

**VALIDACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES EN *LHCGR* EN
PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA NO SINDRÓMICA**

KAREN MARCELA JIMÉNEZ RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C.

NOVIEMBRE DE 2017

**VALIDACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES EN *LHCGR* EN PACIENTES
CON FALLA OVÁRICA PREMATURA NO SINDRÓMICA**

KAREN MARCELA JIMÉNEZ RODRIGUEZ

TRABAJO DE GRADO

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

DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD., MSc., PhD., HDR

CODIRECTORA

LILIANA CATHERINE PATIÑO., MSc., PhD(c)

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C.

NOVIEMBRE DE 2017

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

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

**VALIDACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES EN *LHCGR* EN PACIENTES
CON FALLA OVÁRICA PREMATURA NO SINDRÓMICA**

KAREN MARCELA JIMÉNEZ RODRIGUEZ

APROBADO

PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD, HDR

DIRECTOR

JURADO

JURADO

Agradecimientos

- *A la vida*, que me permitió hacer la maestría en el momento indicado con las personas indicadas. No sólo aprendí sino que gané grandes amigos.
- *A mis papas*, por su amor, esfuerzo y constante apoyo en todos mis proyectos.
- *Al Dr. Paul*, por brindarme la oportunidad de ser parte de CIGGUR, por enseñarnos la perfección, y por su guía y apoyo a lo largo del desarrollo de la tesis.
- *A Lili*, por sus enseñanzas y apoyo a lo largo de todo este proceso.
- *A la Dra. Dora*, por transmitirme todos sus conocimientos, confiar en mí y siempre estar ahí.
- *A las profesoras de genética*, por siempre estar dispuestas a ayudarme cuando lo necesité.
- *Al haplotipo en desequilibrio de ligamiento*, por siempre estar ahí, por los buenos momentos que pasamos en clase y en el laboratorio. Los quiero y admiro.
- *A Dani*, por su apoyo incondicional de principio a fin.
- *A Chiqui*, por desestresarme.

Tabla de contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	3
3.1 Foliculogénesis	3
3.1.1 Desarrollo folicular	3
3.1.2 Factores genéticos que regulan el desarrollo folicular	7
3.1.3 Eje Hipotálamo – hipófisis – Gónada	11
3.2 Falla ovárica prematura	14
3.2.1 Definición y diagnóstico	14
3.2.2 Epidemiología	15
3.2.3 Etiología	16
3.2.3.1 Enfermedades autoinmunes	17
3.2.3.2 Enfermedades metabólicas	18
3.2.3.3 Causas iatrogénicas	19
3.2.3.4 Agentes infecciosos y ambientales	20
3.2.3.5 Factores genéticos	21
3.2.3.5.1 Causas sindrómicas	21
3.2.3.5.2 Causas no sindrómicas	27
3.2.3.5.2.1 Factores de crecimiento	28
3.2.3.5.2.2 Factores de transcripción específicos del oocito	29
3.2.3.5.2.3 Receptores de gonadotropinas	33
3.2.3.5.2.4 Otros genes	35
3.3 LHCGR	37
3.3.1 Gen <i>LHCGR</i>	37
3.3.2 Proteína LHCGR	39
3.3.3 Expresión	43
3.3.4 Ligandos	44
3.3.5 Activación	47
3.3.6 Vías de señalización activadas por el LHCGR	52
3.3.7 Modelos animales del LHCGR	55
3.3.8 Variantes en el LHCGR asociadas con la etiología de la falla ovárica prematura no sindrómica	59
4. Pregunta científica	67
5. Objetivos de la investigación	67
5.1 objetivo general	67
5.2 objetivos específicos	67
6. Materiales y métodos	68

6.1 Construcciones plasmídicas de LHCGR.....	68
6.1.1 Generación de las variantes c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro) mediante mutagénesis dirigida por PCR fusión.....	68
6.1.2 PCR para la obtención del ADNc del gen <i>LHCGR</i> en la versión <i>wildtype</i> (WT).....	72
6.1.3 Subclonaje de los ADNc del gen <i>LHCGR</i>	73
6.1.3.1 Transformación	74
6.1.3.2 Verificación del subclonaje.....	74
6.1.4 Clonaje en el vector pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO.....	76
6.1.4.1 Transformación.....	77
6.1.4.2 Verificación del clonaje.....	77
6.1.5 Clonaje por medio de digestión – ligación.....	79
6.1.5.1 Digestión.....	79
6.1.5.2 Ligación.....	79
6.1.5.3 Transformación.....	80
6.1.5.4 Verificación del clonaje.....	80
6.1.6 Generación de la variante c.455T>C (p.Ile152Thr) mediante mutagénesis dirigida.....	81
6.1.6.1 Transformación.....	83
6.1.6.2 Verificación de la mutagénesis.....	83
6.2 Ensayo funcional <i>in vitro</i> de la localización celular.....	83
6.2.1 Cultivo celular y siembra de las células para la transfección.....	84
6.2.2 Transfección.....	84
6.2.3 Tinción del retículo endoplasmático y montaje de las células.....	85
6.3 Ensayo funcional <i>in vitro</i> para el análisis de la transducción de la señal.....	86
6.3.1 Cultivo celular y siembra de las células para la cotransfección.....	87
6.3.2 Cotransfección.....	88
6.3.3 Estimulación con hCG.....	89
6.3.4 Ensayo <i>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</i> (DLR™).....	90
7. Resultados.....	91
7.1 Localización subcelular de LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P marcadas con GFP.....	91
7.2 Producción de cAMP de LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P, mediante la estimulación post transfección con hCG.....	93
8. Discusión.....	95
9. Conclusión y perspectivas.....	100
10. Bibliografía.....	101
11. Anexo 1.....	130

Lista de figuras

Figura 1. Desarrollo folicular.....	6
Figura 2. La Proteína LHCGR y los sitios donde ocurren las principales modificaciones postraduccionales.....	40
Figura 3. Pedigrí de la familia POF19.....	65
Figura 4. Esquema de la mutagénesis dirigida realizada para la generación de las variantes de <i>LHCGR</i>	71
Figura 5. Carta de los vectores pCR 4-TOPO.....	76
Figura 6. Carta de los vectores pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO.....	78
Figura 7. Carta de los vectores pcDNA3.1 Zeo (+).....	81
Figura 8. Carta de la construcción plasmídica pcDNA-LHCGR- I152T.....	83
Figura 9. Células COS-7 transfectadas con las construcciones plasmídicas GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S o GFP-TOPO-LHCGR-S176P.....	92
Figura 10. Recuento de 170 células transfectadas con las construcciones plasmídicas GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S o GFP-TOPO-LHCGR-S176P.....	93
Figura 11. Curva de respuesta de las células HEK293, transfectadas con las construcciones plasmídicas pcDNA-LHCGR-WT, pcDNA-LHCGR-N99S, pcDNA-LHCGR-S176P, pcDNA-LHCGR- I152T o con el control negativo, a la estimulación con diferentes concentraciones de hCG.....	94

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencia de los <i>primers</i> empleados y longitud de los fragmentos generados en la primera ronda de PCR de la mutagénesis dirigida.....	70
Tabla 2. Programa de PCR empleado en la segunda ronda de PCR de la mutagénesis dirigida.....	71
Tabla 3. Programa de termociclador empleado para la mutagénesis por GenArt®	82
Tabla 4. Ensayo de estimulación con hCG.....	89

Anexos

Anexo 1: Artículo publicado. Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Suárez, Y. C., de Jesús Rodríguez, A., Mateus, H. E., **Jiménez, K. M.**, Ortega-Recalde, O, Díaz-Yamal, I, Laissue, P. (2015). **Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations.** Fertility and sterility, 104(1), 154-162.

1. Resumen

La falla ovárica prematura (FOP) afecta al 1%-2% de las mujeres menores de 40 años. Se caracteriza por presencia de amenorrea y niveles elevados de gonadotropinas. En un estudio reciente, mediante un experimento de secuenciación de NGS de 70 genes candidatos, se encontraron las variantes heterocigotas c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro) en el gen *LHCGR*. Variantes en este gen han sido previamente relacionadas con la FOP.

El objetivo de la presente tesis fue evaluar el potencial impacto funcional de las variantes identificadas mediante ensayos *in vitro*. Inicialmente, se determinó si las variantes encontradas afectaban la localización subcelular. Posteriormente, se evaluó si estas variantes tenían un efecto deletéreo en la producción de cAMP y por lo tanto, en la transducción de la señal corriente abajo. Para esto se cotransfectaron la condición WT o las condiciones mutantes (LHCGR-N99S o LHCGR-S176P) con un plásmido reportero de cAMP. La medición del cAMP se realizó luego de la estimulación con hCG, mediante un ensayo reportero de luciferasa. Se encontró que la localización subcelular fue similar entre la condición WT y las condiciones mutantes. Sin embargo, en las condiciones mutantes se observó que hubo un incremento significativo en imágenes similares a agregados. También, se identificó que estas variantes no afectaron la señalización mediada por la hCG. Con los ensayos funcionales realizados no se pudo determinar de manera directa que las variantes analizadas tuvieran un efecto deletéreo. No obstante, considerando que la FOP es una patología de origen poligénico, no se descarta la posibilidad que las variantes c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C

(p.Ser176Pro) tuvieran un efecto aditivo mínimo y estuvieran relacionadas con su etiología.

2. Introducción

La falla ovárica prematura (FOP), es una de las principales causas de infertilidad humana ya que puede afectar aproximadamente al 1%-2% de la población femenina antes de los 40 años. Se ha encontrado que enfermedades autoinmunes y metabólicas, causas iatrogénicas, agentes infecciosos y ambientales, y factores genéticos contribuyen a la etiología de la FOP. Sin embargo, más del 50% de los casos son idiopáticos, lo que sugiere que existen causas genéticas y epigenéticas aún desconocidas. El gen *LHCGR* ha sido relacionado con la FOP por su importante función en la maduración folicular, en la esteroidogénesis gonadal, en la ovulación y en la formación del cuerpo lúteo. No obstante, pocas variantes en este gen, encontradas por secuenciación directa, han sido validadas por estudios funcionales *in vitro* como causales de esta patología. Recientemente, nuestro grupo encontró por medio de la NGS, las variantes heterocigotas c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro) en el gen *LHCGR*. A través de análisis *in silico* previos, se encontró que estas variantes eran potencialmente patogénicas. Además, en una de las pacientes portadoras de la variante c.296A>G (p.Asn99Ser), también se encontró la variante c.2960C>T (p.Ser987Phe) en el gen *BMPR2*, lo que apoya la idea de la naturaleza poligénica de la FOP. Por lo tanto, en el presente estudio, mediante ensayos *in vitro*, se quiso determinar el impacto funcional de estas variantes encontradas en pacientes con esta patología.

3. Marco Teórico

3.1 Foliculogénesis

3.1.1 Desarrollo folicular

La foliculogénesis se inicia con la formación del folículo primordial. Esta estructura se desarrolla cuando los oocitos, retenidos en la profase I de la meiosis, son rodeados por células somáticas aplanadas conocidas como células de la pre-granulosa (**Fig. 1**) (Edson et al., 2009; Hirshfield, 1991; Matzuk et al., 2002; McGee & Hsueh, 2000; Oktem & Urman, 2010). Aquellos oocitos que no son rodeados por estas células, sufren apoptosis y los que sobreviven se convierten en folículos primordiales formando el *pool* que va determinar la vida reproductiva de la mujer (**Fig. 1**) (Edson et al., 2009; McGee & Hsueh, 2000; Oktem & Urman, 2010). Estos folículos comienzan a ser visibles en la semana 20 de gestación y permanecen en quiescencia por meses o años (McGee & Hsueh, 2000). Factores intraováricos y una comunicación bidireccional entre el oocito y las células somáticas estimulan, progresivamente, algunos de estos folículos primordiales a iniciar la etapa de crecimiento (Edson et al., 2009; McGee & Hsueh, 2000; Kim, 2012). En la etapa de crecimiento, el oocito y los folículos incrementan de tamaño, desarrollándose los folículos primarios, secundarios, pre- antrales y antrales (**Fig. 1**) (Fortune, 1994; Hirshfield, 1991; Matzuk et al., 2002; McGee & Hsueh, 2000). Los folículos primarios se forman cuando, en aquellos folículos primordiales activados para iniciar la etapa de crecimiento, las células aplanadas de la pre-granulosa se transforman en células cuboides y proliferativas (**Fig. 1**) (Hirshfield, 1991; Matzuk et al., 2002; Oktem & Urman, 2010). Estos folículos, en la especie humana son observados en la semana 24 de gestación (McGee & Hsueh, 2000). Cuando las células

de la granulosa comienzan a proliferar, el oocito es rodeado por más de una capa de estas células, desarrollándose el folículo secundario (**Fig. 1**) (Edson et al., 2009; Hirshfield, 1991; Oktem & Urman, 2010). Estos folículos son observados en la semana 26 de gestación (McGee & Hsueh, 2000).

Luego del desarrollo del folículo secundario, se desarrolla el folículo pre-antral (**Fig. 1**). En este folículo el oocito continua creciendo, las células de la granulosa proliferando, se forma la lamina basal, y surge una nueva capa de células somáticas. Esta nueva capa de células se conoce como la teca y constituye la capa externa del folículo (**Fig. 1**) (Edson et al., 2009; Hirshfield, 1991; McGee & Hsueh, 2000). El folículo pre-antral se observa, en el tercer trimestre del embarazo (McGee & Hsueh, 2000). Durante el continuo crecimiento del folículo la teca se estratifica formando la teca externa y la teca interna. La teca externa es importante en la ovulación, mientras la teca interna es fundamental para la producción de andrógenos necesarios para la producción de estrógenos en las células de la granulosa (Edson et al., 2009; McGee & Hsueh, 2000; Oktem & Urman, 2010).

Posteriormente, múltiples canales pequeños llenos de fluido se unen y forman la cavidad antral, desarrollándose el folículo antral (**Fig. 1**). En este estadio se dividen las células de la granulosa en dos poblaciones celulares, las células de la granulosa murales y las células del cúmulo. Las células murales, se encuentran en la pared del folículo y son importantes para la esteroidogénesis y la ovulación, mientras que las células del cúmulo, rodean al oocito y son importantes para su crecimiento y desarrollo (**Fig. 1**) (Edson et al., 2009; Hirshfield, 1991; Matzuk et al., 2002). Este estadio de desarrollo

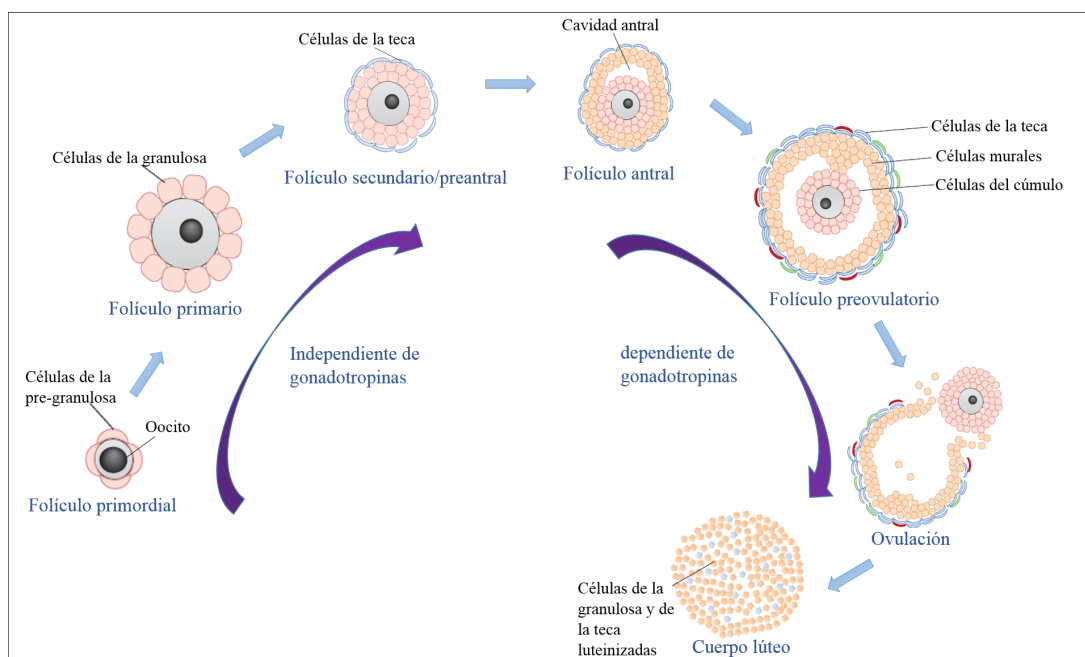
folicular también está caracterizado por un incremento en la vascularización que rodea las células de la teca, y por el crecimiento del oocito y del folículo por el efecto del fluido de la cavidad antral (Oktem & Urman, 2010). Se evidencia además, expresión de los receptores de las gonadotropinas FSH (en células de la granulosa) y LH (en células de la teca), y una transición en la regulación intraovárica a extraovárica, ya que el eje hipotálamo, hipófisis, gónada (HHG), comienza a tener una función importante en la foliculogénesis (Edson et al., 2009; Oktem & Urman, 2010).

Todos los folículos que alcanzan el estadio antral están destinados a sufrir atresia (Edson et al., 2009; McGee & Hsueh, 2000; Oktem & Urman, 2010; Kim, 2012). Sin embargo, en la pubertad, por la acción protectora de la FSH circulante, un pequeño número de folículos antrales es rescatado cíclicamente (Edson et al., 2009; McGee & Hsueh, 2000). Entre ellos, sólo uno será el folículo dominante destinado a ser ovulado durante cada ciclo reproductivo. Este folículo es conocido como folículo preovulatorio o folículo de Graaf (**Fig. 1**) (Edson et al., 2009; Fortune, 1994; McGee & Hsueh, 2000). Cabe mencionar que la FSH no sólo es importante para proteger a los folículos de la atresia. También previene la apoptosis de las células de la granulosa, estimula la expresión del receptor de la LH (*LHCGR*) y la producción de estradiol (Edson et al., 2009). El folículo seleccionado como preovulatorio es el que logra crecer mas rápido y tiene mayor respuesta a la estimulación por la FSH. Lo anterior se debe a un aumento de los factores de crecimiento locales y a la sobre-expresión de los receptores de FSH (*FSHR*), respectivamente. Una mayor respuesta a la FSH genera un mayor aumento en la expresión de *FSHR* y *LHCGR*, generando que este folículo produzca altos niveles de estrógenos e inhibinas, los cuales inhiben la liberación de esta gonadotropina en la

hipófisis. Como consecuencia, los folículos restantes, los cuales responden menos a la acción de la FSH, sufren atresia al ser privados de la estimulación adecuada necesaria para su supervivencia (Edson et al., 2009; McGee & Hsueh, 2000).

Además, en el folículo preovulatorio, *LHCGR* se expresa en las células de la granulosa murales en altas concentraciones, lo que permite que responda al pico ovulatorio de LH (Edson et al., 2009). El aumento de LH, el cual es originado en la hipófisis como consecuencia del incremento en la producción de estradiol folicular, desencadena una serie de eventos que culminan en la ovulación del oocito (**Fig. 1**). Entre estos eventos se encuentra el resurgimiento de la meiosis hasta la metafase II, la expansión del cúmulo y la ruptura folicular para la liberación del oocito competente para ser fertilizado. Por otra parte, las células de la granulosa y de la teca se transforman en el cuerpo lúteo (**Fig. 1**) (Edson et al., 2009; McGee & Hsueh, 2000; Matzuk et al., 2002).

Figura 1. Desarrollo folicular. Figura modificada de Georges *et al.*, 2014.



3.1.2 Factores genéticos que regulan el desarrollo folicular

El inicio del desarrollo folicular es controlado principalmente por factores producidos localmente, que actúan a nivel paracrino y autocrino (Gougeon, 2004; Oktem & Urman, 2010). Por lo tanto, la transcripción de numerosos genes esenciales para el crecimiento y la regulación se inicia en las etapas tempranas de la foliculogénesis (Gosden, 2002; Pangas & Rajkovic, 2006). La acción coordinada entre las señales inhibitorias y las señales activadoras, junto con una comunicación bidireccional entre el oocito y las células somáticas que lo rodean, es fundamental para este proceso (Gougeon, 2004; Kim, 2012; Oktem & Urman, 2010; Picton et al., 1998). Los factores inhibitorios son señales que mantienen el *pool* de folículos primordiales en estado de quiescencia, hasta que señales apropiadas disminuyen su expresión y por tanto se inicia la etapa del crecimiento folicular. Cuando fallan, ocurre un agotamiento prematuro de los folículos que conduce a falla ovárica prematura (FOP) (Kim, 2012; Oktem & Urman, 2010). Dentro de los principales factores inhibitorios se encuentran PTEN, FOXO3a, la hormona antimulleriana (AMH), y FOXL2.

PTEN (gen supresor de tumor homólogo de fosfatasa y tensina) se expresa exclusivamente en los oocitos (Oktem & Urman, 2010). En ratones *knockout* WT condicional, con delección en *Pten* de expresión oocito específico *OoPten*^{-/-}, se encontró un aumento de folículos primordiales sobreactivados y en crecimiento, lo que generó un agotamiento prematuro de los folículos primordiales (Kim, 2012; Oktem & Urman, 2010; Reddy et al., 2008). *Foxo3a* se expresa en el núcleo de los oocitos de los folículos primordiales (Kim, 2012). En ratones *Foxo3a*^{-/-} se evidenció infertilidad como

consecuencia del agotamiento prematuro de los folículos (Castrillon et al., 2014; Edson et al., 2009; Kim, 2012; Rajkovic et al., 2006).

En los humanos, *AMH* se expresa en las células de la granulosa de los folículos primordiales y en crecimiento (Edson et al., 2009; Rajkovic et al., 2006). Su función principal, es inhibir la transición del folículo primordial al primario, como también el crecimiento folicular estimulado por la FSH (al atenuar la sensibilidad a esta gonadotropina). Investigaciones con ratones *Amh*^{-/-} y con cultivos de tejidos ováricos humanos estimulados con AMH de rata, mostraron una disminución rápida y prematura de los folículos primordiales, como también de su crecimiento (Choi & Rajkovic, 2006; Durlinger et al., 1999; Edson et al., 2009; Gougeon, 2004; Kim, 2012; Oktem & Urman, 2010; Rajkovic et al., 2006).

FOXL2 en el ovario se expresa en las células de la pregranulosa y la granulosa (Edson et al., 2009; Pangas & Rajkovic, 2006). Su función principal en la foliculogénesis, está relacionada con la transición del folículo primordial al primario, en particular en la transición morfológica y funcional de las células de la granulosa aplanadas a cuboides (Edson et al., 2009; Oktem & Urman, 2010). Se ha relacionado también con la inhibición en el crecimiento de los folículos primordiales (Kim, 2012). En el ratón *Foxl2*^{-/-} se encontró una formación normal de los folículos primordiales pero una transición incompleta de las células de la granulosa aplanadas a cuboides, generando ausencia de folículos secundarios (Schmidt et al., 2004; Uda et al., 2004). También, se observó la interrupción en la proliferación de las células de la granulosa, el crecimiento retardado en el oocito y una disminución de la *Amh* (Choi & Rajkovic, 2006; Edson et

al., 2009; Kim, 2012; Oktem & Urman, 2010; Pangas & Rajkovic, 2006; Rajkovic et al., 2006).

Los factores activadores, son señales importantes que facilitan la activación de los folículos primordiales a primarios (Gosden, 2002; Kim, 2012; Oktem & Urman, 2010). Además, están involucrados en la progresión del crecimiento folicular, hasta en fases dependientes de gonadotropinas, como en la selección del folículo dominante y en la inhibición prematura de la luteinización (Oktem & Urman, 2010). Cuando fallan, ocurre infertilidad (Gosden, 2002; Oktem & Urman, 2010). Miembros de la superfamilia del factor- β de crecimiento transformante (TGF- β), como *GDF9* y *BMP15*, tienen un rol importante en la activación de la foliculogénesis (Gosden, 2002; Kim, 2012; Oktem & Urman, 2010; Picton et al., 1998).

GDF9 se expresa en los oocitos a partir del estadio de folículos primordiales (Oktem & Urman, 2010; Pangas & Rajkovic, 2006; Rajkovic et al., 2006). Es un marcador de la activación de los oocitos y su función está relacionada con el inicio y el progreso del crecimiento folicular mas allá del estadio primario. Además, promueve la supervivencia folicular al estar involucrado en el reclutamiento de las células de la granulosa, la diferenciación de las células de la teca y la prevención de la luteinización temprana (Edson et al., 2009; Gosden, 2002; Kim, 2012; Oktem & Urman, 2010; Picton et al., 1998; Rajkovic et al., 2006). Se encontró en el ratón *Gdf9*^{-/-} infertilidad como consecuencia del bloqueo en el desarrollo folicular mas allá del folículo primario (Dong et al., 1996; Elvin et al., 1999). También se observó crecimiento acelerado del oocito, disminución en la proliferación de las células de la granulosa, y ausencia de formación

de las células de la teca (Edson et al., 2009; Elvin et al., 1999; Gosden, 2002; Kim, 2012; Matzuk et al., 2002; McGee & Hsueh, 2000; Rajkovic et al., 2006).

BMP15 es un factor de crecimiento que también se expresa en los oocitos, particularmente en los folículos primarios en transición a folículos secundarios. Su función específica está relacionada con la estimulación de la proliferación de las células de la granulosa en una manera independiente de la acción de la FSH (Choi & Rajkovic, 2006; Gougeon, 2004; Matzuk et al., 2002; Oktem & Urman, 2010). Además, al igual que *GDF9*, previene la luteinización prematura (Oktem & Urman, 2010). Los ratones *Bmp15*^{-/-} son subfértiles con camadas más pequeñas que los ratones *wildtype* (Yan et al., 2001). Estudios realizados en ovejas Inverdale y Hanna mostraron que mutaciones puntuales en el péptido maduro de BMP15 estaban relacionadas con anomalías luego del estadio de folículo primario, e infertilidad en homocigotos. Los heterocigotos presentaron mayor fertilidad (Choi & Rajkovic, 2006; Matzuk et al., 2002; Oktem & Urman, 2010). En humanos, mutaciones puntuales en *BMP15* han sido relacionadas con FOP (Oktem & Urman, 2010; Laissue, 2015). Lo anterior, pone de manifiesto que existen diferencias interespecíficas en el modo de actuar de este gen (Oktem & Urman, 2010).

Otros factores activadores importantes son KIT/KIT ligando. KIT se expresa en los oocitos de los folículos primarios y en crecimiento, mientras KIT ligando lo hace en las células de la granulosa (Edson et al., 2009; Gosden, 2002). Las señales de KIT ligando se producen a través de KIT, el cual es un receptor transmembrana tirosina quinasa tipo III, que participa en la comunicación bidireccional entre el oocito y las células

somáticas (Gosden, 2002; Picton et al., 1998). Mutaciones que afectan a KIT o a KIT ligando están asociadas a defectos en los folículos primarios (Edson et al., 2009).

3.1.3 Eje Hipotálamo – hipófisis – Gónada

El eje Hipotálamo – Hipófisis – gónada (HHG), en la mujer, es fundamental en la regulación del desarrollo folicular (principalmente a partir del folículo antral), la esteroidogénesis ovárica, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo (Atwood et al., 2005; Matzuk & Lamb, 2008; Plant, 2008, 2015a). Los principales actores moleculares en el hipotálamo, son el neuropéptido kisspetina y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). En la hipófisis, las gonadotropinas FSH y LH tienen una función primordial. En los ovarios, los estrógenos, la progesterona, las inhibinas y las activinas son las principales moléculas reguladoras (Dagklis et al., 2015 Maggi et al., 2015).

La función de kisspeptina, codificada por el gen *KISS1*, es generar y regular la secreción pulsátil de GnRH al interactuar con su receptor KISSR, que se encuentra en las neuronas GnRH (Javed et al., 2015; Matzuk & Lamb, 2008; Plant, 2015). La GnRH, codificada por el gen *GNRHI*, estimula a los gonadotropos que se localizan en la hipófisis para que se produzca la liberación de la FSH y la LH en la circulación periférica (Plant, 2015b; Pohl & Knobil, 1982). La manera en la que se produce la secreción pulsátil de GnRH es importante para la liberación de estas gonadotropinas (Plant, 2015b; Pohl & Knobil, 1982). Los pulsos de alta frecuencia favorecen la secreción de FSH, mientras los de baja frecuencia favorecen la secreción de LH (Dagklis et al., 2015).

La FSH y la LH son glicoproteínas diméricas compuestas por una subunidad α y una subunidad β (Rajkovic et al., 2006). La subunidad α es codificada por el gen *CGA* y la comparten todas las gonadotropinas, junto con la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Rajkovic et al., 2006). La subunidad β es la que confiere la especificidad entre las hormonas y sus receptores, y determina la actividad biológica específica de cada hormona. (Rajkovic et al., 2006). La subunidad β de la FSH y la LH es codificada por el gen *FSHB* y *LHB*, respectivamente. Actúan directamente en el ovario, particularmente en las células de la granulosa y de la teca del folículo antral (Atwood et al., 2005; Edson et al., 2009; Oktem & Urman, 2010). Estas proteínas se encargan de regular la foliculogénesis, controlar la ovulación y hacen parte fundamental de la esteroidogénesis gonadal (Bedecarrats, 2014; Dubois et al., 2015; Maggi et al., 2015; Plant, 2008; Plant, 2015a).

Cuando la LH interactúa con su receptor LHCGR en las células de la teca interna, hay conversión de colesterol a androstenediona, iniciándose de esta manera la vía de la esteroidogénesis (Atwood et al., 2005; Filicori, 1999). Como estas células no pueden producir estrógenos (puesto que no expresan el gen de la aromatasa (*CYP19*)), la androstenediona tiene que atravesar la lamina basal para llegar a las células de la granulosa en donde sí se expresa *CYP19* (Atwood et al., 2005; Dagklis et al., 2015). La FSH al interactuar con su receptor en las células de la granulosa estimula la aromatasa para producir estradiol a partir de la androstenediona (Atwood et al., 2005; Dagklis et al., 2015; Filicori, 1999).

Por tanto, el producto final del HHG es la producción de estos esteroides ováricos, los

cuales tienen un rol central en la fisiología reproductiva (Plant, 2015b). Estas sustancias inhiben o estimulan la secreción pulsátil de GnRH regulando de esta manera el eje (Christensen, 2012; Herbison, 2016; Plant, 2015a). La regulación del eje se da por un *feedback* negativo y positivo a través de los receptores de estrógenos presentes en las kisspeptinas del núcleo arcuato (ARC) y del núcleo anteroventral periventricular (AVPV) del hipotálamo, respectivamente (Dubois et al., 2015; Javed et al., 2015; Matzuk & Lamb, 2008). El *feedback* negativo, está involucrado en la selección del folículo dominante al disminuir la secreción de la FSH (Hendrix et al., 2014; Plant, 2015a, Plant, 2015b). A medida que este folículo continua su crecimiento, se secretan altas cantidades de estradiol, y por *feedback* positivo la secreción de LH aumenta, concluyendo en la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Christensen, 2012; Dagklis et al., 2014; Hendrix et al., 2014; Javed et al., 2015; Plant, 1986). Si no hay embarazo la progesterona, por *feedback* negativo, desacelera los pulsos de GnRH al actuar sobre las kisspeptinas del ARC, lo que disminuye la producción de las gonadotropinas (Christensen, 2012; Dagklis et al., 2014; Hendrix et al., 2014; Javed et al., 2015; Plant, 1986). En la fase lútea tardía, como los esteroides gonadales escasean, su efecto negativo en la secreción de la FSH y la LH disminuye, por lo que el nivel de las gonadotropinas aumenta nuevamente iniciándose un nuevo ciclo (Dagklis et al., 2015).

Cabe mencionar, que en esta regulación también actúan de manera paracrina las activinas y las inhibinas (Knight et al., 2012; Matzuk & Lamb, 2008). Las activinas, aumentan la sensibilidad de las células de la granulosa por la FSH y suprimen la sensibilidad de las células de la teca por la LH, inhibiendo la producción de

androstenediona (Atwood et al., 2005; Knight et al., 2012). Sin embargo, el aumento en la sensibilidad a la FSH hace que se produzcan inhibinas, las cuales aumentan la sensibilidad de las células de la teca por la LH favoreciendo la producción de androstenediona (Atwood et al., 2005; Knight et al., 2012). Adicionalmente, estimulan su aromatización favoreciendo la producción de estradiol y progesterona (Dagklis et al., 2015).

3.2. Falla ovárica prematura

La edad promedio de la menopausia está alrededor de los 50 a 51 años de edad (Bilgin & Kovanci, 2015; Chapman et al., 2015; Conway, 2000; Persani et al., 2010). Sin embargo, en estados patológicos, esta puede ocurrir antes (antes de los 40 años) o después (alrededor de los 60 años) (Conway, 2000). Cuando ocurre antes de los 40 años se define como prematura y se denomina falla ovárica prematura (FOP) (Chapman et al., 2015; Conway, 2000).

3.2.1 Definición y diagnóstico

La FOP se conoce como el estadio final de la insuficiencia ovárica primaria (IOP), término que hace referencia al continuo y progresivo deterioro de la función ovárica, caracterizado por ovulación irregular (Cox & Liu, 2014; Van Dooren et al., 2009; Laissue, 2015; Nelson, 2009; Persani et al., 2010; Pu et al., 2014). Sin embargo, a lo largo del presente escrito se va a emplear el término FOP.

La FOP [OMIM 311360] se define cuando hay pérdida de la función ovárica antes de los 40 años, y por tanto, presencia en plasma de niveles elevados de FSH ($>40\text{UI/l}$) y LH, hipoestrogenismo, y amenorrea primaria o secundaria (mínimo por 4 - 6 meses) (Anasti, 1998; Chapman et al., 2015; Conway, 2000; Cox & Liu, 2014; Ebrahimi & Asbagh, 2015; Goswami & Conway, 2005; Laissue, 2015; Nelson, 2009; Persani et al., 2010; Pouresmaeili & Fazeli, 2014; Pu et al., 2014; Woad., et al 2006). Las principales consecuencias son la pérdida de la fertilidad y los efectos clínicos asociados a la deficiencia de estrógenos, como la osteoporosis, las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Ebrahimi & Asbagh, 2015; Laissue et al., 2008; Pu et al., 2014; Woad et al., 2006).

3.2.2 Epidemiología

La FOP, puede considerarse una patología frecuente al afectar aproximadamente al 1%-2% de la población femenina antes de los 40 años (Conway, 2000; Coulam et al., 1986; Luborsky., 2002). La frecuencia antes de los 30 años es del 0.1% y antes de los 20 años es del 0.01% (Anasti, 1998; Coulam et al., 1986; Ebrahimi & Asbagh, 2011). Aproximadamente del 10% al 28% de mujeres presentan amenorrea primaria y del 4% al 18% amenorrea secundaria (Anasti, 1998; Coulam et al., 1986; Ebrahimi & Asbagh, 2011; Goswami & Conway, 2005; Kokcu, 2010).

La incidencia de FOP puede variar entre los diferentes grupos étnicos (Luborsky et al., 2002). Se ha descrito 1% para las mujeres de origen caucásico, 1.4% para las mujeres de origen hispano y afro-americano, 0.5% para las mujeres de China y 0.1% para las mujeres de Japón (Luborsky et al., 2002).

3.2.3 Etiología

La FOP puede originarse por disminución de los folículos, o por alteración en los mecanismos de estímulo hormonal en el desarrollo folicular (Barchi et al., 2011; Nelson, 2009; Woad et al., 2006). La disminución de los folículos se produce por una reducción en el *pool* inicial de folículos primordiales, o por un incremento o aceleración de la atresia folicular durante la vida reproductiva (Christin-maitre et al., 1998; Cox & Liu, 2014; Ebrahimi & Asbagh, 2015; Nelson, 2009; Persani et al., 2010; Shelling, 2010; Vujović et al., 2012). Alteraciones en el desarrollo folicular incluyen, la deficiencia en la selección del folículo dominante, o la interrupción en la maduración del folículo (Christin-maitre et al., 1998; Cox & Liu, 2014; Ebrahimi & Asbagh, 2015; Nelson, 2009; Persani et al., 2010; Vujović et al., 2012).

Varias causas pueden activar estos mecanismos, por lo que la FOP es considerada una enfermedad heterogénea (Caburet et al., 2012; Chapman et al., 2015; F. van Dooren et al., 2009; Persani et al., 2010). Se ha encontrado que enfermedades autoinmunes y metabólicas, causas iatrogénicas, agentes infecciosos y ambientales, y factores genéticos (sindrómicos y condiciones aisladas) contribuyen a la etiología de la FOP (Barchi et al., 2011; Chapman et al., 2015; Cox & Liu, 2014; Ebrahimi & Akbari Asbagh, 2015; F. van Dooren et al., 2009; Goswami & Conway, 2005; Laissue et al., 2008, 2015; Persani et al., 2010; Pu et al., 2014). Sin embargo, más del 50% de los casos son idiopáticos (Chapman et al., 2015; Paul Laissue, 2015).

3.2.3.1 Enfermedades autoinmunes

Causas autoinmunes asociadas con la FOP se han encontrado en más del 30% de las mujeres (Conway et al., 1996; Vujović et al., 2012). La evidencia de esta relación, se fundamenta en la presencia de autoanticuerpos ováricos, trastornos autoinmunes asociados, estudios con tejido ovárico de mujeres afectadas y estudios con modelos murinos (Bakalov et al., 2005; Goswami & Conway, 2005).

La autoinmunidad en la FOP puede dividirse en dos: asociada con insuficiencia adrenal y asociada con otra enfermedad autoinmune (Anasti, 1998; Welt, 2008). La insuficiencia adrenal conduce a la enfermedad de Addison, la cual se ha encontrado en el 2 al 10% de los casos FOP (Goswami & Conway, 2005; Hoek et al., 1997; Welt, 2008). Esta enfermedad autoinmune órgano específica, se caracteriza por ooforitis autoinmune y por la presencia de anticuerpos contra células esteroideas (por lo que afecta al folículo secundario y antral) (Bakalov et al., 2005; Vujović et al., 2012). Puede darse, en la mayoría de los casos, asociado con trastornos endocrinos, como el síndrome poliglandular autoinmune (SPA) tipo I y II (Anasti, 1998; Hoek et al., 1997). El SPA tipo I es caracterizado por la asociación con hipoparatiroidismo y candidiasis mucocutánea crónica, afecta principalmente a niñas y produce FOP en aproximadamente el 60% de los casos (Anasti, 1998; Hoek et al., 1997; Persani et al., 2010; Welt, 2008). En el SPA tipo II se encuentra la insuficiencia adrenal asociada con hipotiroidismo. Ocurre principalmente entre los 30 y 40 años, y produce FOP en el 10% de los casos (Anasti, 1998; Hoek et al., 1997; Welt, 2008).

Entre los trastornos más frecuentes, asociados con otras enfermedades autoinmunes y FOP, se encuentran el hipotiroidismo (27%), la miastenia gravis (2.5%) y la diabetes mellitus (2.5%) (Anasti, 1998; Conway, 2000; Welt, 2008). También se ha encontrado FOP en la enfermedad de Crohn, en el vitíligo, en la anemia perniciosa, en la artritis reumatoide, en el lupus eritematoso sistémico, y en la hepatitis activa crónica (Anasti, 1998; Cox & Liu, 2014; Ebrahimi & Asbagh, 2011; Vujović et al., 2012).

3.2.3.2 Enfermedades metabólicas

Una de las primeras enfermedades metabólicas descritas, asociada con la FOP fue la galactosemia (Cox & Liu, 2014). Esta enfermedad se desarrolla debido a la deficiencia de la enzima Galactosa 1-fosofato uridiltransferasa (GALT), la cual esta encargada de convertir la galactosa a glucosa (Welt, 2008). Generalmente, y como consecuencia de la acumulación de la galactosa y sus metabolitos, se encuentra afectación en los sistemas ocular, renal, hepático y daño neurológico (Anasti, 1998; Cox & Liu, 2014; Ebrahimi & Asbagh, 2011). Entre el 70% – 80% de las mujeres con galactosemia desarrolla FOP (Anasti, 1998; Kokcu, 2010). Aún no está claro, si la FOP que presentan estas pacientes, se debe a un incremento en la apoptosis de los oocitos como consecuencia de la acumulación intracelular de los metabolitos de la galactosa, ó a una disminución en la estimulación ovárica y a un incremento en la atresia folicular por reacciones de glicosilación deficientes (Goswami & Conway, 2005; Kokcu, 2010; Persani et al., 2010). Diversos estudios con modelos murinos y pacientes han mostrado resultados no concordantes (Anasti, 1998; Kokcu, 2010).

También se ha encontrado FOP en pacientes con deficiencia de las enzimas Fosfomanomutasa 1 (PMM1), 17 α -hidrolasa/17,20-liasa (CYP17A1), y de la aromatasasa (Cox & Liu, 2014).

3.2.3.3. Causas iatrogénicas

Entre los principales mecanismos iatrogénicos que se asocian a FOP están la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía pélvica (Cox & Liu, 2014; Goswami & Conway, 2005; Shelling, 2010; Vujović et al., 2012; Welt, 2008). La quimioterapia conduce a FOP, ya que reduce el número, la estructura, y la función de los oocitos, y de las células de la granulosa y de la teca (Goswami & Conway, 2005; Kokcu, 2010; Shelling, 2010). Sin embargo, el riesgo de desarrollar FOP esta determinado por la edad, la dosis, y el tipo droga (Anasti, 1998; Ebrahimi & Asbagh, 2011; Goswami & Conway, 2005; Kokcu, 2010; Vujović et al., 2012; Welt, 2008). Se ha encontrado que a mayor edad hay mayor riesgo, observándose en las niñas mayor resistencia a los daños causados por la quimioterapia (Anasti, 1998; Kokcu, 2010; Welt, 2008). Además, estudios han demostrado que el empleo de drogas alcalinas, las cuales destruyen las células al alterar la estructura del ADN, pueden incrementar el riesgo de desarrollar FOP hasta en nueve veces más (Anasti, 1998; Cox & Liu, 2014; Kokcu, 2010).

La radioterapia, conduce a FOP, ya que afecta a las células de la granulosa y acelera la atresia folicular (Cox & Liu, 2014; Welt, 2008). Al igual que con la quimioterapia, sus efectos perjudiciales en el ovario dependen de la edad, la dosis, y el campo de radioterapia (Anasti, 1998; Goswami & Conway, 2005; Kokcu, 2010). Se ha observado, que se necesitan dosis de 20 Gy para que se produzca FOP en mujeres menores de 40

años, mientras que con dosis de sólo 6 Gy ocurre FOP en mujeres mayores de 40 años (Anasti, 1998; Ebrahimi & Asbagh, 2011; Kokcu, 2010; Vujović et al., 2012). Además, otros estudios demuestran que existe un menor riesgo, cuando los campos de radiación se producen por fuera de la pelvis (Cox & Liu, 2014; Goswami & Conway, 2005; Kokcu, 2010).

Por otro lado, la cirugía pélvica esta asociada con FOP, ya que puede afectarse el suministro sanguíneo o causar inflamación en el área, generando daño ovárico (Conway, 2000; Cox & Liu, 2014; Goswami & Conway, 2005; Kokcu, 2010). La embolización de la arteria uterina también se ha relacionado con FOP (Goswami & Conway, 2005; Vujović et al., 2012).

3.2.3.4 Agentes infecciosos y ambientales

Parotiditis se ha encontrado en aproximadamente el 2% al 8% de mujeres con FOP, siendo la infección viral que principalmente se asocia con esta patología (Goswami & Conway, 2005; Kokcu, 2010; Morrison et al., 1975; Vujović et al., 2012). FOP también se ha encontrado en mujeres que presentan infecciones con citomegalovirus, varicela, VIH, malaria, tuberculosis y shigella (Cox & Liu, 2014; Ebrahimi & Asbagh, 2011; Kokcu, 2010).

Con respecto a agentes ambientales, el cigarrillo principalmente se asocia con FOP (Anasti, 1998). Se ha encontrado que en mujeres fumadoras la menopausia ocurre mas temprano en comparación con mujeres no fumadoras (Anasti, 1998; Goswami & Conway, 2005; Welt, 2008). Otros agentes ambientales como metales pesados,

pesticidas, plasticidas y químicos industriales pueden afectar la correcta función ovárica y estar relacionados con FOP (Goswami & Conway, 2005; Vujović et al., 2012).

3.2.3.5 Factores genéticos

En análisis genético de pacientes con FOP sindrómica y no sindrómica se han identificado causas asociadas con el desarrollo de esta enfermedad entre las que se incluyen anomalías cromosómicas y variantes de secuencia presentes tanto en el cromosoma X como en los autosomas (Chapman et al., 2015; Laissue et al., 2008, 2015).

3.2.3.5.1 Causas sindrómicas

Las causas sindrómicas están asociadas con anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, como también con genes aislados como el gen *FMRI* y el gen *FOXL2* (Chapman et al., 2015; Persani et al., 2010; Powell et al., 1994).

Síndrome de Turner

El síndrome Turner (ST) es la patología mas común que asocia una anomalía cromosómica con POF (Bilgin & Kovanci, 2015; Kokcu, 2010). Se encuentra aproximadamente en 1 de cada 2500 niñas recién nacidas y puede generarse por la delección total o parcial de un cromosoma X (Albanese et al., 1994; Bilgin & Kovanci, 2015; Chapman et al., 2015; Persani et al., 2010). En niñas con ST se ha encontrado en aproximadamente el 50% de los casos el cariotipo 45,X (Persani et al., 2010; Welt, 2008). En el resto de los casos se han encontrado el mosaico 45X/46XX (asociado a fenotipos mas leves) y anomalías estructurales cromosómicas como delecciones e

isocromosomas (Persani et al., 2010; Welt, 2008). Las principales manifestaciones clínicas de este síndrome son el cuello alado, el epicanto, la estatura corta y la disgenesia ovárica (Barchi et al., 2011; Goswami & Conway, 2005). En pacientes con cariotipo 45,X se observa amenorrea primaria y niveles elevados de FSH en la infancia, como consecuencia de una pérdida de oocitos secundaria a una atresia folicular acelerada hacia la semana 20 de gestación (Albanese et al., 1994; Barchi et al., 2011; Chapman et al., 2015; Christin-maitre et al., 1998; Persani et al., 2010). No obstante, entre el 30% al 40% de los mosaicos puede experimentar pubertad espontánea, la cual puede permanecer por varios años hasta que desarrollan FOP (Persani et al., 2010; Welt, 2008). La falla ovárica que presentan las niñas con ST puede ser explicada por la haploinsuficiencia de genes importantes para el correcto funcionamiento ovárico que escapan a la inactivación del cromosoma X (Bilgin & Kovanci, 2015; Ebrahimi & Asbagh, 2011; Paul Laissue, 2015; Persani et al., 2010).

Por otro lado, aparte de las anomalías cromosómicas asociadas con el ST, también es frecuente observar en el cariotipo de pacientes con FOP, trisomías, deleciones y translocaciones que principalmente involucran al cromosoma X (Ebrahimi & Asbagh, 2011; Marozzi et al., 2000; Powell et al., 1994). Por medio de análisis citogenéticos y moleculares en estas pacientes se han identificado tres regiones críticas, que se consideran importantes para la función ovárica normal y que por lo tanto tienen genes candidatos para FOP (Chapman et al., 2015; Kokcu, 2010; Paul Laissue, 2015; Marozzi et al., 2000; Powell et al., 1994). En el brazo largo del cromosoma X se localizan los loci FOP-1 (Xq23 – Xq27) y FOP-2 (Xq13.3 – Xq21.1) (Anasti, 1998; Chapman et al., 2015; Kokcu, 2010; Marozzi et al., 2000; Powell et al., 1994; Shelling, 2010). Las

deleciones principalmente ocurren en la región FOP-1 y están asociadas con la aparición de FOP entre los 24 y los 39 años, mientras que las translocaciones (balanceadas entre el cromosoma X y un autosoma) ocurren frecuentemente en la región FOP-2 y están asociadas con aparición de FOP a edades más tempranas (entre los 16 y los 21 años) (Chapman et al., 2015; Kokcu, 2010; Marozzi et al., 2000; Powell et al., 1994; Shelling, 2010). Algunos de los genes candidato asociados con FOP que se encuentran en estos dos loci son: *XIST*, *DIAPH2*, *XPNPEP2*, *POF1B*, *ATZ*, *CHM* y *FRM1* (Cox & Liu, 2014; Marozzi et al., 2000; Persani et al., 2010). En el brazo corto del cromosoma X se identificó el locus Xp11-p22.1 (FOP-3), en donde ocurren deleciones que están asociadas, en el 50% de los casos, con amenorrea primaria y en el otro 50% con amenorrea secundaria (Ebrahimi & Asbagh, 2011; Vujović et al., 2012). En esta región se encuentran los posibles genes candidato, *USP9X*, *ZFX* y *BMP15* (Cox & Liu, 2014).

Síndrome del X frágil

El gen *FMRI* (*Fragile X mental retardation I*) se localiza en la región cromosómica Xq27.3. Tiene, en la región 5'UTR, repeticiones en tándem del trinucleótido CGG, que de acuerdo a su número determinan el estado normal (6 a 54 repeticiones), el de premutación (55 a 200 repeticiones) y de mutación del gen (>200 repeticiones) (Cox & Liu, 2014; Murray et al., 1998; Persani et al., 2010). Codifica para la proteína FMRP (*Fragile X mental retardation protein*), proteína de unión al RNA que regula la traducción de ciertos RNAm a través de mecanismos de supresión (Persani et al., 2010). Cuando existe mutación, esta proteína se silencia por hipermetilación, presentándose como resultado el síndrome del X frágil, de herencia dominante ligada al X, el cual está

asociado con retraso mental y retraso en el desarrollo (Persani et al., 2010). Premutaciones en el gen *FMRI* (Fragile X mental retardation 1), no están asociadas a retraso mental pero en mujeres portadoras se ha encontrado predisposición a desarrollar FOP (Barchi et al., 2011; Chapman et al., 2015; Cox & Liu, 2014; Murray et al., 1998; Persani et al., 2010). En 1 de cada 100 – 200 mujeres se encuentra la premutación, desarrollándose FOP en aproximadamente el 13% al 28% de los casos (Barchi et al., 2011; Bilgin & Kovanci, 2015). Cuando hay premutaciones, se encuentra sobreexpresión del RNAm, por lo que se ha hipotetizado que la FOP que desarrollan estas mujeres puede ser causada a un efecto tóxico de la acumulación de RNAm mutado en el ovario que generaría una excesiva atresia folicular (Barchi et al., 2011; Bilgin & Kovanci, 2015; Chapman et al., 2015; Murray et al., 1998; Persani et al., 2010). Además, teniendo en cuenta que FMRP es altamente expresada en las células germinales del ovario fetal, su acumulación anormal puede afectar la expresión de genes importantes para el desarrollo del oocito, generando como consecuencia una disminución en el pool inicial de folículos (Barchi et al., 2011; Bilgin & Kovanci, 2015; Chapman et al., 2015; Murray et al., 1998; Persani et al., 2010).

Por otro lado, se ha encontrado en el 1.5% de mujeres con FOP microdeleciones en el gen *FMR2* (*Fragile mental retardation 2*), por lo que también se ha asociado con la predisposición a desarrollar FOP (Murray et al., 1999).

Síndrome de BPES

El síndrome de Blefarofimosis – Ptosis – Epicanto inverso (BPES; MIM #110100), es de herencia autosómica dominante (Persani et al., 2010). Involucra anomalías

cráneo-faciales y palpebrales que pueden estar asociadas con FOP (BPES tipo I) o no (BPES tipo II) (Goswami & Conway, 2005; Harris et al., 2002; Laissue et al., 2009; Persani et al., 2010). Las mutaciones de *FOXL2* están relacionadas con este síndrome, el cual se localiza en el cromosoma 3q23 y codifica para la proteína Forkhead box L2, miembro de la familia de factores de transcripción *Forkhead* (Persani et al., 2010; Welt, 2008). Esta proteína tiene dos dominios altamente conservados en los mamíferos (Chapman et al., 2015). Está compuesto por un dominio de unión al DNA tipo hélice alada (*winged helix*), característico de todos los miembros de esta familia de factores de transcripción, y un dominio compuesto por un tracto de 14 residuos de alanina (poli-alanina), importante para la actividad represora de la proteína (Persani et al., 2010; Welt, 2008). Se expresa principalmente en el ovario, la región cráneo-facial y en la hipófisis (Woad et al., 2006). Con respecto al ovario, los blancos transcripcionales de *FOXL2* son principalmente genes involucradas en la esteroidogénesis, como el gen *STAR* (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*), y el gen del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (*GNRH*) (Batista et al., 2007; Persani et al., 2010; Welt, 2008).

La asociación de este gen con los dos tipos de BPES, fue evidenciada funcionalmente mediante la creación del ratón *knock-out Foxl2^{-/-}*, en el cual se encontraron características clínicas similares a las que presentan pacientes con este síndrome (Uda et al., 2004). Los machos y las hembras eran pequeños y presentaron anomalías en la morfología cráneo-facial con párpados superiores ausentes y únicamente las hembras eran infértiles (Uda et al., 2004). Además, se observó una incapacidad de las células de la granulosa para diferenciarse correctamente en el momento de la formación del

folículo primordial lo que explicaría en gran medida la FOP encontrada en las pacientes (Uda et al., 2004).

En los humanos, se han identificado mutaciones intragénicas (80% de los casos) y deleciones de todo el gen (12% de los casos) (Persani et al., 2010). En las mutaciones intragénicas, se ha evidenciado una correlación genotipo – fenotipo, donde mutaciones que generan proteínas truncadas se asocian con BPES tipo I, mientras que mutaciones que generan expansiones del tracto de alaninas están asociadas con BPES tipo II (Persani et al., 2010; Woad et al., 2006). Sin embargo, no en todos los casos se observa esta correlación, por lo que se ha propuesto clasificar las mutaciones en mutaciones que alteran la interacción proteína – proteína y las que alteran la interacción con el ADN (Persani et al., 2010).

Por otro lado, es importante mencionar que, aunque no son muy frecuentes, se han encontrado mutaciones en *FOXL2* en pacientes con FOP no sindrómico (Baere et al., 2001; Gersak et al., 2004; Harris et al., 2002; Laissue et al., 2009a). En un estudio de 70 mujeres, de Nueva Zelanda y Eslovenia, con FOP idiopática, se hizo un *screening* de la región codificante de *FOXL2* y se encontraron dos variantes asociadas con el fenotipo (Harris et al., 2002). En una paciente se encontró la variante heterocigota c.661_690del (p.Ala221_Ala230del), la cual remueve 10 de las 14 alaninas encontradas en el dominio poli-alanina, y en la otra paciente se encontró la variante heterocigota c.772T>A (p.Tyr258Asn) (Gersak et al., 2004; Harris et al., 2002). En otro estudio se describió la variante heterocigota c.560G>A (p.Gly187Asp), la cual se encontró en una mujer de origen tunecino con FOP idiopática (Laissue et al., 2009a). Esta variante se validó

funcionalmente como causal del fenotipo al encontrarse que, aunque no afectaba la localización subcelular, sí disminuía significativamente la capacidad de transactivación (Laissue et al., 2009a).

3.2.3.5.2 Causas no sindrómicas

Las causas genéticas asociadas a FOP no sindrómica han sido establecidas principalmente por tamizaje de genes candidato en mujeres afectadas y por análisis de ligamiento en familias (Laissue et al., 2008, 2015). Los genes candidato han sido identificados por su función (involucrados en la foliculogénesis y la función ovárica), y mediante la creación de modelos animales, principalmente murinos (Chapman et al., 2015; Laissue et al., 2008; Shelling, 2010). Otras metodologías como el análisis de asociación de genoma completo (GWAS) y la secuenciación de siguiente generación (NGS) también han permitido identificar factores genéticos potencialmente asociados con FOP (Bilgin & Kovanci, 2015).

Numerosas variantes de secuencia han sido identificadas en genes candidato en pacientes con FOP como *GDF9*, *INHA*, *FOXO4*, *FOXO3a*, *CYP19A1*, *ESR1*, *CITED2*, *NOG*, *LAMC1*, *MSH5*, *POF1B*, *FSHB*, *LHB*, *CDKN1B*, entre otros (Barchi et al., 2011; Ebrahimi & Asbagh, 2011; F. van Dooren et al., 2009; Fonseca et al., 2012; Goswami & Conway, 2005; Laissue et al., 2008, 2015; Ojeda et al., 2011; Pyun et al., 2012). Sin embargo, sólo variantes en los genes descritos a continuación han sido validadas funcionalmente como causales de FOP no sindrómica (Laissue, 2015).

3.2.3.5.2.1 Factores de crecimiento

BMP15

El gen *BMP15*, se localiza en el cromosoma Xp11.2. Codifica para la proteína *bone morphogenetic 15*, compuesta por un péptido señal, una larga pro-región y un péptido maduro. Los dímeros activos maduros (homodímeros BMP15:BMP15 o heterodímeros BMP15:GF9) se forman luego de la remoción del péptido señal y del clivaje proteolítico en un sitio conservado que se encuentra entre la pro-región y el péptido maduro (Laissue et al., 2008). Se expresa exclusivamente en los oocitos. Los modelos animales se describieron en la sección 3.1.2

La primera variante heterocigota descrita en este gen asociada con FOP fue la c.704A>G (p.Tyr235Cys), encontrada en dos hermanas de origen italiano con amenorrea primaria (Di Pasquale et al., 2004). Esta variante fue analizada funcionalmente y se encontró que generaba una reducción en el crecimiento de las células de la granulosa, una pérdida de la actividad estimuladora y producía un efecto dominante negativo sobre la proteína *wildtype*, por lo que se validó como causal de la FOP encontrada en las dos hermanas (Di Pasquale et al., 2004). A partir de este estudio, se ha secuenciado este gen en un largo número de pacientes con FOP de diferentes orígenes étnicos, y se han encontrado variantes heterocigotas *missense*, situadas principalmente en la región del gen que codifica para el dominio pro-región, la cual es importante en la dimerización y la secreción de los dímeros activos maduros (Di Pasquale et al., 2006; Dixit et al., 2006; Laissue et al., 2006; Rossetti et al., 2009; Tiotiu et al., 2010; Wang et al., 2010). Sin embargo, pocas han sido validadas como causales de la enfermedad. Rossetti *et al*, analizaron funcionalmente las variantes heterocigotas

c.202C>T (p.Arg68Trp), c.413G>A (p.Arg138His) y c.443T>C (p.Leu148Pro) ubicadas en el dominio del propéptido y encontraron que estas variantes generaban una reducción marcada en la producción de la proteína madura (Rossetti et al., 2009). Fonseca *et al*, analizaron la variante c.-9G>C, por medio de un ensayo reportero de luciferasa, y encontraron que este cambio generaba alteraciones en la transactivación del promotor (Fonseca et al., 2014). Recientemente, Patiño *et al*, analizaron el efecto de variantes previamente asociadas con la FOP (entre ellas las tres validas funcionalmente por Rosseti *et al*) en diferentes procesos biológicos (Patiño et al., 2017). Encontraron, por medio de ensayos funcionales, que las variantes c.443T>C (p.Leu148Pro), c.581T>C (p.Phe194Ser) y c.704A>G (p.Tyr235Gly) generaban disminución en la producción de la proteína madura (Patiño et al., 2017). Asimismo, encontraron que las variantes c.413G>A (p.Arg138His) y c.538G>A (p.Ala180Thr) disminuyeron significativamente la actividad de BMP15. Por otro lado, las variantes c.202C>T (p.Arg68Trp), c.581T>C (p.Phe194ser) y c.588T>A (p.Asn196Lys) redujeron significativamente la habilidad de unirse con GDF9 (Patiño et al., 2017). Además, en este estudio, por medio de secuenciación directa de BMP15, realizado en 35 mujeres con FOP, identificaron y validaron funcionalmente la variante c.986G>A (p.Arg329His) (Patiño et al., 2017). Esta variante disminuyó significativamente la actividad de esta proteína (Patiño et al., 2017).

3.2.3.5.2.2 Factores de transcripción específicos del oocito

NR5A1

El receptor nuclear de la subfamilia 5, grupo A, miembro 1 (*NR5A1*) se localiza en el cromosoma 9q33 y codifica para el Factor Esteroidogénico 1 (SF1). SF1 es un

regulador transcripcional de varios genes involucrados en la reproducción, el desarrollo gonadal y la esteroidogénesis, como *CYP11A1*, *CYP19A1*, *INHA*, *AMH*, *LHB* y *STAR* (Jiao et al., 2013; Lakhal et al., 2012; Lourenco et al., 2009; Philibert et al., 2013). Se expresa en el hipotálamo, la hipófisis, el bazo, la corteza adrenal y el ovario (Camats et al., 2012; Laissue, 2015; Lakhal et al., 2012; Suwanai et al., 2013).

Las primeras variantes de secuencia descritas que fueron funcionalmente asociadas con FOP fueron c.386C>T (p.Pro129Leu) y c.877G>A (p.Asp293Asn), y las delecciones: c.390delG (p.Pro131fs), c.666delC (p.Asn222fs) y c.691_699del (p.Leu231_Leu233del) encontradas en familias afectadas con anormalidades en el desarrollo sexual 46,XY y disgenesia gonadal 46,XX, y en mujeres no emparentadas con FOP (Lourenco et al., 2009). Por medio de análisis funcionales se encontró que estas variantes generaban una disminución significativa en la actividad transactivacional de SF1 en los promotores de los genes *CYP11A1* y *CYP19A1* (Lourenco et al., 2009).

A partir de ese momento, se secuenció de manera más amplia este gen en pacientes con FOP no sindrómica encontrándose numerosas variantes *missense*, *nonsense* y *frameshift* en pacientes de diferentes orígenes étnicos (Camats et al., 2012; Janse et al., 2012; Jiao et al., 2013; Lakhal et al., 2012; Philibert et al., 2013; Suwanai et al., 2013; Voican et al., 2013). Entre las variantes encontradas, sólo las variantes heterocigotas c.13T>G (p.Tyr5Asp), c.704C>T (p.Pro235Leu), c.763C>T (p.Arg255Cys) y c.768delC (p.Asp257fs) han sido validadas funcionalmente como causales de FOP. Se encontró que cada una de ellas conducía a una disminución en el efecto de transactivación de promotores de genes importantes en la foliculogénesis, sin que existiera un efecto

dominante negativo (Camats et al., 2012; Jiao et al., 2013; Philibert et al., 2013; Suwanai et al., 2013).

NOBOX

El gen *Newborn ovary homeobox (NOBOX)* esta ubicado en el cromosoma 7q35. Codifica para un regulador transcripcional homeobox específico del ovario, el cuál es importante en la etapa inicial de la foliculogénesis al regular la expresión de genes como *BMP15*, *GDF9* y *KITLG* (Bouilly et al., 2015, 2011; Chapman et al., 2015; Laissue, 2015; Qin et al., 2009). NOBOX tiene un homodeominio altamente conservado, el cual es el dominio de fijación al ADN (Laissue, 2015).

En el ratón *Nobox*^{-/-} se observó luego del nacimiento una pérdida acelerada de los oocitos, semejándose al fenotipo de FOP no sindrómica observado en los humanos, por lo que se han efectuado varios estudios, en diferentes poblaciones, que tratan de establecer la relación de este gen con la FOP (Bouilly et al., 2015, 2011; Chapman et al., 2015; Qin et al., 2007, 2009; Rajkovic et al., 2004; Zhao et al., 2005). La variante heterocigota c.1064G>A (p.Arg355His), encontrada en una paciente de origen caucásico, fue la primera validada funcionalmente (Qin et al., 2007). Mediante un ensayo en el cambio de la corrida electroforética (EMSA) se encontró que esta variante interrumpía la unión del homodeominio al ADN. Además se encontró que tenía un efecto negativo dominante sobre la proteína NOBOX *wildtype* (Qin et al., 2007). Posteriormente, se encontraron y validaron funcionalmente las variantes heterocigotas c.271G>T (p.Gly91Trp), c.349C>T (p.Arg117Trp), c.907C>T (p.Arg303Ter), c.1025G>C (p.Ser342Tyr), c.1048G>T (p.Val350Leu), c.331G>A (p.Gly111Arg),

c.1112A>G (p.Lys371Thr) y c.1856C>T (p.Pro619Leu) (Bouilly et al., 2015, 2011). Se encontró, por medio de ensayos reporteros de luciferasa, que estas variantes generaban una pérdida de la transactivación de los promotores de los genes *GDF9* y *KITLG* (Bouilly et al., 2015, 2011). En la población asiática no se han encontrado variantes en este gen, sugiriendo que las encontradas hasta el momento son de población específica (Qin et al., 2009; Zhao et al., 2005).

FIGLA

El gen *Factor in germline alpha* (*FIGLA*) se localiza en el cromosoma 2p13.3. Codifica para un factor de transcripción tipo *hélix loop hélix* (bHLH), específico del ovario, el cual regula la expresión de genes de la zona pelúcida y genes específicos de los oocitos importantes para el inicio de la foliculogénesis (Chapman et al., 2015; Laissue, 2015; Zhao et al., 2008). Los factores de transcripción bHLH son altamente conservados, forman heterodímeros con el factor de transcripción 3 (TCF3) y regulan los promotores de sus genes blanco mediante unión a secuencias consenso llamadas E-box (Laissue, 2015; Zhao et al., 2008).

En el ratón *Figla*^{-/-} se evidencia postnatalmente una pérdida temprana de los oocitos y una ausencia en la formación de los folículos primordiales, haciéndolo un claro gen candidato para FOP no sindrómica. Sin embargo, hasta la fecha, sólo dos estudios que evalúan variantes en el gen *FIGLA* en pacientes con FOP se han realizado (Tosh et al., 2015; Zhao et al., 2008). En un estudio realizado con pacientes chinos, se encontró y validaron las deleciones heterocigotas, c.15_36del (p.Gly6fs*66) y c.419_421del (p.Asn140del) (Zhao et al., 2008). La deleción c.15_36del generó un codón de parada

premature, por lo que se concluyó que el efecto patogénico era probablemente consecuencia de una haploinsuficiencia (Zhao et al., 2008). Por otro lado, se encontró, por medio de un ensayo de doble híbrido, que la variante c.419_421del alteraba significativamente la dimerización con TCF3, por lo que el efecto patogénico de esta variante podría estar determinado por un efecto dominante negativo o por una disminución de heterodímeros funcionales (Zhao et al., 2008).

3.2.3.5.2.3 Receptores de gonadotropinas

FSHR

El gen que codifica para el receptor de la hormona folículo estimulante (*FSHR*) se localiza en el cromosoma 2p16.3 (Kuechler et al., 2010). *FSHR*, es miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G, los cuales cuando se activan transmiten la señal a partir del segundo mensajero cAMP (Allen et al., 2003; Doherty et al., 2002). Esta compuesto por siete dominios transmembrana y un dominio extracelular que interactúa con la hormona folículo estimulante (FSH). Se expresa en las células de la granulosa en el ovario y en las células de Sertoli en los testículos. En el ovario regula la maduración de los folículos y estimula la producción de estrógenos (Allen et al., 2003; Kuechler et al., 2010). En las hembras del ratón *knock-out Fshr^{-/-}* se observaron el útero delgado, los ovarios pequeños y esterilidad como consecuencia del arresto de la foliculogénesis antes de la formación del folículo antral, lo que lo convirtió en un claro gen candidato de FOP (Dierich et al., 1998).

Variantes de secuencia en este gen relacionadas con la FOP no sindrómica han sido encontradas y validadas funcionalmente (Laissue, 2015). La primera variante en ser

descrita fue c.566C>T (p.Ala189Val), encontrada por medio de análisis de ligamiento, en varias pacientes de origen finlandés con hipogonadismo hipergonadotrófico y amenorrea primaria (Aittomaki et al., 1995). Análisis funcionales mostraron que esta variante producía una reducción en la capacidad de unión con el ligando y en la transducción de la señal (Aittomaki et al., 1995). En otro estudio, esta variante junto con la variante c.1255G>A (p.Ala459Thr) fue encontrada en una paciente de origen finlandés con amenorrea primaria (Doherty et al., 2002). Por análisis funcionales se encontró que la variante c.1255G>A (p.Ala459Thr) tenía un efecto mínimo en la afinidad de unión con el ligando pero disminuía casi totalmente la transducción de la señal (Doherty et al., 2002). Otras variantes heterocigotas compuestas como la c.671A>T (p.Asp224Val) // c.1801C>G (p.Leu601Val), y c.479C>T (p.Ile160Thr) // c.1717C>T (p.Arg573Cys), las cuales producen principalmente disminución en la transducción de la señal, se han encontrado en dos pacientes con amenorrea primaria y secundaria, respectivamente, (Beau et al., 1998; Kuechler et al., 2010; Touraine et al., 1999).

También han sido descritas otras variantes homocigotas en pacientes con amenorrea primaria (Allen et al., 2003). La variante c.1043C>T (p.Pro348Arg) generó una completa pérdida de función del receptor al disminuir casi totalmente la unión con el ligando y la transducción de la señal (Allen et al., 2003). La variante c.1555C>A (p.Pro519Thr) alteró la localización celular del receptor y produjo una pérdida en la señal de transducción (Meduri et al., 2003). Finalmente, la variante c.1760C>A (p.Pro587His) encontrada en una paciente que también tenía una delección de 163Kb y

que involucraba al exón 9 y 10, generó una disminución casi total de transducción de la (Kuechler et al., 2010).

LHCGR

El gen *LHCGR* se revisará detalladamente en la sección 3.3 ya que hace parte principal de la temática de esta tesis.

3.2.3.5.2.4 Otros genes

NANOS3

El gen *Nanos C2HC-type zinc finger 3 (NANOS 3)* se localiza en el cromosoma 9p13.13. Codifica para una proteína de unión al ARN con función represora, la cual tiene el dominio de interacción tipo dedos de zinc CCHC, altamente conservado (Laissue, 2015; Santos et al., 2014). Se expresa en las gónadas femeninas y masculinas, tanto en el estadio fetal como en el adulto (Santos et al., 2014).

Este gen fue considerado como candidato para FOP no sindrómica, ya que las hembras de ratón *Nanos3^{-/-}* presentaron ovarios atróficos sin células germinales detectables, debido a un incremento en la apoptosis (Santos et al., 2014). Por medio de ensayos *in vitro*, se ha comprobado la importante función de la proteína NANOS3 en las células germinales humanas (Santos et al., 2014). Hasta la fecha sólo dos variantes relacionadas con FOP se han encontrado y han sido validadas funcionalmente (Santos et al., 2014; Wu et al., 2013). La primera fue la variante heterocigota c.457C>T (p.Arg153Trp) encontrada en una paciente china (Wu et al., 2013). Se demostró, por medio de ensayos bioquímicos, que esta variante disminuía la estabilidad de NANOS3 (Wu et al., 2013).

La siguiente variante reportada, fue la variante homocigota c.358G>A (p.Glu120Lys), localizada en el dominio de dedos de zinc, encontrada en dos hermanas brasileñas con amenorrea primaria (Santos et al., 2014). Esta variante, aunque no afectó la localización celular, aumentó significativamente los niveles de apoptosis. Estos resultados demostraron la función de NANOS3 como inhibidor de la apoptosis de las células germinales primordiales (Laissue, 2015; Santos et al., 2014).

STAG3

El gen *stromal antigen 3* (*STAG3*) se localiza en el cromosoma 7q22.1. Codifica para una subunidad de la cohesina específica de la meiosis implicada en el adecuado apareamiento y segregación de los cromosomas (Caburet et al., 2014). Esta proteína se expresa al inicio de la espermatogénesis y oogénesis (Caburet et al., 2014). Las hembras de ratones *Stag3*^{-/-}, presentaron disgenesia gonadal temprana generada por la ausencia de oocitos y folículos ováricos, y fueron estériles (Caburet et al., 2014). En estos animales se observó que, debido que los oocitos quedaban arrestados en la profase I temprana, se generaba depleción de los oocitos hacia la primera semana de edad, como también una pérdida de la cohesión en la región centrómerica de las cromátidas hermanas (Caburet et al., 2014).

Hasta la fecha, en este gen sólo se ha encontrado una delección homocigota de 1pb en cuatro hermanas con FOP en una familia consanguínea de palestina (Caburet et al., 2014). Esta variante, c.968delC (p.Phe187fs), se encontró mediante la secuenciación del exoma de toda la familia y generó un codón de parada prematuro pues se traducían 8 de los 34 exones (Caburet et al., 2014). En la proteína mutada se perdió el dominio tipo

armadillo (ARM), encargado de la interacción con otras proteínas o ácidos nucleicos (Caburet et al., 2014).

3.3. LHCGR

3.3.1 Gen *LHCGR*

El gen *LHCGR* (*Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor*) (MIM*152790), fue mapeado mediante la técnica de hibridación *in situ* en el brazo corto del cromosoma 2 (2p21) (Rousseau-Merck et al., 1990).

Su promotor se encuentra en la posición -1pb a -176pb corriente arriba a partir del ATG. En esta región se localizan los principales sitios de inicio de transcripción, dos dominios consenso Sp1 (-70pb y -120pb), tres elementos AP2 ricos en GC (-58pb, -82pb y -137pb) y un sitio EREhs (*halfsite*) (-165pb) (Dufau, 1998; Geng et al., 1999). Los factores Sp1/Sp3 tienen una función central en la transcripción de este gen al interactuar con los dos dominios consenso Sp1 (Geng et al., 1999). Consta de 11 exones, todos codificantes, y 10 intrones que se encuentran en fase 2 (unión exón – intron se da entre la segunda y tercer letra del codón), generando un transcrito de 3044pb (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Geng et al., 1999; Koo et al., 1991; Troppmann et al., 2013). El ORF (Marco abierto lectura) de *LHCGR* consta de 2100pb. Los exones 1 al 10 codifican para el péptido señal, el dominio extracelular y la región amino terminal del dominio herradura, mientras que el exón 11 codifica para la región carboxilo terminal del dominio herradura, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Menon & Menon, 2012).

Se han identificado cuatro variantes de *splicing* en el ovario, específicamente en las células de la granulosa y en el cuerpo lúteo (Kossack et al., 2008; Madhra et al., 2004; Minegishi et al., 1997). En las células de la granulosa se encontró una variante que incluía un exón adicional, entre el exón seis y siete, el cual fue designado como el exón 6A (Kossack et al., 2008). Este exón codificaba 30 aminoácidos y tenía dos codones de parada por lo que la inserción de este exón generaba una proteína truncada de 209 aminoácidos (Kossack et al., 2008). En el cuerpo lúteo, la primera variante que se identificó no tenía 62 aminoácidos, los cuales eran codificados por el exón 9 (Minegishi et al., 1997). Se encontró un aumento en su expresión durante el transcurso de la fase lútea (Minegishi et al., 1997; Minegishi et al., 2007). Mediante ensayos funcionales, se evidenció que esta variante generaba una completa pérdida en la transducción de la señal y no se expresaba en la membrana celular (Minegishi et al., 1997, 2007). Posteriormente, mediante estudios de expresión en la fase lútea, se identificaron dos variantes adicionales que contenían codones de parada prematuros que generaban que no se tradujera el exón 11 (Madhra et al., 2004). En una de estas variantes se observó también ausencia del exón 9 (Madhra et al., 2004). A través de estudios *in vitro*, empleando la metodología de PCR en tiempo real, se encontró una relación inversamente proporcional en la expresión de la proteína *wildtype* y la variante de *splicing* que generaba una proteína más truncada (ausencia de exón 9 y 11) a lo largo de la fase lútea (Dickinson et al., 2009). En la fase temprana había mayor expresión de la proteína *wildtype*, mientras en la fase tardía se encontró mayor expresión de la variante truncada (Dickinson et al., 2009). Además, cuando se coexpresaron había pérdida en la transducción de la señal indicando un efecto negativo en la señalización de la proteína *wildtype* (Dickinson et al., 2009). Estos estudios demostraron, que estas variantes de

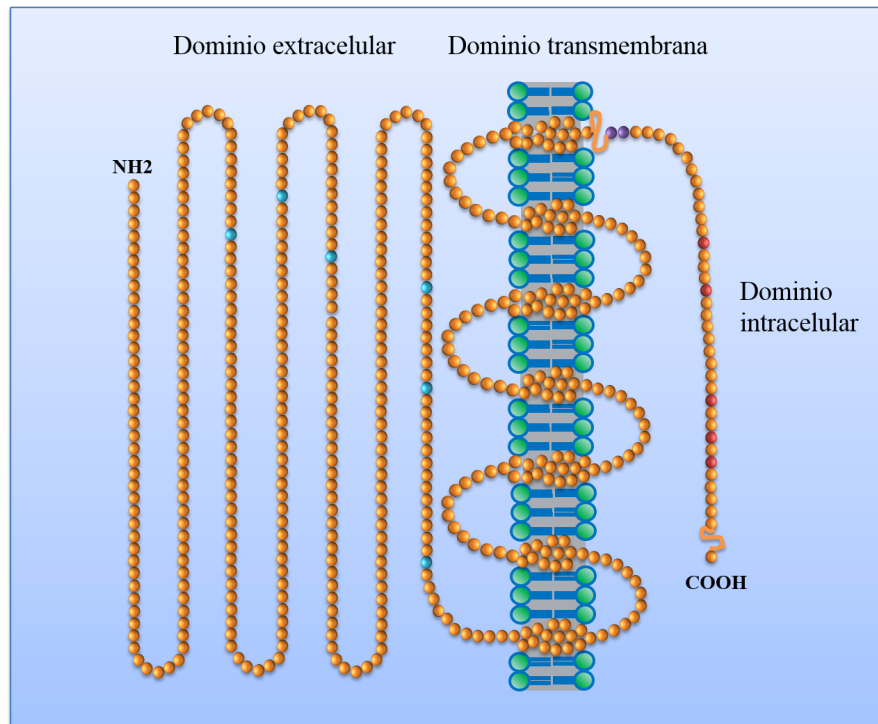
splicing pueden tener una función importante en la regulación de la proteína *wildtype* (Dickinson et al., 2009; Kossack et al., 2008; Minegishi et al., 2007).

3.3.2 Proteína LHCGR

La proteína LHCGR madura consta de 699 aminoácidos y se localiza en la membrana celular. Tiene un peso de aproximadamente 85 – 95 kDa y se forma por la glicosilación y el transporte de una proteína precursora (peso de aproximadamente 65 - 75 kDa) que se encuentra en el retículo endoplasmático (Troppmann et al., 2013). La forma más abundante que se encuentra normalmente en la célula es la proteína madura (**Fig. 2**) (Ascoli et al., 2002; Troppmann et al., 2013).

LHCGR, al igual que la FSHR y la TSHR, es una glicoproteína miembro de la subfamilia de receptores adrenérgicos β_2 de la familia rodopsina clase A, los cuales se acoplan a proteínas G (GPCRs) (Ascoli et al., 2002; Lagerström & Schiöth, 2008; Laissue, 2015). Estos receptores se caracterizan por tener un dominio extracelular largo, un dominio transmembrana que atraviesa la membrana siete veces y un dominio intracelular corto (**Fig. 2**) (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Troppmann et al., 2013).

Figura 2. La Proteína LHCGR y los sitios donde ocurren las principales modificaciones postraduccionales. En azul, en morado y en rojo se muestra los sitios donde ocurre la N-glicosilación, la palmitoilación y la fosforilación, respectivamente. Figura modificada de Laissie, 2015.



Específicamente, LHCGR tiene un péptido señal compuesto por 26 aminoácidos, encargado de transportar la proteína al retículo endoplasmático para sus respectivas modificaciones postraduccionales (Dufau, 1998). Tiene además, un dominio extracelular codificado por los aminoácidos 27 a 354, involucrado en la adecuada maduración de la proteína, la expresión en la superficie celular, el reconocimiento y la alta afinidad con los ligandos (Ascoli et al., 2002; Chan et al., 2008; Dufau, 1998; Menon & Menon, 2012; Troppmann et al., 2013). Este dominio está caracterizado por tres regiones, una región rica en cisteínas que se localiza en el extremo amino terminal, seguido por una región conocida como LRR, compuesta por 10 repeticiones ricas en

leucina las cuales se organizan en láminas beta que forman la superficie interna cóncava, lugar donde ocurre la interacción con el ligando (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Troppmann et al., 2013). Se compone además de hélices alfa que se alinean en la cara opuesta formando una estructura en forma de herradura (Ascoli et al., 2002; Menon & Menon, 2012; Troppmann et al., 2013). Por mutagénesis dirigida se encontró que específicamente las repeticiones dos a la ocho son indispensables para la alta afinidad de unión con sus ligandos (Troppmann et al., 2013). En el extremo carboxilo terminal se encuentra otra región rica en cisteínas que se conoce como la región bisagra, encargada de unir el dominio extracelular con el dominio transmembrana por medio de puentes disulfuro (Ascoli et al., 2002; Menon & Menon, 2012; Troppmann et al., 2013). El dominio transmembrana codificado por los aminoácidos 355 a 627, está involucrado en la transducción de la señal (Dufau, 1998; Menon & Menon, 2012; Puett et al., 2010). Se caracteriza por la presencia de siete hélices transmembrana conectados por tres *loops* extracelulares y tres *loops* intracelulares, los cuales tienen numerosos residuos altamente conservados en las glicoproteínas (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Puett et al., 2010). En el primer y el segundo *loop* extracelular se encuentran cisteínas las cuales forman puentes disulfuro que ayudan en la estabilización de los segmentos transmembrana (Dufau, 1998). Finalmente, el dominio intracelular codificado por los aminoácidos 628 a 699 se encuentra unido a la proteína G y es importante en su reciclaje, en particular los aminoácidos glicina y treonina del motivo GTALL (Galet et al., 2003).

Las principales modificaciones postraduccionales de LHCGR son la N-glicosilación, la palmitoilación y la fosforilación (Ascoli et al., 2002; Menon et al., 2005; Min & Ascoli,

2000; Zhu et al., 1995). El dominio extracelular de LHCGR tiene seis sitios consenso de glicosilación (AsnXxxSer/Thr) en donde se unen cadenas de carbohidratos tipo manosa en las asparaginas de las posiciones 99, 174, 195, 291, 299 y 313 (**Ver Fig. 2**) (Ascoli et al., 2002; Bradbury et al., 1997; Dufau, 1998; Zhang et al., 1995). Esta modificación postraduccional ocurre a medida que la proteína se traduce y tiene una función principal en la maduración y en la facilitación del correcto plegamiento de la proteína, ya que estas cadenas de carbohidratos interactúan con la calnexina, chaperona encargada del plegamiento y el transporte de las glicoproteínas (Ascoli et al., 2002; Menon et al., 2005). El dominio intracelular de LHCGR tiene dos sitios de palmitoilación en los residuos de cisteína de las posiciones 643 y 644, en donde se unen covalentemente moléculas de ácido palmítico (**Ver Fig. 2**) (Menon et al., 2005; Munshi et al., 2005). Esta modificación postraduccional está presente sólo en la proteína madura luego que es glicosilada e insertada en la membrana celular y se ha encontrado que es importante para promover el eficiente reciclaje del LHCGR (Munshi et al., 2005; Zhu et al., 1995). El dominio intracelular tiene cinco sitios potenciales para fosforilación que se encuentran en las serinas de las posiciones 657, 661, 670, 674 y 676 (**Ver Fig. 2**) (Ascoli et al., 2002; Min & Ascoli, 2000). La fosforilación sólo es detectable en la proteína madura y se produce luego de la interacción ligando – receptor (Ascoli et al., 2002; Menon et al., 2005; Min & Ascoli, 2000). Las quinasas encargadas de la fosforilación de esta proteína pertenecen a la familia GRK (Ascoli et al., 2002). Esta modificación postraduccional es importante para la endocitosis e internalización del receptor (Menon et al., 2005; Min & Ascoli, 2000).

3.3.3 Expresión

La expresión de *LHCGR* se ha observado principalmente en los tejidos gonadales (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998). En los testículos se expresa en las células de Leydig mientras que en el ovario es predominante en las células de la teca, en las células de la granulosa y en el cuerpo lúteo (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Troppmann et al., 2013). Generalmente se observa expresión de este receptor durante la foliculogénesis y en la fase lútea (Minegishi et al., 1997; Troppmann et al., 2013; Yung et al., 2014). Durante la foliculogénesis se expresa constitutivamente en las células de la teca y en las células intersticiales, mientras que en las células de la granulosa y en las del cúmulo se encuentra a partir del folículo antral (Jeppesen et al., 2012; Maman et al., 2012; Troppmann et al., 2013). El nivel más alto de expresión de este receptor se ha encontrado en el folículo preovulatorio justo antes de la ovulación (Jeppesen et al., 2012; Maman et al., 2012; Yung et al., 2014). Este patrón en la expresión del *LHCGR* es importante, porque permite responder al surgimiento de la LH que ocurre a mitad del ciclo menstrual y el cual es importante para la maduración del oocito, la ovulación, y la formación del cuerpo lúteo (Law et al., 2013). Luego de la ovulación, se han observado en el cuerpo lúteo altos niveles de expresión de este receptor al inicio de la fase lútea, los cuales alcanzan el máximo nivel de expresión en la mitad de la fase (Nishimori et al., 1995; Yung et al., 2014). En la fase tardía disminuye significativamente y es indetectable luego de la menstruación (Nishimori et al., 1995; Yung et al., 2014). También se ha descrito expresión de *LHCGR* en diferentes tejidos extragonadales (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998). Estos tejidos incluyen el útero, la placenta, las trompas de Falopio, el cordón umbilical, las glándulas mamarias, el esperma, la vesícula seminal, la próstata, la piel, la corteza adrenal, el cerebro, los linfocitos, la tiroides, los

huesos, entre otros (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Pidoux et al., 2007; Rao & Lei, 2007). Además, se ha encontrado expresión de *LHCGR* en diferentes líneas celulares tumorales como MCF7, ZR75, T47D y en biopsias de tumores mamarios benignos y malignos (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998).

3.3.4 Ligandos

Los ligandos naturales de LHCGR son la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (hCG) (Casarini et al., 2012; Dufau, 1998). Ambos, junto con la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona folículo estimulante (FSH), son glicoproteínas formadas por dos dímeros unidos no covalentemente, conocidos como la subunidad α y la subunidad β (Choi & Smitz, 2014b; Dufau, 1998). La subunidad α es compartida por todas las glicoproteínas y es codificada por el gen *CGA* localizado en el cromosoma 6q14.3. La proteína está constituida por 92 aminoácidos y dos sitios para N-glicosilación (Choi & Smitz, 2014b). Por el contrario, la subunidad β , es diferente en todas las glicoproteínas en cuanto a contenido de aminoácidos e hidratos de carbono, siendo la encargada de conferir funciones específicas y la especificidad de unión de cada hormona con su respectivo receptor (Choi & Smitz, 2014b; Fournier et al., 2015). Los genes de la subunidad β de la LH y la hCG tienen secuencias similares y se encuentran en un cluster ubicado en el cromosoma 19q13.3 (Choi & Smitz, 2014b; Fournier et al., 2015). La subunidad β de la LH es codificada por el gen *LHB*, mientras la subunidad β de la hCG es codificada por los genes *CGB*, *CGB5*, *CGB7* y *CGB8* (Choi & Smitz, 2014b; Fournier et al., 2015). En este cluster también se encuentran los pseudogenes *CGB1* y *CGB2* (Choi & Smitz, 2014b). Las modificaciones postraduccionales de estas hormonas, principalmente glicosilación, crean una amplia

variedad de isoformas (aproximadamente 30), las cuales son importantes porque confieren diferencias en el tiempo de semivida circulante, aclaramiento metabólico y actividad biológica (Choi & Smitz, 2014b).

A pesar de que la LH y la hCG comparten el mismo receptor y tienen una homología en la secuencia cercana al 82%, difieren en la función, en el perfil de expresión, en el tiempo de semivida circulante y en algunas características estructurales (incluyendo el tipo y la cantidad de glicosilación) (Casarini et al., 2012; Choi & Smitz, 2014a, 2014b). La LH es secretada luego del estímulo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en la hipófisis y está involucrada en la maduración folicular, en la esteroidogénesis gonadal, en la inducción de la ovulación y en la formación del cuerpo lúteo (Casarini et al., 2012; Choi & Smitz, 2014a, 2014b; Cole, 2010; Rahman & Rao, 2009). Tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa y un tiempo de semivida circulante de aproximadamente 30 minutos (Choi & Smitz, 2014b). Este corto tiempo es importante porque permite la generación de los pulsos de la LH (Choi & Smitz, 2014b). Estructuralmente, la subunidad β de esta hormona está compuesta por 121 aminoácidos y tres cadenas de carbohidratos con un único lugar para la glicosilación (Burgon et al., 1996; Choi & Smitz, 2014b). Sus isoformas están determinadas por el grado de sialilación y sulfonación de los oligosacáridos, las cuales varían durante el ciclo menstrual y están influenciadas por la GnRH, el estradiol y la testosterona (Choi & Smitz, 2014b; Wide et al., 2009). Se ha encontrado que la sialilación prolonga la vida media de la LH mientras la sulfonación apresura su eliminación (Burgon et al., 1996; Wide et al., 2009).

Por el contrario, la hCG es secretada principalmente por el trofoblasto (específicamente por el sincitiotrofoblasto) y es la encargada, si hay embarazo, de promover la producción de estrógenos por el cuerpo lúteo hasta el primer trimestre (Casarini et al., 2012; Choi & Smitz, 2014b; Fournier et al., 2015). Se encuentra en la circulación a partir de la implantación y se va incrementado progresivamente hasta alcanzar su pico de expresión cerca de la décima semana de gestación, momento en el cual disminuye y permanece hasta el final del embarazo (Choi & Smitz, 2014a; Cole, 2010; Fournier et al., 2015; Rahman & Rao, 2009). Se ha encontrado que la hCG también tiene otras funciones importantes en el transcurso del embarazo, como promover la angiogénesis (permitiendo un adecuado flujo sanguíneo en la placenta y una adecuada nutrición para el feto), la inmunotolerancia materna, el crecimiento y la diferenciación del cordón umbilical, la supresión de las contracciones miométriales, el crecimiento de los órganos fetales, entre otros (Choi & Smitz, 2014a, 2014b; Cole, 2010; Fournier et al., 2015). Tiene un peso de aproximadamente 36 kDa, 30% del cual lo aportan las cadenas de oligosacáridos (se unen a los dos sitios para N-glicosilación y a los cuatro sitios para O-glicosilación de la subunidad β) (Cole, 2010; Fournier et al., 2015). Al ser una molécula altamente glicosilada y su subunidad β estar conformada por 145 aminoácidos (29 aminoácidos adicionales en la región carboxilo-terminal con respecto a la LH) tiene un tiempo de semivida circulante de aproximadamente 37 horas, lo que la hace más estable y biológicamente más activa que la LH (Casarini et al., 2012; Choi & Smitz, 2014b; Fournier et al., 2015; Rahman & Rao, 2009).

Además de la isoforma de hCG descrita anteriormente (isoforma principal), existen otras tres estructuras importantes fisiológicamente, las cuales dependiendo de su fuente

de origen y del grado de glicosilación, tienen diferentes actividades biológicas y funciones (Choi & Smitz, 2014b; Cole, 2010; Fournier et al., 2015). La hCG hiperglicosilada (peso molecular de 40 – 41 kDa) es sintetizada por los citotrofoblastos y su función principal consiste en promover el crecimiento e invasión de este tipo de células y del coriocarcinoma (Choi & Smitz, 2014a, 2014b; Cole, 2010). Además, se ha encontrado que no promueve la síntesis de progesterona (Choi & Smitz, 2014a). Esta isoforma predomina en los primeros días de gestación, pero gradualmente va siendo sobrepasada en proporción por la isoforma principal (Choi & Smitz, 2014a). La hCG con la subunidad β libre de glicosilación es sintetizada por tumores malignos no trofoblásticos. Su función consiste en promover el crecimiento y la malignidad del tumor, por lo que su detección está asociada a un pobre pronóstico (Cole, 2010). Finalmente, la isoforma sintetizada en la hipófisis tiene un mayor número de oligosacáridos sulfonados y por lo tanto un menor tiempo de semivida circulante que la isoforma principal (Cole, 2010). Se produce en bajos niveles durante el ciclo menstrual paralelo a la síntesis de la LH pero es 40 veces más potente (Cole, 2010). Su función consiste en ayudar en la maduración folicular, la esteroidogénesis gonadal, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Choi & Smitz, 2014a, 2014b; Cole, 2010).

3.3.5 Activación

Cuando la hCG y la LH interactúan con el LHCGR se genera su activación, la cual incluye la generación, la propagación y la transferencia de la señal (Ciertas mutaciones también pueden inducir su activación) (Ascoli et al., 2002; Yi et al., 2002). Aunque a la fecha no se conoce con exactitud el mecanismo de activación de este receptor, resultados de varias investigaciones han permitido establecer varias hipótesis (Angelova

et al., 2008; Bruysters et al., 2008; Grzesik et al., 2015; Nakabayashi et al., 2000; Song et al., 2001a, 2001b). En términos generales, la activación del LHCGR se inicia en el dominio extracelular, en donde se han identificado dos regiones de contacto con los ligandos (Grzesik et al., 2015; Troppmann et al., 2013; Zeng et al., 2001). La interacción inicial (alta afinidad) se genera en el extremo amino terminal que involucra la región rica en cisteínas y la región de diez repeticiones ricas en leucina (LRRs 1 a 10), mientras la segunda interacción (baja afinidad) se produce en la región bisagra (Ascoli et al., 2002; Grzesik et al., 2015; Troppmann et al., 2013; Zeng et al., 2001). Luego del contacto de los ligandos en estos dos puntos, el complejo hormona – dominio extracelular contacta el dominio transmembrana, en donde se generan una serie de cambios conformacionales que se propagan hasta el dominio intracelular (Grzesik et al., 2015; Puett et al., 2007; Zeng et al., 2001). Lo anterior genera que se acople y se active la proteína G y se inicie la subsecuente señalización intracelular (Grzesik et al., 2015; Puett et al., 2007; Yi et al., 2002)

Empleando diferentes metodologías (quimeras, mutagénesis dirigida, ensayos de unión y modelamiento comparativo), se ha identificado que en el dominio extracelular existen aminoácidos cruciales para la generación (unión y selectividad de los ligandos) y la propagación de la señal (Bruysters et al., 2008; Galet & Ascoli, 2005; Menon & Menon, 2012; Nakabayashi et al., 2000; Song et al., 2001a, 2001b). Resultados de diferentes estudios han evidenciado que para que se produzca la primera interacción con los ligandos, son importantes los aminoácidos Cys³⁰, Cys³⁴, Cys³⁶, Asp³⁹, Leu⁴², Cys⁴⁴ y Gly⁴⁶, que se encuentran en el extremo amino terminal, y la región de las LRRs, lo que sugiere la presencia de múltiples sitios de contacto en esta región (Ascoli et al., 2002;

Dufau, 1998; Galet & Ascoli, 2005; Song et al., 2001a, 2001b; Yi et al., 2002). Cada una de las LRRs es importante pero en diferente grado (Song et al., 2001a, 2001b; Yi et al., 2002). Se ha encontrado que las LRRs esenciales para la unión con la hormona se encuentran principalmente hacia el extremo amino terminal (LRRs 1 al 6) siendo principalmente las LRRs 2 y 4 completamente indispensables (Ascoli et al., 2002; Song et al., 2001a, 2001b). Cuando se sustituyeron los aminoácidos que conforman estas dos LRRs por alaninas hubo una completa pérdida de la unión con el ligando (Song et al., 2001a, 2001b). Específicamente, los residuos indispensables fueron Ile⁶⁴, Phe⁶⁹, Ile⁷⁸, Ile⁸⁰ y Leu⁸⁶ que conforman el centro hidrofóbico de la LRR 2 y los aminoácidos Leu¹²⁵, Tyr¹²⁷, Leu¹²⁸, Ser¹²⁹ y Ile¹³⁰ que conforman el centro hidrofóbico de la LRR 4 y los cuales están relacionados con la integridad estructural de todas las LRRs (Song et al., 2001a, 2001b). Así mismo, para la segunda interacción con los ligandos, que se produce en la región bisagra, se encontró que específicamente el aminoácido Tyr³³¹ y su región adyacente, son indispensables (Bruysters et al., 2008; Grzesik et al., 2015; Troppmann et al., 2013). Además, se ha encontrado que el dominio extracelular es el encargado de la selectividad de los dos ligandos descritos (Grzesik et al., 2015). Se identificó que la delección del exón 10, que traduce parte de la región bisagra, sólo afecta la señalización mediada por la LH, mientras que el doble mutante p.Gln303Pro//p.Glu305Pro (aminoácidos transcritos también por el exón 10) sólo afecta la señalización mediada por la hCG (Bruysters et al., 2008; Gromoll et al., 2000; Grzesik et al., 2015). Estos resultados indican que ambos ligandos interactúan de manera diferente en esta región (Grzesik et al., 2015). También se ha encontrado que diferencias estructurales entre ambas hormonas, particularmente con respecto a importantes y específicas prolinas presentes en el segundo *loop* de la subunidad β , están

involucradas en el modo de interacción con la región bisagra, específicamente en el sitio donde ocurre la segunda interacción (Grzesik et al., 2015). Aunque tanto la subunidad α como la subunidad β de ambas hormonas interactúan en esta región, la presencia en el segundo *loop* de la subunidad β de una prolina en la posición 71 en la LH *versus* la presencia en la hCG de una alanina en la misma posición, generó que no tuvieran la misma conformación, y por tanto la interacción entre ambas hormonas en la región bisagra fuera diferente (Grzesik et al., 2015). A partir de esta diferencia en la conformación, se sugirió que la activación de LHCGR por la LH dependería de la distancia de determinados aminoácidos en relación a Tyr³³¹, mientras que la activación por la hCG dependería de la interacción con elementos estructurales presentes en esa región (Grzesik et al., 2015). Por consiguiente, se pudo afirmar que en la región bisagra se determina la selectividad de los ligandos (Bruysters et al., 2008; Grzesik et al., 2015). En el dominio extracelular también se han identificado aminoácidos importantes para la generación de la señal (Song et al., 2001b; Yi et al., 2002; Zeng et al., 2001). Diferentes estudios han encontrado que los aminoácidos Asn¹³², Thr¹³³, Ile¹³⁵ y en especial Gly¹³⁴, los cuales se localizan en el extremo carboxilo terminal de la LRR 4, al ser sustituidos por alaninas disminuyen significativamente la producción de cAMP (Song et al., 2001b; Yi et al., 2002). Además, se encontró que la sustitución del aminoácido Ser²⁷⁷, localizado en la región bisagra, por cualquier aminoácido hidrofóbico generó la activación constitutiva del LHCGR (Ascoli et al., 2002; Menon & Menon, 2012; Nakabayashi et al., 2003; Nakabayashi et al., 2000). Se ha identificado que estos aminoácidos interactúan con el *loop* extracelular 2 del dominio transmembrana indicando que ambos dominios se encuentran asociados antes y después de la unión con los ligandos (Jeoung et al., 2001; Song et al., 2001b; Yi et al., 2002; Zeng et al., 2001).

Estos resultados sugirieron que los aminoácidos Gly¹³⁴ y Ser²⁷⁷ podrían actuar como activador y supresor, respectivamente (Yi et al., 2002).

Por otro lado, en el dominio transmembrana se produce una serie de cambios conformacionales que inician luego de la interacción de los ligandos con el dominio extracelular del LHCGR (Ascoli et al., 2002; Menon & Menon, 2012; Troppmann et al., 2013; Yi et al., 2002; Zeng et al., 2001). Estos cambios conformacionales son modificaciones de las interacciones intramoleculares que hacen que el equilibrio entre el estado inactivo y activo cambie hacia un estado activo del receptor, facilitando la interacción con la proteína G (Troppmann et al., 2013). Se ha encontrado, a partir de las mutaciones activadores, que las hélices transmembrana 3, 7 y especialmente la 6, son indispensables para la transición de la conformación del receptor a un estado activo, ya que la interacción entre estas hélices estabiliza la estructura inactiva (Ascoli et al., 2002; Menon & Menon, 2012; Troppmann et al., 2013). Los *loops* extracelulares, que conectan las siete hélices transmembrana, contribuyen a la propagación de la señal al interactuar con el dominio extracelular (Jeoung et al., 2001; Yi et al., 2002; Zeng et al., 2001). El *loop* extracelular 2 (específicamente los aminoácidos Ser⁵⁰⁶, Tyr⁵⁰⁸, Cys⁵¹⁴ y Pro⁵¹⁶), de manera opuesta al *loop* extracelular 3, restringe la unión de los ligandos con el dominio extracelular (Yi et al., 2002; Zeng et al., 2001). Por medio de mutagénesis dirigida, se encontró que la afinidad de unión del dominio extracelular con los ligandos mejoró de un 30% a un 100% cuando se truncó el *loop* extracelular 2 (Yi et al., 2002). Finalmente, la extensión citoplasmática de las hélices transmembrana y los *loops* intracelulares son los encargados de la activación y el correcto acoplamiento de la proteína G, el cual es importante para aumentar la afinidad de unión con los ligandos,

estabilizar el estado activo y para la transferencia de la señal (Angelova et al., 2008; Troppmann et al., 2013). Se encontró que principalmente la extensión citoplasmática de la hélice 3 y el *loop* intracelular 2 son fundamentales para esta función (Angelova et al., 2008). Además, por medio de modelos computacionales, se identificó que en estos dos sitios hay regiones importantes para los cambios estructurales intramoleculares (Ile⁴⁶⁰, Thr⁴⁶¹, His⁴⁶⁶ y Ile⁵⁴⁹) y para el reconocimiento de la proteína G (Arg⁴⁶⁴, Thr⁴⁶⁷, Ile⁴⁶⁸, Tyr⁴⁷⁰, Tyr⁵⁵⁰ y Asp⁵⁶⁴) (Angelova et al., 2008).

3.3.6 Vías de señalización activadas por el LHCGR

El LHCGR esta acoplado a dos subfamilias distintas de proteínas G, la Gs y la Gq, las cuales pueden activar independientemente la vía de señalización del adenosín monofosfato cíclico (cAMP) o la vía del inositol fosfato (IP), respectivamente (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Gilchrist et al., 1996; Jo et al., 2005; Morris & Richards, 1995; Rajagopalan-Gupta et al., 1998). Estas proteínas G son heterotriméricas y están compuestas por las subunidades α , β y γ (Rajagopalan-Gupta et al., 1998). Cuando la señal alcanza el dominio intracelular de LHCGR, luego de la unión de la LH o la hCG, la subunidad α se disocia de las subunidades β y γ , que se encuentran altamente asociadas, e interactúa con la adenilato ciclase (AC) o con la fosfolipasa C (PLC), iniciando de esta manera la señalización intracelular (Rajagopalan-Gupta et al., 1998). La activación de estas vías de señalización genera un incremento en la producción de los andrógenos, de los estrógenos y de la progesterona, y además permite que se produzcan la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Rao & Lei, 2002).

La vía de señalización predominante en el LHCGR es la del cAMP, la cual se puede activar a concentraciones bajas de la LH o la hCG (Chin & Abayasekara, 2004; Puett et al., 2005; Richards, 2001; Russell & Robker, 2007; Troppmann et al., 2013). Esta vía inicia con la unión de la subunidad α de la proteína Gs a la AC. Esta enzima convierte el adenosín trifosfato (ATP) en cAMP promoviendo de esta manera un incremento intracelular rápido en la concentración de este segundo mensajero (Casarini et al., 2016; Menon & Gunaga, 1974; Menon et al., 2004; Yan et al., 2016). La concentración del cAMP es controlado por la enzima fosfodiesterasa (PDE), que hidroliza el cAMP (Menon & Gunaga, 1974; Yan et al., 2016). Posteriormente, el cAMP se une a la subunidad regulatoria de la proteína quinasa dependiente del cAMP (PKA), generando que se disocie de su subunidad catalítica y se activen reacciones de fosforilación (Casarini et al., 2016; Menon & Gunaga, 1974; Richards, 2001; Yan et al., 2016). La PKA activada cataliza la fosforilación de la Ser¹³³ de la proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP (CREB), el cual es un factor de transcripción que luego de fosforilado se trasloca al núcleo y se une al elemento de respuesta de cAMP (CRE) (Casarini et al., 2016). Esta unión promueve la transcripción y regulación de genes requeridos para el desarrollo folicular, la esteroidogénesis gonadal (producción de andrógenos, estrógenos y progesterona), la ovulación, y la luteinización (Casarini et al., 2016; Chin & Abayasekara, 2004; Freimann et al., 2004; Khan et al., 2015; Menon & Gunaga, 1974; Richards, 2001; Russell & Robker, 2007). PKA también puede activar, directamente o indirectamente (a través de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)), a las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), las cuales a su vez fosforilan a los factores de transcripción Sp1 y Sp3 (Casarini et al., 2016; Choi & Smitz, 2014b; Khan et al., 2015; Menon & Menon, 2012;

Richards, 2001; Russell & Robker, 2007). Las ERK1/2 son importantes para la expansión de las células del cúmulo, la maduración del oocito y la diferenciación de las células de la granulosa en células luteales (Casarini et al., 2012, 2016; Karlsson et al., 2010; Khan et al., 2015). La activación de las ERK1/2 por parte de la PKA depende de cual ligando interactúa con el LHCGR. Se encontró que la LH tuvo un mayor impacto en la activación de esta vía complementaria (Casarini et al., 2012; Choi & Smitz, 2014a; Troppmann et al., 2013). Además de la importante función de la señalización del LHCGR en la esteroidogénesis, la ovulación y la luteinización, se ha encontrado que también es indispensable para la morfología de las células de la granulosa (Casarini et al., 2012; Khan et al., 2015; Morris & Richards, 1995). Se encontró que, en ausencia de estimulación del LHCGR, las células de la granulosa del estadio preovulatorio presentaron una forma aplanada. Sin embargo, posterior a la exposición con la LH o la hCG estas células se volvieron redondas (Casarini et al., 2012; Karlsson et al., 2010; Morris & Richards, 1995).

La vía de la señalización del inositol fosfato, por el contrario, se activa cuando hay altas concentraciones de la LH o la hCG y cuando hay una alta densidad del LHCGR, por lo que se ha propuesto que su activación sólo se produce durante el pico ovulatorio de la LH o durante el primer trimestre del embarazo (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Menon et al., 2004). Esta vía inicia cuando la subunidad α de la proteína Gq activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) liberando diacilglicerol (DAG) y al inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Chin & Abayasekara, 2004; Jo et al., 2005; Menon et al., 2004; Yan et al., 2016). DAG activa a la proteína quinasa C (PKC) que fosforila posteriormente a CREB para que se una a CRE, mientras IP₃ libera

el calcio del retículo endoplasmático aumentando los niveles de calcio intracelular (Chin & Abayasekara, 2004; Jo et al., 2005; Menon et al., 2004; Yan et al., 2016).

3.3.7 Modelos animales del LHCGR

Dos modelos *Lhcgr*-KO han sido generados (Laissue, 2015; Lei et al., 2001; Zhang et al., 2001). Estos ratones KO (*Lhcgr*^{-/-}) se generaron independientemente en dos laboratorios en el año 2001 por medio del empleo de la metodología del *gen targeting*, la cual se realizó en células madre embrionarias (Lei et al., 2001; Zhang et al., 2001). Para lograr la completa eliminación del receptor funcional y por tanto generar los ratones *Lhcgr*^{-/-}, en el primer modelo se delecionó selectivamente parte de la región proximal del promotor y el exón 1 (Lei et al., 2001), mientras que en el segundo se delecionó el exón 11 con el fin de transcribir el ARNm del receptor truncado y obtener proteínas no funcionales (Zhang et al., 2001).

En ambos modelos *Lhcgr*-KO se observaron fenotipos muy similares (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Se evidenció que el silenciamiento del *Lhcgr* no fue letal ni tuvo efecto en la diferenciación sexual (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Además, estos ratones nacieron fenotípicamente normales y no hubo diferencia en la histología gonadal al momento del nacimiento con respecto a los ratones *Lhcgr*^{+/+} (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Sin embargo, luego de la séptima semana de edad se observaron varios defectos en los ratones hembra *Lhcgr*^{-/-} que generaron que fueran infértiles (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). En estos animales hubo una significativa reducción en el crecimiento y en el desarrollo de los ovarios y del tracto reproductivo en comparación con los animales

Lhcgr^{+/+} y *Lhcgr*^{+/-}. Se encontró que estos órganos eran más pequeños y livianos, hubo una disminución en la profundidad de las capas del útero y se observaron pocas glándulas en el endometrio (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). En la histología ovárica, se encontró que estos ratones tenían folículos preantrales y antrales pero no se observaron folículos preovulatorios ni cuerpo lúteo, lo que sugirió un arresto folicular mas allá del estadio antral (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Asimismo, se observó que estos animales eran 50% más pesados, no tuvieron ciclos estrales y presentaron retraso y ambigüedad en la apertura vaginal (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Adicionalmente, se encontró que tenían niveles de la LH significativamente elevados mientras los de la FSH estaban moderadamente elevados, y que a pesar de que hubo una disminución importante en los niveles de progesterona y estradiol estos no se suprimieron totalmente (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Lei *et al.*, observaron particularmente que los animales *Lhcgr*^{-/-} también presentaban una gran disminución en el RNAm de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénica (*Star*) y en el RNAm del receptor de estrógenos 1 (*Esr1*), mientras que hubo un incremento en el RNAm del receptor de estrógenos 2 (*Esr2*) (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002).

Por lo que se refiere a los ratones hembra *Lhcgr*^{+/-}, estas fueron fértiles, tuvieron ciclos estrales normales y no presentaron diferencias en la morfología ovárica ni uterina con respecto a los ratones *Lhcgr*^{+/+} (Huhtaniemi et al., 2006; Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). En estos ratones se observó la presencia de cuerpo lúteo lo que indicó una normal progresión en el desarrollo folicular y una normal ovulación. El útero fue grueso con una morfología normal y se observaron numerosas glándulas en el

endometrio (Huhtaniemi et al., 2006; Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Sin embargo, en los animales *Lhcgr*^{+/-} creados por Lei et al., se observó que tuvieron un incremento y una disminución modesta en la FSH y en los niveles de estradiol, respectivamente (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002). Adicionalmente, a medida que crecieron y cumplieron un año de edad presentaron senescencia reproductiva antes que los ratones *Lhcgr*^{+/+}. Algunos se volvieron extremadamente obesos, tuvieron disminución en la densidad del fémur y todos desarrollaron tumores endometriales malignos (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002).

Aunque se obtuvieron fenotipos muy similares con ambos modelos *Lhcgr*-KO, la interpretación que los investigadores le dieron a la funcionalidad de la acción del receptor en los tejidos extragonadales fue diferente (Lei et al., 2001; Pakarainen et al., 2005; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Lei *et al.*, encontraron que el silenciamiento de *Lhcgr* podía afectar la calidad de vida de los ratones, en cuanto a que se observaron cambios comportamentales, problemas de alimentación, debilidad del sistema inmune y cambios esqueléticos, entre otros (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002). De manera opuesta, Pakarainen *et al.*, mediante trasplante ortotópico de ovarios de ratones *wildtype* en ratones *Lhcgr*^{-/-} en edad prepuberal, encontraron que la expresión de *Lhcgr* extragonadal no tuvo ninguna significancia fisiológica (Huhtaniemi et al., 2006; Pakarainen et al., 2005). Encontraron que en los ratones *Lhcgr*^{-/-} trasplantados, a pesar de no expresarse el receptor en los tejidos extragonadales, se restauró la fertilidad, tuvieron crías sanas, presentaron ciclos astrales normales, comportamiento sexual normal, apertura vaginal normal y correcta función endocrina (Huhtaniemi et al., 2006; Pakarainen et al., 2005). Además, en la histología ovárica se observaron folículos en

todos los estadios de desarrollo y presencia de cuerpo lúteo. Por consecuente, los investigadores pudieron concluir que, en los ratones, la acción del receptor en el tejido extragonadal no es necesaria para la maduración sexual normal, el comportamiento sexual, el mantenimiento del embarazo, ni para la lactación (Huhtaniemi et al., 2006; Pakarainen et al., 2005).

Por otro lado, Lei *et al.*, además de crear el modelo *Lhcgr*-KO, emplearon terapia de reemplazo hormonal con el objetivo de determinar si los cambios fenotípicos observados en los ratones *Lhcgr*^{-/-} eran debidos a los bajos niveles de las hormonas sexuales o si por el contrario eran consecuencia de la falta de señalización ejercida por la LH (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002). El reemplazo hormonal consistió en inyectar a animales de 30 días de nacidos 0.1mg de 17b-estradiol y 5 mg de progesterona por 21 días (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002). Los investigadores encontraron que la terapia produjo un pequeño incremento en el tamaño ovárico, en el grosor del útero y ya no se encontró disminución en los niveles del RNAm de *Star* y de *Esr1* (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002). Sin embargo, el reemplazo hormonal no tuvo efecto en la morfología ovárica ni en la fertilidad. No hubo reanudación del desarrollo folicular mas allá del folículo antral y el número de glándulas endometriales permaneció bajo (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002). Estos resultados demostraron que la estimulación por la LH, independiente de las hormonas sexuales, es indispensable para el desarrollo folicular a partir del folículo antral, para la ovulación y para la formación del cuerpo lúteo (Lei et al., 2001; Rao & Lei, 2002).

Finalmente, mediante la creación de los dos modelos *Lhcgr*-KO se pudo concluir que la activación de la señalización de *Lhcgr* mediada por la LH, tiene una función importante en el crecimiento y desarrollo de los ovarios y el tracto reproductivo en la vida postnatal (Huhtaniemi et al., 2006; Lei et al., 2001; Pakarainen et al., 2005; Rao & Lei, 2002; Zhang et al., 2001). Estos modelos pueden ser considerados fenocopias de las mutaciones inactivadoras encontradas en los humanos y han contribuido a la comprensión de las funciones normales y patológicas del LHCGR (Huhtaniemi et al., 2006; Laissue, 2015; Rao & Lei, 2002).

3.3.8 Variantes en el *LHCGR* asociadas con la etiología de la FOP no sindrómica

Se han encontrado numerosas variantes de secuencia en el gen *LHCGR* que pueden generar activación constitutiva o inactivación (parcial o completa) de la señalización efectuada por este receptor (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Narayan, 2015; Segaloff, 2009; Themmen, 2005; Themmen & Huhtaniemi, 2000). Las variantes que produjeron activación constitutiva se localizaron principalmente en el exón 11, lo que argumenta a favor de la importancia del dominio transmembrana en la propagación y en la transferencia de la señal (Ascoli et al., 2002; Menon & Menon, 2012; Narayan, 2015; Themmen & Huhtaniemi, 2000). Se consideran como *hotspots* para estas variantes la hélice transmembrana 6 y el *loop* intracelular 3 (Fanelli et al., 2001; Menon & Menon, 2012; Narayan, 2015; Themmen & Huhtaniemi, 2000; Troppmann et al., 2013). Estas variantes facilitaron la conformación del estado activo del receptor o fortalecieron la interacción con la proteína G (Themmen & Huhtaniemi, 2000; Troppmann et al., 2013). En mujeres portadoras de estas variantes, no se observó ningún efecto fenotípico detectable en la edad prepuberal ni en la post puberal, mientras que los hombres

presentaron pubertad precoz (Fanelli et al., 2001; Narayan, 2015; Segaloff, 2009; Themmen, 2005; Themmen & Huhtaniemi, 2000). Por el contrario, las variantes que generaron inactivación del receptor se encontraron a lo largo de todo el ORF (Ascoli et al., 2002; Narayan, 2015; Troppmann et al., 2013). Se encontró que estas variantes interfirieron en el correcto plegamiento de la proteína, generando que fueran retenidas en el retículo endoplasmático (RE), y por tanto afectando directamente la expresión de los receptores en la membrana celular (Ascoli et al., 2002; Narayan, 2015; Segaloff, 2009; Troppmann et al., 2013). Además, algunas variantes afectaron la interacción con el ligando, la propagación de la señal y la activación de la proteína G (Ascoli et al., 2002; Narayan, 2015; Troppmann et al., 2013). Mujeres portadoras de estas variantes presentaron un desarrollo puberal normal, con menarquía normal o tardía, la cual ocurrió espontáneamente entre los 12 a 20 años de edad, seguida por oligomenorrea e infertilidad (Latronico & Arnhold, 2012; Narayan, 2015; Segaloff, 2009). En algunas mujeres también se observó amenorrea primaria (Segaloff, 2009; Toledo et al., 1996). Por ultrasonido pélvico se observó que el útero y los ovarios fueron normales (Latronico & Arnhold, 2012). Además, en estas pacientes se encontró que tenían niveles bajos de estradiol y progesterona, y niveles altos de la LH y la FSH, indicando disfunción del circuito de retroalimentación negativa del eje HHG (Latronico & Arnhold, 2012). En los hombres se observó un fenotipo más severo que en las mujeres, el cual se correlacionó con el efecto deletéreo ocasionado por estas variantes (Narayan, 2015; Themmen & Huhtaniemi, 2000). Presentaron hipogonadismo primario e hipoplasia de las células de Leydig, lo que generó que hubiera una submasculinización fetal. Por lo tanto, se observaron fenotipos que incluyeron desde pseudohermafroditismo 46,XY hasta una normal diferenciación sexual masculina con

presencia de hipospadias o micropene (Bruysters et al., 2008; Dufau, 1998; Latronico et al., 1998; Menon & Menon, 2012; Narayan, 2015; Segaloff, 2009).

Algunas variantes de secuencia, identificadas por secuenciación directa del gen *LHCGR*, han sido validadas funcionalmente como causales de la FOP no sindrómica (Laissue, 2015; Latronico et al., 1996, 1998; Stavrou et al., 1998; Toledo et al., 1996). Las primeras variantes fueron descritas en 1996 (Latronico et al., 1996; Toledo et al., 1996). Estas variantes se encontraron en mujeres 46,XX con hipogonadismo hipergonadotrópico y amenorrea primaria, y en sus hermanas con pseudohermafroditismo 46,XY (Latronico et al., 1996; Toledo et al., 1996). Latronico *et al.*, describieron la variante homocigota c.1996T>C (p.Arg554Ter), que se localizó en el dominio transmembrana, específicamente en el *loop* intracelular 3 (Latronico et al., 1996). Esta variante se encontró en una familia de origen brasilero y a pesar de no haber sido validada funcionalmente, el hecho de que generara un codón de parada prematuro fue sugerida como causal del fenotipo encontrado en la paciente y en sus hermanas (Latronico et al., 1996). Por su parte, Toledo *et al.*, describieron la variante homocigota c.1777G>C (p.Ala593Pro), que se encontró también en el dominio transmembrana, específicamente en la hélice transmembrana 6 (Toledo et al., 1996). Por medio de análisis funcionales, encontraron que esta variante producía una reducción en la capacidad de unión con el ligando y una disminución en la producción del segundo mensajero cAMP luego de la estimulación con la hCG (Toledo et al., 1996).

Dos variantes más se describieron en 1998 (Latronico et al., 1998; Stavrou et al., 1998). Latronico *et al.*, describieron y validaron funcionalmente la delección homocigota,

c.1822_1827del (p.Leu608_Val609del), que se localizó en el dominio transmembrana, específicamente en la hélice transmembrana 7 (Latronico et al., 1998). Esta variante se encontró en una mujer que presentó menstruaciones irregulares y periodos variables de amenorrea, y en su hermana pseudohermafrodita 46,XY (Latronico et al., 1998). Receptores con esta variante se expresaron menos en la superficie celular, debido a que la mayoría quedaron retenidos intracelularmente (Latronico et al., 1998). Los pocos receptores que lograron expresarse correctamente, tenían la misma capacidad de unión con el ligando, con respecto a los receptores *wildtype*, pero tuvieron una reducción significativa en la producción del cAMP (Latronico et al., 1998). Stavrou *et al.*, describieron la variante homocigota c.1060A>G (p.Glu354Lys), que se localizó en el dominio extracelular, específicamente en la región bisagra (Stavrou et al., 1998). Esta variante se encontró en una mujer 46,XX con amenorrea primaria y en sus dos hermanas 46,XY pseudohermafroditas (Stavrou et al., 1998). Por medio de ensayos funcionales, encontraron que esta variante generó una completa pérdida de la función del receptor, debido a que no hubo producción del cAMP luego de la estimulación con la hCG (Stavrou et al., 1998).

Años después se describió la variante de *splicing* IVS10-G>A (Bruysters et al., 2008). Esta variante se encontró en estado de homocigoto en cuatro hermanos que presentaron un fenotipo reproductivo más leve, con respecto a los casos descritos anteriormente (Bruysters et al., 2008). Dos hermanas tenían oligomenorrea, una hermana tuvo menstruaciones regulares por varios años y presentó valores normales de la LH en sangre, y un hermano presentó retraso en la pubertad y tenía micropene y oligospermia (Bruysters et al., 2008). Esta variante generó la delección de los aminoácidos Tyr317 a

Ser324, los cuales se localizan en el dominio extracelular, específicamente en la región bisagra (Bruysters et al., 2008). Por ensayos funcionales se encontró que los receptores con esta variante, se expresaron correctamente en la superficie celular y respondieron al estímulo inducido por la LH. Sin embargo, hubo una disminución significativa en la intensidad de la estimulación (Bruysters et al., 2008). Estos resultados sugirieron que esta variante generó inactivación parcial del LHCGR (Bruysters et al., 2008).

Las últimas variantes descritas y posiblemente asociadas con la etiología de la FOP no sindrómica, fueron las variantes heterocigotas c.455T>C (p.Ile152Thr) y c.537-3C>A (Qiao et al., 2009). Ambas variantes, que se localizaron en el dominio extracelular, se encontraron en una niña de 8 años y en su hermana con pseudohermafroditismo 46,XY (Qiao et al., 2009). Por ensayos funcionales, se encontró que la variante de *splicing* c.537-3C>A generó *skipping* del exón 7 (Qiao et al., 2009). También se encontró, que los receptores con la variante c.455T>C (p.Ile152Thr) se localizaron en la superficie celular al igual que los receptores *wildtype*. Sin embargo, estos receptores presentaron una significativa reducción en la afinidad de unión con el ligando y una total pérdida en la transducción de la señal mediada por la estimulación con diferentes concentraciones de la hCG (Qiao et al., 2009).

Recientemente, nuestro grupo publicó un estudio en el que se encontraron variantes heterocigotas en los genes *ADAMTS19*, *BMP2* y *LHCGR*, potencialmente relacionados con la etiología de la FOP no sindrómica (Fonseca et al., 2015). En este estudio, se diseñó un microarreglo para secuenciar masivamente, por medio de secuenciación de siguiente generación (NGS), la región codificante de 70 genes candidatos de la FOP no

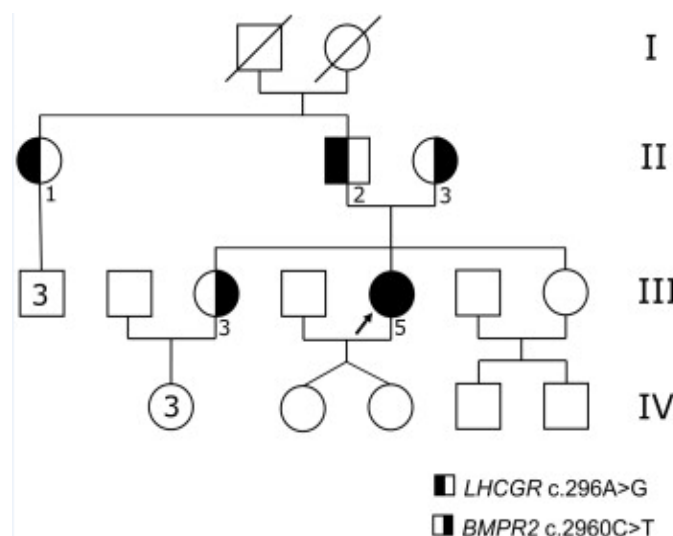
sindrómica (Fonseca et al., 2015). Estos genes fueron seleccionados según varios criterios, entre los que se incluyeron, que hubieran sido validados funcionalmente, que tuvieran un perfil de expresión ovárico, que tuvieran una asociación genética positiva con el fenotipo y que por medio de modelos animales se hubieran encontrado fenotipos similares a la FOP (Fonseca et al., 2015). Este microarreglo se diseñó, con el objetivo de analizar simultáneamente extensas regiones genómicas, y de esta manera poder encontrar variantes que de otra manera serían difíciles de identificar, debido a la complejidad molecular asociada a la reproducción y a las limitaciones técnicas de la secuenciación de Sanger (sólo se pueden analizar entre 600 a 700pb por reacción) (Fonseca et al., 2015). Esta secuenciación masiva se realizó en 12 pacientes afectadas por FOP (Fonseca et al., 2015).

Las variantes identificadas en este estudio fueron la c.2828C>T (p.Thr943Ile) en el gen *ADAMTS19*, la c.2960C>T (p.Ser987Phe) en el gen *BMPR2* y las variantes c.296A>G (p.Asn99ser) y c.526C>T (p.Ser176Pro) en el gen *LHCGR* (Fonseca et al., 2015). Estas variantes fueron validadas por secuenciación de Sanger, y podrían ser causales del fenotipo encontrado en las pacientes, ya que no se encontraron en ninguno de los grupos control (Fonseca et al., 2015). Estos grupos consistieron en 176 controles FOP (mujeres cuya menopausia ocurrió después de los 50 años y no tenían antecedentes de enfermedad ginecológica) y en 345 controles poblacionales (mujeres entre los 19 años y los 63 años) (Fonseca et al., 2015). Además, por medio de análisis *in silico*, se encontró que los aminoácidos intercambiados eran altamente conservados entre diferentes especies de vertebrados. Asimismo, predictores *in silico* de la patogenicidad, como

PolyPhen y SIFT, sugirieron que estas variantes podrían tener un potencial efecto deletéreo a nivel de la proteína (Fonseca et al., 2015).

En el caso particular de las variantes heterocigotas encontradas en el gen *LHCGR*, estas se encontraron en pacientes que tenían hipogonadismo hipergonadotrópico y amenorrea secundaria (Fonseca et al., 2015). La variante c.296A>G (p.Asn99ser), se encontró en la paciente POF19, una mujer de 36 años (en el momento de la evaluación clínica), quien tuvo dos hijos y ningún antecedente familiar de infertilidad (Fonseca et al., 2015). Esta variante se localizó en el dominio extracelular, específicamente en un sitio de glicosilación. El predictor patogénico SIFT arrojó un puntaje de 0.26 y en PolyPhen se encontró que esta variante era benigna (Fonseca et al., 2015). En esta paciente también se identificó la variante c.2960C>T (p.Ser987Phe) encontrada en el gen *BMPR2* (**Fig. 3**) (Fonseca et al., 2015).

Figura 3. Pedigrí de la familia POF19. La paciente III-5, el caso índice, es portadora de las variantes encontradas en los genes *LHCGR* y *BMPR2*. Los individuos II-1, II-2, II3 y III-3 son portadores heterocigotos de las variantes encontradas en el gen *LHCGR* o en el gen *BMPR2*. Imagen tomada de Fonseca et al, 2015.



Por otro lado, la variante c.526C>T (p.Ser176Pro) se encontró en la paciente POF23, una mujer de 30 años (en el momento de la evaluación clínica), que a pesar de presentar menstruaciones irregulares luego de la menarquia, quedó en embarazo y tuvo un hijo (Fonseca et al., 2015). No tenía ningún antecedente familiar de enfermedad reproductiva (Fonseca et al., 2015). Esta variante se localizó en el dominio extracelular. El predictor SIFT arrojó un puntaje de 0.03 (patogénico) y en Polyphen se encontró que esta variante era benigna (Fonseca et al., 2015).

Los resultados mencionados anteriormente no fueron considerados como tema central de la presente tesis, ya que fueron presentados previamente por otro maestrante. Sin embargo, es importante mencionar que tuve participación activa en el hallazgo de estos resultados (Fonseca et al., 2015). **El tema central de la presente tesis es la validación funcional de las variantes encontradas en el gen *LHCGR* (ver más adelante).**

Por último, es importante señalar que numerosas publicaciones del grupo fundamentan y complementan los abordajes teóricos y experimentales citados en el marco teórico presentado (Caburet et al., 2012; Carlosama et al., 2017; Castro et al., 2013; Diggle et al., 2012; Ducat et al., 2016; Fonseca et al., 2012, 2012b, 2012c, 2013, 2014, 2015; Forero et al., 2016; L'Hote et al., 2010; Laissue et al., 2009, 2009b 2009c, 2015, 2016, 2017, 2017b; Lakhal et al., 2008, 2009, 2010; Mitropoulos et al., 2015; Niño et al., 2012; Ojeda et al., 2011; Ortega-Recalde et al., 2013, 2013b, 2015, 2015b, 2016; Patiño et al., 2014, 2017, 2017b, 2017c; Prada & Laissue, 2014; Quintero-ronderos et al., 2017; Vatin et al., 2012, 2014).

4. Pregunta científica

¿Qué impacto funcional tienen las variantes p.Asn99Ser y p.Ser176Pro en LHCGR, encontradas en las pacientes afectadas por FOP no sindrómica?

5. Objetivos de la investigación

5.1 Objetivo General

Evaluar el potencial impacto funcional de las variantes p.Asn99Ser y p.Ser176Pro en LHCGR en el contexto de la etiología de la FOP no sindrómica.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar si las variantes p.Asn99Ser y p.Ser176Pro afectan la localización subcelular de LHCGR.
2. Determinar si las variantes p.Asn99Ser y p.Ser176Pro afectan la producción del segundo mensajero (cAMP), y por tanto la transducción de la señal corriente abajo.

6. Materiales y métodos

6.1 Construcciones plasmídicas de LHCGR

La secuencia codificante completa (ADNc) del gen *LHCGR* (NM_000233), que se encontraba clonada en el vector de expresión pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific), fue amablemente donada por el Dr. Aaron Hsueh (Stanford, CA, USA) (Laue et al., 1996a). Esta secuencia tenía insertados 24 nucleótidos hacia el extremo 5' (luego de la secuencia que codifica el péptido señal), que codificaba para un péptido *FLAG* (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C).

6.1.1 Generación de las variantes c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro) mediante mutagénesis dirigida por PCR fusión

La metodología de mutagénesis dirigida por PCR fusión consiste en dos rondas de PCR (Patel et al., 2009). En la primera ronda de PCR se emplean dos *primers* flanqueantes y dos *primers* internos que tienen en su secuencia la variante de interés (*primers* mutagénicos) (Patel et al., 2009). En la segunda ronda de PCR (PCR fusión) no hay necesidad del empleo de *primers*, ya que los fragmentos, generados en la primera ronda, tienen secuencias complementarias (en sus extremos) y por lo tanto se anillan a si mismos (Patel et al., 2009).

Para la generación de las variantes encontradas en las pacientes con FOP no sindrómica, se siguió el protocolo descrito previamente por Patel *et al.*, con algunas modificaciones (Fig. 4) (Patel et al., 2009). En la primera ronda de PCR por cada variante se realizaron dos reacciones independientes. En una reacción se empleó un *primer forward*

flanqueante y un *primer reverse* mutagénico, y en la otra reacción se empleó un *primer forward* mutagénico y un *primer reverse* flanqueante (**Tabla 1**). Los dos *primers* flanqueantes tenían, en sus extremos, secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción KpnI (localización 5' de los ADNc) y XhoI (localización 3' de los ADNc) para el clonaje por medio del método de digestión - ligación (ver sección 6.1.5). Los dos *primers* mutagénicos, tenían secuencias complementarias entre ellos y la variante que se quería generar (c.296A>G o c.526T>C) se encontraba en la mitad de sus secuencias (**Tabla 1**). Para cada una de las reacciones de PCR se agregaron 100 ng de ADN plasmídico, 12.5 µl del master mix *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), 0.8µM de cada uno de los *primers* y 7.5 µl de agua ultra pura para completar un volumen final de 25 µl. El programa de PCR, para todas las reacciones, consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguido por 15 ciclos de desnaturalización por 40 segundos a 94°C, de anillamiento por 40 segundos a 57°C y de elongación por 1:10 minutos a 72°C. Se terminó con un ciclo de elongación final por 5 minutos a 72°C. Para la visualización de los productos de la PCR, se realizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente se realizó una electroforesis a 110V por 40 minutos. Como resultado de estas reacciones de PCR se obtuvieron dos fragmentos (fragmentos A y B) de diferente tamaño (de acuerdo a la localización de la variante) (**Tabla. 1, Fig. 4**).

Tabla 1. Secuencia de los *primers* empleados y longitud de los fragmentos generados en la primera ronda de PCR de la mutagénesis dirigida.

Variante	Reacción	Secuencia de los <i>primers</i> (sentido 5'-3')	Fragmento generado
c.296A>G	1	huLHCGR-αKpnI-1F: cgccggGGTACCGCCGCCACCATGAAGCAGCGGTTCTCGGCGCT	Fragmento A: 352pb
		huLHCGR-m296a-g-R: TCAGTATTTTCAGACAAACTGAGGAGGTTGTCAAAG	
	2	huLHCGR-m296a-g-F: CTTGACAACCTCTCACTTTGTCTGAAATACTGA	Fragmento B: 1827pb
		huLHCGR-ΩXhoI-1R: cgccgCTCGAGTTAACTCTGTGTAGCGAGTCTTGT	
c.526T>C	1	huLHCGR-αKpnI-1F: cgccggGGTACCGCCGCCACCATGAAGCAGCGGTTCTCGGCGCT	Fragmento A: 582pb
		huLHCGR-m526t-g-R2: TAGTTTGAGTGTTACAGCTTCATTATTCATCCCTT	
	2	huLHCGR-m526t-g-F2: AAGGGATGAATAATGAACCTGTAACTCAAACCTA	Fragmento B: 1597pb
		huLHCGR-ΩXhoI-1R: cgccgCTCGAGTTAACTCTGTGTAGCGAGTCTTGT	

Nota: En negrilla se muestran las secuencias de restricción, en *italica* se encuentra señalada la secuencia Kozak y subrayado se muestra la variante que se quería generar.

En la PCR fusión se realizó una reacción por cada variante. En cada reacción se agregaron los fragmentos A y B generados en la primera ronda de PCR (en una relación molar fragmento A: fragmento B de 5:1 y de 3:1 para las variantes c.296A>G y c.526T>C, respectivamente), 25 μ l *GoTaq Green Master Mix* (Promega) y agua para completar un volumen final de 50 μ l (**Figura 4**). Para lograr que se anillaran los fragmentos A y B entre ellos, se empleó un programa de PCR Touchdown con temperaturas de anillamiento entre 47°C a 57°C, con intervalos de 2°C (**Tabla 2**).

Figura 4. Esquema de la mutagénesis dirigida realizada para la generación de las variantes de *LHCGR*. Imagen tomada y modificada de Patel et al., 2009.

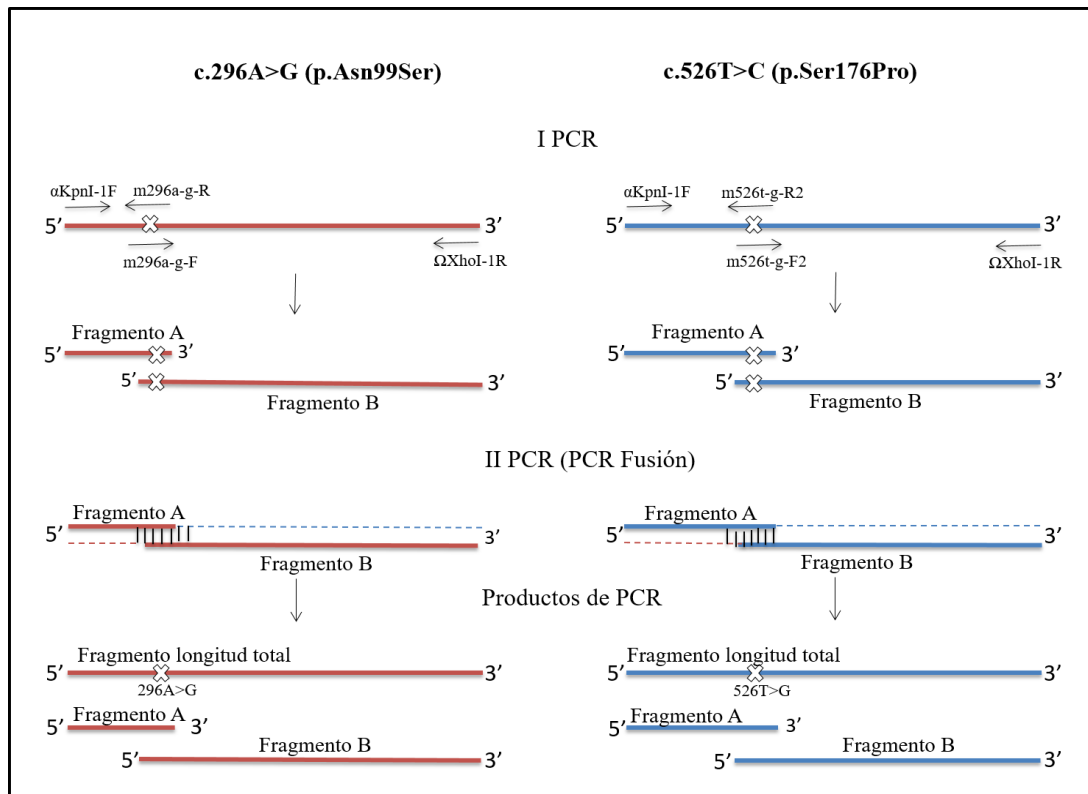


Tabla 2. Programa de PCR empleado en la segunda ronda de PCR de la mutagénesis dirigida.

No de ciclos	Etapas de PCR	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94°C	2 minuto
2	Desnaturalización	94°C	1 minuto
	Anillamiento	47°C	1:5 minutos
	Elongación	72°C	2:10 minutos
2	Desnaturalización	94°C	1 minuto
	Anillamiento	49°C	1:5 minutos
	Elongación	72°C	2:10 minutos
2	Desnaturalización	94°C	1 minuto
	Anillamiento	53°C	1:5 minutos
	Elongación	72°C	2:10 minutos
4	Desnaturalización	94°C	1 minuto
	Anillamiento	55°C	1:5 minutos
	Elongación	72°C	2:10 minutos
4	Desnaturalización	94°C	1 minuto
	Anillamiento	57°C	1:5 minutos
	Elongación	72°C	2:10 minutos
1	Elongación final	94°C	5 minuto

Los productos de la PCR se sembraron en un gel preparativo al 1% teñido con bromuro de etidio. Se hizo la electroforesis a 110V por una hora. Como resultado se observaron fragmentos del tamaño del ADNc del gen de *LHCGR* (producto de la fusión de los fragmentos A y B), con las variantes generadas en la primera ronda de PCR (**Fig. 4**). Se realizó la extracción de la banda de interés y se purificó empleando el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Thermo Fisher Scientific).

Se verificó el proceso de purificación por medio de una amplificación con los *primers* HuLHCGRalpha: 5'-ATGAAGCAGCGGTTCTCG-3' y HuLHCGRom: 5'TTAACAC TCTGTGTAGCGAGCTTGTC-3'. A la reacción se le agregaron 2.5 µl del producto purificado, 12.5 µl *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 0.8µM de cada uno de los *primers* y 6 µl de agua ultra pura para completar un volumen final de 25 µl. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 20 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 40 segundos, 72°C por 2:10 minutos, y un ciclo de elongación final a 72°C por 10 minutos.

6.1.2 PCR para la obtención del ADNc de *LHCGR* en la versión *wildtype* (WT)

Se realizó una PCR sobre el vector pcDNA3 para la obtención del ADNc del gen *LHCGR* en la versión WT. El objetivo de esta PCR fue insertarle las secuencias de reconocimiento de las enzimas KpnI y XhoI en los extremos 5' y 3', respectivamente, para el clonaje por medio de digestión-ligación (ver sección 6.1.5).

En la reacción de PCR se agregaron 100ng de ADN plasmídico, 12.5 µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 0.8 µM de cada *primer* y 7.5 µl de agua ultra pura para completar un volumen final de 25 µl. Se emplearon el *primer forward* huLHCGR-

α KpnI-1F y el *primer reverse* huLHCGR- Ω XhoI-1R (Ver **tabla 1**). El programa de PCR consistió de un ciclo de desnaturalización inicial por 5 minutos a 94°C seguido por 20 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 57°C y 2:10 minutos a 72°C. Se terminó con un ciclo de elongación final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 110V por 60 minutos.

6.1.3 Subclonaje de los ADNc del gen *LHCGR*

El ADNc, con cada una de las variantes obtenidas a partir de la mutagénesis dirigida (LHCGR-N99S y LHCGR-S176P) y el ADNc WT (LHCGR-WT), se subclonaron en el vector de almacenamiento pCR[®] 4-TOPO (Thermo Fisher Scientific), por el método de clonaje TA. Los vectores para este tipo de clonaje están linealizados y en sus extremos 3' tienen residuos de deoxitimidina (T). Por lo tanto, es necesario que los productos de PCR que se van a clonar tengan en sus extremos 3' residuos de deoxiadenosina (A) para que se ligen adecuadamente con el vector. La *Taq* polimerasa que se empleó para la generación de los fragmentos de interés, tiene la facultad de generar estos residuos en los extremos 3' de manera independiente de la secuencia molde. Para el clonaje se empleó el kit TOPO[®] TA *Cloning*[®] (Thermo Fisher Scientific) y se realizó una reacción por cada ADNc. En cada reacción se agregaron en orden, 1.5 μ l de agua ultra pura, 1 μ l de solución salina, 2.5 μ l del respectivo ADNc y 1 μ l del vector pCR[®] 4-TOPO, completando un volumen final de 6 μ l. Estas reacciones se dejaron por una hora a temperatura ambiente.

6.1.3.1 Transformación

Se realizó la transformación de los productos de clonaje en células de *Escherichia coli* quimio-competentes *One Shot TOP10 Competent cells* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo estandarizado previamente en el laboratorio. Inicialmente, se agregaron 2 µl del producto de clonaje en 50 µl de bacterias y se incubaron en hielo por 30 minutos. Luego se realizó un choque térmico a 42°C por 30 segundos, seguido por una incubación en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 250 µl de medio S.O.C (Thermo Fisher Scientific), el cual es rico en nutrientes necesarios para reactivar las bacterias luego del choque térmico. Se dejó en hielo por 2 minutos. Seguidamente, se dejó incubando a 37°C en agitación a 250 rpm durante 60 minutos. Finalmente, se sembraron 150 µl en placas de LB agar con ampicilina, las cuales se incubaron toda la noche a 37°C en agitación a 250 rpm. Al siguiente día las células que se transformaron exitosamente crecieron y formaron colonias, debido a que el vector pCR® 4-TOPO tiene el gen de resistencia a la ampicilina.

6.1.3.2 Verificación del subclonaje

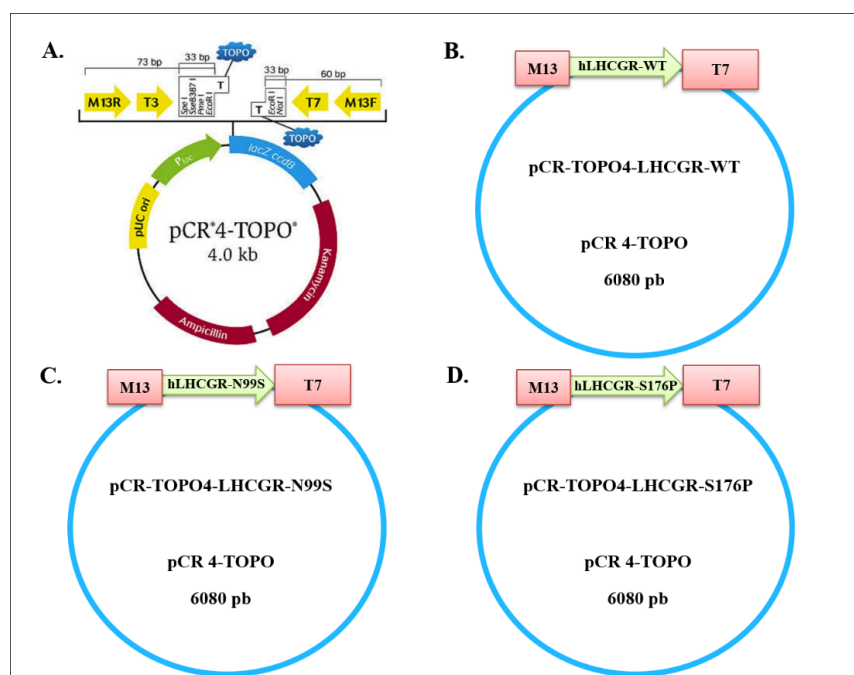
Se escogieron algunas de estas colonias para verificar que los vectores tuvieran clonado el respectivo ADNc (LHCGR-WT, LHCGR-N99S o LHCGR-S176P). La verificación del subclonaje se realizó por medio de PCRs de colonia empleando un *primer forward* T7 que se unió al vector y un *primer reverse* interno que se unió a una secuencia específica de *LHCGR* que se encontraba hacia el extremo 5' (huLHCGR-485R: 5'-GT TATGTGTAAGTTATCACAATTTC-3').

En cada reacción de PCR se agregaron 1 µl de bacterias, 6 µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 0.8 µM de cada *primer* y 3 µl de agua ultra para completar un volumen final de 12 µl. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial por 5 minutos a 94°C, seguido por 25 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 57°C y 50 segundos a 72°C. Se terminó con una elongación final por 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se corrió a 110V por 60 minutos. Las colonias en las que se observó amplificación se cultivaron para miniprets.

Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico empleando el kit de *PureLink® Quick Plasmid Miniprep* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo sugerido en este kit. El ADN plasmídico fue enviado a secuenciación con *primers* sobre el vector e internos sobre la secuencia de *LHCGR*. Se analizaron las secuencias y por medio de alineamientos con la secuencia codificante NM_000233, realizados con el programa informático ClustalW, se verificó que tuvieran las variantes c.296A>G o c.526T>C. En el caso de la secuencia WT se verificó que no tuviera ninguna variante.

Las construcciones plasmídicas resultantes se nombraron pCRTPO4-LHCGR-WT, pCRTPO4-LHCGR-N99S y pCRTPO4-LHCGR-S176P (**Fig. 5**).

Figura 5. Carta de los vectores pCR 4-TOPO. **A.** Mapa del vector pCR[®] 4-TOPO[®] (Thermo Fisher Scientific). **B, C y D.** Carta de los vectores de las construcciones plasmídicas pCRTOPO4-LHCGR-WT, pCRTOPO4-LHCGR-N99S y pCRTOPO4-LHCGR-S176P, respectivamente.



6.1.4 Clonaje en el vector pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO

Se realizó el clonaje en el vector pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Thermo Fisher Scientific) del ADNc de LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P por el método TA. Este vector expresa el producto de PCR en fase con la proteína GFP fusionada en el extremo carboxilo terminal. Esta construcción se realizó para el ensayo posterior *in vitro* de la localización subcelular de LHCGR WT y mutantes (ver sección 6.2).

Para la realización de este clonaje se realizó una PCR sobre cada una de las construcciones plasmídicas pCRTOPO4-LHCGR-WT, pCRTOPO4-LHCGR-N99S o pCRTOPO4-LHCGR-S176P para obtener el ADNc respectivo. En cada reacción se agregaron 1 µl de ADN plasmídico, 12.5 µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega),

0.8µM de cada *primer* (HuLHCGRalpha: 5'-ATGAAGCAGCGGTTCTCG-3' y HuLHCGRΩ-GFP-1: 5'-ACACTCTGTGTAGCGAGTCTTG-3') y 7.5 µl de agua ultra pura para completar un volumen final de 25 µl. El programa consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguido por 20 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 64°C, 2:10 minutos a 72°C, y un ciclo de elongación final por 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR se sembraron en un gel preparativo al 1% teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 110V por 70 minutos. Posteriormente, se extrajeron las bandas de interés y se purificaron empleando el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Thermo Fisher Scientific).

Para el clonaje se empleó el kit *CT-GFP Fusion TOPO® TA Expression* (Thermo Fisher Scientific). En la reacción se agregaron, en el siguiente orden, 1.5 µl de agua ultra pura, 1 µl de solución salina, 2.5 µl del producto purificado y 1 µl del vector, para completar un volumen final de 6 µl. Esta reacción se dejó incubando a temperatura ambiente por 50 minutos.

6.1.4.1 Transformación

La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.1.3.1.

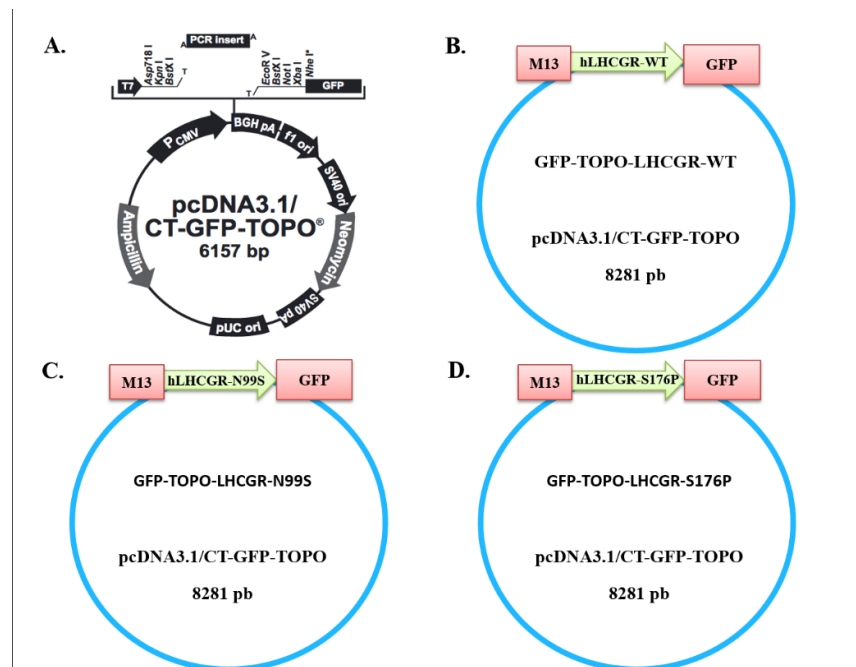
6.1.4.2 Verificación del clonaje

La verificación del clonaje, las reacciones y el programa de PCR, como también la extracción del ADN plasmídico y la verificación de las secuencias clonadas se realizó como esta descrito en la sección 6.1.3.2.

Luego de la verificación del clonaje, las colonias se añadieron a 100 ml de medio LB Broth con ampicilina. Se incubaron en agitación a 250 rpm toda la noche a 37°C. Finalmente, se realizaron midipreps para extraer el ADN plasmídico utilizando el kit *PureLink® HiPure Plasmid Filter* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo descrito en este kit.

Las construcciones plasmídicas resultantes se nombraron GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S y GFP-TOPO-LHCGR-S176P (**Fig. 6**).

Figura 6. Carta de los vectores pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO. **A.** Mapa del vector pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO® (Thermo Fisher Scientific). **B, C y D.** Carta de los vectores de las construcciones plasmídicas GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S y GFP-TOPO-LHCGR-S176P, respectivamente.



6.1.5 Clonaje por medio de digestión – ligación

Se realizó el clonaje del ADNc de LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P en el vector de expresión pcDNA3.1 Zeo (+) (Thermo Fisher Scientific) por medio del método de clonaje por digestión – ligación. Este clonaje se realizó para el ensayo posterior *in vitro* del análisis de la transducción de la señal de LHCGR WT y mutantes (ver sección 6.3).

6.1.5.1 Digestión

Las construcciones plasmídicas pCRTPO4-LHCGR-WT, pCRTPO4-LHCGR-N99S y pCRTPO4-LHCGR-S176P, junto con el vector de expresión pcDNA3.1 Zeo (+) vacío (Thermo Fisher Scientific) se sometieron a un proceso de digestión con las enzimas de restricción KpnI y XhoI (New England BioLabs). En cada reacción de digestión se agregaron 1000 ng del respectivo ADN plasmídico, 1 µl (10U) de KpnI, 1 µl (20U) de XhoI, 1 µl de BSA (100X), 5 µl de NEBuffer 3.1 (10X) y agua ultra pura para completar un volumen final de 50 µl. Estas reacciones se incubaron por 4 horas a 37°C. Posteriormente, los productos de la digestión se sembraron en un gel preparativo al 1% teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se corrió a 110V por 70 minutos. Finalmente, se realizó la extracción de las bandas y su purificación por medio del kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Thermo Fisher Scientific).

6.1.5.2 Ligación

La ligación de los productos purificados de los ADNc LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P con el producto purificado del vector pcDNA3.1 Zeo (+) se realizó por medio de una T4 ligasa de ADN (Thermo Fisher Scientific), la cual efectúa la ligación

por medio de enlaces covalentes. Para la ligación se agregaron el vector y el respectivo ADNc en una relación molar vector:inserto de 1:3. En cada reacción se agregaron 4 µl de buffer T4 ligasa, 1 µl del vector, 3 µl del ADNc, 2 µl de T4 ligasa y 10 µl de agua, para completar un volumen final de 20 µl. Estas reacciones se incubaron a 16°C por 16 horas.

6.1.5.3 Transformación

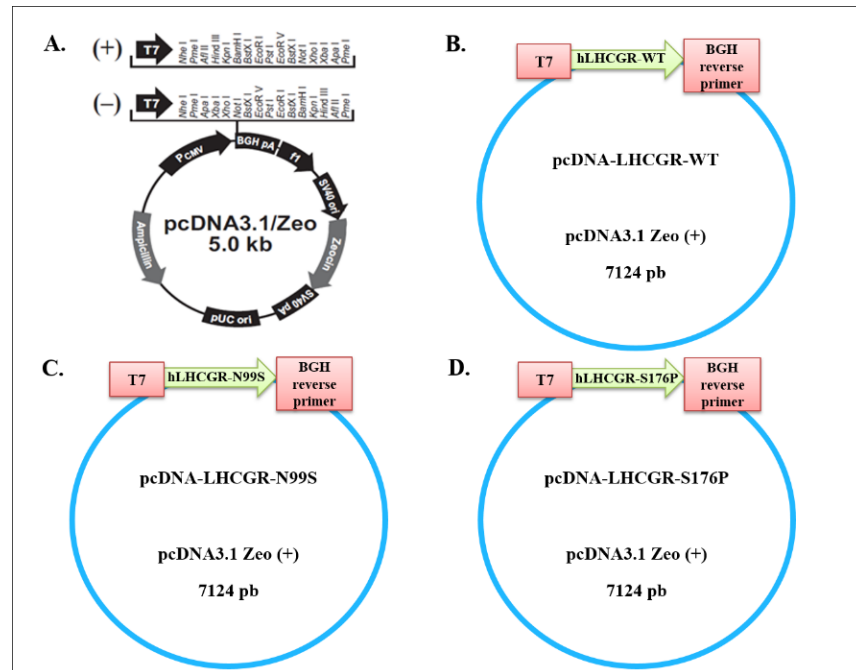
La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.1.3.1.

6.1.5.4 Verificación del clonaje

La verificación del clonaje se realizó como esta descrito en la sección 6.1.4.2.

Las construcciones plasmídicas resultantes se nombraron pcDNA-LHCGR-WT, pcDNA-LHCGR-N99S y pcDNA-LHCGR-S176P (**Fig. 7**).

Figura 7. Carta de los vectores pcDNA3.1 Zeo (+). **A.** Mapa del vector pcDNA 3.1 Zeo (+) (Thermo Fisher Scientific). **B, C y D.** Carta de los vectores de las construcciones plasmídicas pcDNA-LHCGR-WT, pcDNA-LHCGR-N99S y pcDNA-LHCGR-S176P, respectivamente.



6.1.6 Generación de la variante c.455T>C (p.Ile152Thr) mediante mutagénesis dirigida

Se empleó el sistema GeneArt[®] *Site-Directed Mutagenesis System* (Thermo Fisher Scientific) para la generación de la variante c.455T>C (p.Ile152Thr) (Sección 6.3). En este sistema primero se realiza la metilación del ADN plasmídico, luego se hace una amplificación empleando una *Taq* polimerasa de alta fidelidad y finalmente se realiza una reacción de recombinación *in vitro*. Además, se deben emplear dos *primers* (*primers* mutagénicos) que tengan en el centro de la secuencia la variante de interés y que tengan secuencias complementarias entre ellos.

La mutagénesis se realizó a partir de la construcción plasmídica pcDNA-LHCGR-WT. En la reacción se agregaron 20 ng de ADN plasmídico, 5 µl de *AccuPrimeTM Pfx Reaction mix* (Thermo Fisher Scientific), 5 µl de *enhancer*, 0.3 µM de cada *primer* mutagénico (huLHCGR-m455t-c-F: 5'-CTGAATCAAATTTCAcTCTGGAAATTTGTGA-3' y huLHCGR-m455t-c-R: 5'-TCACAAATTTCCAGAgTGAAATTTGATTCA G-3'), 1 µl (4U) de metilasa de ADN, 2 µl de SAM, 0.4 µl (1U) de la *Taq* polimerasa *AccuPrimeTM Pfx* (Thermo Fisher Scientific) y agua ultra pura para completar un volumen final de 50 µl. La reacción se colocó en el termociclador y se empleó el programa descrito en la tabla 3 para permitir la metilación del ADN plasmídico y su amplificación.

Tabla 3. Programa de termociclador empleado para la mutagénesis por GenArt[®]

No de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	37°C	20 minutos
	94°C	2 minutos
18	94°C	20 segundos
	57°C	30 segundos
	68°C	3:6 minutos
1	68°C	5 minutos

Posteriormente, se realizó la reacción de recombinación *in vitro* en la que se agregaron 4 µl del buffer de reacción, 10 µl de agua ultra pura, 4 µl del producto de PCR y 10 µl de *Enzymer mix*. Se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. En la reacción se agregó 1 µl de 0.5 M EDTA, para parar la reacción. Se colocaron los tubos en hielo y se continuó con la transformación.

6.1.6.1 Transformación

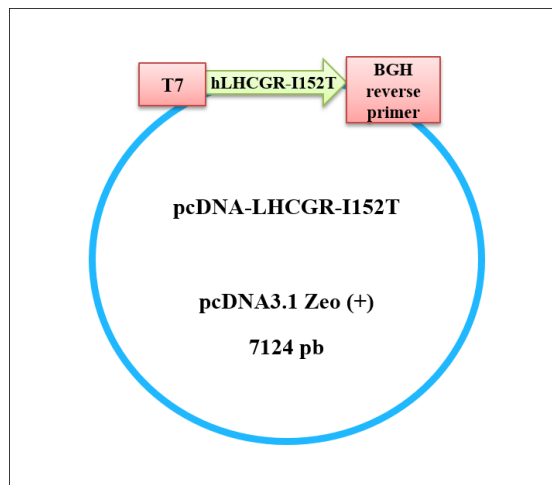
La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.1.3.1.

6.1.6.2 Verificación de la mutagénesis

La verificación de la mutagénesis se realizó como esta descrita en la sección 6.1.4.2 la verificación del clonaje.

La construcción plasmídica resultante se nombró pcDNA-LHCGR- I152T (**Fig. 8**).

Figura 8. Carta de la construcción plasmídica pcDNA-LHCGR- I152T



6.2 Ensayo funcional *in vitro* de localización subcelular

Este ensayo funcional se realizó con el objetivo de determinar la localización subcelular de LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P marcadas con la proteína GFP (proteína verde fluorescente).

6.2.1 Cultivo celular y siembra de las células para la transfección

Células COS-7, las cuales provienen del riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), se emplearon en este ensayo. Estas células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de los antibióticos Penicilina/Streptomicina (Pen/Strep) (Gibco - Thermo Fisher Scientific). Esta línea celular expresa el gen *LHCGR*.

Previo a la siembra de las células para la transfección (ver sección 6.2.2), se esterilizaron laminillas circulares en UV por 60 minutos. Posteriormente, se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos y se sembraron 50.000 células/pozo, 24 horas antes de la transfección. Se continuó con las mismas condiciones de cultivo.

6.2.2 Transfección

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70% se transfectaron transitoriamente con las construcciones plasmídicas GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S o GFP-TOPO-LHCGR-S176P (ver sección 6.1.4). Cada construcción plasmídica se transfectó en sextuplicado con el lípido catiónico FuGENE[®]6 *Transfection Reagent* (Promega). Para la transfección se emplearon 500 ng de ADN de la respectiva construcción plasmídica y se hicieron cálculos para mantener una relación de 1:3 entre la cantidad de ADN (μg) y de FuGENE[®]6 *Transfection Reagent* (μl). Cada mezcla de transfección se realizó con 9 μl de FuGENE[®]6 *Transfection Reagent* y con 111 μl de medio Opti-MEN (Thermo Fischer Scientific), el cual esta libre de SFB y antibióticos. Es importante el empleo de este medio ya que el

SFB es un inhibidor de la transfección. Esta mezcla inicial se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 30 µl de ADN de la respectiva construcción plasmídica que se encontraba a una concentración de 100 ng y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el medio DMEM-F12 (Gibco - Thermo Fisher Scientific) en el que estaban previamente las células, y se agregaron 500 µl/pozo de medio Opti-MEM. Finalmente, se agregaron 25 µl/pozo de la mezcla de transfección y se verificó que quedara uniformemente distribuida en el pozo. Se emplearon como control negativo células no transfectadas (NT) (células sembradas en 4 pozos, n=4). Las células se dejaron incubando a 37°C y en 5% de CO₂ por 48 horas, tiempo adecuado para permitir la expresión proteica de las células transfectadas.

6.2.3 Tinción del retículo endoplasmático y montaje de las células

Luego de 48 horas se procedió a teñir el retículo endoplasmático con el reactivo ER-Tracker™ Red (Thermo Fisher Scientific). La solución de tinción se preparó a una concentración final de 0.5 µM el cual se diluyó en la solución de sales balanceadas de Hank's (HBSS). Para la tinción y el montaje de las células se siguió el siguiente protocolo:

1. Se precalentó la solución de tinción por 30 minutos.
2. Se removió el medio de cultivo y se hizo un lavado con la solución HBSS.
3. Se agregaron 300 µl/pozo de solución de tinción precalentada y se dejó incubando a 37°C por 30 minutos.
4. Se retiró la solución de tinción y se hizo un lavado con la solución HBSS.
5. Para la fijación de las células se agregaron 300 µl/pozo de paraformaldehído (PFA) al 4% y se dejó incubando a 37°C por dos minutos.

6. Se realizaron dos lavados finales con la solución HBSS.
7. Se transfirieron las lamillas a láminas portaobjetos y se agregó 5 µl del líquido de montaje *UltraCruz[®] Mounting Medium* (Santa Cruz Biotechnology Inc). Este líquido de montaje tiene DAPI para la tinción de los núcleos.
8. Los montajes se sellaron con esmalte, se protegieron de la luz y se almacenaron a 4°C.

Finalmente, las láminas se observaron en el microscopio fluorescente *Nikon Eclipse NiE microscope*. Las fotos se capturaron con la cámara digital fotométrica *Coolnap EZ*, empleando el *software NIS -Elements Advanced Research*. Se contaron 170 células para cada una de las condiciones (LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P). Posteriormente, se establecieron categorías fenotípicas (agregación y no agregación) que se compararon entre la condición WT y cada una de las variantes. El *test* exacto de Fisher, realizado en el programa estadístico SPSS (versión 21), se empleó para evaluar estadísticamente las diferencias entre estas condiciones.

6.3 Ensayo funcional *in vitro* para el análisis de la transducción de la señal

Este ensayo funcional se realizó con el objetivo de determinar por medio de experimentos *in vitro* la producción de cAMP post-transfección de LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P, luego de la estimulación con hCG.

En este ensayo se empleó el kit *Signal CRE Reporter Assay Kit (LUC)* (Qiagen), con el cual se puede analizar, en un cultivo celular, la vía de señalización mediada por el cAMP. Este kit está compuesto por un vector que codifica para el gen reportero de la

firefly (*Photinus pyralis*) luciferasa, el cual se encuentra corriente abajo de repeticiones en tándem del elemento de respuesta al cAMP (CRE) y de la caja TATA, un elemento del promotor basal. Si hay aumento en la producción de cAMP intracelular, promovido por la estimulación con la LH o la hCG, se activará CREB (proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP) y se traslocará al núcleo para unirse a CRE e inducir la expresión de la *firefly* luciferasa. Este vector está premezclado con un vector que expresa constitutivamente el gen de la *Renilla* (*Renilla reniformis*) luciferasa (en una relación de 40:1), el cual sirve como un control interno (normalizador) de la eficiencia de la transfección. Esta premezcla se llama *Signal reporter*. Además, este kit incluye dos controles. El control positivo es una premezcla de un vector que expresa constitutivamente la *Renilla* luciferasa y de un vector que expresa constitutivamente la *firefly* luciferasa (control positivo). El control negativo es una premezcla de un vector que expresa constitutivamente la *Renilla* luciferasa y de un vector sin CRE y con el gen reportero de la *firefly* luciferasa (control negativo).

6.3.1 Cultivo celular y siembra de las células para la transfección

La línea celular proveniente de riñón embrionario humano, HEK293, se empleó para este ensayo. Veinticuatro horas antes de la cotransfección (ver sección 6.3.2) se sembraron 100.000 células por pozo, en cajas de cultivo de 24 pozos. Estas células se mantuvieron bajo las mismas condiciones de cultivo descritas en la sección 6.2.1. Esta línea celular no expresa el gen *LHCGR*

6.3.2 Cotransfección

Cuando las células alcanzaron una confluencia entre el 80% al 90% se cotrasfectaron transitoriamente con las construcciones plasmídicas pcDNA-LHCGR-WT, pcDNA-LHCGR-N99S o pcDNA-LHCGR-S176P (sección 6.1.5) y el *Signal reporter* en una proporción de 1:2. En este ensayo también se cotransfectó la construcción plasmídica pcDNA-LHCGR- I152T (sección 6.1.6) para emplearla como control positivo debido a que estudios previos demostraron que tenía un efecto funcional sobre la transducción de la señal (Qiao et al., 2009).

Por lo tanto, cada construcción plasmídica se cotransfectó en las siguientes cantidades:

- 300 ng de pcDNA-LHCGR-WT + 150 ng de *Signal reporter* (n=30).
- 300 ng de pcDNA-LHCGR-N99S + 150 ng de *Signal reporter* (n=30).
- 300 ng de pcDNA-LHCGR-S176P + 150 ng de *Signal reporter* (n=30).
- 300 ng de pcDNA-LHCGR- I152T + 150 ng de *Signal reporter* (n=30).

La transfección se realizó con FuGENE®6 *Transfection Reagent* (Promega) y se hicieron cálculos para mantener una relación de 1:3 entre la cantidad de ADN (μg) y de FuGENE®6 *Transfection Reagent* (μl). Cada mezcla de transfección se realizó con 43.2 μl de FuGENE®6 *Transfection Reagent* y con 612.8 μl de medio Opti-MEM (Thermo Fischer Scientific). Se dejó incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 96 μl y 48 μl de ADN de la respectiva construcción plasmídica y del *Signal reporter*, respectivamente, los cuales se encontraban a una concentración de 100 ng. Se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el medio DMEM-F12 (Gibco - Thermo Fisher Scientific) en el que estaban previamente

las células, y se agregó 500 µl/pozo de medio Opti-MEM. Finalmente, se agregaron 25 µl/pozo de la mezcla de transfección y se verificó que quedara uniformemente distribuida en el pozo. Los controles negativos y positivos contenidos en el kit se transfectaron en sextuplicado. También se emplearon células NT como control negativo (n=6). Las células se dejaron incubando a 37°C y en 5% de CO₂ por 48 horas, tiempo adecuado para permitir la expresión proteica de las células transfectadas.

6.3.3 Estimulación con hCG

Las células se estimularon post-transfección con diferentes concentraciones de hCG (0.001, 0.01, 0.1 y 1 UI/ml) (Sigma) por 3 horas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Ensayo de estimulación con hCG

Construcción plasmídica	Concentración de hCG (UI/ml) empleada para la estimulación	No de replicas
pcDNA-LHCGR-WT	1	6
	0.1	6
	0.01	6
	0.001	6
	0	6
pcDNA-LHCGR-N99S	1	6
	0.1	6
	0.01	6
	0.001	6
	0	6
pcDNA-LHCGR-S176P	1	6
	0.1	6
	0.01	6
	0.001	6
	0	6
pcDNA-LHCGR-I152T	1	6
	0.1	6
	0.01	6
	0.001	6
	0	6

Control positivo	0	6
Control negativo	0	6
NT	0	6

Para la estimulación se empleó el siguiente protocolo:

1. Se retiró el medio Opti-MEM y se hizo un lavado con PBS 1X.
2. Se realizaron las diluciones respectivas de la hCG en medio DMEM no suplementado.
3. Se agregó 300 µl de la dilución correspondiente a cada pozo.
4. Se incubó a 37°C por 3 horas.

6.3.4 Ensayo *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (DLR™)

Se empleó el ensayo DLR™ (Promega) para hacer la medición de la actividad de la *firefly* luciferasa y de la *Renilla* luciferasa en la misma reacción. Para esto se siguió el siguiente protocolo:

1. Se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS 1X.
2. Se agregó 100 µl/pozo de buffer de lisis 1X y se dejó incubando en agitación a 200 rpm por 60 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
3. Se realizó lisis mecánica y los lisados celulares se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml.
4. En tubos de Eppendorf de 1.5 ml se agregó 100 µl de LAR II (reactivo de ensayo de luciferasa II).
5. Posteriormente se transfirió 20 µl del lisado celular (paso 3) a los tubos que contenían el reactivo LAR II y se mezcló por pipeteo.
6. Se realizó la lectura en el luminómetro GloMax® 20/20 y se registró la actividad de la *firefly* luciferasa.

7. A esta mezcla se le agregó 100 μ l del reactivo *Stop & Glo* y se mezcló suavemente por pipeteo.
8. Se realizó nuevamente la lectura en el luminómetro y se registró la actividad de la *Renilla* luciferasa.

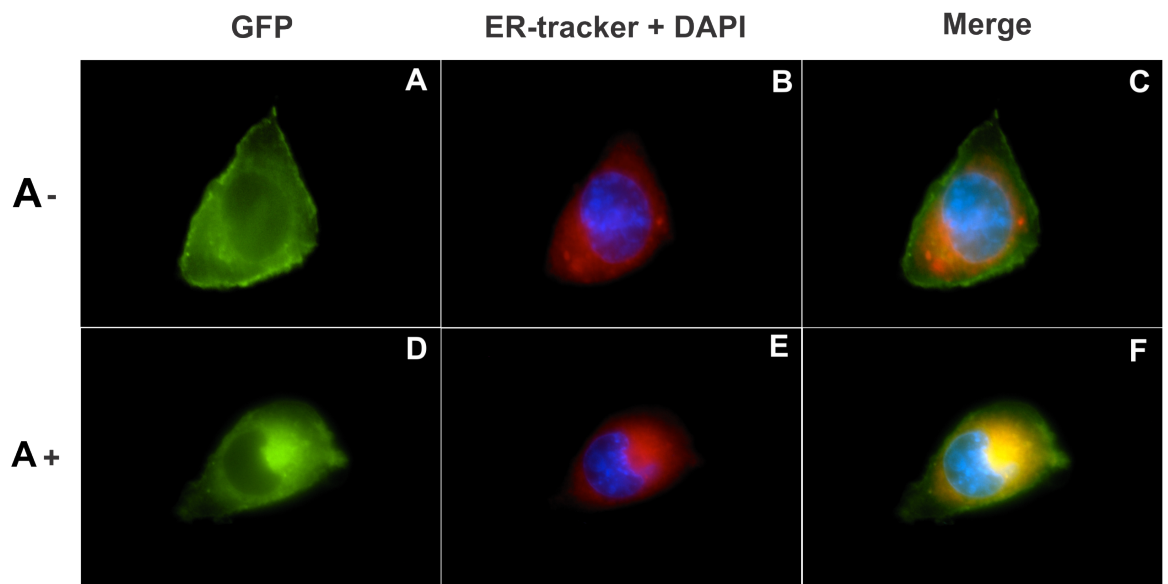
Finalmente, los resultados de la actividad de la *firefly* luciferasa se normalizaron con los resultados de la actividad de la *Renilla* luciferasa y se obtuvieron las unidades relativas de luciferasa (URL). La significancia estadística entre la condición WT y los mutantes se estimó por medio de la prueba *t-Student* y el ANOVA de una vía con análisis *post-hoc*, utilizando el programa estadístico SPSS (versión 21). Se realizaron dos experimentos independientes.

7. Resultados

7.1 Localización subcelular de LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P marcadas con GFP

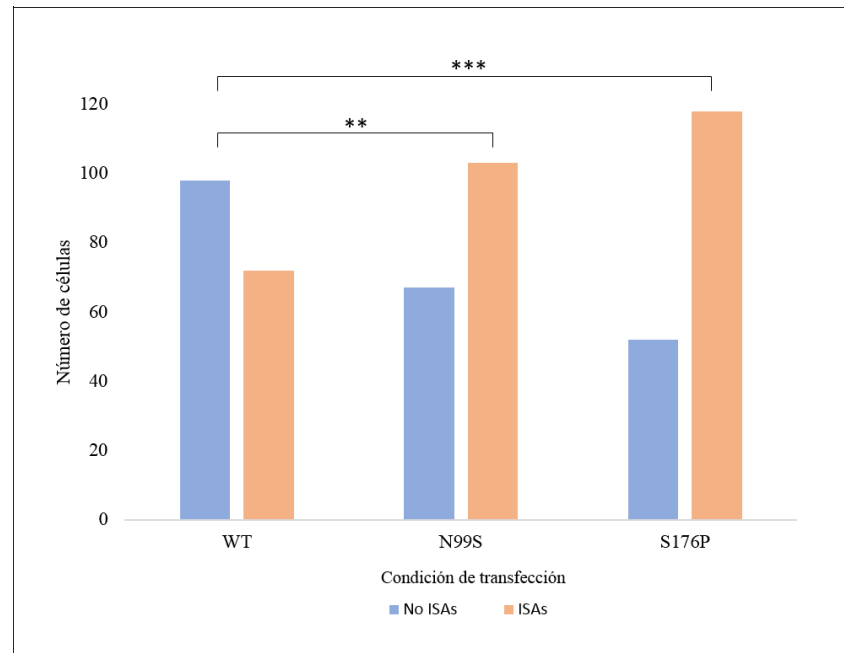
Mediante observación microscópica, se encontró que las proteínas recombinantes, traducidas luego de la transfección con las construcciones plasmídicas GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S o GFP-TOPO-LHCGR-S176P, se localizaron en la membrana celular y en el citoplasma (**Fig. 9**). Además, se observaron imágenes similares agregados subcelulares (ISA) que permitieron establecer categorías fenotípicas de no agregación (células con distribución homogénea en el citoplasma) (**Fig. 9A-C**) y de agregación (células con agregados perinucleares, citoplasmáticos o mixtos) (**Fig. 9D-F**).

Figura 9. Células COS-7 transfectadas con las construcciones plasmídicas GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S o GFP-TOPO-LHCGR-S176P. **A, D** muestra la tinción con GFP. **B, E** muestra la tinción de los núcleos y el retículo endoplasmático con DAPI y ER-Tracker red, respectivamente. **C, F** muestra el Merge. A-: no agregación, A+: agregación. Células observadas con aumento 100X.



Los resultados del recuento celular, de acuerdo a las categorías establecidas, se muestran en la figura 10. Se encontró que las células transfectadas con las condiciones mutantes (LHCGR-N99S o LHCGR-S176P) tenían un incremento estadísticamente significativo de ISAs con respecto a las células transfectadas con la condición WT (WT - N99S: $p=0.001$; WT - S176P: $p=0.0008$).

Figura 10. Recuento de 170 células transfectadas con las construcciones plasmídicas GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S o GFP-TOPO-LHCGR-S176P. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.



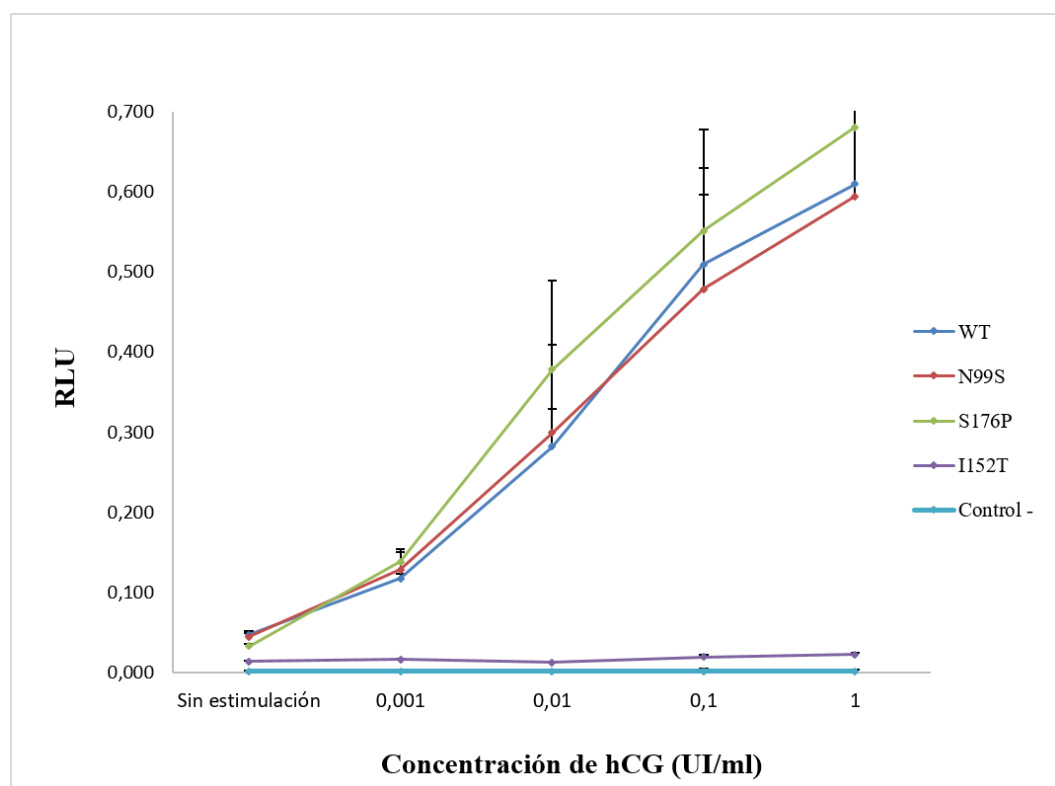
7.2 Producción de cAMP de LHCGR-WT, LHCGR-N99S y LHCGR-S176P, mediante la estimulación post transfección con hCG.

La estimulación con diferentes concentraciones de hCG (0.001 – 1 UI/ml) produjo un incremento significativo, dependiente de la concentración, en la producción de cAMP (cuantificado por las unidades relativas de luciferasa (RLU)) en las células transfectadas con las construcciones plasmídicas pcDNA-LHCGR-WT ($p=0.001$), pcDNA-LHCGR-N99S ($p=1.84 \times 10^{-4}$) o pcDNA-LHCGR-S176P ($p=2.98 \times 10^{-6}$) (**Fig. 11**). Con la concentración más alta de hCG (1 UI/ml), se observó que los niveles de cAMP aumentaron 13 veces más en las células transfectadas con las condiciones WT o N99S, y 20 veces más en las células transfectadas con la condición S176P, en comparación con las células no estimuladas (**Fig. 11**). Por el contrario, en las células transfectadas con la

construcción plasmídica pcDNA-LHCGR- I152T (control positivo) o con el control negativo, no se observó producción de cAMP con ninguna de las concentraciones de hCG analizadas (**Fig. 11**).

Con respecto a la producción de cAMP, entre las células transfectadas con la condición WT y las células transfectadas con las condiciones mutantes N99S o S176P, no se encontraron diferencias significativas (WT-N99S: $p=0.781$; WT-S176P: $p=0.404$).

Figura 11. Curva de respuesta de las células HEK293, transfectadas con las construcciones plasmídicas pcDNA-LHCGR-WT, pcDNA-LHCGR-N99S, pcDNA-LHCGR-S176P, pcDNA-LHCGR- I152T o con el control negativo, a la estimulación con diferentes concentraciones de hCG. Los valores hacen referencia a los promedios de los resultados de dos ensayos independientes, cada uno realizado por sextuplicado.



8. Discusión

Previamente, en mujeres afectadas por FOP no sindrómica se encontraron, por medio de la NGS, las variantes heterocigotas c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro) en el gen *LHCGR* (Fonseca et al., 2015). En los últimos años, la NGS, ha permitido proponer e identificar con éxito nuevas variantes, en diversos genes, asociadas con la etiología de la FOP, las cuales difícilmente podrían haber sido encontrados por la tradicional secuenciación de Sanger (Bouilly et al., 2016; Laissue, 2017; Patiño et al., 2017b). Estas variantes heterocigotas, se describieron como potencialmente patogénicas, debido a que no se encontraron en la población control, afectaron aminoácidos altamente conservados durante la evolución y predictores de patogenicidad indicaron un posible efecto deletéreo (Fonseca et al., 2015). Además, en la paciente portadora de la variante c.296A>G (p.Asn99Ser) también se encontró la variante c.2960C>T (p.Ser987Phe) en el gen *BMP2*, mientras que su familia (sanos) eran heterocigotos para alguna de estas variantes (**Fig. 1**) (Fonseca et al., 2015). Por lo tanto, se podría pensar que ambas variantes podrían tener un efecto deletéreo aditivo apoyando la idea de la naturaleza poligénica de la FOP (Bouilly et al., 2016; Fonseca et al., 2015; Laissue, 2015, 2017; Patiño et al., 2017b). Por esta razón, en la presente tesis se quiso evaluar el impacto funcional de las variantes c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro), con el objetivo de establecer su contribución al fenotipo encontrado en las pacientes.

Inicialmente, se hipotetizó que las variantes encontradas podrían tener un efecto deletéreo en la localización subcelular del LHCGR, por lo que se quiso determinar por

medio de ensayos *in vitro* este efecto funcional. Varios estudios han encontrado que variantes *missense*, localizadas en el dominio extracelular de LHCGR y otras glicoproteínas, afectaron el correcto plegamiento de estas proteínas causando su retención parcial o total en el retículo endoplasmático (ER) (Fanelli et al., 2001; Latronico et al., 1998; Latronico & Segaloff, 1999; Richter-Unruh et al., 2004; Rozell et al., 1995; Tao et al., 2004). En el caso de la variante c.296A>G (p.Asn99Ser), el cambio de una asparagina por una serina en la posición 99, eliminaría uno de los seis potenciales sitios consenso donde ocurre la N-glicosilación. Esta modificación postraduccional es importante, debido a que puede contribuir en el correcto plegamiento de la proteína al facilitar la interacción con proteínas chaperonas, como la calnexina, que residen en el ER (Ascoli et al., 2002). En cuanto a la variante c.526T>C (p.Ser176Pro), el cambio de una serina (un aminoácido polar sin carga, no aromático y con un grupo funcional hidroxilo) por una prolina (un aminoácido apolar con un grupo funcional imino de carácter cíclico) podría modificar la estructura de la proteína y su hidrofobicidad, alterando su correcto plegamiento.

Se observó, que al transfectar transitoriamente células COS-7 con las construcciones plasmídicas GFP-TOPO-LHCGR-WT, GFP-TOPO-LHCGR-N99S o GFP-TOPO-LHCGR-S176P, la localización subcelular fue similar entre la condición WT y las condiciones mutantes. Sin embargo, se observaron imágenes similares a agregados (ISA) que incrementaron significativamente en las condiciones mutantes, lo que podría indicar una retención intracelular de la proteína. En estudios previos, se evaluó el efecto de variantes *missense* (ubicadas en el dominio extracelular de LHCGR) en la localización subcelular, por medio de GFP. Sin embargo, independientemente si la

variante analizada generó o no retención intracelular, no reportaron la presencia de ISA (Qiao et al., 2009; Richter-Unruh et al., 2004; Tao et al., 2004). La observación de esta característica particular, pudo deberse a artefactos intrínsecos al proceso de fijación de las células, ya que la observación microscópica se realizó empleando un microscopio de fluorescencia en donde fue necesario que las células estuvieran fijadas previamente (Tavaré et al., 2001). Los estudios que no reportaron ISA realizaron la observación microscópica en células vivas, por medio del empleo de un microscopio confocal (Qiao et al., 2009; Richter-Unruh et al., 2004; Tao et al., 2004). El efecto también pudo deberse a efectos de sobreexpresión (Patiño et al., 2017c), ya que las células que se emplearon expresan LHCGR, mientras que en los otros estudios emplearon células HEK293 que no expresan este receptor. Además, considerando que la GFP es una proteína de aproximadamente 27 kDa, es posible que pueda afectar la función y la localización de la proteína con la que se encuentra fusionada (Tavaré et al., 2001). Sin embargo, otros estudios también emplearon la metodología de GFP (Qiao et al., 2009; Richter-Unruh et al., 2004; Tao et al., 2004). Asimismo, en un estudio, con diversos controles experimentales, se encontró que la fusión de la GFP en el extremo carboxilo terminal de LHCGR no tuvo efecto en la expresión ni en la localización subcelular de la proteína (Tao et al., 2004).

A pesar de lo mencionado anteriormente, las diferencias significativas encontradas en las ISA entre la condición WT y las condiciones mutantes, son representativas y las variantes c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro) en el gen *LHCGR* podrían estar relacionadas con la etiología de la FOP. Se analizó un número representativo de células (n=170 por cada construcción) y se siguieron las mismas condiciones de

transfección y fijación en las tres construcciones analizadas. Además, se observaron resultados similares a los encontrados en el análisis funcional de la variante c.2960C>T (p.Ser987Phe) del gen *BMP2* (Patiño et al., 2017c). Esta variante generó un incremento significativo de patrones similares a agregación en el retículo endoplasmático (Patiño et al., 2017c). No obstante, con el objetivo de validar los resultados encontrados, se recomienda repetir el experimento analizando un número mayor de células.

Posteriormente, se quiso determinar si las variantes encontradas en el gen *LHCGR* afectaban la producción del cAMP y por lo tanto, la transducción de la señal corriente abajo. Este ensayo se realizó con base a la hipótesis de que las variantes c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro), encontradas en el dominio extracelular, específicamente en los exones 3 y 6, respectivamente, podrían tener un efecto deletéreo en la unión con la hCG y afectar la transducción de la señal. Varias investigaciones han identificado que el dominio extracelular es el encargado de la interacción inicial de alta afinidad con los ligandos, iniciando de esta manera la activación del LHCGR. Esta interacción se produce principalmente en la superficie interna cóncava, que se forma por la organización de la región de las LRRs (transcrita por los exones 2 al 8) en láminas beta (Ascoli et al., 2002; Dufau, 1998; Fanelli et al., 2001; Grzesik et al., 2015; Jeoung et al., 2001; Menon & Menon, 2012; Song et al., 2001b; Troppmann et al., 2013). Además, la mayoría de variantes que ocasionan pérdida de la unión con la hCG se han encontrado en el dominio extracelular (Ascoli et al., 2002).

Luego de la estimulación de las células HEK293, transfectadas con las construcciones plasmídicas pcDNA-LHCGR-WT, pcDNA-LHCGR-N99S o pcDNA-LHCGR-S176P, con diferentes concentraciones de hCG, se identificó que estas variantes no generaron un efecto deletéreo en la activación del receptor. Aunque se ha encontrado que la mayoría de las variantes validadas funcionalmente como causales de la FOP no sindrómica generaron una completa pérdida en la producción de cAMP luego de la estimulación con hCG, los resultados encontrados en la presente tesis no son discordantes (Latronico et al., 1996, 1998; Qiao et al., 2009; Stavrou et al., 1998; Toledo et al., 1996). Se ha identificado, en el caso del LCHGR que la severidad del fenotipo reproductivo podría depender de la actividad residual del receptor y haber una correlación genotipo – fenotipo (Laue et al., 1996b). De hecho, las variantes que generaron una completa pérdida de la función del receptor se encontraron en estado homocigoto y se han asociado a fenotipos reproductivos severos como amenorrea primaria o secundaria e infertilidad (Latronico et al., 1996, 1998; Stavrou et al., 1998; Toledo et al., 1996). Asimismo, variantes que generaron inactivación parcial del receptor se han encontrado en pacientes con fenotipos reproductivos más leves (Bruysters et al., 2008; Laue et al., 1996b; Misrahi et al., 1997). En el caso de nuestras pacientes, ellas tuvieron menstruaciones regulares por varios años, por lo que fueron fértiles. Luego desarrollaron amenorrea secundaria y presentaron hipogonadismo hipergonadotrópico (Fonseca et al., 2015).

Nuestros resultados son similares a los encontrados por Bruysters et al (Bruysters et al., 2008). Ellos realizaron sus ensayos funcionales en células HEK293 y realizaron la medición de la producción de cAMP por medio de un ensayo reportero de luciferasa,

luego de la estimulación con diferentes concentraciones de hCG y de LH (Bruysters et al., 2008). Encontraron que la variante de *splicing* IVS10-G>A, identificada en tres hermanas con un fenotipo reproductivo similar al de nuestras pacientes, no generó pérdida en la producción de cAMP posterior a la estimulación con ambas hormonas. Sin embargo, observaron que la intensidad de la estimulación con la LH, pero no con la hCG, disminuyó significativamente (Bruysters et al., 2008). Por consiguiente, no se podría descartar la posibilidad de encontrar diferencias significativas al realizar la estimulación con la LH entre la condición WT y mutantes. De hecho, se ha encontrado que existen diferencias en la señalización mediada por la LH y la hCG (Grzesik et al., 2015).

9. Conclusiones y perspectivas

Se concluye que las variantes c.296A>G (p.Asn99Ser) y c.526T>C (p.Ser176Pro), podrían generar retención intracelular del receptor pero no afectar la transducción de la señal mediada por la hCG. Por lo tanto, con los ensayos funcionales realizados no se pudo determinar de manera definitiva que las estas variantes tuvieran un efecto funcional deletéreo. No obstante, considerando que la FOP es una patología de origen poligénico, no se descartaría la posibilidad de que tuvieran un efecto aditivo mínimo y estuvieran relacionadas con su etiología.

Por otro lado, con el objetivo de validar los resultados encontrados en el ensayo *in vitro* de localización celular, se recomienda hacer inmunofluorescencia con un anticuerpo primario anti-FLAG (en células COS-7) o anti-LHCGR (en células HEK293) y repetir

el ensayo en células HEK293 usando membranas de poli-D-lisina para la adherencia celular. Asimismo, se recomienda determinar por medio de la estimulación con la LH si las variantes encontradas afectan la producción de cAMP. Para complementar los resultados obtenidos en la presente tesis, se sugiere hacer un modelamiento bioinformático para predecir los potenciales cambios estructurales y moleculares que podrían generar las variantes encontradas. También se propone un análisis funcional de la variante *LHCGR* c.296A>G coexpresada con la variante *BMP2* c.296C>T, ambas presentes en la misma paciente.

10. Bibliografía

- Aittomaki, K., Dieguez Lucena, J. L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J., Kaskikari R., Sankila E. M., Lehvaslaiho H., Engel A.R., Nieschlag E., Huhtaniemi I., de la Chapelle, A. (1995). Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Causes Hereditary Hypergonadotropic Ovarian Failure. *Cell*, 82(6), 959–968.
- Albanese, C., Christin-Maitre, S., Sluss, P. M., Crowley, W. F., & Jameson, J. L. (1994). Development of a bioassay for FSH using a recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1(1–2), 211–219. [http://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90237-2](http://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90237-2)
- Allen, L. A., Achermann, J. C., Pakarinen, P., Kotlar, T. J., Huhtaniemi, I. T., Jameson, J. L., Cheetham T. D., Ball, S. G. (2003). A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotrophic hypogonadism : clinical and molecular characteristics. *Human Reproduction*, 18(2), 251–256. <http://doi.org/10.1093/humrep/deg046>
- Anasti, J. N. (1998). Premature ovarian failure: an update. *Fertility and Sterility*, 70(1), 1–15.
- Angelova, K., Fanelli, F., & Puett, D. (2008). Contributions of Intracellular Loops 2 and 3 of the Lutropin Receptor in Gs Coupling. *Molecular Endocrinology*, 22(1), 126–

138. <http://doi.org/10.1210/me.2007-0352>

- Ascoli, M., Fanelli, F., & Segaloff, D. L. (2002). The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor, A 2002 Perspective. *Endocrine Reviews*, 23(2), 141–174.
- Atwood, C. S., Smith, M. A., & Bowen, R. L. (2005). Feedback on a feedback loop: The hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 7(1), 1–2.
- Baere, E. De, Dixon, M. J., Small, K. W., Jabs, E. W., Leroy, B. P., Devriendt, K., Gillerot Y., Mortier G., Meire F., Van Maldergem L., Courtens W., Hjalgrim H., Huang S., Liebaers I., Van Regemorter N., Touraine P., Praphanphoj V., Verloes A., Udar N., Yellore V., Chalukya M., Yelchits S., De Paepe A., Kuttenn F., Fellous M., Veitia R., Messiaen, L. (2001). Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype – phenotype correlation. *Human Molecular Genetics*, 10(15), 1591–1600.
- Bakalov, V. K., Anasti, J. N., Calis, K. A., & Pharm, D. (2005). Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 84(4).
<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.04.060>
- Barchi, E., Denise, C., & Christofolini, M. (2011). Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Archives of Gynecology Obstetrics*, 283, 635–643.
<http://doi.org/10.1007/s00404-010-1815-4>
- Batista, F., Vaiman, D., Dausset, J., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2007). Potential targets of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3330–3335.
- Beau, I., Touraine, P., Meduri, G., Gougeon, A., Desroches, A., Matuchansky, C., Milgrom E., Kuttenn F., Misrahi, M. (1998). A Novel Phenotype Related to Partial Loss of Function Mutations of the Follicle Stimulating Hormone Receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 102(7), 1352–1359.
- Bedecarrats, G. Y. (2015). Control of the reproductive axis: Balancing act between stimulatory and inhibitory inputs. *Poultry Science*, 94(4), 810–815.
- Bilgin, E. M., & Kovanci, E. (2015). Genetics of premature ovarian failure. *Current*

Opinion in Obstetrics and Gynecology, 27, 167–174.

<http://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000177>

Bouilly, J., Bachelot, A., Broutin, I., Touraine, P., & Binart, N. (2011). Novel NOBOX Loss-of-Function Mutations Account for 6.2 % of Cases in a Large Primary Ovarian Insufficiency Cohort. *Human Mutation*, 32(10), 1108–1113.

<http://doi.org/10.1002/humu.21543>

Bouilly, J., Beau, I., Barraud, S., Bernard, V., Azibi, K., Fagart, J., Fèvre A., Todeschini A. L., Veitia R. A., Beldjord C., Delemer B., Dodé C., Young J., Binart, N. (2016). Insufficiency of multiple gene mutations accounts for a new genetic architecture of primary ovarian insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(12), 1–9. <http://doi.org/10.1210/jc.2016-2152>

Bouilly, J., Roucher-boulez, F., Gompel, A., Bry-gauillard, H., Azibi, K., Beldjord, C., Dodé C., Bouligand J., Mantel A. G., Hécart A. C., Delemer B., Young J., Binart, N. (2015). New NOBOX Mutations Identified in a Large Cohort of Women With Primary Ovarian Insufficiency Decrease KIT-L Expression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(3), 994–1001.

<http://doi.org/10.1210/jc.2014-2761>

Bradbury, F. A., Kawate, N., Foster, C. M., & Menon, K. M. . (1997). Post-translational Processing in the Golgi Plays a Critical Role in the Trafficking of the Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor to the Cell Surface. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 5921–5926.

Bruysters, M., Christin-Maitre, S., Verhoef-Post, M., Sultan, C., Auger, J., Faugeron, I., Larue L., Lumbroso S., Themmen A. P., Bouchard, P. (2008). A new LH receptor splice mutation responsible for male hypogonadism with subnormal sperm production in the propositus, and infertility with regular cycles in an affected sister. *Human Reproduction*, 23(8), 1917–1923.

Bruysters, M., Verhoef-Post, M., & Themmen, A. P. N. (2008). Asp330 and Tyr331 in the C-terminal Cysteine-rich Region of the Luteinizing Hormone Receptor Are Key Residues in Hormone-induced Receptor Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 25821–25828. <http://doi.org/10.1074/jbc.M804395200>

Burgon, P. G., Stanton, P. G., & Robertson, D. M. (1996). *In vivo* Bioactivities and Clearance Patterns of Highly Purified Human Luteinizing Hormone Isoforms.

Endocrinology, 137(11), 4827–4836.

Caburet, S., Arboleda, V., Llano, H., Overbeek, P. A., Barbero, J. L., Oka, K., Harrison W., Vaiman D., Ben-Neriah Z., García-Tuñón I., Fellous M., Pendás A. M., Veitia R. A., Vilain, E. (2014). Mutant Cohesin in Premature Ovarian Failure. *The New England Journal of Medicine*, 370(10), 943–949.

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

Caburet, S., Zabadakova, P., Ben-Neriah, Z., Bouhali, K., Dipietromaria, A., Charon, C., Besse C., Laissue P., Chalifa-Caspi V., Christin-Maitre S., Vaiman D., Levi G., Veitia R. A., Fellous M. (2012). Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial Premature Ovarian Failure. *Plos One*, 7(3), e33412.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0033412>

Camats, N., Pandey, A. V., Fernandez-Cancio, M., Andaluz, P., Janner, M., Torán, N., Moreno F., Bereket A., Akcay T., García-García E., Muñoz M. T., Gracia R., Nistal M., Castaño L., Mullis P. E., Carrascosa A., Audí L., Fluck, C. E. (2012). Ten Novel Mutations in the NR5A1 Gene Cause Disordered Sex Development in 46, XY and Ovarian Insufficiency in 46, XX Individuals. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(7), E1294–E1306.

<http://doi.org/10.1210/jc.2011-3169>

Carlosama, C., Zaiat, M. El, Patiño, L. C., Mateus, H. E., Veitia, R. A., & Laissue. (2017). A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene *MSH4* causes primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*, ddx199.

Casarini, L., Lispi, M., Longobardi, S., Milosa, F., La Marca, A., Tagliasacchi, D., Pignatti E., Simoni, M. (2012). LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling. *PloS One*, 7(10), e46682. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046682>

Casarini, L., Riccetti, L., De Pascali, F., Nicoli, A., Tagliavini, S., Trenti, T., La Sala G. B., Somini, M. (2016). Follicle-stimulating hormone potentiates the steroidogenic activity of chorionic gonadotropin and the anti-apoptotic activity of luteinizing hormone in human granulosa-lutein cells *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 422, 103–114. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.008>

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(5630), 215–218. <http://doi.org/10.1126/science.1086336>
- Castro, T., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Forero, D., Restrepo, C. M., Talero C., Vélez A., Laissue, P. (2013). Sequence analysis of the ADRA2A coding region in children affected by attention deficit hyperactivity disorder. *Neurological Science*, 34(12), 2219–2222. <http://doi.org/10.1007/s10072-013-1569-4>
- Chan Juan Lin, C., Clouser, C., Peegel, H., Menon, B., & Menon, J. K. M. (2008). The Extracellular Domain of Luteinizing Hormone Receptor Dictates Its Efficiency of Maturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), 307–311. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.136>.
- Chapman, C., Cree, L., & Shellin, A. (2015). The genetics of premature ovarian failure: current perspectives. *International Journal of Women's Health*, 7, 799–810.
- Chin, E. C., & Abayasekara, D. R. E. (2004). Progesterone secretion by luteinizing human granulosa cells: a possible cAMP-dependent but PKA-independent mechanism involved in its regulation. *Journal of Endocrinology*, 183, 51–60. <http://doi.org/10.1677/joe.1.05550>
- Choi, J., & Smitz, J. (2014a). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin : distinguishing unique physiologic roles. *Gynecological Endocrinology*, 30(3), 174–181. <http://doi.org/10.3109/09513590.2013.859670>
- Choi, J., & Smitz, J. (2014b). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin : Origins of difference. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 383(1), 203–213. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.009>
- Choi, Y., & Rajkovic, A. (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(5), 579–590. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5394-7>
- Christensen, A. (2012). Hormonal Regulation of Female Reproduction. *Hormone and Metabolic Research*, 44(8), 587–591. <http://doi.org/10.1055/s-0032-1306301>.
- Christin-maitre, S., Vasseur, C., Portnoi, M., & Bouchard, P. (1998). Genes and premature ovarian failure. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145, 75–80.
- Cole, L. A. (2010). Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(102), 1–14.
- Conway, G., Kaltsas, G., Patel, A., Davies, M., & Jacobs, H. (1996). Characterization of

- idiopathic premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 65(2), 337–341.
[http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)58095-9](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58095-9)
- Conway, G. S. (2000). Premature ovarian failure. *British Medical Bulletin*, 56(3), 643–649.
- Coulam, C., Adamson, S., & Annegers, J. (1986). Incidence of Premature Ovarian Failure. *Obstetrics & Gynecology*, 67(4), 604–606.
- Cox, L., & Liu, J. H. (2014). Primary ovarian insufficiency: an update. *International Journal of Women's Health*, 6, 235–243.
- Dagklis, T., Ravanos, K., Makedou, K., Kourtis, A., & Rouso, D. (2015). Common features and differences of the hypothalamic – pituitary – gonadal axis in male and female. *Gynecological Endocrinology*, 31(1), 14–17.
<http://doi.org/10.3109/09513590.2014.959917>
- Di Pasquale, E., Beck-peccoz, P., & Persani, L. (2004). Hypergonadotropic Ovarian Failure Associated with an Inherited Mutation of Human Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP15) Gene. *The American Journal of Human Genetics*, 75, 106–111.
- Di Pasquale, E., Rossetti, R., Marozzi, A., Bodega, B., Borgato, S., Cavallo, L., ... Persani, L. (2006). Identification of New Variants of Human *BMP15* Gene Ovarian Failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(5), 1976–1979.
<http://doi.org/10.1210/jc.2005-2650>
- Dickinson, R. E., Stewart, A. J., Myers, M., Millar, R. P., & Duncan, W. C. (2009). Differential Expression and Functional Characterization of Luteinizing Hormone Receptor Splice Variants in Human Luteal Cells: Implications for Luteolysis. *Endocrinology*, 150(6), 2873–2881. <http://doi.org/10.1210/en.2008-1382>
- Dierich, A., Sairam, R. M., Monaco, L., Fimia, G. M., Gansmuller, A., LeMeur, M., & Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling *in vivo*: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13612–13617.
- Diggle, C. P., Parry, D. A., Logan, C. V., Laissue, P., Rivera, C., Restrepo, C. M., Fonseca D. J., Morgan J. E., Allanore Y., Fontenay M., Wipff J., Varret M., Gibault L., Dalantaeva N., Korbonits M., Zhou B., Yuan G., Harifi G., Cefle K.,

- Palanduz S., Akoglu H., Zwijnenburg P. J., Lichtenbelt K. D., Aubry-Rozier B., Superti-Furga A., Dallapiccola B., Accadia M., Brancati F., Sheridan E. G., Taylor G. R., Carr I. M., Johnson C. A., Markham A. F., Bonthron, D. T. (2012). Prostaglandin transporter mutations cause pachydermoperiostosis with myelofibrosis. *Human Mutation*, 38(8), 1175–1181.
<http://doi.org/10.1002/humu.22111>
- Dixit, H., Rao, L., Padmalatha, V., Kanakavalli, M., Deenadayal, M., Gupta, N., Chakrabarty B., Singh, L. (2006). Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Humanan Genetics*, 119, 408–415.
<http://doi.org/10.1007/s00439-006-0150-0>
- Doherty, E., Pakarinen, P., Tiitinen, A., Kiilavuori, A., Huhtaniemi, I., Forrest, S., & Aittoma, K. (2002). A Novel Mutation in the FSH Receptor Inhibiting Signal Transduction and Causing Primary Ovarian Failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3), 1151–1155.
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383(6600), 531–535. <http://dx.doi.org/10.1038/383531a0>
- Dubois, S. L., Acosta-martínez, M., Dejoseph, M. R., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U., Urban J. H., Levine, J. E. (2015). Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor α in kisspeptin neurons. *Endocrinology*, 156(3), 1111–1120. <http://doi.org/10.1210/en.2014-1851>
- Ducat, A., Doridot, L., Calicchio, R., Méhats, C., Vilotte, J.-L., Castille, J., Barbaux S., Couderc B., Jacques S., Letourneur F., Buffat C., Le Grand F., Laissue P., Miralles F., Vaiman, D. (2016). Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Scientific Reports*, 6(19196), 1–9.
<http://doi.org/10.1038/srep19196>
- Dufau, M. L. (1998). The Luteinizing Hormone Receptor. *Annual Review of Physiology*, 60(1), 461–496.
- Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T. J., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. N. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 140(12), 5789–5796.

- Ebrahimi, M., & Akbari Asbagh, F. (2015). The role of autoimmunity in premature ovarian failure. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(8), 461–472.
- Ebrahimi, M., & Asbagh, F. A. (2011). Pathogenesis and Causes of Premature Ovarian Failure : An Update. *International Journal of Fertility & Sterility*, 5(2), 54–65.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, 30(6), 624–712.
<http://doi.org/10.1210/er.2009-0012>
- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., & Matzuk, M. M. (1999). Molecular Characterization of the Follicle Defects in the Growth Differentiation Factor 9-Deficient Ovary. *Molecular Endocrinology*, 13(6), 1018–1034.
- F. van Dooren, M., Bertoli-avella, A. M., & Oldenburg, R. A. (2009). Premature ovarian failure and gene polymorphisms. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 21, 313–317. <http://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32832e0813>
- Fanelli, F., Themmen, A. P. N., & Puett, D. (2001). Lutropin Receptor Function: Insights from Natural, Engineered, and Computer-Simulated Mutations. *IUBMB Life*, 51(3), 149–155.
- Filicori, M. (1999). The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertility and Sterility*, 71(3), 405–414. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00482-8](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00482-8)
- Fonseca, D. J., Garzon, E., Lakhal, B., Braham, R., Ojeda, D., Elghezal, H., Saâd A., Restrepo C. M., Laissue, P. (2012). Screening for mutations of the *FOXO4* gene in premature ovarian failure patients. *Reproductive BioMedicine Online*, 24, 339–341. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.11.017>
- Fonseca, D. J., Ojeda, D., Lakhal, B., Braham, R., Eggers, S., Turbitt, E., White S., Grover S., Warne G., Zacharin M., Nevin Lam A., Landolsi H., Elghezal H., Saâd A., Restrepo C. M., Fellous M., Sinclair A., Koopman P., Laissue, P. (2012b). CITED2 mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure. *Translational Research*, 160(5), 384–388. <http://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.006>
- Fonseca, D. J., Ortega-recalde, O., Esteban-perez, C., Moreno-ortiz, H., Patiño, L. C., Bermúdez, M. O., Ortiz A. M , Restrepo C. M., Lucena E., Laissue, P. (2014). BMP15 c.-9C > G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reproductive BioMedicine Online*, 29, 627–

633. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.018>
- Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Suárez, Y. C., Rodríguez, A. de J., Mateus, H. E., Jiménez, K. M., Ortega-Recalde O., Díaz-Yamal I., Laissue, P. (2015). Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertility and Sterility*, 104(1), 154–162. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.016>
- Fonseca, D. J., Prada, C. F., Siza, L. M., Angel, D., Gomez, Y. M., Restrepo, C. M., Douben H., Rivadeneira F., de Klein A., Laissue, P. (2012c). A *de novo* 14q12q13.3 interstitial deletion in a patient affected by a severe neurodevelopmental disorder of unknown origin. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158(3), 689–693. <http://doi.org/10.1002/ajmg.a.35215>
- Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Vergara, J. I., Ríos, X., Uribe, C., Chávez, L., Velandia F., Vargas C. I., Restrepo C. M., Laissue, P. (2013). A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth – Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene. *British Journal of Dermatology*, 168(2), 456–458. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11181.x>
- Forero, D. A., Wonkam, A., Wang, W., Laissue, P., López-correa, C., Fernández-lópez, J. C., Mugasimangalam R., Perry, G. (2016). Current needs for human and medical genomics research infrastructure in low and middle income countries. *Journal of Medical Genetics*, 53 (7), 1–3. <http://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103631>
- Fortune, J. E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, 50(2), 225–232. <http://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.225>
- Fournier, T., Guibourdenche, J., & Evain-Brion, D. (2015). hCGs: Different sources of production, different glycoforms and functions. *Placenta*, 29, S60–S65. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.02.002>
- Freimann, S., Ben-Amin, I., Dantes, A., Ron-El, R., & Amsterdam, A. (2004). EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(2), 829–834. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.129>
- Galet, C., & Ascoli, M. (2005). The Differential Binding Affinities of the Luteinizing Hormone (LH)/Choriogonadotropin Receptor for LH and Choriogonadotropin Are

- Dictated by Different Extracellular Domain Residues. *Molecular Endocrinology*, 19(5), 1263–1276. <http://doi.org/10.1210/me.2004-0410>
- Galet, C., Min, L., Narayanan, R., Kishi, M., Weigel, N. L., & Ascoli, M. (2003). Identification of a Transferable Two-Amino-Acid Motif (GT) Present in the C-Terminal Tail of the Human Lutropin Receptor that Redirects Internalized G Protein-Coupled Receptors from a Degradation to a Recycling Pathway. *Molecular Endocrinology*, 17(3), 411–422. <http://doi.org/10.1210/me.2002-0161>
- Geng, Y., Tsai-Morris, C.-H., Zhang, Y., & Dufau, M. L. (1999). The Human Luteinizing Hormone Receptor Gene Promoter : Activation by Sp1 and Sp3 and Inhibitory Regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263(2), 366–371.
- Gersak, K., Harris, S. E., Smale, W. J., & Shelling, A. N. (2004). A novel 30 bp deletion in the *FOXL2* gene in a phenotypically normal woman with primary amenorrhoea: Case report. *Human Reproduction*, 19(12), 2767–2770. <http://doi.org/10.1093/humrep/deh496>
- Gilchrist, R. L., Ryu, K.-S., Ji, I., & Ji, T. H. (1996). The Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor has distinct transmembrane conductors for cAMP and inositol phosphate signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19283–19287.
- Gosden, R. G. (2002). Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 186(2), 149–153. [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00683-9](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00683-9)
- Goswami, D., & Conway, G. S. (2005). Premature ovarian failure. *Human Reproduction Update*, 11(4), 391–410. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmi012>
- Gougeon, A. (2004). Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects. *The Ovary*, (1).
- Gromoll, J., Eiholzer, U., Nieschlag, E., & Simoni, M. (2000). Male Hypogonadism Caused by Homozygous Deletion of Exon 10 of the Luteinizing Hormone (LH) Receptor: Differential Action of Human Chorionic Gonadotropin and LH. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(6), 2281–2286.
- Grzesik, P., Kreuchwig, A., Rutz, C., Furkert, J., Wiesner, B., Schuelein, R., Kleinau G., Gromoll J., Krause, G. (2015). Differences in signal activation by LH and hCG

- are mediated by the LH/CG receptor's extracellular hinge region. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 1–14. <http://doi.org/10.3389/fendo.2015.00140>
- Harris, S. E., Chand, A. L., Winship, I. M., Gersak, K., Aittoma, K., & Shelling, A. N. (2002). Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Molecular Human Reproduction*, 8(8), 729–733.
- Hendrix, A. O., Hughes, C. L., & Selgrade, J. F. (2014). Modeling Endocrine Control of the Pituitary – Ovarian Axis: Androgenic Influence and Chaotic Dynamics. *Bulletin of Mathematical Biology*, 76(1), 136–156. <http://doi.org/10.1007/s11538-013-9913-7>
- Herbison, A. E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature Reviews. Endocrinology*, 12(8), 452. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2016.70>
- Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124, 43–101. [http://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](http://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)
- Hoek, A., Schoemaker, J., & Drexhage, H. A. (1997). Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity. *Endocrine Reviews*, 18(1), 107–134.
- Huhtaniemi, I., Ahtiainen, P., Pakarainen, T., Rulli, S. B., Zhang, F., & Poutanen, M. (2006). Genetically modified mouse models in studies of luteinising hormone action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 252(1), 126–135. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.026>
- Janse, F., de With, L. M., Duran, K. J., Kloosterman, W. P., Goverde, A., Lambalk, C., Laven J. S., Fauser B. C., Giltay, J. (2012). Limited contribution of NR5A1 (SF-1) mutations in women with primary ovarian insufficiency (POI). *Fertility and Sterility*, 97(1), 141–146. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.10.032>
- Javed, Z., Qamar, U., & Sathyapalan, T. (2015). The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic – pituitary – gonadal axis — current perspective. *Endokrynologia Polska*, 66(6), 534–547. <http://doi.org/10.5603/EP>
- Jeoung, M., Phang, T., Sang Song, Y., Ji, I., & Ji, T. H. (2001). Hormone Interactions to Leu-rich Repeats in the Gonadotropin Receptors III. Photoaffinity labeling of human chorionic gonadotropin with receptor LEU-rich repeat 4 peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3443–3450.

<http://doi.org/10.1074/jbc.M003774200>

- Jeppesen, J. V., Kristensen, S. G., Nielsen, M. E., Humaidan, P., Canto, M. D., Fadini, R., Schmidt K. T., Ernst E., Andersen, C. Y. (2012). LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(8), e1524–e1531.
<http://doi.org/10.1210/jc.2012-1427>
- Jiao, X., Qin, Y., Li, G., Zhao, S., You, L., Ma, J., Simpson J. L., Chen, Z.-J. (2013). Novel NR5A1 missense mutation in premature ovarian failure: detection in han chinese indicates causation in different ethnic groups. *Plos One*, 8(9), e74759.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074759>
- Jo, Y., King, S. R., Khan, S. A., & Stocco, D. M. (2005). Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3', 5' -monophosphate- dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 73(2), 244–255.
<http://doi.org/10.1095/biolreprod.104.037721>
- Karlsson, A. B., Maizels, E. T., Flynn, M. P., Jones, J. C., Shelden, E. A., Bamburg, J. R., & Hunzicker-Dunn, M. (2010). Luteinizing hormone receptor-stimulated progesterone production by preovulatory granulosa cells requires protein kinase A-dependent activation/dephosphorylation of the actin dynamizing protein cofilin. *Molecular Endocrinology*, 24(9), 1765–1781. <http://doi.org/10.1210/me.2009-0487>
- Khan, D. R., Guillemette, C., Sirard, M. A., & Richard, F. J. (2015). Transcriptomic analysis of cyclic AMP response in bovine cumulus cells. *Physiological Genomics*, 47(9), 432–442. <http://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00043.2015>
- Kim, J. Y. (2012). Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 39(1), 10–14.
<http://doi.org/10.5653/cerm.2012.39.1.10>
- Knight, P. G., Satchell, L., & Glister, C. (2012). Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 359(1), 53–65.
<http://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.024>
- Kokcu, A. (2010). Premature ovarian failure from current perspective. *Gynecological Endocrinology*, 26(8), 555–562. <http://doi.org/10.3109/09513590.2010.488773>
- Koo, Y. B., Inhae, J., Slaughter, R. G., & Ji, T. H. (1991). Structure of the Luteinizing

- hormone receptor gene and multiple exons of the coding sequence. *Endocrinology*, 128(5), 2297–2308.
- Kossack, N., Simoni, M., Richter-Unruh, A., Themmen, A. P. N., & Gromoll, J. (2008). Mutations in a novel, cryptic exon of the Luteinizing hormone/Chorionic Gonadotropin receptor gene cause male pseudohermaphroditism. *Plos Medicine*, 5(4), e88. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050088>
- Kuechler, A., Hauffa, B. P., Koninger, A., Kleinau, G., Albrecht, B., Horsthemke, B., & Gromoll, J. (2010). An unbalanced translocation unmasks a recessive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene and causes FSH resistance. *European Journal of Human Genetics*, 18(6), 656–661. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2009.244>
- L'Hôte, D., Laissue, P., Serres, C., Montagutelli, X., Veitia, R. A., & Vaiman, D. (2010). Interspecific resources: a major tool for quantitative trait locus cloning and speciation research. *BioEssays*, 32(2), 132–142. <http://doi.org/10.1002/bies.200900027>
- Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein- coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(4), 339–357. <http://doi.org/10.1038/nrd2518>
- Laissue, P. (2015). Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411, 243–257.
- Laissue, P. (2017). The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.021>
- Laissue, P., Burgio, G., L'Hôte, D., Renault, G., Marchiol-fournigault, C., Fradelizi, D., Fellous M., Serres C., Montagutelli X., Monget P., Vaiman, D. (2009b). Identification of Quantitative Trait Loci responsible for embryonic lethality in mice assessed by ultrasonography. *The International Journal of Developmental Biology*, 53, 623–629. <http://doi.org/10.1387/ijdb.082613pl>
- Laissue, P., Christin-maitre, S., Touraine, P., Kuttann, F., Ritvos, O., Aittomaki, K., Bourcigaux N., Jacquesson L., Bouchard P., Frydman R., Dewailly D., Reyss A. C., Jeffery L., Bachelot A., Massin N., Fellous M., Veitia, R. A. (2006). Mutations

- and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology*, 154, 739–744.
<http://doi.org/10.1530/eje.1.02135>
- Laissue, P., L'Hote, D., Serres, C., & Vaiman, D. (2009c). Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. *Animal*, 3(1), 55–71.
<http://doi.org/10.1017/S1751731108003315>
- Laissue, P., Lakhal, B., Benayoun, B., Dipietromaria, A., Braham, R., Elghezal, H., Philibert P., Saâd A., Sultan C., Fellous M., Veitia, R. A. (2009). Functional evidence implicating FOXL2 in non syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *Journal of Medical Genetics*, 46(7), 455–457.
- Laissue, P., Lakhal, B., Vatin, M., Batista, F., Burgio, G., Mercier, E., Santos E. D., Buffat C., Sierra-Diaz D. C., Renault., Montagutelli X., Salmon J., Monget P., Veitia R. A., Méhats C., Fellous M., Gris J. C., Cocquet J., Vaiman, D. (2016). Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. *Open Biology*, 6(10), 160109.
- Laissue, P., Restrepo, C. M., & Ortiz, A. M. (2017b). Improving the evaluation of milestones for students completing a clinical genetics elective. *Genetics in Medicine*, 1–2. <http://doi.org/10.1038/gim.2017.62>
- Laissue, P., Vinci, G., Veitia, R. A., & Fellous, M. (2008). Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 282, 101–111. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.005>
- Lakhal, B., Ben-hadj-khalifa, S., Bouali, N., Philipert, P., Audran, F., Braham, R., Hatem E., Saad, A. (2012). Mutational screening of SF1 and WNT4 in Tunisian women with premature ovarian failure. *Gene*, 509(2), 298–301.
<http://doi.org/10.1016/j.gene.2012.08.007>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., El-ghezal, H., Saad, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2010). BMP15 and premature ovarian failure: causal mutations, variants, polymorphisms. *Clinical Endocrinology*, 72(3), 425–426.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03643.x>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saad, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2009). A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a

- familial case of premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*, 71, 752–753.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03571.x>
- Lakhal, B., Laissue, P., Elghézal, H., & Fellous, M. (2008). Genetic analysis of premature ovarian failure: Role of forkhead and TGF- β genes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 36, 862–871. <http://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.07.002>
- Latronico, A. C., Anasti, J., Arnhold, I. J. P., Rapaport, R., Mendonca, B. B., Bloise, W., Castro M., Tsigos C., Chrousos, G. P. (1996). Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *The New England Journal of Medicine*, 334(8), 507–512.
- Latronico, A. C., & Arnhold, I. J. P. (2012). Inactivating mutations of the human luteinizing hormone receptor in both sexes. In *Seminars in Reproductive Medicine* (pp. 382–386). Thieme Medical Publishers.
- Latronico, A. C., Chai, Y., Arnhold, I. J. P., Liu, X., Mendonca, B. B., & Segaloff, D. L. (1998). A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Molecular Endocrinology*, 12(3), 442–450.
- Latronico, A. C., & Segaloff, D. L. (1999). Naturally occurring mutations of the luteinizing-hormone receptor: lessons learned about reproductive physiology and G protein – coupled receptors. *The American Journal of Human Genetics*, 65(4), 949–958.
- Laue, L. L., Wu, S. M., Kudo, M., Bourdony, C. J., Cutler, G. B., Hsueh A. J., Chan, W. Y. (1996b). Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Molecular Endocrinology*, 10(8), 987–997.
- Laue, L., Wu, S. M., Kudo, M., Hsueh, J. W., Cutler, G. B., Jelly, D. H., Diamond F. B., Chan, W. Y. (1996a). Heterogeneity of activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in male-limited precocious puberty. *Biochemical and Molecular Medicine*, 58(2), 192–198.
- Law, N. C., Weck, J., Kyriss, B., Nilson, J. H., & Hunzicker-Dunn, M. (2013). Lhcgr expression in granulosa cells: roles for PKA-Phosphorylated β -Catenin, TCF3, and FOXO1. *Molecular Endocrinology*, 27(8), 1295–1310.

<http://doi.org/10.1210/me.2013-1025>

- Lei, Z. M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X., & Rao, C. V. (2001). Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Molecular Endocrinology*, 15(1), 184–200.
- Lourenco, D., Brauner, R., Lin, L., De Perdigo, A., Weryha, G., Muresan, M., Boudjenah R., Guerra-Junior G., Maciel-Guerra A. T., Achermann J. C., McElreavey K., Bashamboo, A. (2009). Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *The New England Journal of Medicine*, 360(12), 1200–1210.
- Luborsky, J. L., Meyer, P., Sowers, M. F., Gold, E. B., & Santoro, N. (2002). Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Human Reproduction*, 18(1), 199–206. <http://doi.org/10.1093/humrep/deg005>
- Madhra, M., Gay, E., M. Fraser, H., & Duncan, W. C. (2004). Alternative splicing of the human luteal LH receptor during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Molecular Human Reproduction*, 10(8), 599–603. <http://doi.org/10.1093/molehr/gah076>
- Maggi, R., Cariboni, A. M., Marelli, M. M., Marzagalli, M., Moretti, R. M., Andre, V., & Limonta, P. (2016). GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human Reproduction Update*, 22(3), 358–381. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmv059>
- Maman, E., Yung, Y., Kedem, A., Yerushalmi, G. M., Konopnicki, S., Cohen, B., Dor J., Hourvitz, A. (2012). High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertility and Sterility*, 97(3), 592–598. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.027>
- Marozzi, A., Manfredini, E., Tibiletti, M., Furlan, D., Villa, N., Vegetti, W., Crosignani P. G., Ginelli E., Meneveri R., Dalpra, L. (2000). Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure. *Humanan Genetics*, 107, 304–311. <http://doi.org/10.1007/s004390000364>
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., & Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science*, 296(5576), 2178–2180.

- Matzuk, M. M., & Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*, 14(11), 1197–1213.
<http://doi.org/10.1038/nm.f.1895>.The
- McGEE, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214.
- Menon, K. M. J., & Gunaga, K. P. (1974). Role of cyclic AMP in reproductive processes. *Fertility and Sterility*, 25(8), 732–750. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)40577-7](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)40577-7)
- Menon, K. M. J., Clouser, C. L., & Nair, A. K. (2005). Gonadotropin receptors: role of post-translational modifications and post-transcriptional regulation. *Endocrine*, 26(3), 249–257.
- Menon, K. M. J., & Menon, B. (2012). Structure, function and regulation of gonadotropin receptors – A perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356(1), 88–97. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.021>
- Menon, K. M. J., Munshi, U. M., Clouser, C. L., & Nair, A. K. (2004). Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biology of Reproduction*, 70(4), 861–866.
<http://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024471>
- Min, L., & Ascoli, M. (2000). Effect of activating and inactivating mutations on the phosphorylation and trafficking of the human lutropin/choriogonadotropin receptor. *Molecular Endocrinology*, 14(11), 1797–1810.
- Minegishi, T., Nakamura, K., Yamashita, S., & Omori, Y. (2007). The effect of splice variant of the human luteinizing hormone (LH) receptor on the expression of gonadotropin receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 262, 117–125.
<http://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.051>
- Minegishi, T., Tano, M., Abe, Y., Nakamura, K., Ibuki, Y., & Miyamoto, K. (1997). Expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin (LH/HCG) receptor mRNA in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 3(2), 101–107.
- Misrahi, M., Meduri, G., Pissard, S., Bouvattier, C., Beau, I., Loosfelt, H., Jolivet A., Rappaport R., Milgrom E., Bougneres, P. (1997). Comparison of immunocytochemical and molecular features with the phenotype in a case of

- incomplete male pseudohermaphroditism associated with a mutation of the luteinizing hormone receptor. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(7), 2159–2165.
- Mitropoulos, K., Jaibaji, H. Al, Forero, D. A., Laissue, P., Wonkam, A., Lopez-correa, C., Mohamed Z., Chantratita W., Lee., Llerena A., Brand A., Ali B. R., Patrinos, G. P. (2015). Success stories in genomic medicine from resource-limited countries. *Human Genomics*, 9(11), 1–7. <http://doi.org/10.1186/s40246-015-0033-3>
- Morris, J. K., & Richards, J. S. (1995). Luteinizing hormone induces prostaglandin endoperoxide synthase-2 and luteinization *in vitro* by A-Kinase and C-Kinase pathways. *Endocrinology*, 136(4), 1549–1558.
- Morrison, J. C., Givens, J. R., Wiser, W. L., & Fish, S. A. (1975). Mumps Oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertility and Sterility*, 26(7), 655–659. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)41233-1](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)41233-1)
- Munshi, U. M., Clouser, C. L., Peegel, H., & Menon, K. M. J. (2005). Evidence that palmitoylation of carboxyl terminus cysteine residues of the human luteinizing hormone receptor regulates postendocytic processing. *Molecular Endocrinology*, 19(3), 749–758. <http://doi.org/10.1210/me.2004-0335>
- Murray, A., Webb, J., Dennis, N., Conway, G., & Morton, N. (1999). Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *Journal of Medical Genetics*, 36, 767–770.
- Murray, A., Webb, J., Grimley, S., Conway, G., & Jacobs, P. (1998). Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *Journal of Medical Genetics*, 35, 637–640.
- Nakabayashi, K., Kudo, M., Hsueh, A. J. W., & Maruo, T. (2003). Activation of the luteinizing hormone receptor in the extracellular domain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202, 139–144. [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00075-3](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00075-3)
- Nakabayashi, K., Kudo, M., Kobilka, B., & Hsueh, A. J. . W. (2000). Activation of the luteinizing hormone receptor following substitution of Ser-277 with selective hydrophobic residues in the ectodomain hinge region. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30264–30271. <http://doi.org/10.1074/jbc.M005568200>
- Narayan, P. (2015). Genetic models for the study of luteinizing hormone receptor function. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 1–12.

<http://doi.org/10.3389/fendo.2015.00152>

- Nelson, L. M. (2009). Primary Ovarian Insufficiency. *The New England Journal of Medicine*, 360(6), 606–614. <http://doi.org/10.1056/NEJMcp0808697>.
- Niño, M. Y., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Kroos, M. A., Ospina, S. Y., Mejía, J. F., Uribe J. A., Reuser A. J., Laissue, P. (2012). Identification and functional characterization of GAA mutations in Colombian patients affected by Pompe disease. *JIMD Reports*, 38–48. <http://doi.org/10.1007/8904>
- Nishimori, K., Dunkel, L., J.W. Hsueh, A., Yamoto, M., & Nakano, R. (1995). Expression of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in human corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(4), 1444–1448.
- 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. *Fertility and Sterility*, 95(8), 2658–2661. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.045>
- Oktem, O., & Urman, B. (2010). Understanding follicle growth *in vivo*. *Human Reproduction*, 25(12), 2944–2954. <http://doi.org/10.1093/humrep/deq275>
- Ortega-Recalde, O., Beltrán, O. I., Gálvez, J. M., Palma-Montero, A., Restrepo, C. M., Mateus, H. E., & Laissue, P. (2015). Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability. *Clinical Genetics*, 88(4), e1–e3.
- Ortega-recalde, O., Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Atuesta, J. J., Rivera-Niño, C., Restrepo, C. M., Mateus H. E., van der Knaap M. S., Laissue, P. (2013). A novel familial case of diffuse leukodystrophy related to NDUFV1 compound heterozygous mutations. *Mitochondrion*, 13(6), 749–754. <http://doi.org/10.1016/j.mito.2013.03.010>
- Ortega-Recalde, O., Moreno, M. B., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Mosquera, H., Medina C. L., Restrepo C.M., Laissue, P. (2015b). A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 40(7), 757–760. <http://doi.org/10.1111/ced.12627>
- Ortega-Recalde, O., Silgado, D., Fetiva, C., Fonseca, D. J., & Laissue P. (2016).

- Transcriptomic analysis of skin in a case of ichthyosis Curth–Macklin caused by a KRT1 mutation. *British Journal of Dermatology*, 175, 1372–1375.
<http://doi.org/10.1111/bjd.14969>
- Ortega-Recalde, O., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Ríos, X., Mosquera, H., Bermúdez, O. M., Medina C. L., Vargas C. I., Pallares A. E., Restrepo C. M., Laissue, P. (2013b). Whole-Exome sequencing enables rapid determination of xeroderma pigmentosum molecular etiology. *Plos One*, 8(6), e64692.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0064692>
- Pakarainen, T., Zhang, F., Poutanen, M., & Huhtaniemi, I. (2005). Fertility in luteinizing hormone receptor – knockout mice after wild-type ovary transplantation demonstrates redundancy of extragonadal luteinizing hormone action. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1862–1868. <http://doi.org/10.1172/JCI24562.1862>
- Pangas, S. A., & Rajkovic, A. (2006). Transcriptional regulation of early oogenesis: In search of masters. *Human Reproduction Update*, 12(1), 65–76.
<http://doi.org/10.1093/humupd/dmi033>
- Patel, D. H., Wi, S. G., & Bae, H. J. (2009). Modification of overlap extension PCR: A mutagenic approach. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 183–186.
- Patiño, L. C., Battu, R., Ortega-recalde, O., Nallathambi, J., Anandula, R., Renukaradhya, U., & Laissue, P. (2014). Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *Plos One*, 9(10), e109576. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0109576>
- Patiño, L. C., Beau, I., Carlosama, C., Buitrago, J. C., González, R., Suárez, C. F., Patarroyo M. A., Delemer B., Young J., Binart N., Laissue, P. (2017b). New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Human Reproduction*, 1–9.
<http://doi.org/10.1093/humrep/dex089>
- Patiño, L. C., Silgado, D., & Laissue, P. (2017c). A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(3), 145–149.
<http://doi.org/10.1080/19396368.2017.1291767>
- Patiño, L. C., Walton, K. L., Mueller, T. D., Johnson, K. E., Stocker, W., Richani, D., Agapiou D., Gilchrist R. B., Laissue P., Harrison, C. A. (2017). BMP15 mutations

- associated with primary ovarian insufficiency reduce expression, activity, or synergy with GDF9. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(3), 1009–1019. <http://doi.org/10.1210/jc.2016-3503>
- Persani, L., Rossetti, R., & Cacciato, C. (2010). Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45, 257–279. <http://doi.org/10.1677/JME-10-0070>
- Philibert, P., Pharm, D., Paris, F., Lakhal, B., Audran, F. A., Gaspari, L., Saâd A., Christin-Maître S., Bouchard P., Sultan, C. (2013). NR5A1 (SF-1) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency. *Fertility and Sterility*, 99(2), 484–489. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.10.026>
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1), 27–37. [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00166-X](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00166-X)
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Tsatsaris, V., Marpeau, O., Ferreira, F., Meduri, G., Guibourdenche J., Badet J., Evain-Brion D., Frendo, J. L. (2007). Biochemical characterization and modulation of LH/CG receptor during human trophoblast differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 212(1), 26–35. <http://doi.org/10.1002/JCP>
- Plant, T. M. (1986). Gonadal regulation of hypothalamic gonadotropin releasing hormone release in primates. *Endocrine Reviews*, 7(1).
- Plant, T. M. (2008). Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: Key Advances over the Last Two Decades Neuroendocrinology. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 719–726. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01708.x>
- Plant, T. M. (2015a). Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 38, 73–88. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.04.002>.
- Plant, T. M. (2015b). The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Journal of Endocrinology*, 226(2), T41–T54. <http://doi.org/10.1530/JOE-15-0113>.
- Pohl, C. R., & Knobil, E. (1982). The role of the central nervous system in the control of ovarian function in higher primates. *Annual Review of Physiology*, 44(1), 583–593.
- Pouresmaeili, F., & Fazeli, Z. (2014). Premature ovarian failure: a critical condition in

- the reproductive potential with various genetic causes. *International Journal of Fertility and Sterility*, 8(1), 1–12.
- Powell, C. M., Taggart, R. T., Drumheller, T. C., Wangsa, D., Qian, C., Nelson, L. M., & White, B. J. (1994). Molecular and cytogenetic studies of an X;autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics*, 52, 19–26.
- Prada, C. F., & Laissue, P. (2014). A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics. *Mammalian Genome*, 25(11–12), 618–635. <http://doi.org/10.1007/s00335-014-9537-8>
- Pu, D., Xing, Y., Gao, Y., Gu, L., & Wu, J. (2014). Gene variation and premature ovarian failure: a meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 182, 226–237. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.09.036>
- Puett, D., Angelova, K., Rocha da Costa, M., Warrenfeltz, S. W., & Fanelli, F. (2010). The luteinizing hormone receptor: insights into structure-function relationships and hormone-receptor-mediated changes in gene expression in ovarian cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 329(1), 47–55. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.025>
- Puett, D., Li, Y., Angelova, K., Demars, G., Meehan, T., Fanelli, F., & Narayan, P. (2005). Structure-function relationships of the luteinizing hormone receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061(1), 41–54. <http://doi.org/10.1196/annals.1336.006>
- Puett, D., Li, Y., DeMars, G., Angelova, K., & Fanelli, F. (2007). A functional transmembrane complex: The luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 262, 126–136. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2006.05.009>
- Pyun, J.-A., Hyun, D., & Kwack, K. (2012). *LAMC1* gene is associated with premature ovarian failure. *Maturitas*, 71(4), 402–406. <http://doi.org/10.1016/j.maturitas.2012.01.011>
- Qiao, J., Han, B., Liu, B.-L., Chen, X., Ru, Y., Cheng, K. X., Zhao S. X., Liang J., Lu Y. L., Tang J. F., Wu Y. X., Wu W. L., Chen J. L., Chen M. D., Song, H. D.

- (2009). A splice site mutation combined with a novel missense mutation of LHCGR cause male pseudohermaphroditism. *Human Mutation*, 30(9), E855–E865. <http://doi.org/10.1002/humu.21072>
- Qin, Y., Choi, Y., Zhao, H., Simpson, J. L., Chen, Z., & Rajkovic, A. (2007). NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 576–581. <http://doi.org/10.1086/519496>
- Qin, Y., Shi, Y., Zhao, Y., Ann Carson, S., Leigh Simpson, J., Chen, Z., & Ph, D. (2009). Mutation analysis of NOBOX homeodomain in chinese women with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 91(4), 1507–1509. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.020>
- Quintero-ronderos, P., Mercier, E., Fukuda, M., González, R., Suárez, C. F., Patarroyo, M. A., Vaiman D., Gris J. C., Laissue, P. (2017). Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. *Plos One*, 12(10), e0186149.
- Rahman, N. A., & Rao, C. V. (2009). Recent progress in luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin hormone research. *Molecular Human Reproduction*, 15(11), 703–711. <http://doi.org/10.1093/molehr/gap067>
- Rajagopalan-Gupta, R. M., Lamm, M. L. G., Mukherjee, S., Rasenick, M. M., & Hunzicker-Dunn, M. (1998). Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor-mediated activation of heterotrimeric guanine nucleotide binding proteins in ovarian follicular membranes. *Endocrinology*, 139(11), 4547–4555.
- Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N., & Matzuk, M. M. (2004). NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*, 305(5685), 1157–1159.
- Rajkovic, A., Pangas, S. A., & Matzuk, M. M. (2006). Follicular development: mouse, sheep, and human models. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 1, 383–423. <http://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50015-4>
- Rao, C. V., & Lei, Z. M. (2002). Consequences of targeted inactivation of LH receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1), 57–67.
- Rao, C. V., & Lei, Z. M. (2007). The past , present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 269(1), 2–8. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2006.07.007>
- Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du C., Tang

- W., Hämäläinen T., Peng S. L., Lan Z. J., Cooney A. J., Huhtaniemi I., Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319(5863), 611–613.
- Richards, J. S. (2001). New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate action in endocrine cells. *Molecular Endocrinology*, 15(2), 209–218.
- Richter-Unruh, A., Verhoef-Post, M., Malak, S., Homoki, J., Hauffa, B. P., & Themmen, A. P. N. (2004). Leydig cell hypoplasia: absent luteinizing hormone receptor cell surface expression caused by a novel homozygous mutation in the extracellular domain. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(10), 5161–5167. <http://doi.org/10.1210/jc.2004-0298>
- Rossetti, R., Di Pasquale, E., Marozzi, A., Bione, S., Toniolo, D., Grammatico, P., Nelson L. M., Beck-Peccoz P., Persani, L. (2009). BMP15 mutations associated with Primary Ovarian Insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Human Mutation*, 30(5), 804–810. <http://doi.org/10.1002/humu.20961>.
- Rousseau-Merck, M. F., Misrahi, M., Atger, M., Loosfelt, H., Milgrom, E., & Berger, R (1990). Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenetic and Genome Research*, 54(1–2), 77–79.
- Rozell, T. G., Wang, H., Liu, X., & Segaloff, D. L. (1995). Intracellular retention of mutant gonadotropin receptors results in loss of hormone binding activity of the follitropin receptor but not the lutropin gonadotropin receptor. *Molecular Endocrinology*, 9(12), 1727–1736.
- Russell, D. L., & Robker, R. L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, 13(3), 289–312.
- Santos, M. G., Machado, A. Z., Martins, C. N., Domenice, S., Costa, E. M. F., Nishi, M. Y., Ferraz-de-Souza B., Jorge S. A., Pereira C. A., Soardi F. C., de Mello M. P., Maciel-Guerra A. T., Guerra-Junior G., Mendonca, B. B. (2014). Homozygous inactivating mutation in NANOS3 in two sisters with primary ovarian insufficiency. *BioMed Research International*. <http://doi.org/10.1155/2014/787465>
- Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A., & Treier,

- M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131(4), 933–942. <http://doi.org/10.1242/dev.00969>
- Segaloff, D. L. (2009). Diseases associated with mutations of the human lutropin receptor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 89). Elsevier Inc. [http://doi.org/10.1016/S1877-1173\(09\)89004-2](http://doi.org/10.1016/S1877-1173(09)89004-2)
- Shelling, A. N. (2010). Premature ovarian failure. *Reproduction*, 140, 633–641. <http://doi.org/10.1530/REP-09-0567>
- Song, Y. S., Ji, I., Beauchamp, J., Isaacs, N. W., & Ji, T. H. (2001a). Hormone interactions to Leu-rich repeats in the gonadotropin receptors I. Analysis of Leu-rich repeats of human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor and follicle-stimulating hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3426–3435. <http://doi.org/10.1074/jbc.M003772200>
- Song, Y. S., Ji, I., Beauchamp, J., Isaacs, N. W., & Ji, T. H. (2001b). Hormone Interactions to Leu-rich Repeats in the Gonadotropin Receptors II. Analysis of Leu-rich repeat 4 of human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3436–3442. <http://doi.org/10.1074/jbc.M003773200>
- Stavrou, S. S., Zhu, Y.-S., Cai, L.-Q., Katz, M. D., Herrera, C., Defillo-ricart, M., & Imperato-Mcginley, J. (1998). A novel mutation of the human luteinizing hormone receptor in 46XY and 46XX sisters. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(6), 2091–2098.
- Suwanai, A. S., Ishii, T., Haruna, H., Yamataka, A., Narumi, S., Fukuzawa, R., Ogata T., Hasegawa, T. (2013). A report of two novel NR5A1 mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression. *Clinical Endocrinology*, 78, 957–965. <http://doi.org/10.1111/cen.12054>
- Tao, Y., Johnson, N. B., & Segaloff, D. L. (2004). Constitutive and agonist-dependent self-association of the cell surface human lutropin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5904–5914. <http://doi.org/10.1074/jbc.M311162200>
- Tavaré, J. M., Fletcher, L. M., & Welsh, G. I. (2001). Using green fluorescent protein to study intracellular signalling. *Journal of Endocrinology*, 170(2), 297–306.
- Themmen, A. P. N. (2005). An update of the pathophysiology of human gonadotrophin

- subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. *Reproduction*, 130(3), 263–274. <http://doi.org/10.1530/rep.1.00663>
- Themmen, A. P. N., & Huhtaniemi, I. T. (2000). Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine Reviews*, 21(5), 551–583.
- Tiotiu, D., Mercadal, B. A., Imbert, R., Verbist, J., Demeestere, I., De Leener, A., Englert Y., Vassart G., Costagliola S., Delbaere, A. (2010). Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Human Reproduction*, 25(6), 1581–1587. <http://doi.org/10.1093/humrep/deq073>
- Toledo, S. P. A., Brunner, H. G., Kraaij, R., Post, M., Dahia, P. L. M., Hayashida, C. Y., Kremer H., Themmen, A. P. N. (1996). An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(11), 3850–3854.
- Tosh, D., Rani, H. S., Murty, U. S., Deenadayal, A., & Grover, P. (2015). Mutational analysis of the FIGLA gene in women with idiopathic premature ovarian failure. *Menopause*, 22(5), 520–526. <http://doi.org/10.1097/gme.0000000000000340>
- Touraine, P., Beau, I., Gougeon, A., Meduri, G., Desroches, A., Pichard, C., Detoef M., Paniel B., Prieur M., Zorn J. R., Milgrom E., Kuttann F., Misrahi, M. (1999). New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Molecular Endocrinology*, 13(11), 1844–1854.
- Troppmann, B., Kleinau, G., Krause, G., & Gromoll, J. (2013). Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone/choriogonadotrophin receptor. *Human Reproduction Update*, 19(5), 583–602. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmt023>
- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco A., Cao A., Schlessinger D., Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1171–1181. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddh124>
- Vatin, M., Bouvier, S., Bellazi, L., Montagutelli, X., Laissue, P., Ziyat, A., Serres C., De Mazancourt P., Dieudonné M. N., Mornet E., Vaiman D., Gris, J. C. (2014). Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with *in*

- vitro* fertilization success and recurrent pregnancy loss. *The American Journal of Pathology*, 184(2), 362–368. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.024>
- Vatin, M., Burgio, G., Renault, G., Laissue, P., Firlej, V., Montagutelli, X., Vaiman D., Serres C., Ziyat, A. (2012). Refined mapping of a quantitative trait locus on chromosome 1 responsible for mouse embryonic death. *Plos One*, 7(8), e433556. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043356>
- Voican, A., Bachelot, A., Bouligand, J., Francou, B., Dulon, J., Lombès, M., Touraine P., Guiochon-mantel, A. (2013). NR5A1 (SF-1) Mutations are not a major cause of primary ovarian insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(5), E1017–E1021. <http://doi.org/10.1210/jc.2012-4111>
- Vujović, S., Ivoić, M., Tančić-gajić, M., Marina, L., Barać, M., Arizanović, Z., Nenezić A., Ivanišević M., Micić J., Sajić S., Micić, D. (2012). Premature Ovarian Failure. *Serbian Archives of Medicine*, 140(11–12), 806–811. <http://doi.org/10.2298/SARH1212806V>
- Wang, B., Wen, Q., Ni, F., Zhou, S., Wang, J., Cao, Y., & Ma, X. (2010). Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*, 72(1), 135–136. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03613.x>
- Welt, C. K. (2008). Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*, 68(4), 499–509. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03073.x>
- Wide, L., Eriksson, K., Sluss, P. M., & Hall, J. E. (2009). Serum half-life of pituitary gonadotropins is decreased by sulfonation and increased by sialylation in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(3), 958–964. <http://doi.org/10.1210/jc.2008-2070>
- Woad, K. J., Watkins, W. J., Prendergast, D., & Shelling, A. N. (2006). The genetic basis of premature ovarian failure. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 46, 242–244. <http://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2006.00585.x>
- Wu, X., Wang, B., Dong, Z., Zhou, S., Liu, Z., Shi, G., Cao Y., Xu, Y. (2013). A NANOS3 mutation linked to protein degradation causes premature ovarian insufficiency. *Cell Death and Disease*, 4(10), e825.

<http://doi.org/10.1038/cddis.2013.368>

- Yan, C., Wang, P., Demayo, J., Demayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad S. V., Skinner S. S., Dunbar B. S., Dube J. L., Celeste A. J., Matzuk, M. M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 15(6), 854–866.
- Yan, K., Gao, L., Cui, Y.-L., Zhang, Y., & Zhou, X. (2016). The cyclic AMP signaling pathway: exploring targets for successful drug discovery (Review). *Molecular Medicine Reports*, 13(5), 3715–3723. <http://doi.org/10.3892/mmr.2016.5005>
- Yi, C. S., Song, Y. S., Ryu, K. S., Sohn, J., Ji, I., & Ji, T. H. (2002). Common and differential mechanisms of gonadotropin receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(6), 932–940.
- Yung, Y., Aviel-Ronen, S., Maman, E., Rubinstein, N., Avivi, C., Orvieto, R., & Hourvitz, A. (2014). Localization of luteinizing hormone receptor protein in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 20(9), 844–849. <http://doi.org/10.1093/molehr/gau041>
- Zeng, H., Phang, T., Sang Song, Y., Ji, I., & Ji, T. H. (2001). The role of the hinge region of the luteinizing hormone receptor in hormone interaction and signal generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3451–3458. <http://doi.org/10.1074/jbc.M007488200>
- Zhang, F.-P., Poutanen, M., Wilbertz, J., & Huhtaniemi, Ii. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) Mice. *Molecular Endocrinology*, 15(1), 172–183.
- Zhang, R., Cai, H., Fatima, N., Buczko, E., & Dufau, M. L. (1995). Functional glycosylation sites of the rat luteinizing hormone receptor required for ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21722–21728. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21722>
- Zhao, H., Chen, Z., Qin, Y., Shi, Y., Wang, S., Choi, Y., Simpson J. L., Rajkovic, A. (2008). Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *The American Journal of Human Genetics*, 82(6), 1342–1348. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.04.018>.
- Zhao, X., Suzumori, N., Yamaguchi, M., & Suzumori, K. (2005). Mutational analysis of the homeobox region of the human *NOBOX* gene in Japanese women who exhibit

premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 83(6), 1843–1844.

<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.12.031>

Zhu, H., Wang, H., & Ascoli, M. (1995). The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. *Molecular Endocrinology*, 9(2), 141–150.

Anexo 1

Artículo publicado. Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Suárez, Y. C., de Jesús Rodríguez, A., Mateus, H. E., **Jiménez, K. M.**, Ortega-Recalde, O, Díaz-Yamal, I, Laissue, P. (2015). **Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations.** Fertility and sterility, 104(1), 154-162.