamado. Células del *cumulus*, que mantienen una estrecha relación con el ovocito mediante uniones estrechas (*gap*). Estas uniones intercelulares posibilitan el

intercambio de aminoácidos, nucleótidos y lípidos precursores en el ovocito. La relación con estas células se vuelve más laxa debido a la aparición gradual del líquido que llena los espacios intercelulares. Al desprenderse el ovocito, una ó más capas de las células del *cumulus* permanecen unidas a él, formando la corona radiata, una envoltura celular laxa que persiste alrededor del ovocito aún después de la ovulación. La aparición de los LHR en las células de la granulosa ocurre durante la transición del folículo antral hacia el folículo preovulatorio, debido a la estimulación de la FSH. Este paso es fundamental para que el folículo progrese hacia la ovulación.

Cuando el folículo alcanza su mayor crecimiento y madurez por la influencia de la FSH y de la LH, se le denomina folículo de Graaf o folículo pre-ovulatorio (**Figura 5F**) (Thibault et al.1987, Reynolds et al.1992, Anderson y Albertini, 1976, y Canipari, 1994).

El proceso de atresia folicular puede ocurrir en cualquier momento de la gestación hasta la menopausia. Durante el período fértil de una mujer, sólo 400-500 folículos maduran y se ovulan, y más del 99 % se someten a atresia mediante mecanismos de apoptosis (Gougeon, 1996 y Hsueh et al. 1994).

Figura 5. Foliculogénesis (Modificado de Edson et al.2009).



2.6 FALLA OVARICA PREMATURA (FOP)

La FOP se define clínicamente como la detención de la menstruación antes de los 40 años de edad con amenorrea mayor a 6 meses de evolución asociada a niveles séricos de FSH superiores a 40 UI/l (Coulam, 1982 y Santoro, 2003).

2.6.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA FOP

La FOP afecta aproximadamente al 1% de las mujeres menores de 40 años, y al 0.1% de la mujeres menores de 30 años (Coulam et al. 1986, Cramer y Xu 1996, Luborsky et al.2003).

2.6.2 SÍNTOMAS DE LA FOP

Los síntomas de FOP son variables y se presentan de manera súbita o gradual. Puede presentarse amenorrea primaria, en donde no se presenta menarquia, y amenorrea secundaria, cuando la menstruación cesa espontáneamente después de un periodo de menstruación normal. La FOP puede acompañarse de ausencia en el desarrollo puberal, mamario y del vello púbico (Rajkovic 1999, Anasti 1998, Goswami y Conway 2005).
La FOP post-puberal representa la gran mayoría de los casos y se caracteriza por amenorrea secundaria asociada al arresto o depleción folicular prematuros. Otros síntomas incluyen palpitaciones, intolerancia al calor, sofocos, sudores nocturnos, irritabilidad, ansiedad, depresión, trastornos del sueño, disminución de la libido y sequedad vaginal (Santoro, 2003).

2.6.3 DIAGNÓSTICO DE LA FOP

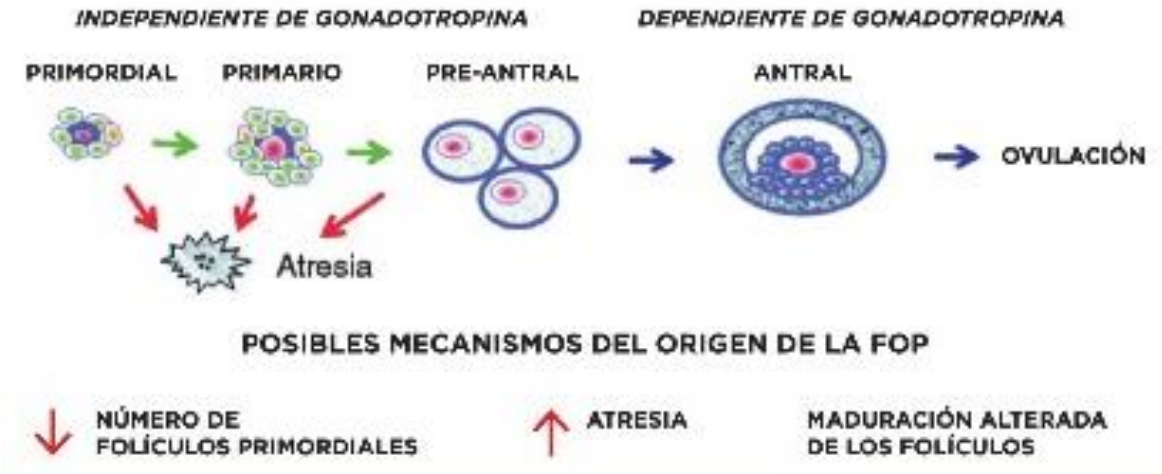
La FOP se caracteriza por amenorrea antes de los 40 años. El diagnóstico se hace después de un período de amenorrea de al menos 6 meses. Para confirmar la anovulación y el hipergonadotropismo se debe realizar la medición sérica de FSH y LH (Vegetti et al., 2000, Nippita y Baber. 2007). Los bajos niveles de inhibina B pueden predecir el agotamiento folicular. La medición de la hormona AMH puede ser útil para

determinar la reserva folicular y la medición de estradiol refleja principalmente la actividad de los ovarios. Las mediciones de estos niveles hormonales deben realizarse al menos dos veces en meses diferentes, ya que pueden fluctuar (Conway, 2000, Rebar, 2009 y Shelling, 2010). El ultrasonido ginecológico es útil para hacer la valoración de los folículos antrales. En pacientes con FOP se evidencian ovarios pequeños sin presencia de folículos en crecimiento.

2.6.4 ETIOLOGÍA DE LA FALLA OVARÍCA PREMATURA

La causa de la FOP es desconocida en la mayoría de los casos. Se ha propuesto que puede darse por un número inicial disminuido de folículos primordiales, por una acelerada atresia folicular o por una alteración en los procesos de maduración de los folículos (**Figura 6**). Estos mecanismos pueden ser activados por múltiples causas: iatrogénicas (quimioterapia o radioterapia), metabólicas, infecciosas, tóxicas y por factores ambientales, autoinmunes, y genéticos (Persani et al. 2010, Woad et al. 2006).

Figura 6. Fases de la foliculogénesis. Posibles mecanismos de FOP (Modificado de Persani et al. 2010).



2.6.5 CAUSAS IATROGÉNICAS

Las causas iatrogénicas incluyen la cirugía pélvico-abdominal y la quimioterapia o radiaciones que generan como reacción secundaria FOP. La quimioterapia puede causar daño citotóxico en los ovarios puesto que la estructura y la función de las células de la granulosa y de los ovocitos se ven afectadas por estos agentes quimioterapéuticos. El efecto gonadotóxico de la quimioterapia dependerá del tipo de droga, de la dosis administrada y de la edad de la paciente. La cirugía pélvica y la embolización de las arterias uterinas pueden atrofiar el ovario al afectar el suministro de sangre y causar inflamación en la zona así como comprometer el suministro vascular (Poirot et al.2002, Howell y Shalet, 1998, Amato y Roberts, 2001).

2.6.6 CAUSAS AUTOINMUNES

Una proporción importante de FOP está asociada con un auto-reconocimiento anormal por el sistema inmune principalmente contra el ovario. Las causas autoinmunes están presentes en el 30% de los casos de FOP. La característica principal es la presencia de anticuerpos anti-ovario que, al parecer, están presentes en la fase inicial de la destrucción folicular (Conway et al. 1996).

Las causas autoinmunes pueden ser:

- **Origen endocrino:** Autoinmunidad en la glándula tiroides en un 14% de los casos, hipoparatiroidismo y diabetes mellitus.

- **Origen no -endocrino:** Candidiasis crónica, púrpura trombocitopenica idiopática, vitíligo, alopecia, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria y hepatitis activa, entre otras.

Clínicamente, la FOP de origen autoinmune se divide en dos grupos:

1. Asociación con la enfermedad de Addison y que corresponde a entre el 2% y el 10 % de los casos de FOP asociados con autoinmunidad suprarrenal.
2. FOP aislada o asociada con otras enfermedades autoinmunes.

El diagnóstico de FOP autoinmune se realiza por medio de una biopsia de ovario. El examen histológico de las biopsias de ovario de pacientes con FOP autoinmune asociadas con autoinmunidad suprarrenal, muestran infiltración de células linfocíticas y plasma alrededor de las células productoras de esteroides de los folículos en desarrollo (Bakalov et al. 2002).

2.6.7 CAUSAS GENÉTICAS

La FOP puede darse por diferentes etiologías, sin embargo, en más del 90% de los casos no se conocen las causas. Una indicación de que la FOP puede tener un componente genético se debe a la presentación de casos familiares, en donde existen múltiples individuos afectados en más de una generación. Sin embargo el porcentaje de casos de FOP familiar es lógicamente bajo por la selección negativa de los potenciales factores genéticos causales (Nippita y Baber. 2007, Davis et al. 2000, Conway et al. 1996).

El análisis de casos familiares, sugiere diferentes modos de herencia, incluyendo formas dominantes y recesivas. Diferentes casos indican que la FOP puede ser una enfermedad genética con expresividad variable. Estudios familiares previos evidencian la heredabilidad en la edad de aparición de la menopausia en madres e hijas. Un estudio en un grupo de pacientes con aparición de menopausia temprana mediante análisis citogenético y pedigrí, mostro un perfil de herencia dominante en lo que respecta la aparición de menopausia temprana. Posteriormente, un estudio realizado en hermanas y en gemelas sugirió que la heredabilidad en la aparición de la menopausia era del 71% al 87% (Conway et al. 1996, Tibiletti et al. 1999, Bruin et al. 2001).

En los últimos años a partir del enfoque gen-candidato, la mayoría basados en modelos murinos de FOP, se han podido identificar variaciones genéticas asociadas con la

patología, permitiendo conocer un poco más acerca de sus mecanismos etiológicos moleculares.

2.6.8 CAUSAS SINDRÓMICAS

2.6.8.1 SÍNDROME TURNER

Cerca del 9% de los casos de FOP están asociados con alteraciones en el cromosoma X. Estos rearreglos cromosómicos comprenden en su mayoría (85%) anomalías numéricas (monosomías y trisomías) y e n menor proporción (15%) defectos estructurales (deleciones, isocromosomas y translocaciones) (Toniolo, 2006). Jiao et al. (2012) analizaron una cohorte de cerca de 500 pacientes con FOP en quienes se evidenció una tasa de anormalidades cromosómicas del 12.1%. El 93.7% de los casos involucró al cromosoma X y el 1.6% restante a cromosomas autosómicos. En estas pacientes el cariotipo predominante fue 45, X que determina el síndrome de Turner. En mujeres con esta alteración numérica del cromosoma X la pérdida de ovocitos se produce en las primeras etapas de la profase meiótica, lo que resulta en una disgenesia gonadal y en amenorrea primaria asociada a niveles elevados de FSH. Estas características son el resultado de la haploinsuficiencia de genes que escapan a la inactivación del cromosoma X necesarios para la correcta función ovárica (Jiao et al, 2012, Reynaud et al. 2004, Zinn y Ross 1998).

Las deleciones del brazo largo del cromosoma X han permitido definir dos regiones críticas (CR) para FOP: CRI en Xq13-Xq21 y CRII en Xq23-Xq27. Esta región está localizada en la región FOP1 dentro de la cual se encuentran potencialmente genes candidato en la etiología molecular de la enfermedad. Algunos de los genes situados en esos loci que están relacionados con la función ovárica son: *DIAPH2*, *XPNPEP2*, *DACH2* y *CHM* (Toniolo, 2006, Laissue et al. 2008, Jiao et al.2012). La introducción de técnicas de citogenética molecular (e.g. FISH) ha permitido aumentar la sensibilidad de detección de mosaicismos 45,X/46,XX y de aberraciones cromosómicas crípticas en las pacientes FOP. Las anormalidades cromosómicas se han reportado con mayor frecuencia en los casos con amenorrea primaria (Lakhal et al.2010).

2.6.8.2 GALACTOSEMIA

La galactosemia es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, causada por la deficiencia de la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT). La incidencia de la galactosemia es de 1:50.000 recién nacidos vivos. Este déficit, al impedir la adecuada oxidación de la galactosa, lleva a un aumento en los niveles de galactosa-1-fosfato de galactitol y al déficit de UDP-Galactosa. La alteración de esta vía metabólica genera el fenotipo de los pacientes caracterizado por daños neurológicos, hepáticos, renales, esqueléticos y gonadales (Baldellou et al. 2000, Holton et al.2001). Los estudios moleculares de pacientes han reportado más de 200 mutaciones en el gen *GALT*. Dos de las mutaciones descritas (p.Gln188Arg y p.Lys285Asn) son la causa del 70% de los casos de galactosemia (Tyfield et al.1999).

Cerca del 70% de las mujeres afectadas por galactosemia desarrollan FOP. La acumulación tóxica de metabolitos de galactosa causa una disminución en el pool de ovocitos debido a apoptosis. La deficiencia de glicoproteínas y glicolípidos alteran la función de la FSH así como de su receptor, ocasionando la reducción de la estimulación ovárica y una mayor atresia folicular. Las pacientes presentan un número bajo de folículos primordiales, un aumento del número de folículos atrésicos, y ausencia completa de folículos pre-antrales y pre-ovulatorios (Tyfield et al.1999, Kaufman et al. 1989, Calderón et al. 2007, Guerrero et al. 2000 y Waggoner et al. 1990).

2.6.8.3 Síndrome *Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (*BPES)

El BPES es una enfermedad de herencia autosómica dominante. Los pacientes afectados por BPES tienen un fenotipo caracterizado por blefarofimosis, ptosis, telecanto y epicanto inverso. Se han descrito dos presentaciones clínicas de BPES. En la tipo I se evidencian alteraciones en los párpados y FOP mientras que en la tipo II el defecto de los párpados ocurre como un signo clínico aislado (Zlotogora et al.1983).

Las mutaciones en el gen *FOXL2* se han encontrado en los dos tipos de BPES. El gen *FOXL2* codifica para un factor de transcripción que es miembro de la familia *forkhead*. Este gen se expresa en el desarrollo de los párpados, del ovario y de la hipófisis. Las mutaciones en *FOXL2* afectan el mantenimiento y la diferenciación del ovario. En el

modelo murino *Foxl2*$^{-/-}$ se evidencian alteraciones craneofaciales típicas de BPES y defectos en el desarrollo folicular temprano (Criponi et al.2000, Uda et al. 2004).

FOXL2 está implicado en la transformación de las células de la granulosa de un epitelio escamoso a cuboidal y en procesos de activación de los ovocitos. En humanos se han descrito cerca de 125 mutaciones causantes de BPES tipo I y II. Se ha descrito que *FOXL2* es también responsable de FOP no-sindrómica lo cual ha sido verificado por el estudio funcional de la mutación p.Gly187Asp en un caso de FOP sin BPES (Laissue et al. 2009). La localización subcelular de FOXL2-p.Gly187Asp en este estudio fue normal pero su capacidad de transactivación de genes blanco fue significativamente menor con respecto a la de FOXL2-WT (Uda et al.2004, Schmidt et al. 2004, Fokstuen et al. 2003, Harris et al. 2002 y Laissue et al. 2009).

2.6.8.4 SÍNDROME DEL X FRAGIL

El síndrome de X Frágil es una enfermedad de herencia dominante ligada al X. El fenotipo de los hombres afectados se caracteriza por cara alargada, frente prominente, mentón pronunciado, orejas grandes y retraso mental. La causa de este síndrome se debe a la expansión del número de repeticiones de trinucleótidos CGG (> 200). En el 30% de las mujeres portadoras de una premutación en el gen *FMR1* (definida por la presencia de 50 a 199 repeticiones) desarrollan FOP. La asociación funcional entre la insuficiencia ovárica y el estado de premutación del gen *FMR1* es la acumulación de la proteína FMR1 que puede tener un efecto tóxico contribuyendo con la atresia folicular progresiva y acelerada (Cronister et al.1991, Wittenberger et al. 2007).

2.6.9 CAUSAS NO SINDRÓMICAS DE FOP

2.6.9.1 PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 15 (BMP15)

BMP15 es un miembro de la súper-familia de factores de crecimiento transformante β (TGFβ). *BMP15* se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.2) y está constituido por dos exones. BMP15 es sintetizada como un péptido inactivo constituido por un péptido de señalización (N-terminal), un pro-dominio y un péptido maduro (C-

terminal). El primer exón codifica para los 17 aminoácidos que conforman el péptido señal y la primera parte de la región del pro-péptido, el segundo exón codifica el resto del pro-péptido y los 125 aminoácidos que conforman el dominio maduro biológicamente activo (Dube et al. 1998).

Las modificaciones post-traduccionales de BMP15 incluyen la eliminación del péptido señal, la dimerización y finalmente el clivaje de la pro-proteína en el sitio dibásico conservado RXXR que separa la pro-región de la región madura bioactiva. La función de la pro-región en BMP15 y GDF9 (un factor parálogo a BMP15) no es conocida pero se ha sugerido que, como en otros miembros de la súper-familia (TGFβ), facilita el correcto plegamiento y la adecuada dimerización de las regiones maduras. La región madura de BMP15 puede formar homodímeros o heterodímeros con la región madura de GDF9 (Wrana et al. 1994, Lin et al.2003).

Funcionalmente, BMP15 actúa principalmente como un factor paracrino sintetizado por los ovocitos para estimular la proliferación de células de la granulosa. BMP15 se expresa en el folículo primordial hasta las fases finales de la foliculogénesis y se mantiene incluso después de la ovulación. El efecto de las mutaciones en este gen y su efecto en la foliculogénesis se ha evidenciado en diferentes especies de mamíferos. Se ha reportado que la función de *BMP15* es más crítica en las especies mono-ovulatorias (ovejas y humanos) que en especies poli-ovulatorias (ratones). Los modelos homo y heterocigotos de ratones KO para *Bmp15* presentan en términos reproductivos un defecto leve mostrando hipofertilidad por disminución de la tasa de ovulación. En contraste, en ovejas, las mutaciones generan dos fenotipos opuestos. Las mutaciones heterocigotas generan un incremento en la tasa de ovulación y del tamaño de las camadas mientras que las mutaciones homocigotas causan infertilidad secundaria a un bloqueo completo de la foliculogénesis (Chang et al.2002, Yan et al. 2001, Galloway et al.2000).

La primera mutación descrita en humanos en *BMP15* (p.Tyr235Lys) fue reportada en dos hermanas italianas que heredaron la mutación de su padre sano (Di Pasquale et al. 2004). En este estudio el análisis funcional del efecto de la mutación demostró una disminución de la proliferación de las células de la granulosa causada por un efecto

dominante negativo. Posteriormente con el objetivo de analizar la implicación de *BMP15* en la patogénesis humana se ha secuenciado el marco abierto de lectura de este gen en más de 1200 pacientes en varias poblaciones a nivel mundial (Di Pasquale *et al.* 2006, Chang et al.2002, Yan et al. 2001, Galloway et al.2000, Laissue *et al*.2006, Rossetti *et al*. 2009, Tiotiu *et al. 2*010 y Wang *et al.* 2010).

2.6.9.2 FACTOR DE CRECIMIENTO DE DIFERENCIACIÓN 9 (GDF9)

El gen *GDF9* se ubica en el cromosoma 5 (5q23.2), se compone de dos exones. Al igual que *BMP15* actúa como factor paracrino del ovocito. *GDF9* se expresa en el ovocito y regula el desarrollo de los folículos primordiales. Los péptidos maduros pueden formar homo o heterodímeros con otros miembros de la familia (TGFβ), en especial con BMP15. En modelos murinos se ha evidenciado que la función de *Gdf9* en la folículogénesis es más relevante en especies poli-ovulatorias. En modelos murinos KO para *Gdf9* $^{-/-}$ se observó que todas las hembras son infértiles. Mutaciones espontáneas de este gen en ovejas Cambridge y Belclare produjeron efectos similares en el ovario a los observados en animales portadores de mutaciones en *BMP15.* En ovejas con mutaciones homocigotas no se produjo ovulación y fueron infértiles mientras que las portadoras de mutaciones heterocigotas mostraron una tasa de ovulación promedio aumentada (Dong et al. 1996, Yan et al. 2001, Hanrahan et al. 2004). Estos hallazgos en modelos animales permitieron sugerir que *GDF9* puede ser un gen candidato implicado en la FOP en humanos. El primer análisis molecular de secuenciación del ORF del gen *GDF9* fue hecho en 15 pacientes japonesas en quienes no se hallaron mutaciones. Posteriormente se han descrito los resultados de un mayor número de pacientes (629 afectadas) en quienes se han encontrado mutaciones con una prevalencia de 1.4% . Todas las pacientes han sido portadoras de mutaciones heterocigotas que afectaron exclusivamente la proregión. Sin embargo a la fecha no hay estudios funcionales concluyentes de las mutaciones detectadas en el gen lo que no permite relacionarlo formalmente con la etiopatología de la enfermedad (Takebayashi et al. 2000, Dixit et al. 2005. Kovanci et al. 2007, Laissue et al. 2006, Zhao et al. 2007).

2.6.9.3 INHIBINAS

Las inhibinas son pequeñas glicoproteínas, que inhiben la síntesis y las secreción de FSH hipofisaria. Se han considerado como genes candidatos de la etiología de la FOP pero no se han validado pero sus variantes no se han validado funcionalmente. Los genes *INHA, INHBA y INHBB* codifican las subunidades inhibina α, inhibina ßA e inhibina Bb respectivamente. La subunidad α se une a la subunidad ßA o βB para inhibir la secreción de FSH hipofisaria. Las inhibinas pueden aumentar el número de folículos ováricos e inhibir la meiosis de los ovocitos. Mutaciones en el gen *INHA* afectan la interacción con las subunidad ßA y βB, generando la disminución de las inhibinas, aumentando las activinas lo que aumenta la concentración de FSH, generando FOP. Esto se ha evidenciado especialmente en ratones KO *Ihha*$^{-/-}$ que presentaron niveles elevados de FSH, infertilidad y tumores a una edad temprana (Hsuesh et al. 1987 y Matzuk et al. 1992).

2.6.9.4 FACTOR ESTEROIDOGÉNICO 1 (NR5A1)

El gen *NR5A1,* se ubica en el cromosoma 9 (9q33), también denominado factor esteroidogénico 1 (*SF1*), codifica para un receptor nuclear expresado en la gónada bipotencial desde el inicio del desarrollo embrionario. Regula la transcripción de genes implicados en el desarrollo sexual, la reproducción y del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Las mutaciones que se han descrito en *NR5A1* pueden ocasionar un fenotipo de trastorno del desarrollo sexual (DSD) con o sin insuficiencia suprarrenal e infertilidad. Las mujeres con mutaciones en *NR5A1* presentan anomalías en los ovarios y disgenesia gonadal con amenorrea primaria o secundaria (Luo et al. 1994, Lin et al. 2007, Lourenco et al.2009).

2.6.9.5 *NOBOX (Newborn ovary homeobox gene)*

El gen *NOBOX* humano, localizado en el cromosoma 7 (7q35), pertenece a un grupo de genes homeobox tejido-específicos. Es un regulador transcripcional específico de ovocitos que se requiere durante las etapas iniciales de la foliculogénesis. La expresión de *Nobox* se ha detectado en la ovogonia a los 15.5 dpc y posteriormente en los ovocitos

durante la foliculogénesis (Suzumori et al. 2002, Huntriss et al. 2006). El modelo murino KO *Nobox*$^{-/-}$ causó en las hembras inferilidad, los ovarios perdieron los folículos rápidamente luego del nacimiento y se afectó la transición de folículos primordiales a primarios. Los machos con ablación de este gen fueron fenotípicamente normales. En los ratones, *Nobox* es esencial para la foliculogénesis y para la regulación de los genes específicos del ovocito (*Mos, Oct4, Rfpl4, Fgf8, Zar1, Dnmt1o, Gdf9, Bmp15*) (Suzumori et al., 2002, Rajkovic et al. 2004).

La expresión de *NOBOX* en tejidos humanos adultos es similar a la del ratón con un predominio de en la gónada. La expresión en el ovario humano es específica de los ovocitos (Huntriss et al. 2006). Qin et al, analizó la región codificante de *NOBOX* en una cohorte de 96 mujeres con FOP encontrando una nueva mutación missense heterocigótica (p.R355H) que no se detectó en 278 controles (Qin et al. 2007). Más recientemente Bouilly et al. Analizó 178 pacientes con FOP, encontrando en 12 de ellas 5 variantes heterocigotas no-sinónimas (p.R303X, p.G91W, p.R117W, p.S342T y p.V350L). Los estudios funcionales evidenciaron que estas mutaciones afectaron la capacidad de transactivación de promotores blanco por parte de NOBOX (Bouilly et al. 2011). Deleciones en el cromosoma 7, que afecten la región que contiene el gen *NOBOX*, han sido asociadas con la presentación de amenorrea primaria, así como una gama de otras características fenotípicas. En 2008 Rossi y colaboradores describieron una deleción de 12 Mb (7q33-q35) en una mujer diagnosticada con autismo, retraso del lenguaje severo y amenorrea primaria. Lo genes más relevantes funcionalmente encontrados en la región delecionada eran *CNTNAP2* y *NOBOX*, asociados con la susceptibilidad al autismo y a FOP respectivamente (Rossi et al. 2008).

2.6.9.6 *FIGLA (factor in the germline alpha*)

En la especie humana *FIGLA* se ubica en el cromosoma 2 (2p13.3) y codifica para un factor de transcripción hélice-loop-hélice básico (bHLH) específico de las células germinales. Tiene como función principal regular la expresión de genes específicos del ovocito especialmente de la zona pelúcida (Anderson et al. 2004, Bayne et al.2004). En humanos y en ratones *FIGLA* es expresado en la gónada embrionaria y forma heterodímeros con el factor de transcripción 3 (*TCF3*) (Liang et al. 1997).

En el modelo murino KO, las hembras *Figla*$^{-/-}$ presentaron infertilidad, no se observó formación de folículos primordiales y se produjo la pérdida de ovocitos luego del nacimiento. El fenotipo de los ovarios de estos ratones sugirió que mutaciones en *FIGLA* podrían contribuir a la aparición de FOP en humanos. (Liang et al. 1997, Dean et al. 2000). Zhao et al. Describieron tres variantes en cuatro mujeres afectadas con FOP: p.Ala4Glu, p.Gly6fsX66 y p.140delAsn. Los ensayos funcionales demostraron que p.140delAsn afecta la unión de FIGLA con el dominio HLH de TCF3 afectando la formación de los heterodímeros activos FIGLA-TCF3 (Zhao et al. 2008).

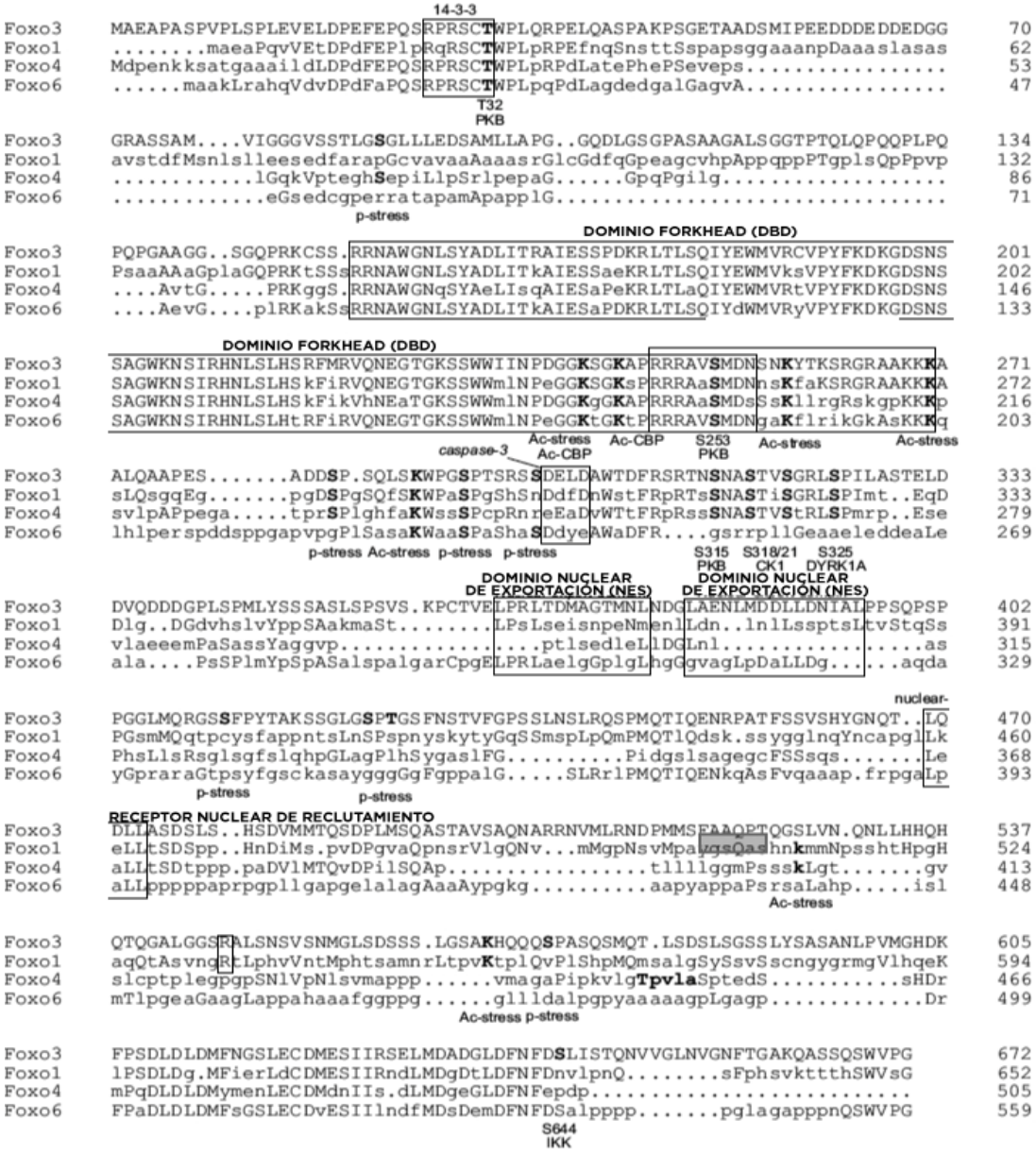
2.7 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN *FORKHEAD*

La familia de factores de transcripción FOX (*forkhead box*), ha sido implicada en numerosos procesos biológicos. Los genes *FOX* son necesarios para el establecimiento del eje corporal, el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación distintos tipos celulares, el adecuado funcionamiento de procesos metabólicos e inmunoreguladores, entre otros (Tuteja et al.2007, Katoh et al.2013). La característica estructural determinante de estas proteínas es una región altamente conservada, el dominio de unión a ADN (*forkhead*) compuesto por 80 a 100 aminoácidos. Esta región forma una estructura hélice-giro-hélice que consiste de tres α-hélices, tres hojas β plegadas y dos regiones en forma de alas que flanquean la tercera hoja β plegada. El dominio *forkhead* (Fkh) es altamente conservado entre diferentes especies y su nomenclatura está basada en una clasificación filogenética que contiene más de 10 especies (FOXA hasta FOXS). Varios miembros de la familia *forkhead* han sido relacionados con la foliculogénesis y con el desarrollo de las gónadas femeninas, como *FOXC1*, *FOXO1*, *FOXO3A*, *FOXO4* y *FOXL2*. Varios miembros de la familia FOX están involucrados en una variedad de procesos durante la embriogénesis y la homeostasis del tejido adulto por lo que mutaciones en algunos de ellos se asocian con una decena de enfermedades humanas, entre ellas diferentes tipos de cáncer.

2.7.1 LA SUBFAMILIA FOXO

Las proteínas FOXO son un subgrupo de la familia de factores de transcripción *forkhead*. El primer miembro de la subclase fue identificado en *Caenorhabditis elegans* y nombrado Daf-16. Después de su identificación se investigaron los homólogos en mamíferos. DAF-16 mostró un alto grado de homología con FOXO4, FOXO1, y FOXO3a regulado negativamente por el receptor de la insulina (DAF-2) y PI3K. (Thomas, 1993, Walker et al. 1988, Brownawell et al. 2001, Brunet et al.1999). En humanos existen 4 miembros de la familia FOXO: FOXO1 (FKHR), FOXO3A (FKHRL1), FOXO4 (AFX) y FOXO6. FOXO1, FOXO3A y FOXO4 tienen una alta similaridad en la secuencia de aminoácidos y en su función (**figura 6**) (Birkenkamp et al.2003). Las proteínas FOXOs se expresan en una amplia variedad de tejidos y la varía dependiendo del estado del desarrollo y del tipo de tejido. FOXO6 se ha encontrado exclusivamente en el tejido cerebral de adulto (Jacobs et al. 2003). Las proteínas FOXO actúan principalmente como activadores transcripcionales a través de la unión con secuencias consenso conservadas evolutivamente. El dominio de unión al ADN de las proteínas FOXO reconoce la secuencia consenso 5´-TTGTTTAC-3´ en los promotores blanco directos. Las funciones de las proteínas FOXOs se relacionan con procesos de diferenciación, arresto del ciclo celular y apoptosis (Huang y Tindall, 2007, Lam et al. 2011). Una serie de modificaciones post-traduccionales son necesarias para la regulación de las proteínas FOXOs que determinan principalmente la estabilidad, la localización subcelular y la capacidad de unión al ADN.

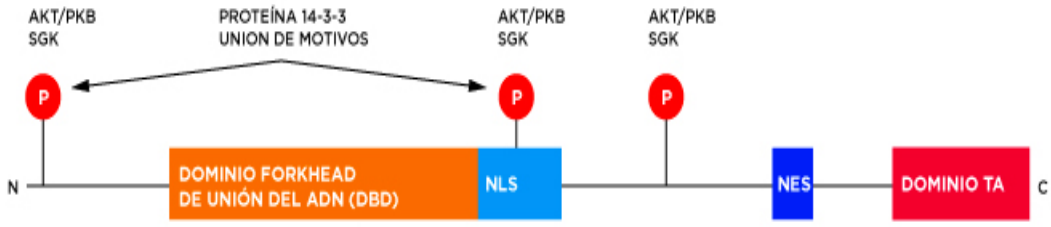
Figura 7. Alineamiento de los miembros de la familia Foxo murinos. (Modificado de Birkenkamp et al. 2003). Regiones conservadas (delimitadas), los sitios de fosforilación conocidos se indican (S y T). Sitios de estrés inducido por acetilación y fosforilación se indican como Ac-estrés y p-estrés respectivamente. Las posiciones de los sitios de fosforilación se numeran de acuerdo a las posiciones en FOXO3.



2.7.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA SUBFAMILIA FOXO

Cada miembro de la familia FOXO tiene cuatro dominios: un dominio de unión al ADN (DBD) muy conservado, un dominio de localización nuclear (NLS), una secuencia nuclear de exportación (NES) y un dominio de transactivación en C-terminal (Obsil and Obsilova, 2008) (**Figura 8**).

Figura 8. Estructura de las proteínas FOXO. (Modificado de Obsil y Obsilova, 2008).



Las Proteínas FOXO1 y FOXO3A contienen aproximadamente 650 aminoácidos, y FOXO4 contiene alrededor de 500 aminoácidos. Análisis de secuencias de las proteínas FOXO muestran altos niveles de similitud. La hélice H3 es muy conservada entre los DBDs de la proteínas FOXO y actúa como el principal sitio de reconocimiento, mientras que otras regiones, como la región C-terminal, la región N-terminal y la región W1 son importantes para la especificidad y la estabilidad de la unión entre en el DBD y el ADN (Obsil y Obsilova, 2008, Tsai et al. 2007). El NES está implicado en la translocación de las proteínas FOXOs desde el núcleo hasta el citoplasma.

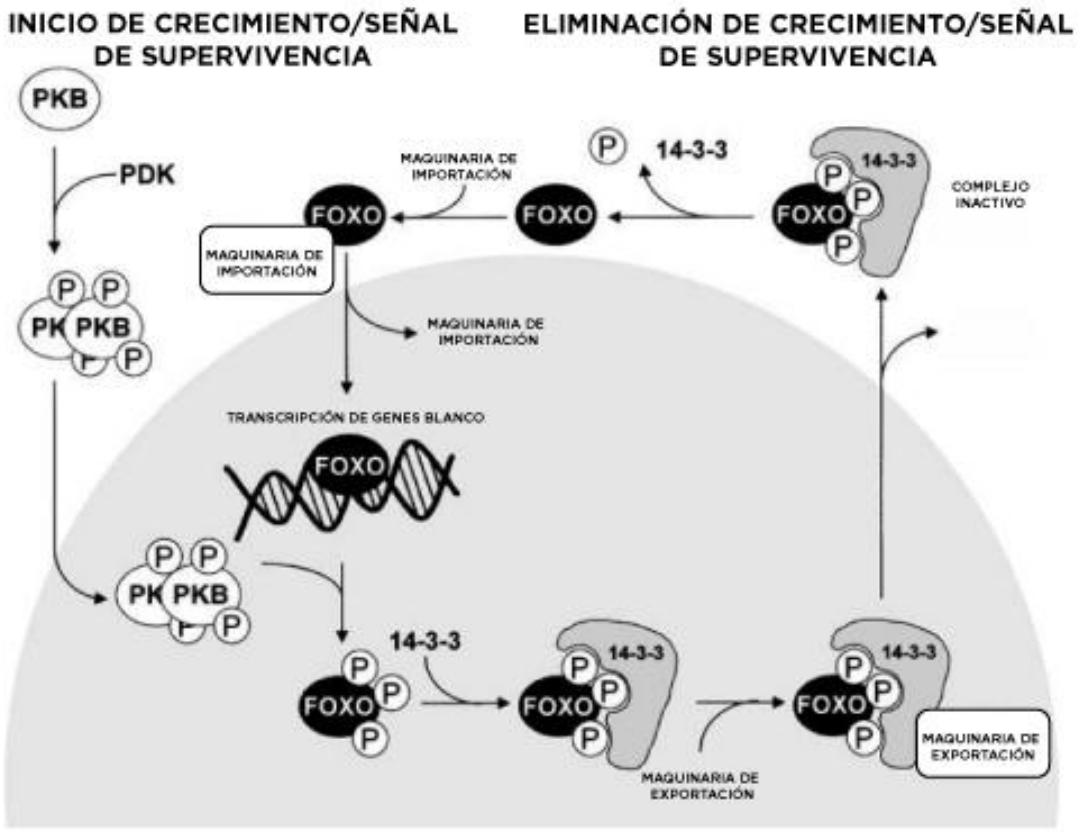
2.7.3 REGULACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN FOXO

La función de las proteínas FOXO depende parcialmente de modificaciones post-traduccionales incluyendo la fosforilación por AKT/PKB, la acetilación y la ubiquitinación. Varios sitios de modificación post-traduccional se encuentran dentro del dominio DBD como se discutirá más adelante.

2.7.3.1 LA FOSFORILACIÓN

La actividad transcripcional de las proteínas FOXO está regulada principalmente por la fosforilación a través de una variedad de vías de señalización. Los principales reguladores de la fosforilación de los FOXOs son las vías de señalización PI3K/AKT e IKK. La fosforilación se produce en tres etapas. La primera modificación se produce dentro del dominio *forkhead* efectuando un cambio conformacional en la proteína. Posteriormente, el residuo N-terminal es fosforilado permitiendo la unión con el complejo denominado 14-3-3. Finalmente, una fosforilación adicional en el extremo N-terminal genera que la proteína sea exportada al citoplasma inhibiendo su actividad de regulador transcripcional (Tran et al.2003). El principal regulador es el sistema PKB (*serine/threonine kinase Akt)* que actúa corriente abajo de la cascada de señalización PI3K (**Figura 8**). PKB permite la fosforilación sobre tres residuos conservados: Thr32, Ser253 y Ser315. Los residuos Thr32 y Ser253 son necesarios para la exportación nuclear y la unión al complejo de proteínas 14-3-3. La fosforilación del residuo Ser315 es necesario para la exportación nuclear. Otros sistemas reguladores implicados en los procesos de fosforilación de FOXO son mediados por las quinasas SGK (*glucocorticoid-regulated-kinase),*DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase) y CK1 (*casein-kinase I).* CK1 reconoce los residuos de serina o treonina de las proteínas fosforiladas. DYRK1A fosforila la Ser325 que se encuentra adyacente a los dos sitios de fosforilación CK1 (Ser318 y Ser321). SGK está regulada a nivel transcripcional y fosforila preferentemente el extremo C-terminal (Rena et al. 2002, Santos et al.1996, Woods et al. 1986, Brunet et al.2001). Los eventos de fosforilación permiten que las proteínas FOXO sean exportadas del núcleo lo que conduce a una inactivación de su función como transactivador o transrepresor de genes blanco. Además de la fosforilación, el proceso de regulación de FOXOs involucra otras modificaciones post-traduccionales como la acetilación y la ubiquitinización (Tran et al. 2003, van der Horst et al.2006).

Figura 9. Fosforilación de proteínas FOXO. (Modificado de Birkenkamp and Coffer, 2003). El mecanismo fundamental por el cual los FoxOs se translocan desde el núcleo hasta el citoplasma es la fosforilación de AKT. Las proteinas 14-3-3 desempeñan una función directa en la exportación nuclear de FOXO.



2.7.3.2 LA ACETILACIÓN

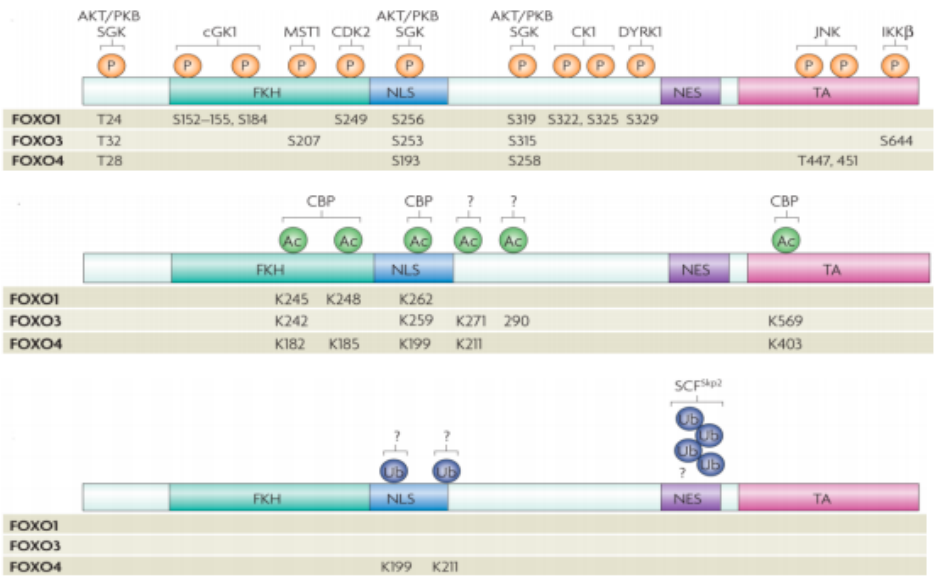
La función de las proteínas FOXOs y su translocación nuclear también está regulada por la acetilación de las histonas. SIRT1 es una de-acetilasa dependiente de NAD. La acetilación de FOXOs por SIRT1 conduce a su translocación nuclear. Por lo tanto, SIRT1 modula la actividad transcripcional de FOXO. La interacción de SIRT1 y FOXO requiere la presencia de la proteína 14-3-3. Varios sitios de acetilación se han descrito en las proteínas FOXO, tres de los cuales están situados en el sitio W2 del dominio (DBD) (Daitoku et al. 2004, Van der Horst et al. 2004).

2.7.3.3 LA UBIQUITINACIÓN

Otra modificación post-traduccional que regula la transcripción de los FOXOs es la ubiquitinación que es regulada por PI3K en los procesos de poli-ubiquitinación y es dependiente de AKT en la degradación del proteosoma (Matsuzaki et al. 2003, Plas y Thompson, 2003).

En las células tratadas con insulina, los niveles de FOXO1 se reducen debido a mono-ubiquitinación a través de la ubiquitina SKP. FOXO3a fosforilado en la Ser644 por IKK conduce su translocación al citoplasma donde se ubiquitina y es degradado. Más recientemente, la MDM2 (una ubiquitina ligasa E3) se demostró que una unión a FOXO1 y FOXO3a promoviendo su ubiquitinación y degradación (Vogt et al.2005,Hu et al.2004, Fu et al.2009). Los sitios de fosforilación, acetilación y ubiquitinación en FOXO1, FOXO3 y FOXO4 se muestran en la figura 10.

Figura 10. Modificaciones post-traduccionales de FOXOS. (Tomado de Van der Horst et al.2007). La fosforilación (P: naranja), la acetilación (Ac: verde) y ubiquitinación (Ub: azul) sitios en factores de transcripción FOXO1, FOXO3a y FOXO4 (barras ocre).



2.7.3.4 LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT

Los FOXOs se encuentran generalmente en una forma activa en el núcleo donde se unen a promotores y modulan la expresión de genes diana. Los cambios en la actividad transcripcional de FOXO son inducidos por su estado de fosforilación en sitios específicos. En particular, los FOXOs constituyen un objetivo importante *downstream* de la vía de señalización PI3K / AKT. La vía PI3K involucra varias moléculas como kinasas, fosfatasas y factores de transcripción que actúan en vías de señalización intracelular fundamentales en la regulación de la proliferación, la sobrevivencia, la migración y el metabolismo. (Cantley, 2002 y Stokoe, 2005). Dentro de los sustratos de AKT se encuentran miembros de la familia FOXO. En los mamíferos, AKT fosforila tres residuos conservados de serina o treonina en *Foxo1*, *Foxo3a y Foxo4* lo que permite que estas moléculas sean exportadas al citoplasma, y por lo tanto se produzca una reducción significativa en su actividad transcripcional (van der Horst y Burgering, 2007). Cada uno de los sitios de fosforilación de AKT tiene una función específica en los FOXOs. Una vez se activa AKT fosforila a los FOXOs generando dos sitios de unión consenso para la proteína chaperona 14-3-3 que al unirse con los FOXOs, ocasiona su liberación. Sin embargo, la unión de FOXOs a la proteína 14-3-3 no es suficiente para su translocación al citoplasma (Obsil y Obsilova, 2008). Los FOXOs, a través de la región NLS, se localizan en el núcleo. Por lo tanto, la fosforilación de AKT en sitios específicos de esta región puede regular la translocación de los FOXOs al citoplasma mediante la interrupción de la función de la región NLS. Varias quinasas incluyendo Akt, PKC y JNK también fosforilan las proteínas 14-3-3. La fosforilación de la proteínas 14-3-3 por JNK es capaz de liberar a los FOXOs de la unión a estas proteínas (Huang y Tindall, 2007, Tran et al. 2003). La vía PI3K constituye una cascada molecular importante en el control del crecimiento del ovocito durante el desarrollo folicular temprano. En la foliculogénesis el crecimiento del ovocito durante la activación folicular involucra cascadas de proliferación y de supervivencia celular. Dentro de ellas se ha determinado que la vía Fosfatidil Inositol 3 Kinasa (PI3K) puede ser activada por vías de señalización mediadas por Kit-KL. Kit puede reclutar a su vez a PI3K desde el citoplasma hacia la membrana celular a través de la unión de la

subunidad p85 de PI3K y de tirosinas fosforiladas de Kit, activando a PI3K (Cantley, 2002, Liu et al. 2007).

2.7.3.5 MIEMBROS DE LA SUBFAMILIA FOXO

2.7.3.5.1 *FOXO3A*

El gen *FOXO3A* humano, localizado en el cromosoma 6 (6q21), codifica para una proteína de 673 aminoácidos que pertenece a la familia de factores de transcripción *forkhead* (subgrupo) FOXO. FOXO3A es un sustrato de AKT y su función está regulada principalmente por la vía PI3K/ PTEN. Se ha demostrado que el ligando kit (KL) conduce a la fosforilación de Foxo3a través de Pi3k en ovocitos de ratón (Reddy et al. 2005). Se ha reportado que la tasa de depleción del pool de folículos primordiales y la duración de la fertilidad es controlada por la fosforilación y la localización de Foxo3a. Cuando la localización es nuclear se previene la activación folicular mientras que la localización citoplasmática tiene el efecto opuesto. En ovocitos que carecen de *Pten*$^{-/-}$, Foxo3a es fosforilada constantemente por la actividad de Akt, manteniéndola en un estado de supresión. Además, los ratones doble mutantes *Pten*$^{-/-}$ y *Foxo3a*$^{-/-}$ no mostraron activación folicular (Reddy et al.2008). John et al. En 2008 demostraron que ratones KO *Pten*$^{-/-}$, tenían un aumento en los niveles de Pip3 y una activación de Akt generando hiperfosforilación y exportación de Foxo3a desde el núcleo al citoplasma (John et al.2008). Las hembras KO *Foxo3*a$^{-/-}$ presentaron FOP, ocasionada por la activación masiva de los folículos primordiales, razón por la cual la reserva de folículos primordiales se agotó dos semanas después del nacimiento. Además, las hembras presentaron una elevación de la FSH y de la LH, y signos de hipogonadismo hipergonadotrópico secundario a FOP (Castrillon et al.2003). Teniendo en cuenta que el fenotipo murino *Foxo3a*$^{-/-}$ es semejante al fenotipo FOP humano este factor de transcripción se ha considerado como un gen candidato de la enfermedad. Se ha observado que en ratones *Foxo3a* se expresa principalmente en los núcleos de los ovocitos primordiales y en los folículos primarios. La expresión constitutiva de *Foxo3a* en los ovocitos conduce a un retardo en el crecimiento, a un retardo en el desarrollo de los folículos primordiales y primarios, a anovulación y a luteinización de los folículos.

La activación de *Foxo3a* en estos ovocitos ocasiona una importante reducción en la expresión de *Bmp15*, indicando que es un regulador transcripcional de *Bmp15* en los ovocitos (Liu et al.2007).

Se han identificado diferentes mutaciones en el gen *FOXO3a* en pacientes con FOP. El primer estudio de mutaciones realizado en pacientes de Nueva Zelanda y Eslovenia reveló dos mutaciones (p.S421L y p.R506H). Un análisis posterior en 50 pacientes francesas reveló sólo un polimorfismo sin impacto deletéreo sobre la función de la proteína (p.Y593S). Hasta la fecha ninguna mutacion ha sido validada por test funcionales (Watkins et al. 2006,Vinci et al.2008).

2.7.3.5.2 *FOXO1*

En la especie humana *FOXO1* se ubica en el cromosoma 13 (13q14.1) y codifica para un factor de transcripción *forkhead* (subgrupo) FOXO. Tiene una importante función en la regulación de la gluconeogénesis, la glucogenolisis, y es fundamental en la adipogénesis. Se regula principalmente a través de mecanismos de fosforilación (Nakae et al.2003, Rena et al. 1999). A partir del cDNA de ovarios de ratón de 23 días de edad se demostró la expresión específica en el ovario de *Foxo1* y *Foxo4*. De manera específica *Foxo1* se localizó en las células de la granulosa de folículos en crecimiento y preovulatorios. Su expresión no es detectable en las células tecales, del cuerpo lúteo y en las células estromales. *Foxo4* por el contrario muestro una alta expresión en las células tecales (Richards et al.2002).

Foxo1 es selectivamente expresado en las células de la granulosa de folículos en crecimiento y está regulado por hormonas. La FSH regula la transcripción de *Foxo1* en las células de la granulosa. La FSH e IGF-1 estimulan la fosforilación de *Foxo1* vía PI3K lo que permite la distribución de Foxo1 del núcleo al citoplasma en las células de la granulosa (Richards et al.2002). El modelo murino $Foxo1^{-/-}$ indicó que los mutantes no son viables (Hosaka et al. 2004).Se ha propuesto que *FOXO1* sea un potencial gen candidato asociado con FOP no- sindrómica. Sin embrago, en un estudio realizado en 90 pacientes afectadas con FOP, a las cuales se les secuencio la región codificante

completa del gen no se encontraron variantes de secuencia (Watkins et al. 2006). Se ha planteado la posibilidad de realizar estos análisis en otras poblaciones (Laissue et al. 2008).

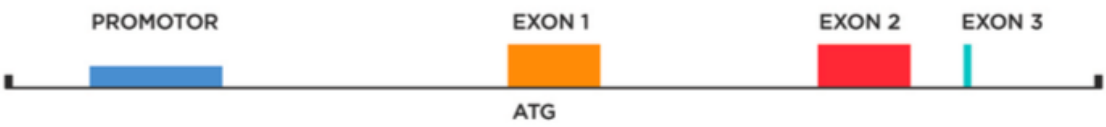
2.7.3.5.3 *FOXO4*

FOXO4 fue descrito por primera vez por Parry et al. En 1994, a partir del clonaje y la secuenciación de la muestra de un paciente con leucemia linfocítica aguda que portaba la translocación t(X;11) (q13;q23). El gen implicado en el cromosoma X *FOXO4* (*AFX1*) indicó un alto grado de homología con la familia de factores de transcripción *forkhead* por lo cual fue incluido como un nuevo miembro de esta familia (Parry et al. 1994).

Borkhardt et al. En 1997 clonaron y caracterizaron el gen *AFX1*, en muestras de pacientes con leucemia aguda. Mediante alineamientos de secuencia, los autores confirmaron que *FOXO4* (*AFX1*) era un miembro de la familia de genes *forkhead* homólogo en su secuencia de nucleótidos con *FKHR* (*FOXO1*) (Borkhardt et al.1997).

FOXO4 está conformado por tres exones de 3301 pares de bases de longitud (Figura 5). Este gen codifica para una proteína de 505 aminoácidos, que se compone de cuatro dominios: un dominio *forkhead* DBD (figura 12) altamente conservado, una señal de localización nuclear (NLS), una secuencia de exportación nuclear (NES) y un dominio de transactivación localizada en C-terminal (Weigelt et al. 2001).

Figura 11. Estructura del gen *FOXO4.*

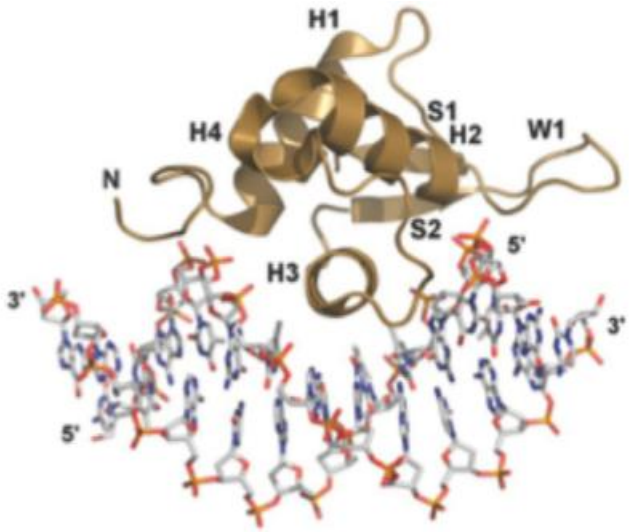


La familia de los factores de transcripción *forkhead* se caracteriza por el motivo de unión de ADN y la subfamilia FOXO (*forkhead box O)* se caracteriza por la homología de secuencia con el dominio *forkhead*. El DBD de FOXO4 es altamente conservado y al

igual que otros miembros de la subfamilia se une a la secuencia consenso 5´-TTGTTTAC- 3´(Pulkki et al. 2012, van der Vos y Coffer, 2011).

El DBD de FOXO4, está constituido por 207 residuos, un dominio C-terminal, el cual tiene una función de regulación, tres hélices (H1, H2 y H3) y una hélice H4 situada entre H2 y H3. La hélice H3 es el elemento principal de reconocimiento del ADN, se acopla en el surco mayor y proporciona todos los contactos específicos para la unión con el ADN. El dominio tiene tres hebras (S1, S2 y S3) y dos bucles (W1 y W2). El bucle W1 junto con el N-terminal hace contactos con los grupos fosfato del ADN (Figura 10). Las regiones H3, W1 y N-terminal del DBD de FOXO4 tienen la mayor variabilidad de secuencia en relación con el resto de dominios de los factores de transcripción *forkhead*, desempeñando posiblemente una funcion en la modulación de la especificidad de unión al ADN. Todas las proteínas FOXO contienen una inserción de cinco aminoácidos (Lys - Gly - Asp -Ser - Asn) entre las hélices H2 y H3 en comparación con otras proteínas FOX. Esto sugiere que esta región participa en la estabilización del complejo mediante una conformación diferente dentro del surco mayor del ADN (Boura et al. 2007, Boura et al. 2010).

Figura 12. Dominio de unión al ADN (DBD) de FOXO4. (Tomado de Boura et al. 2010).



Se han descrito dos isoformas de FOXO4 denominadas AFX α (505 aa) y AFXζ (450aa) Los tres sitios de fosforilación que se han caracterizado en AFX α están conservados en AFXζ y corresponden a Thr32, Ser142 y Ser207. Las dos isoformas tienen capacidades de unión al ADN similares, lo que indica que las diferencias entre las dos secuencias de aminoácidos no altera la estructura del dominio *forkhead*.

AFX α es expresada en Corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas, AFXζ se encuentra sobre-expresada en el hígado, los riñones y el páncreas (Yang et al. 2002).

Los factores de transcripción FOXO4 son regulados por varias modificaciones pos-traduccionales que incluyen la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinización.

En FOXO4 la fosforilación es mediada por PKB/AKT1, inhibiendo la actividad transcripcional y la relocalización del factor de transcripción en el citoplasma. FOXO4 Puede ser fosforilado en múltiples sitios por NLK (Matsuzaki et al.2005).

AKT fosforila a FOXO4 en tres sitios: Thr28, Ser193 y Ser258. Estas fosforilaciones conducen a la inhibición de la actividad de FOXO4 debido a una disminución de la capacidad de unión al ADN y a la relocalización del factor de transcripción en el citoplasma por la acción de la proteína 14-3-3 (Kops et al.1999, Silhan et al. 2009).
La función de las proteínas 14-3-3 en la regulación de los factores FOXO se realiza a través de la inhibición de su interacción con el ADN blanco y bloqueando el NLS. la Las proteínas 14-3-3 interactúan físicamente con las proteínas FOXO4 fosforiladas produciendo el bloqueo de la unión al ADN (Obsilová et al. 2008, Silhan et al.2009). En el citoplasma FOXO4 puede ser poli-ubiquitinizado por SKP2 lo que induce a su degradación proteolítica mediante el sistema ubiquitina-proteasoma (Calnan y Brunet, 2008).

El estrés oxidativo que induce altos niveles celulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), activan la acción de la kinasa JNK que fosforila a FOXO4 en los residuos

Thr447 y Thr451 generando la translocación de este al núcleo y activando su capacidad de unión al ADN (Essers et al. 2004).

La acetilación en FOXO4 es mediada por la vía CREBBP/CBP, la cual es inducida por estrés celular, actúa inhibiendo la actividad transcripcional de FOXO4. La desacetilación se da por acción de SIRT1 el cual es dependiente de NAD y actúa estimulando la actividad transcripcional (van der Horst A et al.2004).

La mono-ubiquitinización de FOXO4 es inducida por el estrés oxidativo, conduce a la localización nuclear de FOXO4 y su activación en la regulación de la actividad transcripcional. La de-ubiquinización ocurre por la acción de la enzima USP7/HAUSP que ejerce una regulación negativa sobre la actividad de FOXO4, translocandolo al citoplasma e inhibiendo su actividad transcripcional (van der Horst A et al.2006).

Los factores FOXO tienen funciones esenciales en una variedad de procesos celulares que incluyen proliferación, apoptosis, autofagia, metabolismo, inflamación y resistencia a estrés (van der Vos y Coffer, 2011).

La regulación del ciclo celular es una de las principales funciones de los factores FOXOs. Estos factores se encargan de modular la transición de la fase G1 a la fase S y de la G2 a M mediante la regulación de la expresión de múltiples genes que actúan como reguladores esenciales del ciclo celular (Ho et al. 2008).

Medema et al. En el 2000 demostraron que la sobreexpresión de FOXO4 provoco la supresión del crecimiento en las líneas celulares A14, U20S y Jurkat. FOXO4 mutante tenía una alteración en los sitios de fosforilación y produjo un efecto de inducción de arresto celular en la fase G1 en las tres líneas celulares analizadas. Este efecto fue dependiente de la expresión del inhibidor del ciclo celular p27. FOXO4 activa transcripcionalmente a p27. FOXO4 es esencial en la regulación de la proliferación celular, el gen *p27* es un blanco de FOXO4 y el arresto en G1 inducido por la acción de FOXO4 mutante es un paso que precede a la apoptosis (Medema et al.2000).

Pisarka et al. En 2009 identificaron la expresión de *FOXO1, FOXO3* y *FOXO4* en las células MGCs *(human luteinized mural granulosa cells)* lo que sugiere que estos factores de transcripción pueden estar involucrados en regulación de procesos de foliculogenésis (Pisarska et al.2009).

Richards et al. En 2002 identificaron mediante RT-PCR transcritos de *Foxo4* en muestras de RNA total de ovarios de ratones de 23 días de edad. Mediante análisis de *hibridación in situ* los autores identificaron una alta expresión que *Foxo4* en las células tecales y las células de la granulosa del cuerpo lúteo. Los ratones KO *Foxo4*$^{-/-}$ mostraron incremento en la expresión de *Sgk* que llevo a una diferenciación de las células de la granulosa en células luteales que no se dividían. *Foxo4* puede ser blanco de *Sgk* en las células luteales (Richards et al.2002).

Modelos animales en *FOXO4*, han demostrado una asociación de este con procesos de envejecimiento y respuesta a estrés oxidativo.

Hosaka et al. En 2004 identificaron que el fenotipo en *Caenorhabditis elegans* para *daf16* $^{-/-}$ cuyos genes homólogos en humanos incluyen *FOXO1*, *FOXO3* y *FOXO4*, se hace más evidente en condiciones no fisiológicas. La reducción de la actividad de *daf16* acelera el envejecimiento de tejidos y acorta la vida útil y su sobreexpresión extiende la vida útil, concluyendo que este gen contribuye a la activación de genes, que promueven la longevidad (Hosaka et al. 2004, Hsu et al. 2003).

Furuyama et al. En 2002 midieron los niveles de expresión de *Foxo3* y *Foxo4*, en el músculos de ratas, evidenciando que la expresión de estos dos genes se da en función de la edad, alcanzando un máximo de expresión a los 6 y 12 meses, respectivamente, con estos hallazgos se plantea la posibilidad de que la regulación de los niveles de FOXO pueden afectar la longevidad en los mamíferos (Furuyama et al.2002).

Tothova y Gilliland, en 2007 reportaron que los ratones *Foxo1/3/4*$^{-/-}$ presentaron un incremento en el número de progenitores mieloides en la sangre periférica y una reducción en el número de células madre hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea. El

análisis de HSC en los animales deficientes para los tres genes *Foxo* indicó un incremento en los niveles de ROS y de la apoptosis. Este hallazgo demostró la importancia de la acción de Foxos en la respuesta a estrés oxidativo y a la supervivencia del sistema hematopoyético (Tothova y Gilliland, 2007).

Estos modelos animales muestran una asociación de los factores FOXO con procesos de envejecimiento, y plantea la posibilidad de un papel crucial del gen *FOXO4* en la regulación de procesos de detoxificación de ROS. Variaciones en la secuencia de *FOXO4* puede alterar su actividad sobre la regulación de genes blanco esenciales para el ovario, conllevar a un envejecimiento prematuro del ovario y ocasionar FOP.

3. HIPOTESIS

1. Los factores de transcripción *forkhead* juegan un papel importante en procesos de longevidad y envejecimiento, estudios en el gen *FOXO4* a partir de modelos animales, se ha relacionado con procesos de envejecimiento.
¿Las variaciones en la secuencia de *FOXO4* podrían estar relacionadas con un proceso de envejecimiento ovárico prematuro y ser la causa de FOP?

2. Se ha demostrado la expresión de *FOXO4* en células de la granulosa en humanos *y en* ratones inmaduros.
¿Las variaciones de secuencia en la región codificante del gen *FOXO4* son una causa de la generación de la FOP?

4. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

4.1 OBJETIVO GENERAL

Análisis del gen *FOXO4* en pacientes con FOP no-sindrónica e idiopática a partir de la secuenciación completa de este en muestras de ADN de pacientes de Túnez, con el fin de establecer si este gen está involucrado como causa común de la FOP.

.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Establecer si las variantes de secuencia en el gen *FOXO4* son una causa común de FOP.

- Establecer las frecuencias de las variantes de secuencia encontradas en el gen *FOXO4* en mujeres con FOP, al igual que en el grupo control.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de pacientes para el análisis del gen *FOXO4* correspondió a 116 mujeres de Túnez con diagnóstico de FOP idiopática. El grupo control estuvo conformado por 143 mujeres procedentes de Túnez sin evidencia clínica de FOP.

5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

5.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN GRUPO DE CASOS (FOP):

Mujeres menores de 40 años con amenorrea primaria o secundaria mayor a 6 meses, cariotipo normal 46, XX y niveles séricos de FSH mayores de 40 UI/ml.

5.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA EL GRUPO DE CONTROLES

Mujeres mayores de 50 años, con menopausia luego de los 48 años, con al menos un hijo nacido vivo y sin antecedentes de disfunciones reproductivas.

5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Presentar antecedentes clínicos de cirugía en la cavidad pélvica, enfermedad autoinmune, tratamiento previo de cáncer (quimio o radioterapia), cariotipo anormal o hipotiroidismo.

5.4 COMITÉ DE ÉTICA

El estudio fue aprobado por el comité de ética de cada institución participante (Universidad del Rosario en Bogotá, Colombia y el Hospital Farhat Hached University

Teaching en Sousse, Túnez).

5.5 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN genómico de los pacientes y los controles se obtuvo de muestras de sangre total por la técnica de extracción salting out. En un tubo falcón de 15 ml, se midieron 6.0 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y sobre este se adicionaron 5 ml de sangre total. Luego de centrifugación, se descartó el sobrenadante y conservó el *pellet*. Se agregaron 2.5 ml de una solución de lisis celular y se adicionaron 10 µl de proteinasa K (10mg/ml). Se incubó por cuatro 4 horas a 55ºC. Transcurrido este tiempo se añadió a cada tubo 800 µl de solución precipitante de proteínas para luego centrifugar. Finalmente, todo el sobrenadante fue vertido sobre un tubo de 15 ml que contenía 2.4 ml de isopropanol frío. Se dejó en reposo 5 minutos. Utilizando una pipeta pasteur de vidrio se extrajo el ADN y fue suspendido en 300µl de TE 1X. Todas las muestras de ADN fueron cuantificadas mediante espectrofotometría usando nanodrop 2000c (ThermoScientific). La integridad del ADN se verifico mediante electroforesis en agarosa, usando geles al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio.

5.6 DISEÑO DE PRIMERS

El diseño de primers para amplificar los tres exones del gen *FOXO4* se realizó de acuerdo a la secuencia *wild type* (NM_005938.3). Se diseñaron dos pares de primers para cada fragmento genómico. Los primers de PCR se diseñaron fuera de la región codificante para poder secuenciar todo el marco abierto de lectura del gen, para la secuenciación se diseñó un primer interno de secuenciación para cada fragmento, los primers se verificaron por medio de BLASTN para asegurar que no fueran complementarios a otras secuencias del genoma (Tabla 3).

Tabla 1. Primers *FOXO4.*

NOMBRE DEL PRIMER	SECUENCIA DEL PRIMER	LOCALIZACIÓN	TAMAÑO AMPLICON
hFOX4Ex1-1AF hFOX4Ex1-1AR	5'- GAAGGGACAGCTTAGGGACTAGC-3´ 5'- AAGCACCGAGTGTGGCATATACT-3´	exón1 (amplificación)	836 pb
hFOX4Ex1-Seq1F hFOX4Ex1-Seq2F	5'-GGCCCTCGATGCTTCCCCCCTGAG-3´ 5'-GCCCTCTCGGCTCCCAGAGCCGG-3´	exón1 (secuencia)	
hFOX4Ex2-1AR hFOX4Ex2-Seq1F	5'-GCTCTGGCTACCACTTGTCCTAA-3´ 5'-CATCAGGGTCCAGCATCCTCTTAG-3	Exón 2 (amplificación)	1264 pb
hFOX4Ex2-Seq3F hFOX4Ex2-Seq3R hFOX4Ex2-1AR	5'- CATTCTGTCCCAGGCTCCGACTC -3´ 5'- GGGGTGTGAGCACAGGAGTCCC-3´ 5'-GCTCTGGCTACCACTTGTCCTAA-3´	exón 2 (secuencia)	
hFOX4Ex3-1AF hFOX4Ex3-1AR	5'-CCTGCAAGGTAGCACAGAAAAG-3´ 5'-CAGACCCCACCCTAGCTCTAAA-3´	Exón 3 (amplificación)	270 pb
hFOX4Ex3-Seq1F	5'-GTATGTGTATGGAAGCGGGTTAG-3´	exón 3 (secuencia)	

5.7 AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La región codificante completa del gen *FOXO4*, fue amplificada por PCR, de acuerdo a los primers mencionados en la tabla 3. La reacción de PCR se realizó con GoTaq Green Master Mix (Promega) con un volumen final de 25 µl con una concentración de ADN de 100ng. Se utilizó 1mM de cada uno de los primers y agua hasta completar 25 µl. Para los blancos de amplificación se utilizó una reacción de PCR con GoTaq Green Master Mix (Promega) con un volumen final de 25 µl, con 1 µl de agua. Se utilizó 0.8 µM de cada primer y agua hasta completar 25µl, se realizó un blanco por cada exón. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100 con un programa específico para cada exón del gen *FOXO4* (Tabla 4).

Tabla 2. Programa de PCR *FOXO4*.

	Exón 1		Exón 2		Exón 3	
Paso	**Tiempo**	**Temperatura**	**Tiempo**	**Temperatura**	**Tiempo**	Temperatura
Desnaturalización inicial	10 Minutos	95 °C	10 Minutos	95 °C	10 Minutos	95 °C
Desnaturalización	40 Segundos	95 °C	40 Segundos	95 °C	40 Segundos	95 °C
Anillaje	30 Segundos	64 °C	40 Segundos	57 °C	40 Segundos	63 °C
Extensión	40 Segundos	72 °C	1.15 Minutos	72 °C	40 Segundos	72 °C
Extensión Final	10 Minutos	72 °C	10 Minutos	72 °C	10 Minutos	72 °C
Numero de ciclos	35		35		35	

5.8 DETECCIÓN AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Para la detección de los productos amplificados se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1%, se verificaron los tamaños de los productos amplificados con un patrón de peso molecular de 50 pb (Invitrogen), y se evidenciaron los blancos de amplificación para cada exón del gen.

5.9 SECUENCIACIÓN DIRECTA

Los amplicones fueron purificados por medio de fosfatasa alcalina y exonucleasa I y secuenciados directamente en la totalidad de su longitud con primers de secuenciación (tabla 3). Aquellas secuencias que no cumplían con los estándares de calidad fueron amplificadas y secuenciadas nuevamente.

5.10 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Las secuencias de los pacientes y controles fueron comparadas con las secuencias *wild type* de *FOXO4* (NM_005938.3) por medio del programa *ClustalW* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

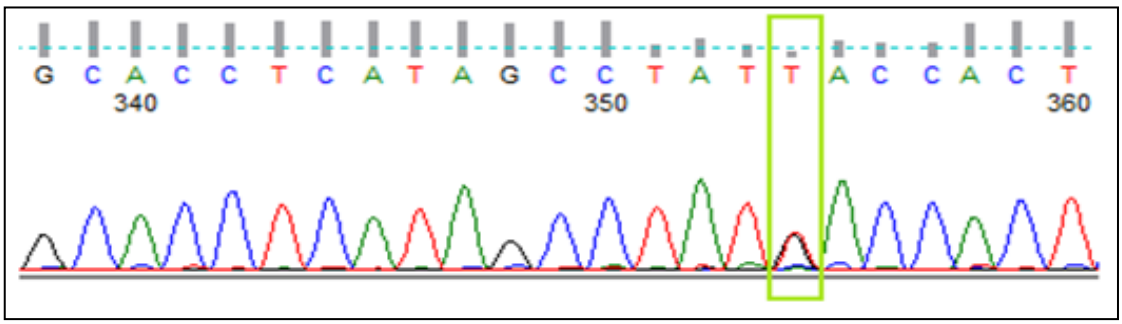
Las variantes de secuencia halladas en casos y controles fueron filtradas en dbSNP para corroborar si habían sido previamente descritas.

Las secuencias fueron analizadas en el software *Human Splicing Finder* (www.umd.be/HSF/), con el fin de predecir in silico potenciales alteraciones de splicing .

6. RESULTADOS

En la secuenciación de la región codificante de *FOXO4* no se identificarón variantes de secuencia. Sin embargo, dado que el diseño de los primers involucraba las uniones intrón-exón se identificó la variante IVS2+41T>G (rs5980742), localizada en el intrón 2 (Figura 11).

Figura 12. Cromatograma de la variante (IVS2 + 41T > G) en estado heterocigoto.



La frecuencia alélica entre casos y controles no indicó una diferencia significativa (Tabla 5).

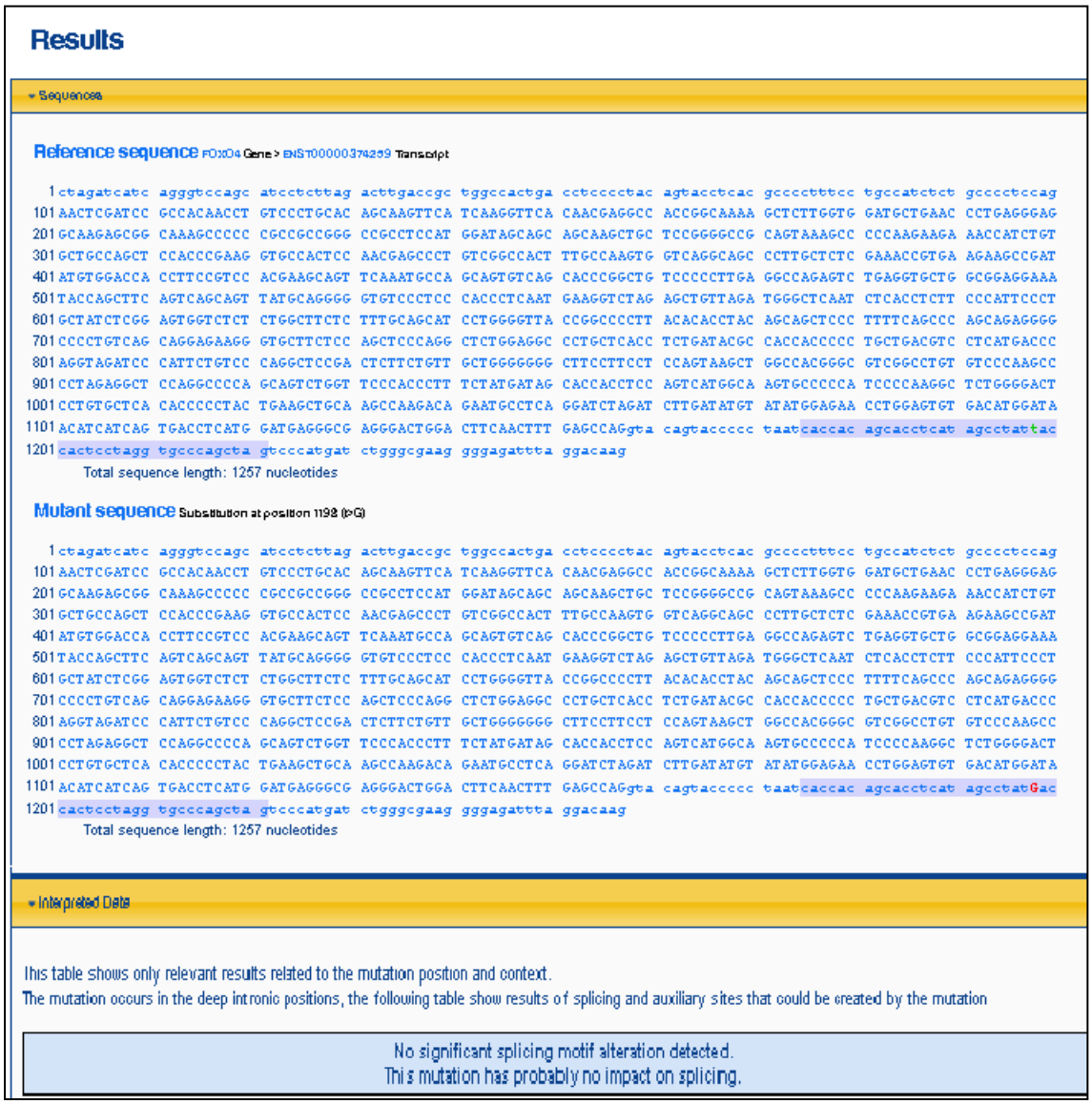
Tabla 3. Análisis de secuencia del gen FOXO4: Frecuencias alélicas de la variante IVS2+41T>G (rs5980742).

Variante de secuencia	**Frecuencias alélicas**			
	Pacientes FOP (n = 116)		Controles (n = 143)	
	G	**T**	**G**	**T**
IVS2+41T>G	0.65 (151 alelos)	0.35 (81 alelos)	0.65 (185 alelos)	0.35 (101 alelos)

La variante intrónica (IVS2+41T>G), ha sido reportada previamente en las bases de datos públicas de SNPs (rs5980742).

Los análisis in silico de esta variante no revelaron alteraciones de splicing (Figura 12). No se identificaron variantes de secuencia adicionales en casos y controles.

Figura 13. Resultado predicción in silico IVS2+41T>G (Human Splicing Finder).



Los presentes resultados se encuentran publicados en:

Fonseca DJ, Garzón E, LakhalB, Braham R, Ojeda D, Elhgezal H, Saad A, Restrepo CM and Laissue P. Screening for mutations of the *FOXO4* gene in premature ovarian failure patients.Reproductive Biomedicine Online. 2012. 24: 339-341**(Anexo1).**

6.1 DISCUSION

La FOP es una patología frecuente que conduce a infertilidad. Se estima que entre el 1% y el 3% de las mujeres sufren de esta enfermedad (Coulam et al. 1986, Conway et al. 2000). La alta incidencia de casos idiopáticos (60%), sugieren como causa factores genéticos. En los últimos años se han descrito nuevos genes candidatos del fenotipo de la FOP, entre estos miembros de la familia de factores de transcripción *forkhead* subfamilia FOXO. Estos factores de transcripción promueven una variedad de respuestas celulares, incluyendo la detención del ciclo celular, la resistencia al estrés oxidativo, apoptosis, mediante la modulación de una serie de genes blanco específicos.

Modelos animales en FOXO4, han permitido dilucidar su función durante los procesos de longevidad o envejecimiento, a través de la regulación de ROS. La regulación entre FOXO, SIRT1, y p53, están implicados en longevidad y envejecimiento, se ha demostrado que p53 acelera el envejecimiento, inhibiendo la actividad de los factores FOXO y la expresión de SIRT1. p53 inhibe la función de los factores FOXO mediante la inducción de la proteína quinasa SGK, lo que resulta en la fosforilación de FOXO y en la relocalización de FOXO desde el núcleo hasta el citoplasma (You *et al.* 2004). Ratones con mutaciones en el gen p53 muestran una reducción de la vida útil en un 19% y presentan signos de envejecimiento prematuro (Tyner *et al.*2002). Mutaciones en el gen *FOXO4* podrían generar inhibición en su función y regulación con genes blanco ocasionando envejecimiento prematuro.

El presente trabajo es el primer estudio de mutaciones del gen *FOXO4* en mujeres afectadas por FOP. La expresión de este gen en células de la granulosa en ratones y humanos, así como su papel en la vía molecular PI3K / Akt / CDKN1B, sugiere un papel funcional durante la fisiología ovárica (Pisarska et al. 2009, Rajareddy et al. 2007, Richards et al. 2002 y Tran et al. 2003).

El grupo de investigación Geniuros reportó una variante en la secuencia de *CDKN1B* posiblemente asociada a FOP idiopática (Ojeda et al., 2011). Este contexto permitió plantear que las variaciones en la secuencia de *FOXO4* pueden alterar su actividad sobre la regulación de genes blanco esenciales para el ovario, la regulación de procesos de

detoxificación de ROS o el envejecimeinto prematura del ovario, eventos relacionados al desarrollo de FOP.

Teniendo en cuenta los blancos directos de *FOXO4*, su expresión en ovario y relación directa con procesos de envejecimiento se propone a este gen como un posible causal de FOP. Sin embargo, la variante intrónica encontrada en la población de estudio (IVS2 + 41T> G) no está relacionada con la etiología de la enfermedad, fue identificada en el grupo de pacientes con FOP y el grupo control. La frecuencia alélica para la variante IVS2 + 41T>G en la población de Túnez para el alelo G (alelo polimórfico) es del 65 % y para el alelo T (alelo wild type) es del 35% en casos y controles , la frecuencia alélica del alelo wild type es menor que la del alelo polimórfico al igual que en otras poblaciones africanas en donde la frecuencia del alelo G (polimórfico) es mayor entre un 68% a 97% con respecto a las frecuencias del alelo T (Wild type), en las poblaciones asiáticas y europeas la frecuencia del alelo T (Wild type) es mayor entre un 57% a 72% con respecto al alelo G (polimórfico). Las diferencias en las frecuencias alélicas para esta variante confirman que la composición étnica debe ser considerada al momento de evaluar la presencia de polimorfismos en una población.

A partir del programa *Human splicing Finder*, el cual permite realizar la predicción de nuevos sitios de splicing, identificando enhancer de empalme exónico (ESE) y silenciadores de empalme exónico (ESE), se realizo el análisis en silico de la variante IVS2 + 41T>G, encontrando que no se genera ninguna alteración significativa que pueda afectar el splicing, por lo cual no sugiere un posible efecto patogénico.

Se han propuesto una cantidad significativa de genes candidato para la etiología de la FOP. Sin embargo con las nuevas técnicas de secuenciación de siguiente generación o NGS (Next Generation Sequencing) han permitido la identificación de variaciones en la secuencia de genes responsables de patologías monogénicas, y la búsqueda de múltiples variaciones del genoma asociadas a patologías complejas.

6.2 CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos se concluyo que mutaciones en la región codificante del gen *FOXO4* no son una causa común de FOP en mujeres de origen tunecino. Sin embargo, este estudio no descarta el hallazgo de variantes potencialmente patogénicas o en la región promotora en otros grupos étnicos en mujeres con FOP.

6.3 PERSPECTIVAS

El grupo de investigación Geniuros, está en la constante identificación de nuevas mutaciones y genes causales de FOP, con la ayuda de técnicas de secuenciación a gran escala y la validación de estas por estudios funcionales con el fin de dilucidar las vías moleculares implicadas en la FOP.

Con respecto al gen *FOXO4*, es importante analizar posibles mutaciones a nivel del promotor en la población tunecina, y en otras poblaciones, para determinar un efecto deletéreo en esta región del gen que pueda estar asociada con la etiología de la FOP, así mismo realizar la búsqueda de mutaciones de este gen en otros grupos étnicos, y determinar nuevos genes blancos de *FOXO4* implicados en la folículogénesis.

7. **Anexo**

Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients

Dora Janeth Fonseca a,b, Eliana Garzo´n a, Besma Lakhal c, Rim Braham d, Diego Ojeda a, Hatem Elghezal c, Ali Saaˆd c, Carlos Martı´n Restrepo a,b, Paul Laissue

[a] 2011, Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved

Reproductive BioMedicine Online (2012) 24, 339–341

www.sciencedirect.com
www.rbmonline.com

SHORT COMMUNICATION

Screening for mutations of the *FOXO4* gene in premature ovarian failure patients

Dora Janeth Fonseca [a,b], Eliana Garzón [a], Besma Lakhal [c], Rim Braham [d], Diego Ojeda [a], Hatem Elghezal [c], Ali Saâd [c], Carlos Martín Restrepo [a,b], Paul Laissue [a,b,*]

[a] *Unidad de Genética, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Carrera 24 N° 63C-69, Bogotá, Colombia;* [b] *Genética Molecular de Colombia, Departamento de Fertilidad Humana, Bogotá, Colombia;* [c] *Department of Cytogenetics and Reproductive Biology, Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia;* [d] *Department of Endocrinology, Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia*

[*] Corresponding author. *E-mail address:* paul.laissue@urosario.edu.co (P Laissue).

Professor Paul Laissue attained the Medical Doctor title at the Universidad del Rosario (Bogotá, Colombia). Then, he obtained a Master degree on Human Genetics (Paris 7 University), a Master degree on Physiopathology of Reproduction (Paris 5 University) and a PhD on Human Genetics (Paris 7 University). At present he is the scientific director of the Genetics Unit of the Universidad del Rosario in Bogotá. The aim of his scientific work is related to understand the molecular basis of human infertility and other complex diseases.

Abstract *FOXO4* constitutes a coherent candidate gene associated with premature ovarian failure (POF) pathogenesis. This study sequenced the coding and exon-flanking regions of this gene in a panel of 116 POF patients and 143 controls of Tunisian origin. In both groups, the IVS2 + 41T > G sequence variant was identified. It is concluded that coding mutations of *FOXO4* should not be a common cause of the disease in women from the Tunisian population. However, this study cannot exclude that *FOXO4* dysfunctions, originated from open reading frame or promoter sequence variations, might be associated with the pathogenesis of the disease in other ethnical groups.

© 2011, Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS: female infertility, FOXO4, premature ovarian failure

Introduction

Premature ovarian failure (POF) is a frequent pathology which affects 1% of women. Clinically, POF is defined as at least 6 months of amenorrhoea occurring under 40 years old associated with elevated plasma concentrations of FSH (>40 IU/l). Up to now, several aetiologies have been related with POF pathogenesis such as infectious agents, autoimmune conditions and iatrogenic injuries. However, in the majority of cases, POF is considered as idiopathic, indicating a potential involvement of genetic factors. Chromosomal abnormalities (e.g. Turner's syndrome), as well as

1472-6483/$ - see front matter © 2011, Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.rbmo.2011.11.017

mutations in autosomal and X-linked genes, have been identified as causative of the phenotype. In recent years, the study of genes that encode proteins which belong to the forkhead (fkh) family of transcription factors has demonstrated its crucial role in several mice and human physiological processes, including gonadal development and fertility (Benayoun et al., 2011). Fkh factors share a highly conserved ~100 amino acid region, the forkhead domain, responsible of the identification and binding to specific DNA sequences located on the promoter regions of target genes. In the ovarian context, *FOXL2*, *FOXE1*, and members of the *FOXO* subfamily have been implicated in normal and pathological conditions. Mutations in *FOXL2* have been related to the aetiology of an autosomal dominant disease: the blepharophimosis, ptosis, epicantus-invesrus syndrome (BPES; De Baere et al., 2009). BPES is characterized by eyelid abnormalities associated (BPES type I) or not (BPES type II) with POF. In addition, *FOXL2* mutations have been reported in non-syndromic POF cases (Harris et al., 2002). These findings are consistent with those observed in $Foxl2^{-/-}$ mice models, in which morphological granulosa cell impairment and premature massive follicle atresia were observed (Schmidt et al., 2004; Uda et al., 2004). Some evidences pinpoint *FOXE1* as a potential genetic factor related to POF origin, since length variation of its polyalanine tract seems to predispose to the disease (Watkins et al., 2006a). Additional studies suggest that a subset of ROS (reactive oxygen species) genes is regulated by members of the *FOXO* subfamily (Tothova and Gilliland, 2007). It has been proposed that these molecules may have a regulatory role during oocyte maturation and folliculogenesis (Agarwal et al., 2005). Among members of the *FOXO* subfamily, *FOXO3A* and *FOXO1* have been particularly well studied in mammalian reproduction, since they have been related to ovulation and oocyte maturation in mice and humans. $Foxo3a^{-/-}$ female mice showed massive follicular activation leading to premature depletion of follicles and infertility (Castrillon et al., 2003). *FOXO3A and FOXO1* screening for mutations led to the identification of sequence variants potentially related to POF aetiology (Wang et al., 2010; Watkins et al., 2006b).

Concerning *FOXO4*, it has been shown that it is expressed in the granulosa cells of the immature mice, as well as in human luteinized mural granulosa cells (Pisarska et al., 2009; Richards et al., 2002). At molecular level, conserved Foxo4 serine/threonine residues are directly phosphorylated by the PI3K/Akt pathway, which leads to its release from DNA and its retention within the cytoplasm (Tran et al., 2003). In this environment, Foxo4 transcriptional effects are silenced, suppressing the expression of target genes such as *Cdkn1b* (also known as *p27*), a negative regulator of the cell cycle. Interestingly, the expressional maintenance of *Cdkn1b* in a mouse model, constitutively expressing *Foxo3a* in oocytes, is related to infertility due to a follicular growth delay (Liu et al., 2007). Conversely, $p27^{-/-}$ animals show a premature follicular stock overactivation leading to ovarian dysfunction (Rajareddy et al., 2007). Recently, Ojeda et al. (2011) identified the first *CDKN1B* sequence variation, which could explain some cases of idiopathic POF. In this context, *FOXO4* sequence variations could alter its transcriptional activity on key target ovarian genes, conducing to premature ageing of the ovary and POF.

Materials and methods

In order to establish whether *FOXO4* sequence variants are a common cause of idiopathic POF, this study analysed its complete open reading frame in a panel of 116 POF patients who attended the Farhat Hached University Teaching Hospital, (Sousse, Tunisia). Inclusion criteria were primary or secondary amenorrhoea occurring before the age of 40, normal 46,XX karyotype and elevated plasma concentrations of FSH (>40 IU/l). Patients presenting clinical antecedents of pelvic surgery, autoimmune diseases and anticancer treatments were excluded. The control group population was composed of 143 women over 50 years old, having at least one child and lacking antecedents of reproductive dysfunctions. These individuals were of Tunisian origin and displayed regular menstrual cycles ranging from 28 to 32 days. The study was approved by the local Review Board of each participant institution (El Rosario University at Bogotá, Colombia and the Farhat Hached University Teaching Hospital at Sousse, Tunisia). Genomic DNA from patients and controls was obtained from whole blood samples using the standard phenol/chloroform procedure. The complete coding region of the gene (three exons) was amplified by PCR using exon-flanking primers (primer sequences and PCR conditions are shown in Supplementary Tables 1 and 2, available online only). Each amplicon was purified using exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase and subsequently sequenced with internal primers. Sequences were aligned and compared with that of the *FOXO4* wild-type version (NM_005938.3). Human Splicing Finder software (www.umd.be/HSF/) was used to predict potential splicing alterations. No further molecular genetic studies were performed in the POF patients.

Results

Since this study amplified and sequenced the coding region of the gene using exon-flanking oligonucleotides, it was able to identify the IVS2 + 41T > G sequence variant located on the second intron of the gene. Allelic frequencies did not significantly differ between POF and control group patients (0.65 versus 0.65 of the G allele and 0.35 versus 0.35 of the T allele, respectively) (Table 1). This nucleotide change was previously reported in public databases of SNPs (rs5980742). The NCBI-SNP database (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) shows dissimilar allele frequencies of this variant in samples from European, Asian and Mexican origin. Individuals from ethnic groups similar to those described in our study have not been reported. *In silico* analysis of this variant did not reveal splicing changes. No further *FOXO4* sequence variants were found in these POF and control populations.

Discussion

The present work constitutes the first screening of mutations of the *FOXO4* gene in women affected by ovarian dysfunction. The strong expression of this gene in mice and human granulosa cells, as well as its role into PI3K/Akt/Cdkn1b molecular pathway, suggests a functional

Table 1 Sequencing analysis of the *FOXO4* gene: allele frequencies of the IVS2+41T>G sequence variant.

Sequence variation	*Allele frequencies*			
	POF patients (n = 116)		*Controls (n = 143)*	
	G	*T*	*G*	*T*
IVS2+41T>G	0.65 (151 alleles)	0.35 (81 alleles)	0.65 (185 alleles)	0.35 (101 alleles)

role during ovarian physiology (Pisarska et al., 2009; Rajareddy et al., 2007; Richards et al., 2002; Tran et al., 2003). The implication of FOXO factors during ageing processes, via ROS regulation, underlies the potential role of *FOXO4* during ovarian dysfunction and POF. However, the intronic IVS2 + 41T > G variant described here is not related to the aetiology of the disease, since it was identified in both POF and control groups at similar allele frequencies. Furthermore, in-silico analysis does not suggest a potential deleterious effect.

Thus, in conclusion, mutations in the coding region of *FOXO4* should not be a common cause of POF in women of Tunisian origin. However, this study cannot exclude that *FOXO4* dysfunctions, originating from open reading frame or promoter sequence variations, might be associated to the pathogenesis of the disease in other ethnical groups.

Acknowledgements

This study was supported by the Universidad del Rosario (grant CS/Genetics).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.rbmo.2011.11.017.

References

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K., 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod. Biol. Endocrinol. 14, 3–28.

Benayoun, B.A., Caburet, S., Veitia, R.A., 2011. Forkhead transcription factors: key players in health and disease. Trends Genet. 27, 224–232.

Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W., DePinho, R.A., 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. Science 301, 215–218.

De Baere, E., Fellous, M., Veitia, R.A., 2009. The transcription factor FOXL2 in ovarian function and dysfunction. Folia Histochem. Cytobiol. 47, S43–S49.

Harris, S.E., Chand, A.L., Winship, I.M., Gersak, K., Aittomäki, K., Shelling, A.N., 2002. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. Hum. Reprod. 8, 729–733.

Liu, L., Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Jagarlamudi, K., Shen, Y., Gunnarsson, D., Selstam, G., Boman, K., Liu, K., 2007. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. Development 134, 199–209.

Ojeda, D., Lakhal, B., Fonseca, D.J., Braham, R., Landolsi, H., Mateus, H.E., Restrepo, C.M., Elghezal, H., Saâd, A., Laissue, P., 2011. Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. Fertil. Steril. 95, 2658–2660.

Pisarska, M.D., Kuo, F.T., Tang, D., Zarrini, P., Khan, S., Ketefian, A., 2009. Expression of forkhead transcription factors in human granulosa cells. Fertil. Steril. 91, 1392–1394.

Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Liu, L., Jagarlamudi, K., Tang, W., Shen, Y., Berthet, C., Peng, S.L., Kaldis, P., Liu, K., 2007. P27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. Mol. Endocrinol. 21, 2189–2202.

Richards, J.S., Sharma, S.C., Falender, A.E., Lo, Y.H., 2002. Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. Mol. Endocrinol. 16, 580–599.

Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treierm, A.C., Treier, M., 2004. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. Development 131, 933–942.

Tothova, Z., Gilliland, G., 2007. FoxO transcriptions factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. Cell Stem Cell 1, 140–152.

Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., Greenberg, M.E., 2003. The many forks in FOXO's road. Sci. STKE 172, RE5.

Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponim, L., Garciam, J.E., Deianam, M., Kimberm, W., Foraboscom, A., Cao, A., Schlessinger, D., Pilia, G., 2004. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. Hum. Mol. Genet. 13, 1171–1181.

Wang, B., Mu, Y., Ni, F., Zhou, S., Wang, J., Cao, Y., Ma, X., 2010. Analysis of FOXO3 mutation in 114 Chinese women with premature ovarian failure. Reprod. Biomed. Online 20, 499–503.

Watkins, W.J., Harris, S.E., Craven, M.J., Vincent, A.L., Winship, I.M., Gersak, K., Shelling, A.N., 2006a. An investigation into FOXE1 polyalanine tract length in premature ovarian failure. Mol. Hum. Reprod. 12, 145–149.

Watkins, W.J., Umbers, A.J., Woad, K.J., Harris, S.E., Winship, I.M., Gersak, K., Shelling, A.N., 2006b. Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. Fertil. Steril. 86, 1518–1521.

Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

Received 13 July 2011; refereed 17 November 2011; accepted 17 November 2011.

8. REFERENCIAS

Alvarez, J. 2002. Diagnóstico genético reinplantación (PGD) y selección de sexo. Gac. MédMex. 138: 0016-3813.

Amato P and Roberts AC (2001) Transient ovarian failure: a complication of uterine artery embolization. Fertil Steril 75,438–439.

Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 1976; 71:680-686.

Anasti, J.N. (1998) Premature ovarian failure: an update. Fertil. Steril., 70, 1± 15

Agoulnik IU, Krause WC, Bingman WE 3rd, Rahman HT, Am- rikachi M, Ayala GE, Weigel NL. Repressors of androgen and progesterone receptor action. J Biol Chem 278: 31136 –31148, 2003.

Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL 1999 A mu- tation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. Nat Genet 22:125–126

Arango, N. A.; R. Lovell-Badge y R. R. Behringer (1999). "Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development", *Cell* 99, 409-419.

Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. Genet*. 1994;7: 497-501.

Bakalov VK, Vanderhoof VH, Bondy CA and Nelson LM (2002) Adrenal antibodies detect asymptomatic auto-immune adrenal insufficiency in young women with spontaneous premature ovarian failure. Hum Reprod 17,2096–2100.

Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. Semin Cell Dev Biol 1998;9:393-400.

Boyer A, Lapointe E, Zheng X, Cowan RG, Li H, Quirk SM, DeMayo FJ, Richards JS, Boerboom D.WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility.FASEB J. 2010 Aug;24(8):3010-25.

Buehr, M., Gu, S. and McLaren, A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. Development 117, 273-281.

Borkhardt, A., Repp, R., Haas, O. A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., … Lampert, F. (1997). Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene*, *14*(2), 195–202. doi:10.1038/sj.onc.1200814

Boura, E., Silhan, J., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V. and Obsil, T. (2007). Both the N-terminal loop and wing W2 of the forkhead domain of transcription factor Foxo4 are important for DNA binding. J. Biol. Chem. 282, 8265- 8275

E. Boura, L. Rezabkova, J. Brynda, V. Obsilova, T. Obsil. Structure of the human FOXO4-DBD-DNA complex at 1.9 A resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 66 (2010), pp. 1351–1357

Bruin JP[1], Bovenhuis H, van Noord PA, Pearson PL, van Arendonk JA, te Velde ER, Kuurman WW, Dorland M. The role of genetic factors in age at natural menopause. Hum Reprod. 2001 Sep;16(9):2014-8.

Burgoyne, P. S., Buehr, M., Koopman, P., Rossant, J. and McLaren, A. (1988). Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX↔XY chimeric mouse testes. Development 102, 443-450.

Calnan, D. R., & Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene*, *27*(16), 2276–88. doi:10.1038/onc.2008.21

Canipari R. Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* 1994; 2:343-345.

Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5573), 1655–7.

Carreau S, Bouraima-Lelong H & Delalande C 2012 Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. Advances in Medical Sciences 57 31–36.

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. Science. 2003;301:215–218.

Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC. Activation of β-catenin signalling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. Hum Mol Genet. 2008;17:1264–1277.

Colvin JS, Feldman B, Nadeau JH, Goldfarb M, Ornitz DM. Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene. Dev Dyn 216: 72–88, 1999.

Conway GS (1996) Clinical manifestations of genetic defects affecting gonadotrophins and their receptors. Clin Endocrinol (Oxf) 45,657–663.

Conway GS (2000) Premature ovarian failure. Br Med Bull 56,643–649.

Coulam, C.B., Adamson, S.C. and Annegers, J.F. (1986) Incidence of premature ovarian failure. Obstet. Gynecol., 67, 604±606.

Couse JF, Korach KS. 1999. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? Endocr Rev 20:358–417.

Cline, T. W. and Meyer, B. J. (1996). VIVE LA DIFFÉRENCE: Males vs Females in Flies vs Worms. Annu. Rev. Genet. 30, 637-702.

Cramer DW (1986) Ovary. In: *Cancer Epidemiology and Prevention*, D Schottenfeld, JF Fraumeni Jr (eds) pp. 871–880, Philadelphia, PA: W.B. Saunders Press

Cramer DW, Xu H, Harlow BL (1995) Family history as a predictor of early menopause. Fertil Steril 64: 740-745.

Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S. *et al.* (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. Nat. Genet., 27, 159–166.

Cummings, Peter M. (2011). Atlas of forensic histopathology. Cambridge : Cambridge University Press.

Davis CJ, Davison RM, Payne NN, Rodeck CH and Conway GS (2000) Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: opinion. Hum Reprod 15, 2418–2422.

De Santa Barbara,P.; C. Mejean; B. Moniot; M. Malcles; P. Berta y B. Boizet-Bonhoure, B.(2001). "Steroidogenic Factor-1 Contrib- utes to the Cyclic-adenosine Monophosphate Down-regulation of Human SRY Gene Expression", *Biol. Reprod*. 64: 775-783.

Durlinger, A.L., et al., Control of primordial follicle recruitment by antiMullerian hormone in the mouse ovary. Endocrinology, 1999. 140(12): p. 5789-96.

Ebner, T., et al., Basal level of anti-Mullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. Hum Reprod, 2006. 21(8): p. 2022-6.

Edson, M. A., Nagaraja, A. K. & Matzuk, M. M. (2009) The mammalian ovary from genesisto revelation. Endocrine Review, 30, 624-712.

Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. 2008. *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*, 4º ed, Panamericana, Buenos Aires, p. 519-540.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Hum Reprod 1992;7:1342-1346.

Essers, M. A. G., Weijzen, S., de Vries-Smits, A. M. M., Saarloos, I., de Ruiter, N. D., Bos, J. L., & Burgering, B. M. T. (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO Journal*, *23*(24), 4802–12. doi:10.1038/sj.emboj.7600476

Faddy MJ Follicle dynamics during ovarian ageing. Mol Cell Endocrinol2000;163:43-48

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an *SRY*-related gene. *Nature.* 1994; 372: 525–530.

Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa SI, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N and Mori N. (2004). *J. Biol. Chem.*, 279, 34741–34749.

Guerrero NV, Singh RH, Manatunga A, Berry GT, Steiner RD and Elsas LJ II (2000) Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia. J Pediatr137,833–841.

Gilbert S. 2000. Developmental Biology. Sinauer Associates, INC., Publishers. Sunderland. Massachusetts. USA.

Goldfien A, Monroe SE. Endocrinología básica y clínica.México: El Manual Moderno,1988; pp:379-425.

Goodfellow, P.N. & Lovell-Badge, R. SRY and sex determination in mammals. *Annu. Rev. Genet., 27:*71-92, 1993.

Gougeon, A., 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev 17, 121-155.

Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. Hum Reprod Update2005;11:391-410.

Gubbay J, Colügnon J, Koopman P et al. 1990. A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonicaliy expressed genes. Nature. 346: 245- 250.

Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI 2000 SRY, SOX9, and DAX1 expression pat- terns during human sex determination and gonadal development. Mech Dev 91:403– 407

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R 1995 Expres- sion of Sry, the mouse sex determining gene. Development 121: 1603–1614

Harley V. R, Lovell-Badge R. and Goodfellow P. N. Definition of a consensus ADN binding site for SRY. *Nucl. Acids Res*. 1994; 22: 1500-1501

Harley, V. R.; M. J. Clarkson y A. Argentaro (2003). "The Molecular Action and Regulation of the Testis-determining Factors, SRY (Sex- determinig Region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related High-Mobility Group (HMG) Box9", *Endocrine Rev.* 24: 466-487.

Hatano, O., K. Takayama, T. Imai, M.R. Waterman, A. Takakusu, T. Omura, and K. Morohashi. 1994. Sex-depen- dent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. Development 120: 2787–2797.

Harris, S. E., Chand, A. L., Winship, I. M., Gersak, K., Aittomäki, K., & Shelling, A. N. (2002). Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Molecular Human Reproduction*, *8*(8), 729–33.

Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN 1992 Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. Hum Genet 88:471–474

HIRSHFIELD A (1992). An overview of folicular development in the ovary: from embryo to the fertilized ovum in vitro. Md Med J; 41:614-620.

Ho, K. K., Myatt, S. S., & Lam, E. W.-F. (2008). Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene*, *27*(16), 2300–11. doi:10.1038/onc.2008.23

Holton, J. B., Walter, J. H., Tyfield, L. A. Galactosemia.In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds.) : The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. II. New York: McGraw-Hill (7th ed.) : 2001. Pp. 1553-1587.

Holter E, Kotaja N, Makela S, Strauss L, Kietz S, Janne OA, Gustafsson JA, Palvimo JJ, Treuter E. Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear recep- tor DAX-1. Mol Endocrinol 16: 515–528, 2002.

Hosaka, T., Biggs, W. H., Tieu, D., Boyer, A. D., Varki, N. M., Cavenee, W. K., &Arden, K. C. (2004). Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 2975–80. doi:10.1073/pnas.0400093101

Howell S and Shalet S (1998) Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. Endocrinol Metab Clin North Am 27,927–943.

Hsu A, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. Science. 2003;300:1142–1145.

Huang, H., & Tindall, D. J. (2007). Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 15), 2479–87.

Hsueh, A.J., Billig, H., Tsafriri, A., 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr Rev 15, 707-724.

Hughes Ieuan a.. Minireview: Sex Differentiation. Endocrinology 142(8):3281–3287.2001.

Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS.Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary.Endocrinology. 2002 Mar;143(3):898-908.

Ieuan A. Hughes minireview : Sexo Differentiation.Endocrinology 142 (8) :3281-3287)

Ikeda, Y., Lala, D.S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M.P., Parker, K.L., 1993. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. Molecular Endocrinology 7, 852–860.

Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai K, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. Mol Endo- crinol 10: 1261–1272, 1996.

99. Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Moro- hashi K. Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. Dev Dyn 220: 363–376, 2001.

Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1476–1483.

Jiao X[1], Qin C, Li J, Qin Y, Gao X, Zhang B, Zhen X, Feng Y, Simpson JL, Chen ZJ. Cytogenetic analysis of 531 Chinese women with premature ovarian failure. Hum Reprod. 2012 Jul;27(7):2201-7. doi: 10.1093/humrep/des104. Epub 2012 Apr 18.

Kaufman FR, Xu YK, Ng WG, Silva PD, Lobo RA and Donnell GN (1989) Gonadal function and ovarian galactose metabolism in classic galactosemia. Acta Endocrinol (Copenh) 120,129–133.

Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C. and Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. Dev. Cell 7, 525-534

Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B (June 2006). "Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination". *PLoS Biol.* 4 (6): e187.

Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 351: 117-121.

Kops, G. J., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L., & Burgering, B. M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, *398*(6728), 630–4. doi:10.1038/19328

Lalli E,BardoniB,ZazopoulosE,WurtzJM,StromTM,Moras D, Sassone-Corsi P. A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. Mol Endo- crinol 11: 1950–1960, 1997.

Laissue, P., Vinci, G., Veitia, R. a, & Fellous, M. (2008a). Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *282*(1-2), 101–11. doi:10.1016/j.mce.2007.11.005

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.

Lane AH, Donahue PK 1998 New insights into Mu¨ llerian inhibiting substance and its mechanism of action. J Endocrinol 158:1–6

Lakhal, B., Braham, R., Berguigua, R., Bouali, N., Zaouali, M., Chaieb, M., … Elghezal, H. (2010a). Cytogenetic analyses of premature ovarian failure using karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in a group of 1000 patients. *Clinical Genetics*, *78*(2), 181–5. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01359.x

Liu, L., Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Jagarlamudi, K., Shen, Y., … Liu, K. (2007). Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a.

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 (Oxford, England), *18*(1), 199–206. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525467

Manuylov NL, Smagulova FO, Leach LL, Tevosian SG. Ovarian Development in Mice Requires the GATA4/FOG2 Transcriptional Complex. Development. 2008 In press.

Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R. and Capel, B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. Curr. Biol. 7, 958-968.

Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. Nat Cell Biol. 2002;4(suppl):s41–s49.

Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., et al. (2005). Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11278–11283.

Medema RH, Kops GJ, Bos JL and Burgering BM. (2000). *Nature*, 404, 782–787.

Merchant-Larios, H. and Moreno-Mendoza, N. (1998). Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. Exp. Cell Res. 244, 230-238.

Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K.Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X126chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 507–519.

Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-van Houten DL, Flana- gan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax1 modulate the orphan nuclear receptor SF1 in sex-specific gene expression. Cell 93: 445–454, 1998.

Nippita TA, Baber RJ. Premature ovarian failure: a review. Climacteric. 2007;10(1):11–22.

Niakan, K. K. y E. R. B. McCabe (2005). "Dax Origin, Function and a Novel Role", *Dev Gen Metabol*. 86: 70-83.

Obsilová, V., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J., & Obsil, T. (2008). 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, *57 Suppl 3*, S11–21. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18481918

Parry, P., Wei, Y., Evans, G. Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family.Genes Chromosomes Cancer 11: 79-84, 1994.

Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. Genes involved in human premature ovarian failure.*J Mol Endocrinol*. 2010; 45:257-279.

Pisarska, M.D., Kuo, F.T., Tang, D., Zarrini, P., Khan, S., Ketefian, A., 2009. Expression of forkhead transcription factors in human granulosa cells. Fertil. Steril. 91, 1392–1394.

Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. Mol Cell Endocrinol 1998;145:27-37.

Poirot C, Vacher-Lavenu MC, Helardot P, Guibert J, Brugieres L and Jouannet P (2002) Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. Hum Reprod 17,1447–1452.

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), 1509–18. doi:10.1210/en.2010-1390

Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Liu, L., Jagarlamudi, K., Tang, W., Shen, Y., Berthet, C., Peng, S.L., Kaldis, P., Liu, K., 2007. P27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. Mol. Endocrinol. 21, 2189–2202.

Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., … Liu, K. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*, *281*(2), 160–70.

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. Science. 2008;

Rebar RW.(2009) Premature Ovarian Failure. Obstet Gynecol. 2009 Jun; 113(6):1355-63.

Reynolds L. P., S. D. Killilea, D. A. Redmer, 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. FASEB J. 6:886-892

Richards, J.S., Sharma, S.C., Falender, A.E., Lo, Y.H., 2002. Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. Mol. Endocrinol. 16, 580–599.

Santoro N: Mechanisms of premature ovarian failure.*Ann Endocrinol* 2003, 64:87-92.

Simpson, J. L., Rajkovic, A. Ovarian differentiation and gonadal failure. Am. J. Med. Genet. 89: 186-200, 1999

Schmahl, J., Eicher, E. M., Washburn, L. L. and Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. Development 127, 65-73.

Schmahl J, Capel B. Cell proliferation is necessary for the deter- mination of male fate in the gonad. Dev Biol 258: 264–276, 2003.

Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, Ornitz DM, Capel B. Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precur- sors during male sex determination. Development 131: 3627–3636, 2004.

Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. Development. 2004;131:933-42.

Shelling AN. Premature ovarian failure. Reproduction. 2010;140:633–41.

Sekido R & Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a spe- cific Sox9 enhancer. Nature 453, 930–934.

Silhan, J., Vacha, P., Strnadova, P., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., … Obsil, T. (2009). 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(29), 19349–60. doi:10.1074/jbc.M109.002725

Sinclair A, Berta P, Palmer M et al. 1991. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif Nature. 346: 240-244.

Suzuki T, Kasahara M, Yoshioka H, Morohashi K, Umesono K. LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the or- phan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. Mol Cell Biol 23: 238–249, 2003.

Van der Vos, K. E., & Coffer, P. J. (2011). The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*(4), 579–92. doi:10.1089/ars.2010.3419

Vinci, G., Christin-Maitre, S., Pasquier, M., Bouchard, P., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2008). FOXO3a variants in patients with premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*, *68*(3), 495–7.

Tibiletti MG[1], Testa G, Vegetti W, Alagna F, Taborelli M, Dalprà L, Bolis PF, Crosignani PG. The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. Hum Reprod. 1999 Nov;14(11):2731-4

Thibault, C., D. Szollosi, and M. Gerard. 1987. Mammalian oocyte maturation. Reprod. Nutr. Dev. 27:885−896.

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A and Donehower LA. (2002). *Nature*, 415, 45–53.

Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, et al: Syndromic true her-maphroditism due to an Rspondin1 *(RSPO1)* homozygous mutation. Hum Mutat 29:220– 226 (2008).
Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, et al: Syndromic true her-maphroditism due to an Rspondin1 *(RSPO1)* homozygous mutation. Hum Mutat 29:220– 226 (2008).

Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C., & Greenberg, M. E. (2003). The many forks in FOXO's road. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, *2003*(172), RE5. doi:10.1126/stke.2003.172.re5

Tothova, Z., & Gilliland, D. G. (2007). FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hemat opoietic system. *Cell Stem Cell*, *1*(2), 140–52. doi:10.1016/j.stem.2007.07.017

Tyfield, L., Reichardt, J., Fridovich-Keil, J., Croke, D. T., Elsas, L. J., Strobl, W., … Boleda, M. D. (1999). Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene. *Human Mutation*, *13*(6), 417–30

Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D & , Shelling AN 2006 The genetic basis of premature ovarian failure. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology **46** 242–244

Yao,H.H.,Matzuk,M.M.,Jorgez,C.J.,Menke,D.B.,Page,D.C.,Swain,A. and Capel, B. (2004) Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. Dev. Dyn., 230, 210 – 215.

Yang, Z., Whelan, J., Babb, R., & Bowen, B. R. (2002a). An mRNA splice variant of the AFX gene with altered transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(10), 8068–75. doi:10.1074/jbc.M10609120

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. Hum Mol Genet. 2004;13:1171–1181.

Yu, R.N.; M. Ito; T. L. Saunders; S. A. Camper y J. L. Jameson (1998). "Role of Nr0b1 in Gonadal Development and Gametogenesis", *Nat Genet*. 20: 353-357.

Vainio S, M. Heikkila, A. Kispert, N. Chin, A.P. McMahon. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. Nature, 397 (1999), pp. 405–409.

van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM. (2004). FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* 279: 28873–28879.

van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F *et al*. (2006). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nature Cell Biol* 8: 1064–1073.

van der Vos KE, Coffer PJ (2011) The extending network of FOXO transcriptional target genes. Antioxid Redox Signal 14: 579–592. doi: 10.1089/ars.2010.3419

Vayena E, Rowe JP, Peterson HB. Assisted reproductive technology in developing countries: why should we care? Fertil Steril. 2002;b 78:13–15.

Wang D, Kobayashi T, Zhou L, Nagahama Y (2004) Molecular cloning and gene expression of Foxl2 in the Nile tilapia, Oreochromis niloticus. Biochem Biophys Res Commun 320:83-9

WANDJI S, SRSEN V, VOSS A, EPPIG J, FORTUNE J (1996). Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. Biol Reprod; 55:942-948.

Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, et al. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. Hum Reprod. 1997;12:1993–2001.

Watkins, W. J., Umbers, A. J., Woad, K. J., Harris, S. E., Winship, I. M., Gersak, K., & Shelling, A. N. (2006). Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with

premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, *86*(5), 1518–21. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.054

Waggoner DD, Buist NR and Donnell GN (1990) Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. J Inherit Metab Dis 13,802–818.

Wilhelm, D.; R. Hiramatsu; H. Mizusaki; L. Widjaja; A. Combes; Y. Kanai y P. Koopman (2007). "Sox9 Regulates Prostaglandin D Synthase Gene Transcription in Vivo to En- sure Testis Development", *J. Biol. Chemistry*. 282: 10553-10560.

Weigelt, J., Climent, I., Dahlman-Wright, K., & Wikström, M. (2001). Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). *Biochemistry*, *40*(20), 5861–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352721

Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D & Shelling AN 2006 The genetic basis of premature ovarian failure. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology **46** 242–244

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ERB, Meltinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for Xlinked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*. 1994; 372: 635–641.

Zhang H, Thomsen JS, Johansson L, Gustafsson JA, Treuter E. DAX-1 functions as an LXXLL- containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem*. 2000; 275: 39855–39859.

Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature*. 1997; 390: 311–315.

Zlotogora, J., Sagi, M., & Cohen, T. (1983). The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *American Journal of Human Genetics*, *35*(5), 1020–7

Zinn, V S Tonk, Z Chen, W L Flejter, H A Gardner, R Guerra, H Kushner, S Schwartz, V P Sybert, D L Van Dyke, and J L Ross. Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1. Am J Hum Genet. 1998 Dec; 63(6): 1757–1766.