

**ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES *CDKN1B* Y *CITED2* EN MUJERES CON  
FALLA OVÁRICA PREMATURA IDIOPÁTICA**

**DIEGO ARMANDO OJEDA PEDRAZA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA  
BOGOTÁ, D.C.  
JULIO DE 2011**

**ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES *CDKN1B* Y *CITED2* EN MUJERES CON  
FALLA OVÁRICA PREMATURA IDIOPÁTICA**

**DIEGO ARMANDO OJEDA PEDRAZA**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de**

**MAGISTER EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA**

**DIRECTOR  
PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA  
BOGOTÁ, D.C.  
JULIO DE 2011**

## NOTA DE ADVERTENCIA

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

**ESTUDIO MOLECULAR DE LOS GENES *CDKN1B* Y *CITED2* EN MUJERES CON  
FALLA OVÁRICA PREMATURA IDIOPÁTICA**

**DIEGO ARMANDO OJEDA PEDRAZA**

**APROBADO**

---

**PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD**

**DIRECTOR**

---

**CARLOS MARTIN RESTREPO MD,MSc, PhD**

**JURADO**

---

**Dra. ANGELA RUIZ MD**

**JURADO**

*Dedico el éxito y la satisfacción de esta investigación a mi familia que nunca me abandona cuando emprendo nuevos retos, a todas las personas que me rodearon calurosamente durante el desarrollo de este nuevo capítulo de mi vida y en especial a mis abuelos que desde el cielo siempre me acompañan.*

*Diego Armando Ojeda Pedraza*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis abuelos que desde el cielo me acompañan, me guían y me cuidan.*

*A mi Papá, por contribuir con mi formación como Ser y como persona.*

*A mi Mamá, por su sacrificio desmedido y desinteresado para procurar mi bien y el de mis hermanos.*

*A mis hermanos, por hacer todo cuanto estuvo a su alcance con tal de ayudarme.*

*A la Universidad del Rosario, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar el presente trabajo.*

*Al Dr. Paul Laissue por todo su apoyo incondicional y depositar su confianza en mí. Por su paciencia, por su comprensión, por guiarme durante la realización de esta tesis.*

*A todas aquellas personas del laboratorio de biología molecular y celular que de una u otra forma contribuyeron a que este trabajo se realizara, aportando un granito de arena con sus consejos y apoyo*

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 DETERMINACIÓN SEXUAL Y DESARROLLO GONADAL.....	2
2.1.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....	3
2.1.1.1 SEXO GENÉTICO Y GONADAL.....	3
2.1.1.2 SEXO FENOTÍPICO.....	5
2.2 FACTORES MOLECULARES RESPONSABLES DEL INICIO DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL. LA BÚSQUEDA DEL “SANTO GRIAL”.....	7
2.2.1 SRY: EL SWITCH MOLECULAR.....	11
2.2.2 SOX9: UNA MOLÉCULA <i>DOWNSTREAM</i> DE SRY.....	14
2.3 DESARROLLO OVÁRICO TEMPRANO.....	18
2.3.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN R-SPONDIN1/WNT4/ $\beta$ -CATENINA.....	19
2.3.2 FOXL2 UN POTENCIAL FACTOR DETERMINANTE OVÁRICO.....	20
2.4 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA FEMENINA.....	24
2.4.1 LA FOLICULOGÉNESIS.....	24
2.5 ETIOLOGÍA DE LA FALLA OVÁRICA.....	28
2.5.1 CAUSAS IATROGÉNICAS.....	29
2.5.2 CAUSAS AUTOINMUNES.....	30

2.5.3 CAUSAS GENÉTICAS .....	31
2.5.3.1 CAUSAS SINDRÓMICAS.....	31
2.5.3.1.1 GALACTOSEMIA.....	32
2.5.3.1.2 SÍNDROME POLIGLANDULAR AUTOINMUNE TIPO I.....	32
2.5.3.1.3 ATAXIA TELANGIECTASIA .....	33
2.5.3.1.4 SÍNDROME BPES.....	33
2.5.3.2 CAUSAS NO-SINDRÓMICAS.....	34
2.5.3.2.1 GEN DEL RETRASO MENTAL DEL X FRÁGIL 1.....	34
2.5.3.2.2 PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 15.....	34
2.5.3.2.5 NR5A1.....	36
2.5.3.2.6 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	37
2.5.4 <i>CDKN1B</i> Y <i>CITED2</i> : DOS NUEVOS GENES RELACIONADOS CON LA FOP .....	43
2.5.4.1 <i>CDKN1B</i> - LA VIA PI3K .....	43
2.5.4.1.1 <i>CDKN1B</i> - INHIBIDOR DE CICLINA DEPENDIENTE DE QUINASAS-1B .....	44
2.5.4.2 <i>CITED2</i> (Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu / Asp-rich carboxy- terminal domain 2).....	46

3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	51
4.	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	53
4.1	OBJETIVO GENERAL .....	53
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
5.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	54
5.1	MATERIALES Y MÉTODOS: SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE <i>CDKN1B</i> .....	54
5.1.1	POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	54
5.1.2	EXTRACCIÓN DE ADN .....	55
5.1.3	DISEÑO DE PRIMERS .....	56
5.1.4	AMPLIFICACIÓN DEL ADN.....	57
5.1.5	SECUENCIACIÓN DIRECTA.....	59
5.1.6	ALINEAMIENTOS DE SECUENCIA .....	59
6.	RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	61
6.1	RESULTADOS <i>CDKN1B</i> .....	61
6.1.1	EXÓN 1 VARIANTE c.326T>G (p.Val109Gly).....	62
6.1.2	EXÓN 1 VARIANTE c.356T.>g (p.Ile119Thr) .....	64
6.2	CONCLUSIONES <i>CDKN1B</i> .....	66
7.	MATERIALES Y MÉTODOS <i>CITED2</i> .....	67
7.1	POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	67
7.2	DISEÑO DE PRIMERS .....	68

7.3	AMPLIFICACIÓN DEL DNA .....	68
7.4	SECUENCIACIÓN DIRECTA .....	71
7.5	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS .....	72
7.5.1	ALINEAMIENTOS DE SECUENCIA .....	72
7.5.2	PREDICCIÓN DE EFECTO DELETÉREO .....	72
8.	RESULTADOS Y CONCLUSIONES <i>CITED2</i> .....	73
8.1	VARIANTE c.604C>A (p.Pro202Thr).....	75
8.2	CONCLUSIONES <i>CITED2</i> .....	77
9.	DISCUSIÓN GENERAL .....	80
10.	PERSPECTIVAS.....	82
11.	ANEXOS .....	83
11.1	ANEXO 1. Sequence analysis of the <i>CDKN1B</i> gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype.....	84
11.2	ANEXO 2. A <i>CITED2</i> mutation in a patient affected by idiopathic premature ovarian failure.....	88
11.3	ANEXO 3. Screening for mutations of the <i>FOXO4</i> gene in premature ovarian failure patients.....	103
12.	REFERENCIAS.....	109

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> La diferenciación sexual de las gónadas.....	19
<b>Figura 2.</b> Reversión sexual en humanos causada por recombinación X-Y anormal.....	23
<b>Figura 3.</b> Estructura de la proteína mSRY de ratón y hSRY hum.....	26
<b>Figura 4.</b> Modelo de la regulación transcripcional de Sox9.....	28
<b>Figura 5.</b> Moleculares de la determinación sexual en los mamíferos.....	36
<b>Figura 6.</b> Etiología Falla Ovárica Prematura.....	42
<b>Figura 7.</b> Regulación de CDKN1B en la vía PI3K.....	58
<b>Figura 8.</b> Alineamiento de las proteínas de la familia Cited.....	60
<b>Figura 9.</b> Amplificación región codificante <i>CDKN1B</i> .....	71
<b>Figura 10.</b> Cromatograma con el cambio c.326T>G.....	75
<b>Figura 11.</b> Alineamiento de la Proteína CDKN1B.....	76
<b>Figura 12.</b> Cromatograma con la variante c.356T>G.....	77
<b>Figura 13.</b> Estructuras de los aminoácidos Isoleucina y Treonina.....	78
<b>Figura 14.</b> Alineamiento de la Proteína CDKN1B.....	78
<b>Figura 15.</b> Amplificación region codificante <i>CITED2</i> .....	84
<b>Figura 16.</b> Cromatograma con el cambio c.604C>A.....	88
<b>Figura 17.</b> Alineamiento de la proteína CITED2.....	89
<b>Figura 18.</b> Resultados programa Polyphen2.....	90

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Causas Autoinmunes de la Falla Ovárica Prematura.....	44
<b>Tabla 2.</b> Genes reportados, asociados a disfunciones reproductivas y candidatos para FOP.....	53
<b>Tabla 3.</b> Población estudio <i>CDKN1B</i> .....	69
<b>Tabla 4.</b> Primers de amplificación <i>CDKN1B</i> .....	70
<b>Tabla 5.</b> Primers de secuenciación <i>CDKN1B</i> .....	70
<b>Tabla 6.</b> Programa de PCR para el exón 1.....	71
<b>Tabla 7.</b> Programa de PCR para el exón 2.....	72
<b>Tabla 8.</b> Primers de secuenciación <i>CDKN1B</i> .....	73
<b>Tabla 9.</b> Resultados del análisis de secuenciación de 87 pacientes FOP.....	75
<b>Tabla 10.</b> Población estudio <i>CITED2</i> .....	82
<b>Tabla 11.</b> Primers de Amplificación <i>CITED2</i> .....	82
<b>Tabla 12.</b> Primers de secuenciación <i>CITED2</i> .....	82
<b>Tabla 13.</b> Programa de PCR para el Fragmento 1.....	83
<b>Tabla 14.</b> Programa de PCR para el Fragmento 2.....	84
<b>Tabla 15.</b> Resultados del análisis de secuenciación de <i>CITED2</i> .....	88

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el aumento sustancial de la incidencia de la infertilidad humana ha convertido esta patología en un problema real de salud pública: alrededor del 15% de las parejas consultan por esta causa. Entre las causas femeninas de infertilidad, la falla ovárica prematura (FOP) es extremadamente frecuente puesto que afecta entre el 1 y el 3% de las mujeres de la población general. Múltiples etiologías de FOP se han descrito (e.g. autoinmunes, infecciosas, iatrogénicas) pero desafortunadamente en más de 80% de los casos no se conocen las causas, lo que sugiere mecanismos genéticos subyacentes. Algunas causas genéticas se han descrito, especialmente relacionadas con formas sindrómicas de la enfermedad (e.g. síndromes de Turner y BPES). En estos casos se evidencian principalmente alteraciones cromosómicas y mutaciones específicas en genes participantes en la foliculogénesis. En otros casos, la presentación de la enfermedad es aislada y se relaciona con mutaciones en genes específicos localizados en los autosomas y en el cromosoma X. Sin embargo, la complejidad genética, la baja heredabilidad y el carácter cuantitativo de los fenotipos asociados a la reproducción en los mamíferos implica que en casos fisiológicos y patológicos (hipofertilidad e infertilidad) cientos de genes participen en una red de sutil regulación. En este contexto, recientemente se han propuesto una cantidad significativa de genes candidato para la FOP. Por consiguiente el estudio de genes potencialmente candidatos en la etiología de la FOP por aproximaciones gen candidato, entre ellos *CDKN1B* y *CITED2*, es de especial interés en la comprensión de los mecanismos subyacentes de esta enfermedad. Además, es una etapa necesaria en la búsqueda de nuevos marcadores de esta patología que permitan en un futuro mejorar el asesoramiento genético y proponer alternativas terapéuticas.

Durante este trabajo de tesis nos hemos focalizado en la búsqueda de variantes en la secuencia codificante de *CDKN1B* y *CITED2* en mujeres FOP. Nuestros resultados sugieren que estos genes son dos nuevos factores etiológicos de la enfermedad.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 DETERMINACIÓN SEXUAL Y DESARROLLO GONADAL

El estudio y la observación de los rasgos distintivos de los fenotipos masculinos y femeninos resultantes de la diferenciación sexual no son nuevos. Aristóteles sugirió, por ejemplo, que la diferenciación sexual es debida a la temperatura del semen en el momento de la cópula: esperma caliente genera hombres mientras que el semen frío genera mujeres. Desde entonces, el conocimiento de los eventos celulares, genéticos y epigenéticos sobre el tema ha avanzado sustancialmente. En los últimos años, se han reportado numerosos estudios en el área de la determinación y de la diferenciación sexual en los mamíferos que sugieren la existencia de diversas interacciones entre las señales genéticas, hormonales y celulares durante el proceso que define la formación del fenotipo masculino o femenino. Este proceso implica dos etapas: la diferenciación sexual que corresponde a la formación de los tractos genitales internos y externos debido principalmente a factores hormonales, y la determinación sexual, que está gobernada por genes que se encuentran tanto en los cromosomas sexuales como en los autosomas.

En la especie humana, una mujer posee dos cromosomas X (46,XX), mientras que un hombre es portador de un cromosoma X y uno Y (46,XY). Sin embargo, en ocasiones se pueden encontrar simultáneamente en un individuo tanto las características fenotípicas masculinas como femeninas. Es entonces posible identificar mujeres XY y hombres XX. Esta situación es conocida como reversión sexual (**ver más adelante**). El estudio de estos individuos ha ayudado a revelar algunos factores genéticos implicados en la determinación sexual, entre ellos el gen *SRY*, que codifica para una proteína esencial para la formación de los testículos. El gen *SRY* (*sex-determining region Y gene*) se localiza en el cromosoma Y, y es necesario en el inicio de la determinación testicular. Partiendo del hecho que el gen *SRY* humano es similar en términos de secuencia y de expresión al gen *Sry* del ratón, se han desarrollado una cantidad importante de modelos murinos que han permitido una mejor comprensión de la función de este gen en los mamíferos y especialmente en humanos. Esto ha sido particularmente importante en el descubrimiento de las interacciones de la proteína Sry con otros genes de la

determinación sexual masculina. Así pues, el objeto de este capítulo, es el de describir los principales mecanismos de diferenciación y de determinación sexual observados en los mamíferos, partiendo del estudio de los modelos murino y humano.

### **2.1.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL**

Las gónadas son consideradas como los órganos principales de la reproducción puesto que su función primordial consiste, en apoyar el desarrollo y la maduración de las células germinales masculinas (los espermatozoides) y femeninas (los ovocitos). Las gónadas masculinas, los testículos, se encargan del desarrollo y de la maduración de los espermatozoides, y de la síntesis y de la secreción de la hormona esteroide sexual masculina, la testosterona. Las gónadas femeninas, los ovarios, tienen a su cargo el desarrollo y la maduración del ovocito, y la síntesis y la secreción de las hormonas esteroides sexuales femeninas, los estrógenos y la progesterona (Gilbert. 2006). La diferenciación sexual incluye el desarrollo de las gónadas, del conducto genital interno y de los genitales externos (MacLaughlin y Donahue, 2004). Los rasgos fenotípicos masculinos o femeninos pueden caracterizarse a partir de tres aspectos: a) el sexo genético, según los cromosomas sexuales sean, XY o XX, b) el sexo gonadal, que depende de la morfología gonadal (testículos y ovarios), y c) el sexo fenotípico o genital (rasgo morfológicos macho o hembra) (**Figura 1**).

#### **2.1.1.1 SEXO GENÉTICO Y GONADAL**

Los cromosomas sexuales (XY en hombres y XX en mujeres) determinan el sexo genético. A comienzo de los años 90, se determinó que el cromosoma Y es necesario pero no suficiente para la diferenciación masculina (Lovell-Badge y Robertson. 1990, Koopman et al. 1991). Además, se evidenció que este proceso requiere de hormonas androgénicas secretadas por los testículos y de receptores de andrógenos localizados en

los tejidos efectores del conducto genital masculino y de los genitales externos. Durante las primeras cinco semanas de vida gestacional en el humano, las gónadas son indiferenciadas o bipotenciales, es decir, que no se evidencian rasgos fenotípicos masculinos o femeninos. Entre las seis y las siete semanas de desarrollo intrauterino comienzan a desarrollarse los testículos en el hombre. A las nueve semanas los ovarios empiezan a formarse en la mujer. La presencia de gónadas masculinas o femeninas, es decir, de testículos u ovarios, define el sexo gonadal. Las gónadas contienen células germinales y células secretoras de hormonas esteroides. Los testículos constan de tres tipos de células: germinales, de Sertoli y de Leydig (Rey et al. 1993). Las células germinales sufren un proceso de diferenciación (desde espermatogonias hasta espermatozoides) mientras que las células de Sertoli sintetizan una hormona glicoprotéica denominada hormona antimülleriana (AMH). Las células de Leydig sintetizan testosterona.

Los ovarios poseen igualmente tres tipos de células: germinales, de la granulosa y tecales. Las células germinales producen ovogonias que de manera análoga a las espermatogonias sufren un proceso de desarrollo con el fin de producir células sexuales maduras (los ovocitos). Las ovogonias meióticas están rodeadas por células de la granulosa y por estroma. Estas células permanecen quiescentes hasta la pubertad en la profase de la meiosis I en tanto ocurre la ovulación. Alrededor de las células sexuales femeninas se encuentran las células de la granulosa y tecales formando los folículos. Las células de la granulosa cumplen funciones cruciales para el ovocito, como las de sostén, nutrición y comunicación molecular bidireccional con el ovocito. Además, sintetizan estradiol, una molécula responsable del crecimiento del útero, las trompas de Falopio y la vagina en las mujeres. Asimismo, estimula el desarrollo de la glándula mamaria y el crecimiento de los órganos genitales externos.

Es importante señalar que, contrariamente a las gónadas femeninas, durante la aparición del sexo fenotípico masculino los testículos sintetizan AMH y testosterona. Estas hormonas son decisivas para determinar el fenotipo masculino. Si no existen gónadas masculinas, el feto tiene aspecto femenino por "*default*" como se mencionará más adelante en el capítulo de determinación sexual.

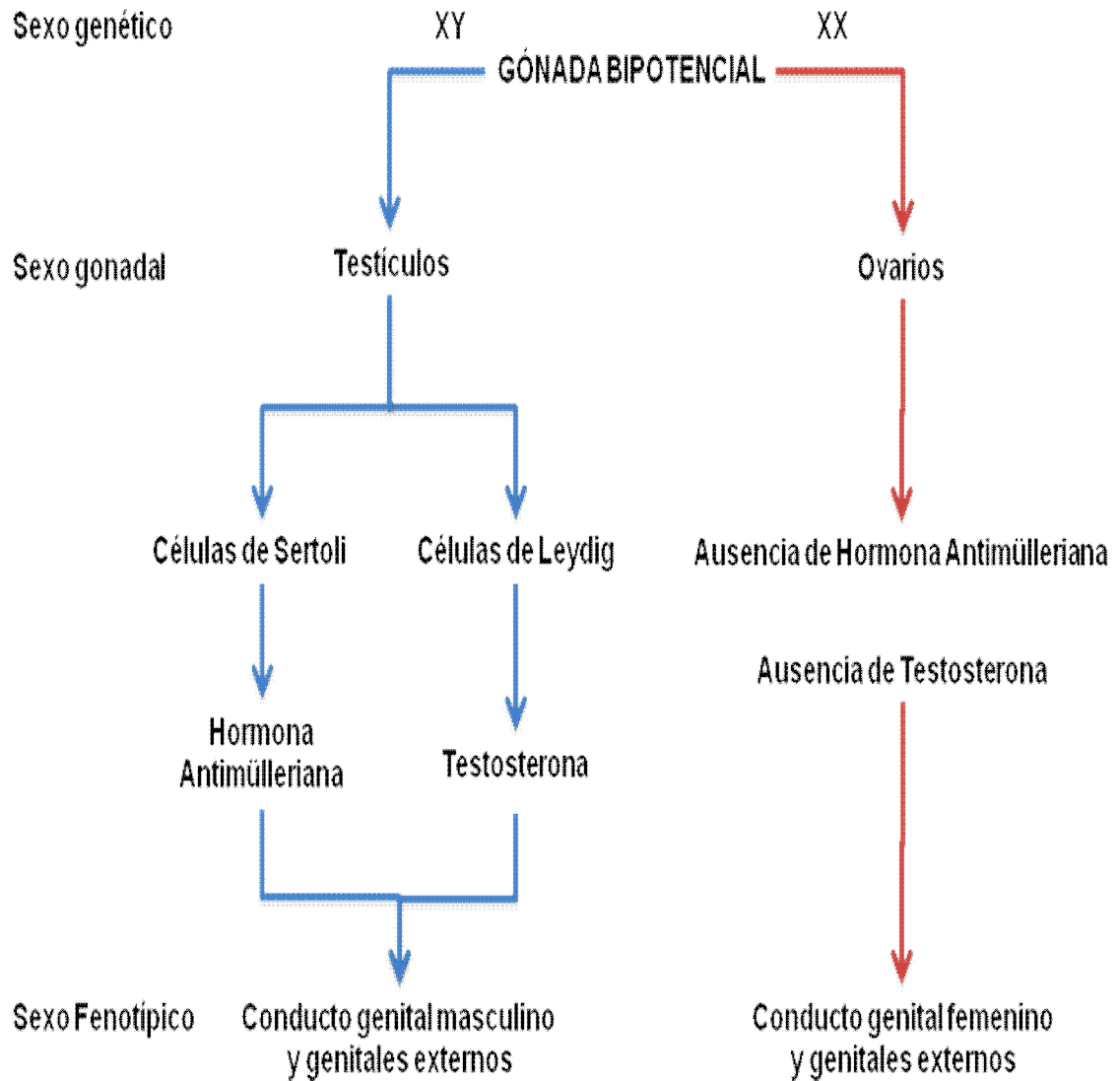
### 2.1.1.2 SEXO FENOTÍPICO

Las características morfológicas del conducto genital interno y de los genitales externos definen el sexo fenotípico. En hombres el conducto genital interno incluye la próstata, las vesículas seminales, el conducto deferente y el epidídimo. Los genitales externos del hombre son el escroto y el pene. En las mujeres, los genitales internos son las trompas de Falopio, el útero y el tercio superior de la vagina. Los genitales externos de las mujeres son el clítoris, los labios mayores los labios menores y los dos tercios inferiores de la vagina (Brennan J y Capel B, 2004, Yao. 2005). Como se mencionó anteriormente, la hormona producida por las gónadas determina el sexo fenotípico de la siguiente manera:

**Fenotipo masculino:** las gónadas masculinas sintetizan y secretan hormona antimülleriana y testosterona, ambas necesarias para el desarrollo del fenotipo masculino. Embriológicamente, los conductos de Wolff dan origen al epidídimo, al conducto deferente, a las vesículas seminales y a los conductos eyaculadores. Los conductos de Wolff se desarrollan tanto en el embrión masculino como en el femenino. Sin embargo, mientras en el embrión femenino existe una regresión del conducto en el masculino se desarrolla por la acción de la testosterona. La testosterona, presente en las gónadas masculinas, estimula el crecimiento y la diferenciación de los conductos de Wolff. La testosterona de cada testículo actúa sobre el mismo lado, es decir, sobre su propio conducto de Wolff. Al mismo tiempo, la hormona AMH producida por las células testiculares de Sertoli causa atrofia de un segundo conjunto de conductos, los conductos müllerianos. En la especie humana los genitales externos masculinos, pene y escroto, se diferencian entre las semanas nueve a diez de gestación. El crecimiento y el desarrollo de los genitales externos durante la pubertad depende de la conversión de la testosterona en dihidrotestosterona y de la presencia de receptores andrógenos en los tejidos efectores (Kobayashi y Behringer. 2003, Barsoum y Yao. 2006, Gilbert. 2006).

**Fenotipo femenino:** las gónadas femeninas secretan estrógenos y no secretan hormona antimülleriana ni testosterona. Por consiguiente, estas últimas se desarrollan para formar los genitales internos de la mujer (trompas de Falopio, útero y tercio superior de la

vagina). El crecimiento y el desarrollo de los genitales externos (clítoris, labios mayores y menores, porción inferior de la vagina) no responden a los estrógenos.



**Figura 1.** Diferenciación sexual de las gónadas. Rasgos fenotípicos masculinos o femeninos pueden caracterizarse a partir de tres aspectos: el sexo genético, el sexo gonadal y el sexo fenotípico.

Hasta aquí, se han descrito brevemente los procesos que definen el fenotipo de los genitales internos y externos, es decir de la diferenciación sexual. Cada etapa de este proceso se refiere a la adquisición de las características o funciones de las estructuras anatómicas que difieren de los primordios originales (MacLaughlin y Donahue. 2004).

A continuación, se revisarán los eventos fisiológicos y moleculares de la determinación sexual, es decir, de los mecanismos moleculares que permiten la formación de los ovarios y de los testículos. Como mencionado anteriormente, estas etapas han sido particularmente bien estudiadas en modelos murinos, razón por la cual, en buena parte de este manuscrito, se hará referencia a este proceso en ratones.

Seguidamente describiré, en primer lugar, los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación testicular para luego discutir lo que actualmente se conoce sobre el desarrollo del ovario.

## **2.2 FACTORES MOLECULARES RESPONSABLES DEL INICIO DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL. LA BÚSQUEDA DEL “SANTO GRIAL”**

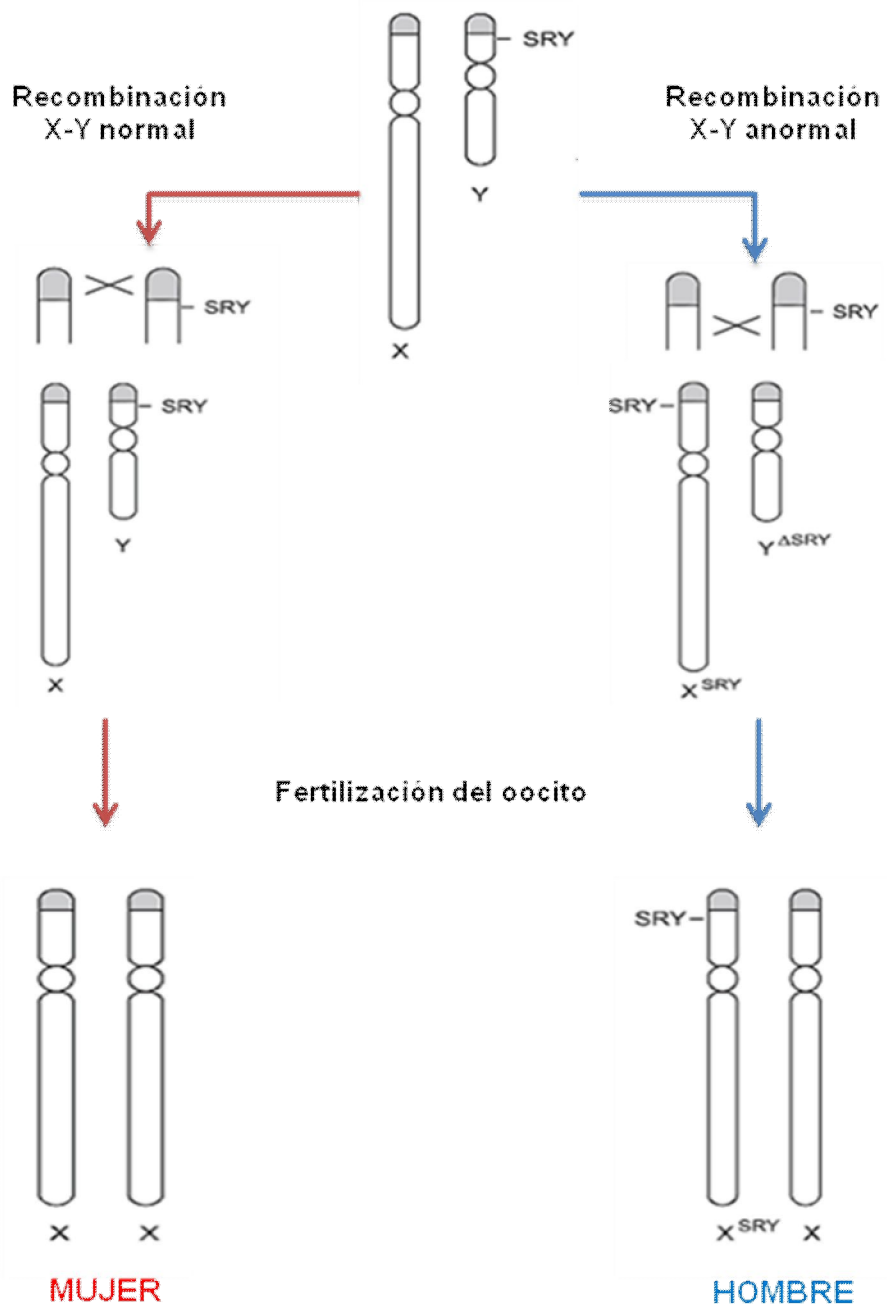
La búsqueda de los factores genéticos implicados en la determinación sexual se inicia a comienzos del siglo XX. En 1916 Bridges describe los cromosomas sexuales de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Bridges. 1921). A pesar que hoy se sabe que en los mamíferos las hembras poseen dos cromosomas sexuales X y los machos un cromosoma X y uno Y, en *Drosophila* la presencia del cromosoma Y no determina el sexo masculino. Cada género es determinado por un equilibrio transcripcional entre los genes de los autosomas y los genes del cromosoma X (Lucchesi. 1973, Maroni y Plaut. 1973, Stewart y Merriam. 1978). Por consiguiente, el género en la mosca de la fruta es determinado por la relación cuantitativa entre el cromosoma X y los autosomas. Esto remite a dividir el número de cromosomas X por el número de conjuntos haploides de cromosomas autosómicos: en hembras 2:2 (XX,AA) y en machos, 1:2 (XY, AA), atribuyendo los mecanismos de determinación sexual al cromosoma X (Lucchesi. 1977, Stewart y Merriam. 1980, Baker y Belote. 1983).

Cuando los cromosomas humanos X y Y fueron observados por primera vez por Painter en 1921 (Karl y Capel, 1995), surgió la idea de que en los humanos pudieran presentarse mecanismos de determinación sexual similares a los observados en *Drosophila melanogaster*. Treinta años después, se observaron las primeras anomalías del número de los cromosomas sexuales en humanos. Individuos con cariotipo XXY, desarrollaron testículos e individuos con cariotipo XO desarrollaron ovarios (Jacobs y Strong. 1959, Ford et al. 1959). En consecuencia, si la determinación sexual estuviera dada por la relación cuantitativa entre el cromosoma X y los autosomas, siguiendo el mecanismo de determinación sexual en *Drosophila*, la presentación de los órganos sexuales en estos individuos habría sido contraria a lo observado. De esta forma, se demostró de manera concluyente que la determinación sexual de los humanos no depende del cromosoma X.

Más adelante en 1947, Alfred Jost desarrolló una serie de experimentos buscando definir de manera más precisa en los mamíferos los procesos de determinación y de diferenciación sexual (Jost et al. 1973). Jost demostró en embriones de conejo que la extirpación intrauterina de las gónadas (ovarios o testículos) produce el desarrollo de características sexuales femeninas, independientemente del sexo cromosómico del embrión. En otras palabras, un individuo que en principio debía desarrollarse fenotípicamente como macho (de acuerdo con sus cromosomas sexuales), se desarrolló morfológicamente como hembra al eliminar los testículos en formación. De esta forma, se introdujo la idea que el fenotipo femenino se desarrolla por “*default*”, al no estar presente el factor masculino. Esta afirmación perduró durante cerca de cuarenta años y en la actualidad se habla más de cascadas moleculares testiculares y de factores pro-ováricos (**ver más adelante**). Esto permitió concluir que los testículos producen algunas “sustancias” capaces de inducir el desarrollo de los conductos de Wolff e inhibir la diferenciación de los conductos müllerianos en el embrión macho (XY). Esto demostró además el papel crucial de las gónadas en especial de la masculina en la determinación sexual. Es importante agregar que estos resultados estimularon notablemente la investigación en el tema y permitieron plantear nuevos interrogantes, más precisos, que permitieran entender mejor los factores moleculares implicados en la determinación sexual.

En 1959, se identificó la presencia del cromosoma Y como el principal factor en la determinación sexual masculina. Se estudiaron, tanto en humanos, como en ratones, individuos portadores de cariotipos XXY que se desarrollaron fenotípicamente como machos con la presencia de testículos. Estas observaciones indicaron que el desarrollo testicular está determinado por la presencia del cromosoma Y de manera independiente al número de cromosomas X (Jacobs y Strong, 1959, Cattanach, 1961). De esta forma, se sugirió que un factor codificado por algún gen localizado en el cromosoma Y pudiera ser responsable del desarrollo testicular. Este factor se denominó Factor de Determinación Testicular (TDF en humanos, Tdy en el ratón).

Para la identificación del TDF, varios estudios se basaron en el análisis de casos esporádicos de reversión sexual en humanos. La reversión sexual 46,XX puede generarse mediante la traslocación del *TDF* al cromosoma X, por recombinación entre el cromosoma X y el Y durante la meiosis masculina. La reversión sexual 46,XX es un estado patológico poco frecuente, que se caracteriza por la presencia de desarrollo testicular en ausencia del cromosoma Y. Clínicamente, los pacientes pueden ser categorizados en tres tipos: varones XX con genitales masculinos normales, varones XX con ambigüedad genital y hermafroditas verdaderos con tejido ovárico y testicular con genitales anormales. Las mujeres normalmente presentan un par de cromosomas X homólogos, que pueden recombinar durante la meiosis al igual que los cromosomas autosómicos. En los hombres la homología entre el cromosoma X y Y está restringida a una pequeña región denominada región pseudoautosómica (PAR) donde se efectúa la recombinación meiótica. Normalmente, la recombinación se puede producir en regiones adyacentes no-homólogas a la región pseudoautosómica, generando el intercambio de ADN específico del cromosoma Y dentro del cromosoma X. En muchos casos la recombinación permite el intercambio del TDF, debido a su proximidad (35 kilobases, Kb) con la región pseudoautosómica (**Figura 2**). Esta disfunción en la recombinación se ha observado frecuentemente en los casos de reversión sexual masculina 46,XX y permitió la localización del gen *SRY* en el locus del *TDF*.



**Figura 2. Reversión sexual en humanos causada por recombinación X-Y anormal.** Durante la meiosis masculina los cromosomas X y Y recombinan en la región pseudoautosómica. Recombinación X-Y anormal (Derecha). Recombinación X-Y normal (Izquierda). Modificado de **Wilhelm et al. 2007**.

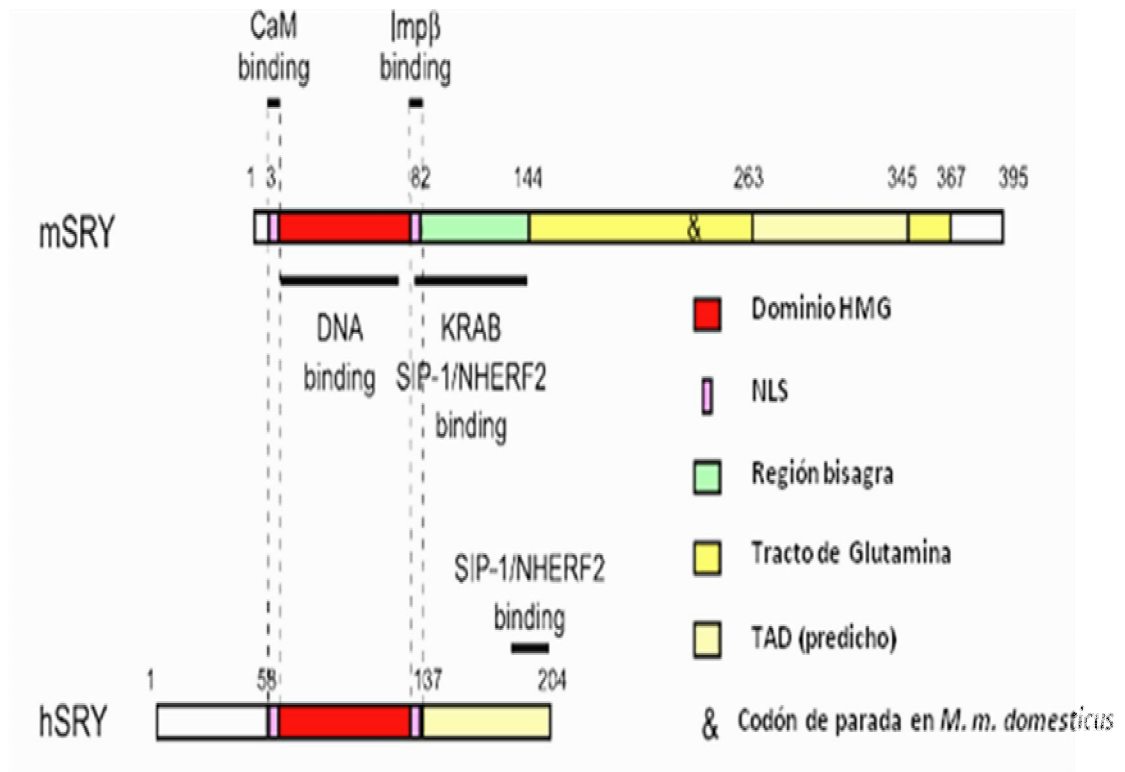
El gen *TDF* se mapeó más finamente e identificó en humanos luego del análisis de cuatro individuos de fenotipo masculino con cariotipo 46,XX que presentaban la inserción de un fragmento de 60 Kb del cromosoma Y en el cromosoma X (Palmer et al. 1989). La búsqueda de secuencias conservadas en el fragmento de 60 Kb en estos individuos, permitió rápidamente la identificación del marco abierto de lectura (ORF) del gen *Sex Determining Region, Y (SRY)* (Sinclair et al. 1990). Para validar la evidencia de que *SRY* correspondía a *TDF*, se estudiaron personas 46,XY con fenotipo femenino sin aparentes anomalías cromosómicas estructurales. Dos de ellas presentaban una mutación no-sinónima (p.Met64Ile) (Berta et al.1990) en el gen *SRY* mientras otra presentaba una delección de cuatro bases entre los nucleótidos 773-776 (Jäger et al. 1990) en el dominio de unión al ADN, modificando el marco de lectura del gen y generando una proteína truncada. De manera interesante, el padre de la paciente presentó un fenotipo normal y un cariotipo 46,XY, y no era portador de la mutación. De esta forma fue posible concluir que *SRY* corresponde al *TDF* (Berta et al. 1990, Jäger et al. 1990).

### 2.2.1 *SRY*: EL SWITCH MOLECULAR

En el día 10.5 dpc (días post coito) en el ratón, se inicia la expresión del gen *Sry*. Como se mencionó anteriormente, el gen *Sry* es necesario y suficiente para iniciar la determinación testicular y por consiguiente el desarrollo de las características sexuales masculinas. Estudios de la proteína *Sry* demostraron su función como activador y represor transcripcional (Cohen et al. 1994, Du et al. 2002). Con respecto al papel como modulador transcripcional, se ha descrito un dominio conservado de *trans*-activación y *trans*-represión (**ver más adelante**) tanto en ratones como en humanos (Desclozeaux et al. 1998, Dubin et al. 1994). En ratones, la eliminación de la secuencia en el gen *Sry* que codifica para este dominio, inhibió el desarrollo fenotípico masculino (Bowles et al. 1999). Sin embargo, es de precisar que este dominio está presente únicamente en ciertas subespecies, como *Mus musculus molossinus* lo que sugiere que algunos resultados obtenidos en ratones transgénicos en estudios previos no reflejaban por completo la importancia funcional de esta región (Dubin et al. 1995).

La proteína Sry es un miembro de una gran familia de factores de transcripción caracterizados por un dominio de unión al ADN conocido como *High Mobility Group* (HMG). Hasta la fecha más de veinte miembros han sido identificados. El dominio HMG de la proteína SRY, reconoce la secuencia nucleotídica AACCAATG en los promotores de genes blanco en humanos, mientras que en ratones Sry reconoce la secuencia CATTGTT (Giese et al. 1992, Harley et al. 1994). Este reconocimiento se realiza en el surco menor de la hélice del ADN, lo que genera un cambio importante en su conformación, induciendo un cambio en la curvatura estructural de 70 a 95 grados dependiendo de la secuencia diana (Lnenicek-Allen et al. 1996, Sebastian et al. 2009, Zhang et al. 2009). No se conoce la función precisa de la variabilidad de la curvatura del ADN dirigida por la proteína. Sin embargo, se ha observado que su interacción origina una expansión en el surco menor, desenrollando el ADN, lo que probablemente altera la arquitectura del ADN en la cromatina, permitiendo la interacción de otros complejos proteicos con el ADN (Harley et al. 1992, Jager et al. 1992, Pontiggia et al. 1994, Schmitt-Ney et al. 1995).

Algunos análisis efectuados en mujeres 46,XY permitieron identificar que la mayoría de las variantes en la secuencia de la proteína SRY, se localizan en el dominio HMG, sugiriendo que las demás regiones de la proteína juegan un papel menor en comparación al del dominio HMG (Wilhelm et al. 2007). Esta idea se basa, entre otros, en el hecho de que los demás aminoácidos que no corresponden al dominio HMG de la proteína, no se encuentran fuertemente conservados en las diferentes especies (**Figura 3**) (Katoh y Miyata. 1999, Pamilo et al. 1997, Tucker et al. 1993, Whitfield et al. 1993). Es importante señalar que estudios de la proteína Sry, permitieron describir otra familia de factores de transcripción, los factores SOX (*SRY-related HMG box protein*) (**ver más adelante**).



**Figura 3. Estructura de la proteína mSRY de ratón y hSRY humana.** El dominio HMG se muestra en color rojo. Señal de localización nuclear (NLS) en rosado. La NLS amino-terminal interactúa con la calmodulina. La NLS carboxi-terminal interactúa con la importina  $\beta$ . Dominio de transactivación (TAD) en amarillo claro. Tracto de glutaminas de la proteína mSRY en amarillo. Modificado de **Wilhelm et al. 2007**

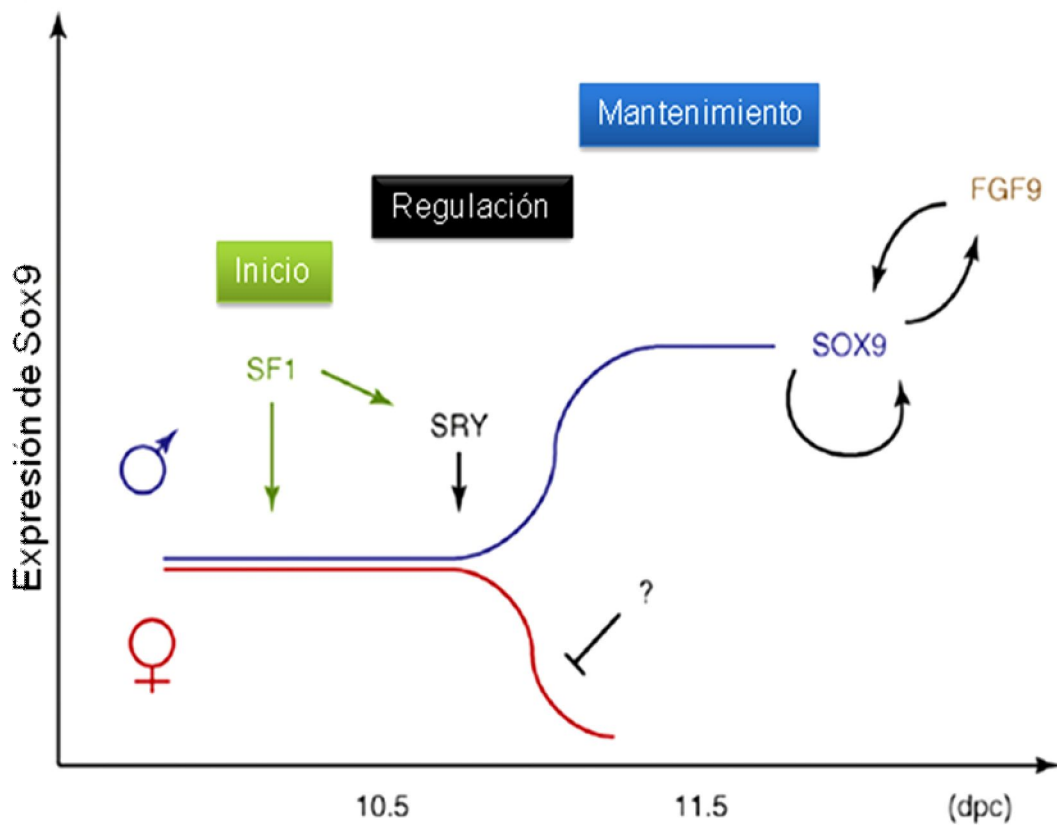
A pesar de que el gen *Sry* se describió hace más de dos décadas, sus genes blanco no han sido identificados *in vivo*. Hasta la fecha, *Sox9* ha sido el potencial gen blanco directo de *Sry* mejor estudiado. *Sox9* pertenece a la familia de genes SOX que codifican un grupo de factores de transcripción definido por la presencia del dominio HMG de unión al ADN. Los genes de la familia SOX juegan un papel importante en la determinación sexual al igual que en la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo (Buescher et al. 2002, Gubbay et al. 1990, Overton et al. 2002, Sinclair et al. 1990). *Sox9* se expresa inicialmente en la gónada bipotencial a los 10.5 dpc (Gasca et al. 2002). Posteriormente, se expresa en la gónadas XY a los 11.5 dpc, momento en el que su participación en las gónadas XX es inexistente (Morais et al. 1996, Kent et al. 1996). Ensayos realizados en una línea de ratones Knockin (KI) XX con sobreexpresión de *Sox9* mostraron una

reversión sexual XX masculina, lo que sugiere que Sox9 es capaz de cumplir las funciones de Sry (Qin et al. 2005, Canning et al. 2002). Adicionalmente, se ha sugerido que Sry actúa directamente inhibiendo la expresión del gen supresor de tumor de Wilms (*Wt1*), sin embargo, esta evidencia proviene de la sobreexpresión del gen *Sry* en una línea celular ES (*Embryonic stem cell*) de ratón con cariotipo XX (Toyooka et al. 1998). Es importante precisar que, al ser un sistema artificial, estos datos pueden no representar completamente lo que ocurre *in vivo*

### **2.2.2 SOX9: UNA MOLÉCULA *DOWNSTREAM* DE SRY**

Como se mencionó anteriormente un gen blanco candidato coherente de Sry es Sox9. Sox9 se expresa inicialmente en la gónada bipotencial y su expresión aumenta dramáticamente en las células de Sertoli inmediatamente después de la expresión de Sry (Kent et al. 1996, Morais da Silva et al. 1996). Sin embargo, a diferencia de la expresión de *Sry*, la expresión de Sox9 se mantiene en las células de Sertoli después del nacimiento. Además, Sox9 se expresa durante la condrogenesis, estimulando la diferenciación de las células mesenquimales condrogenitoras hacia condroblastos (Wright et al. 1995, Zhao et al. 1997). En consecuencia, mutaciones de SOX9 en humanos han sido asociadas a la displasia campomélica. De manera interesante, una proporción importante de pacientes con displasia campomélica y cariotipo XY presentan reversión sexual lo que sugiere que SOX9 es necesario para el desarrollo fenotípico masculino (Foster et al. 1994, Tommerup et al. 1993, Wagner et al. 1994). Esta teoría fue confirmada con la generación de ratones Knockout (KO) para el gen Sox9. Un ratón KO es un animal genéticamente modificado al cual se le invalida (se elimina) un gen en particular. Los ratones KO son modelos esenciales para estudiar la acción de un(os) gen(es) particular(es) en términos bioquímicos y fisiológicos. Se demostró que las gónadas de los embriones XY, Sox9<sup>-/-</sup> se desarrollaron como ovarios y no como testículos (Barrionuevo et al. 2006, Chaboissier et al. 2004). Además, se observó que la autorregulación de Sox9 era un elemento fundamental para su propia función (Polanco y Koopman. 2007). Recientemente, un elemento regulador responsable de la expresión específica testicular de Sox9, fue identificado a 13 Kb *upstream* de su sitio de inicio de la

transcripción (Sekido et al. 2008). Esta región se denominó TES (*testis-specific enhancer of Sox9*). Posteriormente, se identificó dentro de TES una región de 1.4 Kb altamente conservada denominada TESCO (*core region within TES*) (Sekido y Lovell-Badge, 2008). Es importante destacar que la expresión de *Sox9* depende de la presencia de los genes *Sry* y *Sf1* (*Steroidogenic factor-1*, también llamado *Nr5a1*) y de su unión a TESCO. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) mostraron que *SRY* y *SF1* se unen directamente a varios motivos dentro de TES *in vivo* (Sekido y Lovell-Badge, 2008). Por otra parte, al mutar estos sitios de unión en ensayos de co-transfección *in vitro* y en ratones transgénicos, se evidenció que *Sry* y *Sf1* actúan sinérgicamente regulando la expresión de *Sox9* (Sekido y Lovell-Badge, 2008, Sekido y Lovell-Badge, 2009). La regulación transcripcional de *Sox9* se compone de al menos tres fases (Sekido y Lovell-Badge, 2009) (**Figura 4 y 5**): inicio independiente de *SRY*, regulación dependiente de *SRY* y mantenimiento en ausencia de *SRY*.



**Figura 4. Modelo de la regulación transcripcional de *Sox9*.** Se compone de tres fases: Inicio. Regulación. Mantenimiento. Modificado de Sekido y Lovell-Badge, 2009.

Investigaciones en ratones *Sf1*<sup>-/-</sup> señalan que *Sox9* no se expresa en las gónadas masculinas, lo que sugiere que este gen puede ser necesario para la regulación positiva de *Sox9* (Lovell-Badge et al. 2002, Sekido et al. 2004). Este modelo se apoya en un experimento efectuado en ratones XX transgénicos para *Sry*, en los que *Sry* induce la expresión de *Sox9* solamente en los ratones que expresan *Sf-1* (Kidokoro et al. 2005). Por consiguiente, *Sf1* es un buen candidato para activar la expresión de *Sox9* de manera independiente a la participación de *Sry*.

Como se mencionó anteriormente *Sox9* es un factor de transcripción constituido por dos dominios de transactivación y dos secuencias de localización nuclear. Sin embargo, hasta la fecha, poco se conoce sobre los genes que *Sox9* transactiva durante la determinación testicular. Hasta el momento solo se han descrito dos genes regulados directamente por *Sox9*. El primero de ellos es *Sf1*. Se ha demostrado en experimentos *in vitro* que *Sox9* mantiene los niveles de expresión de *Sf1* en las células de Sertoli sin ser su activador primario (Shen et al. 2002). El segundo es la *Amh*. Estudios revelaron que *Sox9* regula la expresión inicial de la *Amh* (Arango et al. 1999).

Por otra parte, es importante señalar que *Sox9* se expresa de manera específica en las gónadas masculinas en muchas especies de no-mamíferos que no poseen *SRY*. En todos estos casos *Sry* no puede ser el activador de la transcripción de *Sox9*, lo que sugiere la existencia potencial de otros factores de activación. De manera interesante, ratones XY, KO para el gen *Dax1* (*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*) muestran una reversión sexual con niveles de *Sry* normales pero con niveles de expresión de *Sox9* disminuidos con respecto a los ratones *wild type* (WT). *Dax1* es crucial para el mantenimiento de la expresión de *Sox9* (Meeks et al. 2003, Schmahl et al. 2004). Adicionalmente, hallazgos recientes permitieron identificar que el factor 9 de crecimiento de fibroblastos (FGF9) es una proteína importante para el mantenimiento de la expresión de *Sox9*. En ratones XY *Fgf9*<sup>-/-</sup> la expresión de *Sox9* no se detectó en la gónada del ratón, lo que se tradujo en una reversión sexual macho-hembra. Por lo tanto, se pudo concluir que *Fgf9* es esencial para el mantenimiento de la expresión de *Sox9* (Kim et al. 2006). Estas observaciones sugieren que *Dax1* y *Fgf9* desempeñan un papel importante en la regulación y en la expresión de *Sox9* como vías paralelas a *Sry*.

En resumen, la inducción y el mantenimiento de la expresión de *Sox9*, es esencial para el desarrollo del testículo funcional. El modelo actual de regulación de *Sox9* propone que su expresión se inicia a través del elemento TESCO por intermedio de *Sf1* a los 10.5 dpc y se incrementa posteriormente al actuar *Sry* a los 11.5 dpc. *Sox9* es un factor crucial para el desarrollo de las células de Sertoli y para la diferenciación y determinación masculina. Otro factor importante, implicado de igual forma en el desarrollo de las células de Sertoli es *Fgf9*, que está ampliamente expresado en el embrión del ratón (Colvin et al. 1999). *Fgf9* puede ser detectado a partir del 11.5 dpc en ambos géneros (Schmahl et al. 2004). Más tarde, su expresión se observa exclusivamente en el cordón testicular de la gónada XY, pero no se expresa en la gónada XX. Ratones XY *Fgf9*<sup>-/-</sup> muestran una reversión sexual en algunos fondos genéticos. En estos animales la gónada XX se desarrolla normalmente (Colvin et al. 2001, Schmahl et al. 2004) lo que implica que la reversión sexual XY está ligada, en parte, a la reducción en la tasa de proliferación celular de la gónada combinada con la alteración en la proliferación de las células pre-Sertoli (Schmahl et al. 2003). Esto se traduce en una disminución del número mínimo de células necesarias para la diferenciación testicular (Burgoyne y Thornhill, 1993).

Otro gen implicado en la determinación sexual es *DAX1*. Este gen se traduce en un factor de la súper familia de receptores nucleares. Se dice que este factor es “huérfano” puesto que hasta la fecha no se ha identificado su ligando. En el extremo N-terminal de la proteína se encuentra la secuencia de aminoácidos LXXLL que media la interacción proteína-proteína (Suzuki et al, 2003, Zanaria et al. 1994, Zhang et al. 2000). En el extremo C- terminal, alberga un dominio de trans-represión (Ito et al. 1997, Zazopoulos et al. 1997). El principal modo de acción de *DAX1* está relacionado con la interacción con otros receptores nucleares como SF1. Algunos de ellos son los receptores de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$ , el receptor de andrógenos y el receptor de progesterona (Lalli et al. 1997, Nachtigal et al. 1998, Susuki et al. 2003 Zhang H et al. 2000 Agoulnik et al. 2003, Holter et al. 2002). Durante el desarrollo embrionario, *Dax1* se expresa en la glándula suprarrenal, las gónadas, el hipotálamo y la hipófisis (Hanley et al. 2000, Ikeda et al. 1996-2001). Durante el desarrollo testicular del ratón, *Dax1* se expresa en las células somáticas antes que *Sry*. Su expresión aumenta drásticamente en las células de Sertoli a los 12.5 dpc y posteriormente disminuye. Sin embargo, posteriormente se presenta un nuevo aumento en su expresión, esta vez en las células intersticiales, entre los 13.5 y 17.5

dpc. Durante el desarrollo ovárico murino *Dax1* es expresado hasta por lo menos los 14.5 dpc (Ikeda et al. 2001). Con base a la identificación de duplicaciones observadas en *DAX1* en humanos afectados por reversión sexual XY se pensó inicialmente que este gen pudiera ser un determinante específico del ovario o un factor anti-testicular (Bardoni et al. 1994, Swain et al. 1996). Por lo tanto, fue sorprendente observar que la pérdida de la función de *Dax1* en ratones hembras no tuvo consecuencias reproductivas, a pesar de que el desarrollo testicular en los animales XY se vio afectado (Bouma et al. 2005, Meeks et al. 2003, Yu et al. 1998). Sin embargo, el mecanismo molecular que subyace al desarrollo testicular frente a la función anti-testicular de *Dax1* aun no es claro. Es posible que los niveles de expresión de *DAX1* durante la diferenciación gonadal jueguen un papel importante tanto en el humano como en el ratón, lo que sugiere que un desequilibrio en los niveles de este gen puedan inclinar la balanza hacia cualquiera de las dos vías (macho o hembra) (Ludbrook et al. 2004).

En los seres humanos, la duplicación de la región Xp21 que incluye a *DAX1* se asocia a la existencia de mujeres 46,XY. Estas observaciones condujeron a la hipótesis original que *DAX1* podría ser el gen determinante ovárico (Bardoni et al. 1994, Swain et al. 1996). Sin embargo, como se mencionó, la inactivación del gen en ratones no perjudica el desarrollo del ovario o de otros aspectos de la diferenciación sexual de las hembras. Por el contrario, causa deficiencias en la espermatogénesis y defectos en el desarrollo testicular temprano. La opinión actual es que *DAX1* cumple funciones tanto en el desarrollo testicular como ovárico y que al parecer existe un requisito diferente en términos de dosis de acuerdo al tipo de determinación (masculina/femenina).

### **2.3 DESARROLLO OVÁRICO TEMPRANO**

En ausencia del gen *Sry*, las gónadas XX se desarrollaran como ovarios. Análisis transcriptómicos han revelado que de manera similar a lo que sucede en las gónadas XY, un programa genético robusto de determinación sexual se inicia en las gónadas XX aproximadamente a los 11.5 dpc (Cederroth et al. 2007). Sin embargo, no existen diferencias morfológicas evidentes hasta el día 13.5 dpc, momento en el cual, las células germinales inician la meiosis I. En contraste con lo que sucede en las gónadas XY, en

las gónadas XX, las células germinales son cruciales para la formación y para el mantenimiento de la estructura del ovario. En los últimos años, avances importantes han permitido la identificación de las bases moleculares de la determinación sexual hembra. Estos hallazgos sugieren que al menos dos factores o vías de señalización independientes, actúan de manera complementaria para promover la formación del ovario y reprimir la vía de determinación masculina. Estas son la vía R-spondin1/Wnt4/ $\beta$ -catenina y la del factor de transcripción FOXL2 (**Figura 5**).

### 2.3.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN R-SPONDIN1/WNT4/ $\beta$ -CATENINA

Recientemente se ha identificado a la R-spondin1 (*Rspo1*) como una proteína clave en la determinación sexual femenina (Parma et al. 2006). Este factor es un potente modulador de la cascada de señalización de Wnt4 (*Wingless-type mmtv integration site family, member 4*) y es capaz de activar la vía canónica  $\beta$ -catenina (Fleming y Vilain, 2005, Chassot et al. 2008). La expresión de la *Rspo1* aumenta en las células somáticas de las gónadas XX a partir del 11.5 dpc. En los seres humanos, las mutaciones que implican pérdida de función en este péptido conducen a una reversión sexual XY (Parma et al. 2006). Estudios recientes en ratones sugieren que *Rspo1* es necesario para la expresión de *Wnt4* en las gónadas XX, para la estabilización de la  $\beta$ -catenina en la estimulación del desarrollo ovárico y para bloquear el desarrollo testicular (Chassot et al. 2008, Maatouk et al. 2008).

En ratones *Rspo1*<sup>-/-</sup> se observó un bloqueo de la determinación ovárica y el desarrollo de ovotestículos (gónadas compuestas de tejido ovárico y testicular) en las gónadas XX (Chassot et al. 2008). Este fenotipo es el producto de la inhibición de la expresión de *Wnt4*, lo que se asocia a la vascularización del testículo y a la aparición de células productoras de andrógenos. Ratones XX *Wnt4*<sup>-/-</sup> muestran una reversión sexual parcial lo que sugiere que *Wnt4* regula positivamente la determinación ovárica. En estos animales las gónadas tienen la apariencia de testículos, son redondeados, no encapsulados, sin conductos müllerianos y con una diferenciación de los conductos de

Wolff. Sin embargo, las gónadas no forman cordones testiculares y expresan marcadores específicos de las células de Sertoli (Vainio et al. 1999). En humanos, las mutaciones de *WNT4* conllevan a un inicio tardío de la determinación sexual lo que se asocia a una reversión parcial similar al fenotipo observado en el ratón (Vainio et al. 1999).

*WNT4* pertenece a una gran familia de proteínas secretadas ricas en cisteínas que actúan como moléculas de señalización intercelular durante el desarrollo embrionario (Katayama et al. 2006). La expresión de *Wnt4* se inicia en el mesénquima mesonéfrico y en el epitelio celómico a partir de los 9.5 dpc. A los 11.5 dpc, *Wnt4* se expresa en el mesénquima de la gónada bipotencial y en el mesonefros, pero 12 horas más tarde su expresión disminuye en la gónada masculina y persiste en la gónada femenina y en el mesénquima que rodea los conductos müllerianos (Stark et al. 1994, Vainio et al. 1999). *Wnt4* tiene diferentes funciones durante la diferenciación sexual. Se requiere para la morfogénesis del conducto mülleriano y para la inhibición de la formación de la vascularización específica del testículo (Vainio et al. 1999, Heikkila et al. 2005).

Se ha sugerido que *Dax1* es un gen blanco de *Wnt4*. Estudios *in vitro* muestran que *Wnt4* activa y regula la expresión de *Dax1* por medio de la vía WNT/ $\beta$ -catenina (Mizusaki et al. 2003). Esta hipótesis se apoya en un caso humano de disgenesia gonadal causada por duplicaciones en el gen *WNT4* (Jordan et al. 2001). En este caso, el fenotipo se asemeja a lo observado en pacientes con duplicaciones del gen *DAX1* como se mencionó anteriormente. En síntesis, *Rspo1*, *Wnt4* y  $\beta$ -catenina son componentes de una vía única que promueve el desarrollo del ovario y suprime la formación testicular.

### 2.3.2 FOXL2 UN POTENCIAL FACTOR DETERMINANTE OVÁRICO

Además de la vía de señalización *Rspo1/Wnt4*/ $\beta$ -catenina, el factor de transcripción FOXL2 también se ha propuesto como gen candidato en la determinación sexual femenina. FOXL2 es un miembro de la gran familia de factores de transcripción *forkhead*. Se ha demostrado que es esencial para la diferenciación de las células de la granulosa y

para el mantenimiento del ovario en ratones (Moumne et al. 2008 Schmidt et al. 2004). Su expresión, que es independiente de *Rspo1*, se inicia a los 12.5 dpc en las células de la pre-granulosa (Schmidt et al. 2004). *Foxl2* ha sido implicado en casos de reversión sexual XX en cabras (Pailhoux et al. 2002). En ratones *Foxl2*<sup>-/-</sup> el fenotipo de reversión sexual es parcial y está acompañado de una depleción precoz de los folículos ováricos en las hembras (Uda et al. 2004, Schmidt et al. 2004). Además, se observan malformaciones de los párpados.

En humanos, mutaciones en *FOXL2* causan el síndrome de Blefarofimosis, Ptosis, Epicantus-Inversus (BPES), que se caracteriza por anomalías en los párpados y está asociado, en algunos casos a Falla Ovárica Prematura (FOP) (Crisponi et al. 2001). Estas observaciones muestran un papel funcional de *FOXL2* en el desarrollo y en el mantenimiento de los ovarios. Hasta la fecha no se han reportado casos de BPES con reversión sexual (Schmidt et al. 2004). Los diferentes efectos de las mutaciones pérdida de función de *FOXL2* en cabras, ratones y humanos han suscitado controversia sobre el papel de este gen como un factor determinante ovárico. Sin embargo, hallazgos recientes sugieren que *FOXL2* y la vía de señalización *Rspo1/Wnt4/β-catenina* pueden actuar de forma independiente, pero de manera complementaria (sinérgica), para promover el desarrollo del ovario y reprimir la vía masculina. La generación de un ratón doble KO para *Wnt4* y *Foxl2* condujo a una reversión sexual XX, permitiendo la expresión de *Sox9* y de la hormona antimülleriana (Ottolenghi et al. 2007). De igual forma, se observó la presencia del cordón testicular y de espermatogonias. Esto indica que el fenotipo de reversión sexual del doble KO es más drástico que el de *Foxl2*<sup>-/-</sup>. A pesar de estos resultados debe aclararse que la reversión sexual del ratón doble KO no fue completa, lo que sugiere que factores adicionales u otras vías de señalización podrían promover también el desarrollo ovárico.

Muy recientemente se han identificado nuevos factores involucrados en la vía de determinación sexual femenina. Uno de ellos es el gen *Sf1*, necesario para la expresión de las enzimas de la esteroidogénesis (Lourenço et al. 2009, Combes et al. 2010). Durante el desarrollo temprano del embrión, *Sf1* se expresa en la gónada bipotencial y posteriormente presenta diferentes niveles de expresión durante el desarrollo fetal ovárico (Takayama et al. 1995, Hanley et al. 1999). Durante la etapa de foliculogénesis, *Sf1* se

expresa en los folículos pre-antrales, en las células de la teca interna, en las células luteinizadas y no-luteinizadas de la granulosa, en el cuerpo lúteo durante la fase lútea, y en los folículos atrésicos (Takayama et al. 1995). Mutaciones de *SF1* se han asociado con FOP en mujeres 46,XX (Lourenço et al. 2009). Este fenotipo es probablemente causado por una regulación anómala en las células de la teca y de la granulosa, de genes necesarios para la esteroidogénesis ovárica, del crecimiento y de la maduración del folículo. Entre ellos se encuentran *STAR*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *CYP19A1*, *LHCGR* e *INHA* (Lavorgna et al. 1991, Keri et al. 1996, Weck et al. 2006, Zhao et al. 2007, Lin et al. 2008).

Otro gen potencialmente implicado en la determinación sexual femenina es *CITED2*. Las características moleculares de este gene serán desarrolladas en extenso más adelante puesto que una parte de los estudios experimentales de este trabajo de tesis se fundamenta en la exploración de sus variantes en mujeres FOP (**ver más adelante**).

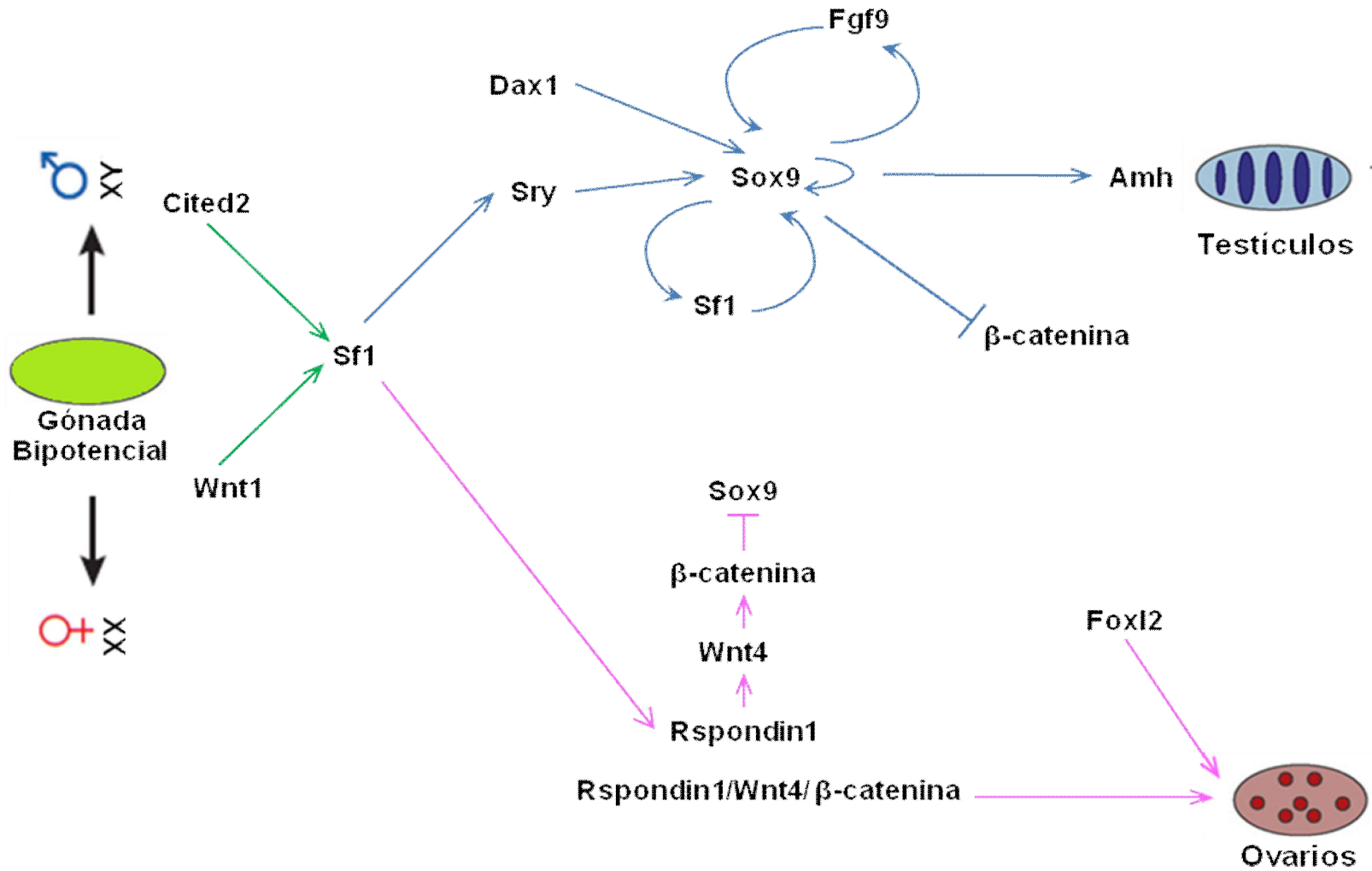


Figura 5. Vías moleculares de la determinación sexual en los mamíferos.

## 2.4 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA FEMENINA

Las gónadas femeninas, el útero y las trompas de Falopio constituyen el conducto reproductivo femenino. Se ha considerado que los ovarios tienen dos funciones principales: la ovogénesis y la secreción de las hormonas esteroideas sexuales femeninas, la progesterona y el estrógeno. Desde un punto de vista histológico el ovario posee tres zonas. **La corteza** que es la zona más extensa y externa. Está revestida por epitelio germinal y contiene los ovocitos, cada uno encerrado en un folículo. **La médula** que se encuentra entre la corteza y el hilio está constituida por una mezcla de diferentes tipos de células. Entre ellas se encuentran células de sostén, fibroblastos, folículos en diferentes estados de maduración, los cuerpos lúteos, el cuerpo *albicans* y las células intersticiales, tecales y deciduales. Finalmente, **el hilio** es la zona interna en la que se encuentran los grandes vasos sanguíneos y linfáticos.

Las hormonas esteroideas ováricas tienen funciones paracrinas y endocrinas. Localmente, en los ovarios, las hormonas esteroideas actúan para sustentar el desarrollo folicular. Sistémicamente, estos péptidos actúan sobre varios tejidos efectores, incluyendo el útero, la glándula mamaria, el hueso y la hipófisis. La unidad funcional de los ovarios es el folículo ovárico, que contiene una célula germinal (ovocito) rodeada por células endocrinas (de la granulosa y tecales). El folículo ovárico desarrollado posee varias funciones decisivas en la biología reproductiva. Suministra nutrientes para el ovocito en desarrollo, libera el ovocito en el momento apropiado (ovulación), prepara la vagina y las trompas de Falopio para la fecundación y modula el desarrollo del endometrio para la implantación del embrión.

### 2.4.1 LA FOLICULOGÉNESIS

En los mamíferos, las células germinales primordiales de origen extraembrionario son precursoras de los espermatozoides en los machos y de los ovocitos en las hembras. El desplazamiento de estas células hacia la cresta genital se efectúa de manera pasiva y activa. El desplazamiento pasivo tiene lugar por la traslocación de dichas células junto con el endodermo y el mesénquima durante la formación del intestino primitivo posterior y el primordio del mesenterio intestinal. Posteriormente, se inicia la migración activa, que se manifiesta por la emisión de pseudópodos que permiten una

capacidad de locomoción para emerger del intestino y atravesar la lámina basal que lo cubre, continuando su camino hacia las crestas genitales. Este proceso ocurre entre la cuarta y la quinta semana de gestación en el humano. Una vez las células germinales primordiales se localizan en las crestas genitales pierden sus características migratorias. Las células germinales primordiales, junto con otros tipos de células somáticas, forman la gónada bipotencial, que es idéntica en ambos sexos. Ante la ausencia del gen *SRY*, las células germinales primordiales se diferencian a ovogonias (Lovell-Badge y Robertson, 1990, Koopman et al.1991). Estas últimas se multiplican por medio de mitosis hasta que comienzan a rodearse de una capa de células de la granulosa formando los folículos primordiales, dentro de los cuales, los folículos primarios permanecen detenidos en la profase de la meiosis I, hasta el inicio de la vida reproductiva.

En los ovarios en desarrollo, las células germinales primordiales producen ovogonias por divisiones mitóticas hasta las semana 20 a 24 de la gestación. En ese momento hay aproximadamente 7 millones de ovogonias. (Baker 1963, Forabosco et al. 1991). Al comienzo de las semanas octava y novena de gestación, algunas de estas ovogonias entran a la profase de la meiosis I y se convierten en ovocitos primarios. Los procesos meióticos continúan hasta casi seis meses después del nacimiento periodo en el cual todas las ovogonias se han convertido en ovocitos. Estos últimos permanecen en un estado de profase latente de la meiosis I que solamente concluye en el momento de la ovulación años más tarde durante la adolescencia. Sin embargo, la gran mayoría de estos ovocitos nunca llegan a la ovulación, puesto que son sometidos a un proceso de atresia fisiológica. Durante la segunda mitad del desarrollo prenatal ocurre una primera fase de atresia masiva de los folículos primordiales. Se estima que al momento del nacimiento una mujer tiene cerca de 1 millones de ovocitos (Block 1953, Carlson 2004). Posteriormente, durante la infancia, la atresia continúa. En el momento de la menarquía se observan cerca de 300.000 a 500.000 células germinales y sólo algunos cientos de ellas sufren una maduración folicular conducente a la ovulación (Speroff L et al. 2005). Durante la edad fértil de la mujer, todos los meses, alrededor de 1000 folículos inician el proceso de atresia. Al final de la cuarta década, ocurre una disminución acelerada de la reserva de folículos, anunciando el fin de la etapa fértil. Cuando no se tienen más folículos en el ovario, o que el *pool* de folículos está próximo a extinguirse, se presenta la última menstruación que da inicio al proceso denominado menopausia. Recientemente, el paradigma que afirma que la

mujer nace con un numero finito de ovocitos ha sido revaluado (Johnson J et al. 2004, Johnson J et al. 2005, Johnson J et al. 2005, Lee HJ et al. 2007). En estos estudios, luego de someter los ovarios de ratones a radiación y verificar la ausencia de ovocitos, la implantación de células madre del epitelio superficial del ovario o de la médula ósea en el ovario del ratón adulto, conduce a un proceso de neo-ovogénesis. Estos nuevos datos apoyan la posibilidad de restaurar la fertilidad de forma experimental en las mujeres que sufren de FOP. Sin embargo, ningún otro grupo de investigación ha replicado los hallazgos reportados y existe un amplio debate sobre esta idea (Byskov et al. 2005, Telfer et al. 2005, Eggan et al. 2006, Faddy y Gosden 2007, Bristol-Gould et al. 2008). Esta situación indujo la discusión sobre la posibilidad de que mujeres irradiadas que han sido sometidas a trasplante de médula y que recobran la fertilidad, puedan tener hijos a partir de material genético del donante. Sin embargo, a pesar de que esta hipótesis ha sido explorada en humanos no ha sido validada (Veitia et al. 2007).

Después del nacimiento, los folículos primordiales son gradualmente separados por un abundante estroma de tejido conectivo. Los folículos primordiales están compuestos por un ovocito en crecimiento, rodeado por un número específico de células planas (pre-granulosas) que ejercen un efecto inhibitor sobre la meiosis y sobre el crecimiento ovocitario (Picton, 2001). A diferencia de los folículos primordiales, los folículos en estadios más avanzados de crecimiento se encuentran siempre en la frontera córtico-medular altamente vascularizada. La transformación de folículos primordiales en folículos primarios es insensible a las gonadotropinas. En el interior de los folículos primarios están presentes los ovocitos, rodeados por una capa unilaminar de células pre-granulosas de morfología plana. Estas células presentan gran actividad mitótica dando lugar progresivamente a una diferenciación en un perfil similar a un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes se originan espacios extracelulares, donde se deposita una sustancia que define el inicio de la formación de la zona pelúcida (ZP). Sobre la ZP, puede decirse que es una característica del folículo preantral primario. Cuando se alcanza esta etapa, las células pre-granulosas no ejercen ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento del ovocito pero sí sobre la meiosis (Thibault et al.1987). En este estadio, estas células inician adicionalmente una fase de mitosis al mismo tiempo que el ovocito aumenta de tamaño. De este modo, el folículo primario se transforma en folículo preantral multilaminar (folículo secundario) lo que implica la transformación de las células pre-

granulosas formando un epitelio estratificado. A partir de este momento se denominan células de la granulosa. En la parte externa de la lámina basal que separa las células de la granulosa del estroma, empiezan a diferenciarse otro tipo de células, las células tecales. Posteriormente, cuando las células de la granulosa alcanzan un número elevado como respuesta a la FSH se forman cavidades en el espacio extracelular llenas de un fluido denominado fluido folicular. A medida que la cantidad de este líquido aumenta, las cavidades que ocupan también aumentan de tamaño para formar el antro. Más tarde, con la aparición de la cavidad antral, el folículo se denomina folículo antral (o folículo terciario). Más adelante, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones. Las primeras revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal. Otras, forman el *cumulus oophorus* en una estructura de varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (Canipari, 1994). En este estadio, comienzan las mitosis de éstas células y al mismo tiempo el ovocito aumenta de tamaño.

Durante la prolongada etapa preantral de la foliculogénesis, el desarrollo del ovocito depende especialmente de su estrecha relación con las células de la granulosa. También durante esta fase de crecimiento se forma la zona pelúcida. La capa de células más cercana a la ZP se denomina *corona radiata*. Mientras se produce el desarrollo folicular, se inicia una cooperación metabólica entre las células de la granulosa y el ovocito. En esta etapa de crecimiento se establece la comunicación entre las células del *cumulus* y el ovocito mediante procesos citoplasmáticos de las células de la *corona radiata* que atraviesan la ZP y conectan con el oolema. Es importante señalar que las células de la granulosa también se interconectan entre ellas mediante uniones tipo *gap* (Anderson y Albertini, 1976).

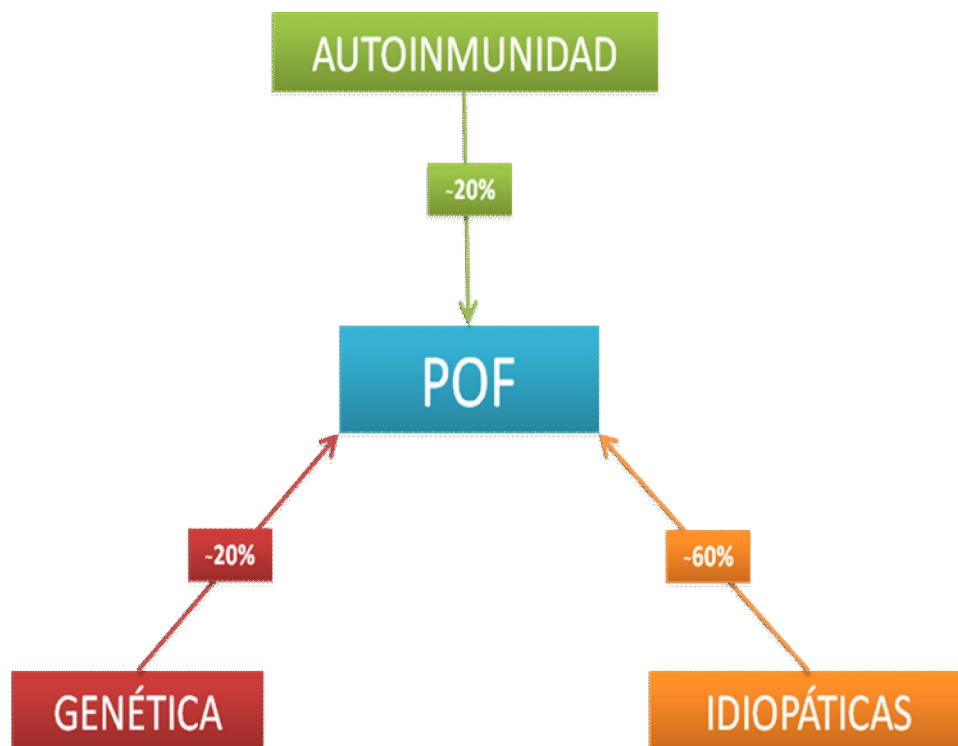
## 2.5 ETIOLOGÍA DE LA FALLA OVÁRICA

La falla ovárica prematura (FOP) afecta aproximadamente al 1.5% de las mujeres menores de 40 años y al 0.1% menores de 30 años (Coulam et al. 1986, Luborsky et al. 2003). Clínicamente, la FOP se define como el cese de la menstruación antes de los 40 años de edad (amenorrea mayor a 6 meses asociado a niveles séricos de FSH superiores a 40 UI/l) (Coulam. 1982). Hoy en día, existen marcadores directos para evaluar la función del ovario y la reserva folicular. Entre estos, se encuentran la medición de la inhibina B producida por las células de la granulosa durante el proceso de desarrollo folicular, el conteo de folículos antrales (AFC), y la cuantificación de la AMH. La AMH ha sido evaluada en varios estudios y se ha establecido como un marcador de la pobre respuesta a la fertilización *in vitro*, en el síndrome del ovario poliquístico, y en el hipogonadismo hipogonadotrópico (Kalantaridou et al. 2000, Broekmans et al. 2006, Broekmans et al. 2008, Van Disseldorp et al. 2009).

Es importante señalar que, el diagnóstico de la FOP trae un fuerte impacto emocional y psicológico para las mujeres que la presentan (Liao et al. 2000, Groff et al. 2005). Además en la mayoría de las mujeres que desarrollan FOP los signos y síntomas que preceden la enfermedad no son claros (Woad et al. 2006). El diagnóstico definitivo es difícil de obtener puesto que los criterios diagnósticos no están estandarizados por dificultades en la definición precisa de la FOP (Panay y Kalu 2009). La mayoría de los diagnósticos se basan en amenorrea de 3 a 6 meses y concentraciones mayores a 40 mUI/ml de FSH obtenidos dos veces en un intervalo de un mes. Adicionalmente, es necesario descartar otras causas que ocasionan amenorrea, tales como el embarazo, el síndrome de ovario poliquístico, la hiperprolactinemia y la disfunción tiroidea.

En la actualidad no se conocen con certeza los mecanismos que conducen a la disminución de la cantidad de los folículos (**Figura 6**). No es claro aún si las mujeres FOP nacen con un número reducido de folículos y/o presentan alteraciones en los mecanismos reguladores de la foliculogénesis que conllevan al aumento de la atresia folicular. Sin embargo, distintos modelos murinos genéticamente modificados (KO y KI) han permitido identificar algunos mecanismos potencialmente relacionados con el fenotipo (**ver más adelante**). En la búsqueda de factores genéticos etiológicos de enfermedades humanas (especialmente de origen monogénico) el estudio de casos

familiares es de crucial importancia. Sin embargo, por las características inherentes al fenotipo, los casos familiares son infrecuentes. Sin embargo, algunos estudios de familias afectadas reportan modos de herencia autosómica dominante o ligada al X con penetrancia incompleta (Vegetti W et al. 1998, Coulam CB et al. 1983, Mattison et al. 1984, Bondy et al. 1998, Chistin-Maitre et al. 1998). En la actualidad, se estima que la reproducción en los mamíferos, y por consiguiente los fenotipos patológicos, son el resultado de la interacción de cientos de genes en una red de regulación sutil, lo que sugiere su estudio desde ópticas cuantitativas (QTL, *Quantitative Trait Loc*). Por su extensión, en este manuscrito no serán revisados conceptos de genética cuantitativa.



**Figura 6. Etiología Falla Ovárica Prematura.**

### **2.5.1 CAUSAS IATROGÉNICAS**

Una de las causas frecuentes de FOP se asocia a iatrogenia. Por ejemplo, en pacientes que desarrollan patologías oncogénicas y que son sometidas a cirugía pélvica, radioterapia y/o quimioterapia desarrollan FOP. Además, las intervenciones quirúrgicas de cualquier tipo en la cavidad pélvica e incluso abdominal pueden dejar

secuelas como isquemia secundaria a procesos cicatriciales (Hoyer et al. 2005, Woad et al. 2006) que pueden conducir a la enfermedad.

## 2.5.2 CAUSAS AUTOINMUNES

Algunos casos de FOP pueden ser originados en disfunciones del sistema inmunitario causando una reducción del número de folículos o la destrucción acelerada del tejido ovárico (Irvine WJ. 1969, Luborsky et al. 2002, Luborsky JL 2002, Meyer et al. 1990). Se considera que el 20% de los pacientes con FOP presenta enfermedades autoinmunes, principalmente enfermedad tiroidea autoinmune (Hoek et al. 1997). La característica principal en estos casos, es la presencia de auto-anticuerpos, especialmente anti-ovario que, al parecer, sólo están presentes en la fase inicial de la destrucción folicular. Entre las asociaciones descritas con condiciones autoinmunes se encuentran la presencia de auto-anticuerpos contra el ovario, la infiltración linfocítica ovárica y la relación entre el desarrollo de FOP y otras enfermedades autoinmunes

Dentro de las enfermedades endocrinas y no endocrinas autoinmunes asociadas a la FOP se encuentran (**Tabla 1**) (Hoek et al. 1997, Betterle et al. 2005).

Tabla 1. Causas Autoinmunes de la Falla Ovárica Prematura		
Endocrinas	No endocrinas	
Tiroidismo	Candidiasis crónica	Anemia perniciosa
Hipoparatiroidismo	Purpura trombocitopenica idiopática	Lupus eritematoso sistémico
Diabetes mellitus	Vitíligo	Artritis reumatoidea
Hipofisitis	Anemia hemolítica autoinmune	Enfermedad de Crohn
	Síndrome de Sjogren	Cirrosis biliar primaria

### 2.5.3 CAUSAS GENÉTICAS

La mayoría de los casos de FOP son idiopáticos. Se considera que hasta el 80% de las pacientes FOP pertenecen a esta categoría. Sin embargo, la observación de casos familiares, indica la participación en su patogénesis de alteraciones genéticas (Conway, 1996). Análisis de familias afectadas por la enfermedad sugieren diferentes modos de herencia, incluyendo formas dominantes y recesivas por transmisión materna o paterna (Vegetti et al. 1998). La forma de herencia materna más frecuente es ligada al cromosoma X con penetrancia incompleta (Davis et al. 2000, Toniolo 2006, Persani et al. 2009). Sin embargo, diferentes casos familiares indican igualmente que la FOP puede ser una enfermedad genética con expresividad variable (Tibiletti et al. 1999) lo que apoya la opinión de que es una enfermedad compleja y multifactorial (Toniolo 2006). A la fecha múltiples regiones y genes candidatos han sido propuestos (Laisue et al. 2008). Sin embargo, la complejidad intrínseca de los procesos moleculares de la reproducción en la que cientos de genes están implicados se traduce en estudios en los cuales, al analizar uno o pocos genes simultáneamente, se asocian variantes en <1% de los casos (Gambaro et al. 2000, Nelson et al. 2003). El objetivo de esta revisión es ilustrar las principales asociaciones genéticas descritas en la patogénesis de la FOP (**Tabla 2**). Se revisarán desde esta óptica tanto las formas no-sindrómicas como las sindrómicas.

#### 2.5.3.1 CAUSAS SINDRÓMICAS

Casos familiares y esporádicos de FOP pueden indicar aberraciones en el cromosoma X, como la monosomía del X (Síndrome de Turner), la trisomía del X, defectos estructurales, deleciones y translocaciones (Zinn, 2001). Genéticamente, el síndrome de Turner es la consecuencia de la ausencia total o parcial de un cromosoma X en la mujer. En aproximadamente el 50% de los casos, se produce una pérdida completa de un cromosoma X, mientras que en el resto de los pacientes se presentan mosaicismo (presencia de dos líneas celulares diferentes con cariotipo distinto procedentes del mismo cigoto) o alteraciones estructurales del cromosoma X que llevan a un fenotipo más leve (Bharat et al. 2010). La prevalencia del síndrome de Turner es de aproximadamente 1:2500 mujeres nacidas vivas (Sybert y McCauley 2004). En mujeres con cariotipo 45,X la pérdida de los ovocitos se produce en las

primeras etapas de la profase meiótica I, lo que resulta en una disgenesia gonadal y en amenorrea primaria asociada a niveles plasmáticos elevados de FSH (Reynaud et al. 2004, Fechner et al. 2006). El fenotipo ovárico de esta enfermedad puede explicarse por varios mecanismos que incluyen la sincronización defectuosa de los cromosomas X en la meiosis (Ogata y Matsuo 1995) y la haploinsuficiencia de genes ligados al X (como el gen *SHOX*) que escapan a la inactivación y que son necesarios para la correcta función ovárica (Zinn y Ross, 1998).

### **2.5.3.1.1 GALACTOSEMIA**

La galactosemia es un trastorno hereditario del metabolismo de la galactosa causado por deficiencia de la enzima GALT (galactosa-1-fosfatasa uridil transferasa). La incidencia de esta enfermedad en Europa y América del Norte es de alrededor de 1:30000 - 1:50000 nacidos vivos (Rubio-Gozalbo et al. 2010). Más de 220 mutaciones han sido descritas en el gen *GALT* (Calderón et al. 2007). Sin embargo, dos mutaciones (p.Gln188Arg y p.Lys285Asn) representan más del 70% de las mutaciones de este gen (Tyfield et al.1999). En general, las mujeres portadoras de mutaciones homocigotas en el gen *GALT* presentan FOP. En estos casos, la actividad de la enzima es nula o se encuentra disminuida (Waggoner et al. 1990). El daño del ovario puede ser inducido por la acumulación de metabolitos tóxicos de la galactosa causando apoptosis del ovocito (Liu et al. 2000), o por deficiencia de glicoproteínas y/o glicolípidos, necesarios para el funcionamiento de la FSH y de su receptor, disminuyendo a su vez la estimulación ovárica y aumentando la tasa de atresia folicular (Tedesco y Miller 1979, Jaeken et al. 1992, Ornstein et al. 1992).

### **2.5.3.1.2 SÍNDROME POLIGLANDULAR AUTOINMUNE TIPO I**

El síndrome poliglandular autoinmune tipo I (APS1) o poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la presencia de 2 de los 3 siguientes rasgos clínicos: enfermedad de Addison, hipoparatiroidismo y candidiasis mucocutánea crónica. El inicio de las manifestaciones clínicas se produce con frecuencia durante la infancia. Los pacientes con APECED habitualmente presentan un número variable de otras manifestaciones

autoinmunes como: tiroiditis, diabetes tipo 1, insuficiencia ovárica y hepatitis (Paterson y Peltonen 2005). Se considera que es un trastorno monogénico. El APS1 es un trastorno raro, pero con una prevalencia particular en ciertas poblaciones como la finlandesa, judía, iraní y sarda (Cervato et al. 2009).

#### **2.5.3.1.3 ATAXIA TELANGIECTASIA**

El gen *ATM* codifica una proteína quinasa que está implicada en la regulación del ciclo celular (Shiloh 2003, Kastan y Bartek 2004). Mutaciones en *ATM* que conlleven a la pérdida total de la proteína causan ataxia telangiectasia (AT) (Lakin et al. 1996). La AT es un desorden autosómico recesivo caracterizado por movimientos descoordinados y telangiectasias oculares (Savitsky et al. 1995). Algunos pacientes con AT presentan insuficiencia ovárica asociada a hipoplasia gonadal (Miller y Chatten 1967, Boder 1975, Sedgwick y Boder 1991). La deficiencia de *Atm* en ratones XX genera la pérdida de folículos primordiales y la formación de ovarios pequeños. Los folículos primordiales se pierden durante la profase de la meiosis I en la gametogénesis (Barlow et al. 1996).

#### **2.5.3.1.4 SÍNDROME BPES**

El Síndrome de blefarofimosis, ptosis, epicanto inverso (BPES) es una enfermedad autosómica dominante. Las malformaciones palpebrales en esta enfermedad pueden estar asociadas (tipo I) o no (tipo II) con FOP. Mutaciones en el gen *FOXL2* causan el síndrome de BPES (Crisponi et al. 2001). El gen *FOXL2* codifica un factor de transcripción que contiene un dominio altamente conservado de unión al ADN y un tracto de polialaninas constituido por 14 residuos. Ratones KO para *Foxl2* presentan alteraciones craneofaciales características del BPES e infertilidad en las hembras secundaria a la detención del desarrollo folicular temprano (Schmidt et al. 2004, Uda et al. 2004). *FOXL2* está implicado principalmente en la transición morfológica de las células de la granulosa de escamosas a cúbicas y en el proceso de activación de los ovocitos (Schmidt et al. 2004, Uda et al. 2004). Debe anotarse que mutaciones en este gen han sido descritas en pocos casos de FOP no-sindrómica (Harris et al. 2002, Gersak et al. 2004)

## 2.5.3.2 CAUSAS NO-SINDRÓMICAS

### 2.5.3.2.1 GEN DEL RETRASO MENTAL DEL X FRÁGIL 1

El gen del retraso mental del X frágil 1 (*FMR1*) se localiza en locus Xq27.3 y es responsable del síndrome del X frágil, una forma de retraso mental ligado al cromosoma X. Cuando el trinucleótido CGG en la región 5' del gen se expande más de 200 repeticiones se genera esta enfermedad. Mujeres que presentan 50 a 200 repeticiones de CGG, en el gen *FMR1* presentan FOP en el 30% de los casos (Wittenberger et al. 2007). La prevalencia de FOP en mujeres con un alelo premutado, es de alrededor del 16% (Wittenberger et al. 2007). La asociación entre el tamaño de las repeticiones y el riesgo de padecer FOP no es lineal, ya que el riesgo parece ser mayor entre 79 y 99 repeticiones, y mucho menor para repeticiones entre 55 y 78 y para más de 100 (Allen et al. 2007, Wittenberger et al. 2007).

### 2.5.3.2.2 PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 15

BMP15 es una proteína específica de los ovocitos (Dube et al. 1998, Chang et al. 2002, McNatty et al. 2005, Shimasaki et al. 2004). El gen *BMP15* codifica una pre-proteína formada por un péptido señal, una región pro-péptido y el péptido maduro que, luego de modificaciones post-traduccionales, puede formar homo o heterodímeros con otros factores como GDF9 (Chang et al. 2002).

Las principales funciones de BMP15 son: a) la participación en la maduración folicular al estimular el crecimiento (mitosis) de las células de la granulosa, la regulación de la sensibilidad de estas células a la acción de la FSH y la prevención de su apoptosis (Shimasaki et al. 2004, Hashimoto et al. 2005, Hussein et al. 2005, 2006, Fabre et al. 2006). La importancia de BMP15 en la foliculogénesis se observó inicialmente tanto en modelos experimentales (ratones) como de manera espontánea en ovejas. La alteración experimental (KO) del gen *Bmp15* en ratones causa un defecto leve en términos reproductivos (hipofertilidad por disminución de la tasa de ovulación) (Yan et al. 2001). En ovejas, las mutaciones espontaneas heterocigotas causan hiperproliferación mientras que las homocigotas causan infertilidad secundaria a un

bloqueo completo de la foliculogénesis (Galloway et al.2000, Davis 2004, Hanrahan et al.2004, McNatty et al.2005, Bodin et al. 2007).

En humanos, mutaciones en el gen *BMP15* se han encontrado asociadas con amenorrea primaria y secundaria. La primera mutación reportada en *BMP15* (p.Tyr235Cys) se encontró en dos hermanas italianas con insuficiencia ovárica (Di Pasquale et al. 2004). Otras variantes se han identificado luego del tamizaje de más de 600 pacientes FOP (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, los ensayos funcionales que han buscado validar de manera definitiva la implicación de este gen en la patogénesis de la enfermedad son aún hoy controversiales.

#### **2.5.3.2.3 FACTOR DE CRECIMIENTO DE DIFERENCIACIÓN 9**

Además de *BMP15*, otros miembros de la familia  $TGF\beta$  tienen un papel relevante en el desarrollo de la foliculogénesis. *GDF9*, un gen parálogo de *BMP15*, se expresa específicamente en el ovocito. Los péptidos maduros pueden formar homo o heterodímeros con otros miembros de la familia, en especial *BMP15* (Yan et al. 2001). Mutaciones espontáneas de este gen en ovejas Cambridge y Belclare, producen efectos similares en el ovario a los observados en animales portadores de mutaciones en *BMP15* (Hanrahan et al. 2004). Se ha demostrado *in vitro* que *GDF9* estimula la expansión del cúmulo y con la inducción de la expresión de sintasa de ácido hialurónico 2, de ciclooxigenasa 2 y de la proteína STAR (Elvin et al. 1999). En mujeres FOP se han detectado variaciones en el gen *GDF9* que afectan la pro-región (Dixit et al. 2005, Laissue et al. 2006, Kovanci et al. 2007, Zhao et al. 2007).

#### **2.5.3.2.4 RECEPTORES DE GONADOTROFINAS**

Los receptores FSHR y LHR son hormonas glicoproteicas que pertenecen a la familia de receptores unidos a proteína G (GPCR) (Themmen y Huhtaniemi 2000). De igual forma que las hormonas LH y FSH, estos receptores son esenciales para la función

reproductiva en ambos sexos. Mutaciones que afecten la función de estos receptores causan resistencia a las gonadotrofinas presentándose hipogonadismo hipergonadotrófico. Sin embargo, estas mutaciones son muy raras. Un análisis de ligamiento en una población finlandesa reveló la asociación entre el locus 2p21 y la disgenesia ovárica. Este loci contiene los genes que codifican para los receptores FSHR y LHR. En 1995 al secuenciar el gen *FSHR* se encontró la mutación homocigota p.Ala189Val en el dominio extracelular del receptor (Aittomaki et al. 1995). Estudios *in vitro*, permitieron establecer que esta mutación en el receptor altera el plegamiento de la proteína manteniendo el receptor en el citoplasma de la célula (Aittomaki et al. 1995, Rannikko et al. 2002). La mutación p.Ala189Val parece ser propia de la población finlandesa lo que sugiere un efecto fundador (da Fonte Kohek et al. 1998, Jiang et al. 1998, Layman et al. 1998, Loutradis et al. 2006, Prakash et al. 2009). Diferentes mutaciones se han identificado en diversas regiones del gen *FSHR* que afectan la unión del ligando al receptor. Otras mutaciones se han localizado en el dominio transmembranal afectando parcialmente la cascada de señalización hormonal (Beau et al. 1998, Touraine et al. 1999, Doherty et al. 2002, Allen et al. 2003, Nakamura et al. 2008).

Las mutaciones en el gen *LHR* (MIM 152790) son una causa rara de FOP en mujeres con cariotipo 46,XX. La presentación clínica de la enfermedad se caracteriza por niveles de LH más elevados que los niveles de FSH. La evidencia particular del fenotipo en mujeres con insuficiencia ovárica y resistencia a la LH fue obtenida inicialmente por estudios en varones con hipoplasia de las células de Leydig (Latronico et al. 1996, 1998). A diferencia de los varones, para causar FOP, el grado de resistencia a la LH debe ser severo y se caracteriza por oligoamenorrea o amenorrea secundaria con evidencias ecográficas de múltiples folículos antrales. Biopsias de ovario revelan en estos casos desarrollo folicular en todas sus etapas hasta la etapa pre-ovulatoria y por lo general la ovulación no se produce.

#### **2.5.3.2.5 NR5A1**

El gen *NR5A1*, también denominado factor esteroideogénico 1 (SF1), codifica un receptor nuclear expresado en la gónada bipotencial desde el inicio del desarrollo embrionario. *NR5A1* es un importante regulador transcripcional de los genes implicados en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Luo et al. 1994). Estos incluyen

*STAR*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *CYP19A1*, *LH/CGR*, e *INHA*. Hasta el 2008, 18 mutaciones de *NR5A1* fueron descritas en casos de trastorno del desarrollo sexual (DSD) con o sin insuficiencia suprarrenal (Achermann et al. 1999, Lin et al. 2007). Recientemente, el papel de este factor en el desarrollo y en la función ovárica se ha puesto de manifiesto. Diecinueve mutaciones adicionales, incluyendo deleciones y cambios no-sinónimos, se detectaron en miembros de cuatro familias con historia de 46, XY DSD y 46,XX FOP, al igual que en 2 casos aislados de insuficiencia ovárica (Lourenço et al. 2009). Las mutaciones se asociaron con una serie de anomalías en los ovarios que incluyen disgenesia gonadal con amenorrea primaria y secundaria. El análisis funcional reveló que en las proteínas mutantes se altera su actividad de transactivación de promotores de genes gonadales importantes para el crecimiento y la maduración folicular. Estos trastornos de la transcripción en el ovario dan lugar a una foliculogénesis alterada y a insuficiencia ovárica (Bashamboo y McElreavey 2010).

#### 2.5.3.2.6 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La familia de factores de transcripción *forkhead* esta constituida por más de 100 factores que participan en diversos procesos del desarrollo. Estos incluyen la mediación de las señales de la superfamilia TGF $\beta$  al unirse a los miembros de la familia de proteínas Smad (Attisano et al. 2001)

Adicionalmente a FOXL2 (**ver más arriba**), algunos miembros de una subfamilia de factores *forkhead* (FOXO3a, FOXO1a y FOXO4) han demostrado jugar un papel clave en la función ovárica. En estudios *in vitro*, se demostró que FOXO3A tiene un rol importante en el crecimiento de los ovocitos y en la activación folicular (Liu et al. 2006, Reddy et al. 2005). En un estudio realizado por Castrillon y colaboradores en 2003, en un modelo de ratón KO para *Foxo3a*, se reportó un fenotipo específico en el ovario. En estas investigaciones se observó un aumento sustancial en el número de folículos activados a partir del día 14 con respecto al ratón WT. En el ratón *Foxo3a*<sup>-/-</sup>, en la semana 18 de edad, los ovarios estaban desprovistos de folículos viables. Estos ratones eran infértiles en la semana 15, lo que demostró que la ausencia de *Foxo3a*, produce la sobreactivación de los folículos primarios indicando un papel angular de este gen en la represión de la activación de los folículos primarios (Castrillon et al., 2003, Hosaka et al., 2004, Lin et al., 2004).

Para comprender mejor el significado fisiológico de *FOXO3A* en cuanto a su expresión en los ovocitos y su función en la foliculogénesis, Liu y colaboradores en 2007 generaron un modelo murino transgénico (Tg, KI) en el cual se expresa de forma constitutiva *Foxo3a* en los ovocitos. Los hallazgos de este estudio mostraron que la expresión del gen *Foxo3a* en los folículos primarios se relaciona con un retraso en el crecimiento folicular, lo que a su vez se traduce en una reducción significativa de la cantidad de folículos secundarios. Considerando de forma conjunta los estudios de Castrillon et al. 2003 y de Liu et al. 2007, es claro cómo en el ovocito miembros de la vía PI3K (**ver más adelante**) juegan un papel importante durante el crecimiento y el desarrollo folicular. Como se observó en el ratón *Foxo3a*<sup>-/-</sup> la función de este gen en el ovario no parece ser compensada por otros miembros de la familia FOXO. Otros hallazgos importantes en el estudio de Liu, demuestran que la proteína P27 o CDKN1B implicada previamente en la detención del ciclo celular y la apoptosis (Fero et al., 1996), estaba presente en el núcleo de los ovocitos. Estos hallazgos ilustran un rol importante de CDKN1B en la inhibición del desarrollo folicular (**Ver también capítulo sobre CDKN1B**).

A pesar de que modelos murinos sugieren la implicación de *Foxo1a* en el desarrollo folicular, la secuenciación del gen en 90 pacientes no FOP mostró variantes relacionadas con el fenotipo (Watkins et al. 2006). El gen *FOXO4* se mapeó en el locus Xq13.1 y es un potente regulador del ciclo celular. En el ovario se ha observado su expresión en las células de la granulosa. El análisis de la región codificante de *FOXO4* por parte de nuestro grupo de investigación en un panel de 116 pacientes con FOP idiopática, no mostró una vinculación del gen con la enfermedad (Fonseca et al. Clinical Endocrinology, **artículo sometido, ver anexos**).

Dos factores de transcripción adicionales han sido relacionados con la FOP en humanos. Los genes *NOBOX* (Newborn ovary homeobox) y *FIGLA* (factor alfa de línea germinal) codifican dos factores de transcripción específicos del ovocito. *Nobox* es un gen homeobox crítico para la expresión específica de genes propios del ovocito como *Mos*, *Oct4*, *Rfp14*, *Fgf8*, *Zar1*, *Dnmt1o*, *Gdf9*, *Bmp15*, y *H1oo* (Rajkovic et al. 2004). En ratones KO para *Nobox* se observó la pérdida acelerada de ovocitos y un fenotipo similar a la FOP. En grupos de pacientes FOP caucásicos de Estados Unidos se encontró una variante (p.Arg355His) (Qin et al.2007) relacionada con la etiología- Esta mutación interrumpe la unión del homeodominio al ADN (Qin et al.2007).

FIGLA es un factor de transcripción que regula la expresión de genes de la zona pelúcida. En ratones XX KO para *Figla* se observó la pérdida rápida de ovocitos después del nacimiento y la no-formación de folículos primordiales. El fenotipo de los ovarios de estos ratones sugirió que mutaciones en *FIGLA* podrían contribuir a la aparición de FOP en humanos. Hasta la fecha, el único estudio del gen *FIGLA* en mujeres FOP permitió identificar deleciones heterocigotas en dos casos de mujeres no-relacionadas (Zhao et al. 2008). Los análisis funcionales mostraron que estas variantes pueden jugar un papel patogénico. De manera más precisa, una de estas deleciones traduce una proteína truncada (p.Gly6fsX66) que podría explicar el fenotipo por un mecanismo de haploinsuficiencia. La segunda deleción c.419\_421delACA, lleva a la pérdida de un aminoácido (p.Asn140del). Estudios *in vitro* de esta mutación demostraron una alteración en la heterodimerización de la proteína mutante con otros factores de transcripción nuclear, lo que sugiere un efecto dominante negativo causal de FOP (Zhao et al. 2008).

A pesar de más de dos décadas de búsqueda de genes FOP, hasta la fecha aún no se conocen factores genéticos causales mayores de la enfermedad. A continuación se resumen los genes más relevantes asociados con la enfermedad.

<b>Tabla 2. Genes reportados, asociados a disfunciones reproductivas y candidatos para FOP</b>				
GEN	NOMBRE	LOCUS HUMANO	MODELO	REFERENCIA
<i>DDX20</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20	1p13.1	Ratón	Lee K, et al. 2005
<i>LHX8</i>	LIM homeobox 8	1p31.1	Ratón Humano	Pangas SA et al. 2006 Qin Y et al. 2007
<i>TGFBR3</i>	Transforming grown factor beta receptor III	1p33-p32	Humano	Dixit H et al. 2006 Chand AL et al. 2007
<i>Wnt4</i>	Wingless-related MMTV integration site 4	1p35	Ratón	Vainio S et al. 1999
<i>Bmp8b</i>	Bone morphogenetic protein 8b	1p35-p32	Ratón	Zhao GQ et al. 1996
<i>Gpr3</i>	G protein-coupled receptor 3	1p36.1-1-	Ratón	Ledent C et al. 2005

		p35	Humano	Kovanci E et al. 2007
<i>FIGURALA</i>	Folliculogenesis specific basic helix-loop-helix	2p13.3	Ratón Humano	Soyal SM et al. 2000 Zhao H et al. 2008
<i>LHR</i>	Luteinizing Hormone Receptor (LHCGR)	2p21	Ratón	Zhang FP et al. 2001 Lei ZM et al. 2011
<i>FSHR</i>	FSH receptor	2p21-p16	Ratón Humano	Dierich A et al. 1998 Aittomaki K et al. 1995
<i>ELF5B</i>	Eukaryotic translation initiation factor 5B	2q11.2	Humano	Fogli A et al. 2004
<i>INHA</i>	Inhibina, Alpha	2q33-q36	Humano	Dixit H, et al. 2004 Sundblad V et al. 2006
<i>DAZL</i>	Deleted in azoospermia-like	3p24	Ratón Humano	Ruggiu M et al. 1997 Dorfman DM et al. 1999 Tung J et al. 2006
<i>FOXL2</i>	Forkhead box L2	3q23	Ratón Humano	De Baere et al. 2001 Harris SE et al. 2002 Schmidt D et al. 2004 Uda M et al. 2004 Crisponi L et al. 2004
<i>Fst</i>	Follistatin	5q11.2	Ratón	Matzuk MM et al. 1995
<i>Adamts19</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 19	5q31	Ratón	Menke DB et al. 2002
<i>GDF9</i>	Grown differentiation factor 9	5q31.1	Ratón Humano	Dong J et al. 1996 Elvin JA et al. 1999 Dixit H et al. 2005 Chand AL et al. 2006 Laissue P et al. 2006 Kovanci E et al. 2007 Zhao H et al. 2007
<i>MSH5</i>	mutS homolog5	6p21.3	Ratón Humano	Edelmann W et al.1999 Mandon-Pepin B et al.2008
<i>Foxo3a</i>	FOXO subfamily 3 <sup>a</sup>	6q21		Castrillon DH et al. 2003 Watkins WJ et al. 2006

			Ratón Humano	Liu L et al. 2007 Gallardo TD et al. 2007 Vinci G et al. 2007
<i>ESR1</i>	Estrogen Receptor $\alpha$	6q25.1	Humano	Bretherick KL et al. 2007
<i>NOBOX</i>	Newborn ovary homeobox gene	7q35	Ratón Humano	Rajkovic A et al. 2004 Zhao XX et al. 2005 Qin Y et al. 2007
<i>NR5A1</i>	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	9q33.3	Humano	Lourenco D et al. 2009
<i>SOHLH1</i>	Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1	9q34.3	Ratón	Pangas SA et al. 2006
<i>FSHB</i>	FSH hormona subunit	11p13	Ratón Humano	Matthews CH et al. 1999 Kumar KA et al. 2005
<i>Cdkn1b</i>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B	12p13.1- p12	Ratón	Singareddy R et al. 2007
<i>Foxo1a</i>	Forkhead box 1	13q14.1	Ratón Humano	Cunningham MA et al. 2004 Watkins WJ et al. 2006
<i>POLG</i>	Polymerase DNA Gamma	15q25	Humano	Luoma P et al. 2004
<i>Sh2b1</i>	SH2B adaptor protein 1	16p11.2	Ratón	Ohtsuka S et al. 2002.
<i>Ybx2</i>	Y box binding protein 2	17p11.2- p13.1	Ratón Humano	Yu J et al. 2001 Yang J et al. 2005
<i>NOG</i>	Noggin	17q22	Humano	Kosaki K et al. 2004 Laissue P et al. 2007
<i>AMH</i>	anti-Mullerian Hormone	19p13.3	Ratón Humano	Behringer RR et al. 1994 Durlinger AL et al. 1999.
<i>LHB</i>	Luteinizing hormone Betapolypeptide	19q13.32	Humano	Takahashi K et al. 1999 Lofrano-Porto A. 2007
<i>Cdc25b</i>	Cell division cycle 25 homolog B	20p13	Ratón	Lincoln AJ et al. 2002
<i>BMP7</i>	Bone morphogenetic protein 7	20q13	Ratón	Lee WS et al. 2001
<i>AIRE</i>	Autoimmune regulator (auto-	21q22.3	Humano	Laml T et al. 2002

	immune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy			
<i>DMC1</i>	Disrupted meiotic CDNA 1 homolog	21q13.1	Ratón Humano	Mandon-Pepin B et al. 2008 Pittman DL et al. 1998 Yoshida K et al. 1998
<i>BMP15</i>	Bone morphogenetic protein 15	Xp11.2	Ratón Humano	Laitinen M et al. 1998 Di Pasquale E et al. 2005 Ledig S et al. 2006 Chand AL et al. 2006 Di Pasquale E et al. 2006 Laissue P et al. 2006 Dixit H et al. 2006
<i>Zfx</i>	Zinc finger protein, X linked	Xp22.2- p21.3	Ratón	Luoh SW et al. 1997
<i>Ar</i>	Androgen receptor	Xq11.2-q12	Ratón	Shiina H et al. 2005
<i>DACH2</i>	Dachshund homolog 2 (Drosophila)	Xq21	Humano	Prueitt RL et al. 2002 Bione S et al. 2004
<i>FOP1B</i>	Preamture ovarian failure, 1B	Xq21.1- q21.2	Humano	Bione S et al. 2003 Lacombe A et al. 2004
<i>Sox3</i>	SRY (Sex determining region Y) - box3	Xq27.1	Ratón	Weiss J et al. 2003
<i>FMR1</i>	Fragile X mental retardation 1	Xq27.3	Humano	Allingham-Hawkins DJ et al. 1999
<i>FMR2</i>	Fragile X mental retardation 2	Xq28	Humano	Murray A et al. 1999.
<i>XIST</i>	X (inactive)-specific transcript ( non-proteincoding)	Inactive Xq13.2	Humano	Brown CJ et al. 1991 Sato K et al. 2004 Bretherick KL et al. 2007 Yoon SH et al. 2008

#### **2.5.4 CDKN1B Y CITED2: DOS NUEVOS GENES RELACIONADOS CON LA FOP**

A continuación se revisarán los genes *CDKN1B* y *CITED2* en el contexto de la fisiología ovárica y la etiología de la FOP. Estos genes hacen parte de los estudios experimentales que sustentan esta tesis. La metodología, los resultados y su discusión serán expuestos más adelante.

##### **2.5.4.1 CDKN1B - LA VIA PI3K**

La vía PI3K (fosfatidil inositol 3 kinasa) es una cascada de señalización en la que participan proteínas de diferentes familias como quinasas, fosfatasas y factores de transcripción. Estas proteínas establecen señales intracelulares fundamentales para la regulación de la proliferación celular, la migración, la supervivencia y el metabolismo (Blume-Jensen and Hunter, 2001, Cantley, 2002, Stokoe, 2005). Distintas rutas de transducción de señales convergen o regulan la enzima PI3K. Diferentes estímulos, como por ejemplo la activación de los receptores del tipo tirosin quinasa, la activación de receptores acoplados a proteínas G y la activación de la proteína Ras, pueden activar a PI3K. Una vez activa, esta enzima cataliza la fosforilación en la posición 3'-OH los anillos porfirínicos de fosfatidilinositoles (PI) específicos para producir fosfatidilinositol 3,4,-bisfosfato y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.

Estos lípidos son potentes efectores reconocidos por proteínas que contienen dominios PH (*pleckstrin homology domains*), entre ellas la enzima serina/treonina quinasa PKB/Akt (Wymann et al.1998). El dominio PH de Akt recluta este enzima en la membrana mediante el reconocimiento de lípidos inositoles generados por la activación de PI3K. Este cambio de localización subcelular, permite que Akt sea fosforilada por enzimas de la familia PDKs (*phosphoinositide-dependent kinases*) en las posiciones Thr-308 y Ser-473 activando su actividad catalítica. La enzima Akt activada, fosforila los aminoácidos serina o treonina de varias de proteínas que poseen la secuencia aminoacídica consenso RxRxxS/T en su estructura primaria para generar señales de citoprotección (Datta et al.1999).

Akt es una molécula perteneciente a la vía PI3K. Su activación regula la síntesis de glicógeno (fosforilando e inactivando la glucógeno sintasa quinasa 3, GSK3) y modula el ciclo celular evitando la fosforilación de GSK3-β y la degradación de la ciclina D1

(Diehl et al., 1998). Este proceso se efectúa por intermedio de la regulación negativa del inhibidor de la ciclina dependiente de kinasa 1B (CDKN1B o p27kip1 (p27) (Blume-Jensen and Hunter, 2001, Shin et al., 2005, Viglietto et al., 2002).

En los mamíferos, Akt fosforila tres residuos de serina o treonina muy conservados en los factores de transcripción *forkhead* de la subfamilia FOXO, entre ellos FOXO1 (FKHR), FOXO3A (FKHRL1) y FOXO4 (AFX) (Arden and Biggs, 2002). Esta modificación post-traducciona evita que estos factores se trasloquen al núcleo e inhiban su función. Estudios *in vitro* han demostrado que los factores FOXO, juegan un papel importante en la inhibición del ciclo celular y la en apoptosis (Burgering and Medema, 2003).

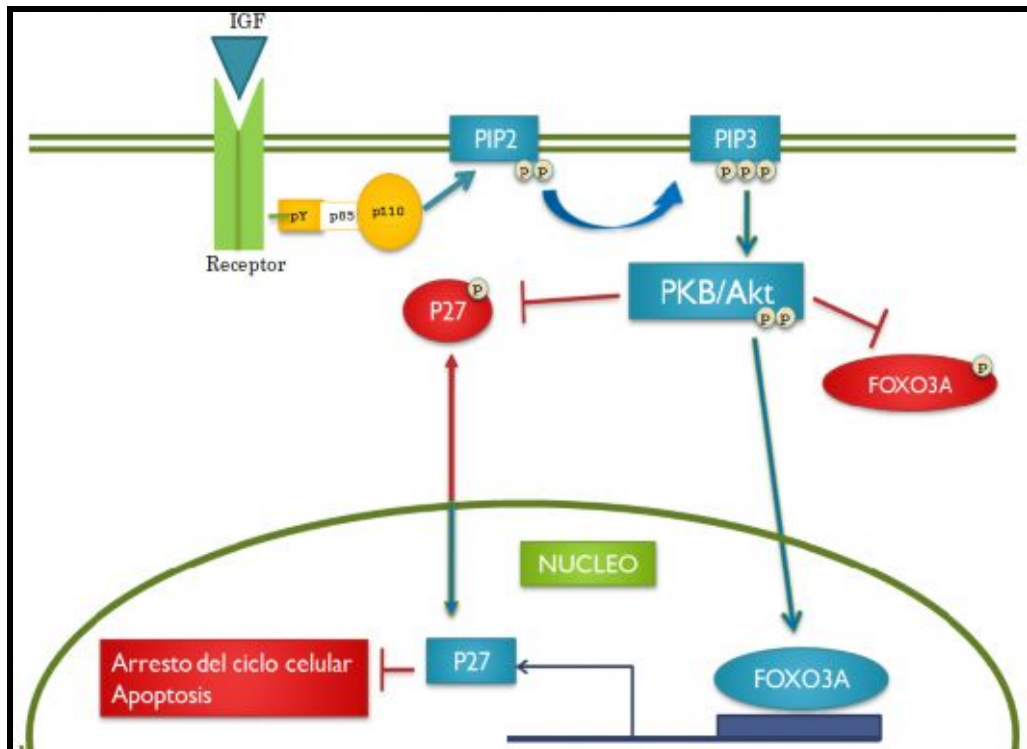
Con respecto a su papel en la biología de la reproducción, estudios recientes han demostrado, cómo la vía PI3K afecta la maduración de los ovocitos (Jin et al., 2005, Reddy et al., 2005). Moléculas de la vía PI3K como Akt, Foxo3a, GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$ , Foxo1 y p27, han demostrado participar en la regulación del el crecimiento de los ovocitos murinos (Zhang et al., 1999, Reddy et al., 2005, Castrillon et al. 2003, Singareddy et al. 2007).

#### **2.5.4.1.1 CDKN1B - INHIBIDOR DE CICLINA DEPENDIENTE DE QUINASAS-1B**

El gen *CDKN1B* en humanos está localizado en el brazo corto del cromosoma 12, está constituido por dos exones codificantes y se traduce en un factor perteneciente a la familia de proteínas inhibidoras de ciclinas dependientes de quinasas *Cip/Kip*. Desde un punto de vista funcional, la proteína Cdkn1b impide la activación de los complejos ciclina E/Cdk2, Ciclina A/Cdk2 o ciclina D/Cdk4, controlando la progresión del ciclo celular en la fase G1 (Lloyd et al. 1999). Estudios han revelado que CDKN1B usa el sitio de unión al ATP para inhibir el complejo Ciclina A/CDK 2 (Russo et al. 1996).

CDKN1B es una de las moléculas importantes en la vía PI3K (**figura 7**). Esta proteína regula de forma negativa el crecimiento y el ciclo celular en los mamíferos (Fero et al., 1996). Este papel lo desempeña según su localización celular ya sea en el citoplasma o en el núcleo. Su ubicación subcelular en el citoplasma permite la proliferación celular mientras que su ubicación nuclear se asocia a la inhibición del ciclo celular. La función

de Cdkn1b es modulada por Akt y Foxo3a. Akt fosforila directamente a Cdkn1b en la tirosina 187 exportándola del núcleo hacia el citoplasma (Cunningham et al. 2004, Shin et al. 2005, Viglietto et al. 2002). Foxo3a regula la expresión de *Cdkn1b* por medio de procesos de señalización en la vía PI3K/Akt *upstream* a Foxo3a (Chandramohan et al. 2004, Dijkers et al. 2000). Además FOXO3A trans-activa a *CDKN1B* (Dijkers et al. 2000, Medema et al. 2000, Stahol et al. 2002).



**Figura 7. Regulación de CDKN1B en la vía PI3K.**

En el ovario, Cdkn1b está expresado en el núcleo de los ovocitos de los folículos primordiales, primarios y secundarios (Zhang et al. 1999). En ratones KO para *Cdkn1b*, los folículos primordiales se sobre-activan, lo que genera hembras infértiles y un aumento en la atresia folicular y una disminución del stock folicular (Singareddy et al. 2007).

Estos resultados indican que Cdkn1b regula negativamente el crecimiento de los ovocitos y el desarrollo folicular temprano. Una desregulación de Cdkn1b puede entonces dar lugar a defectos en el desarrollo folicular y a trastornos en la función ovárica (Singareddy et al. 2007).

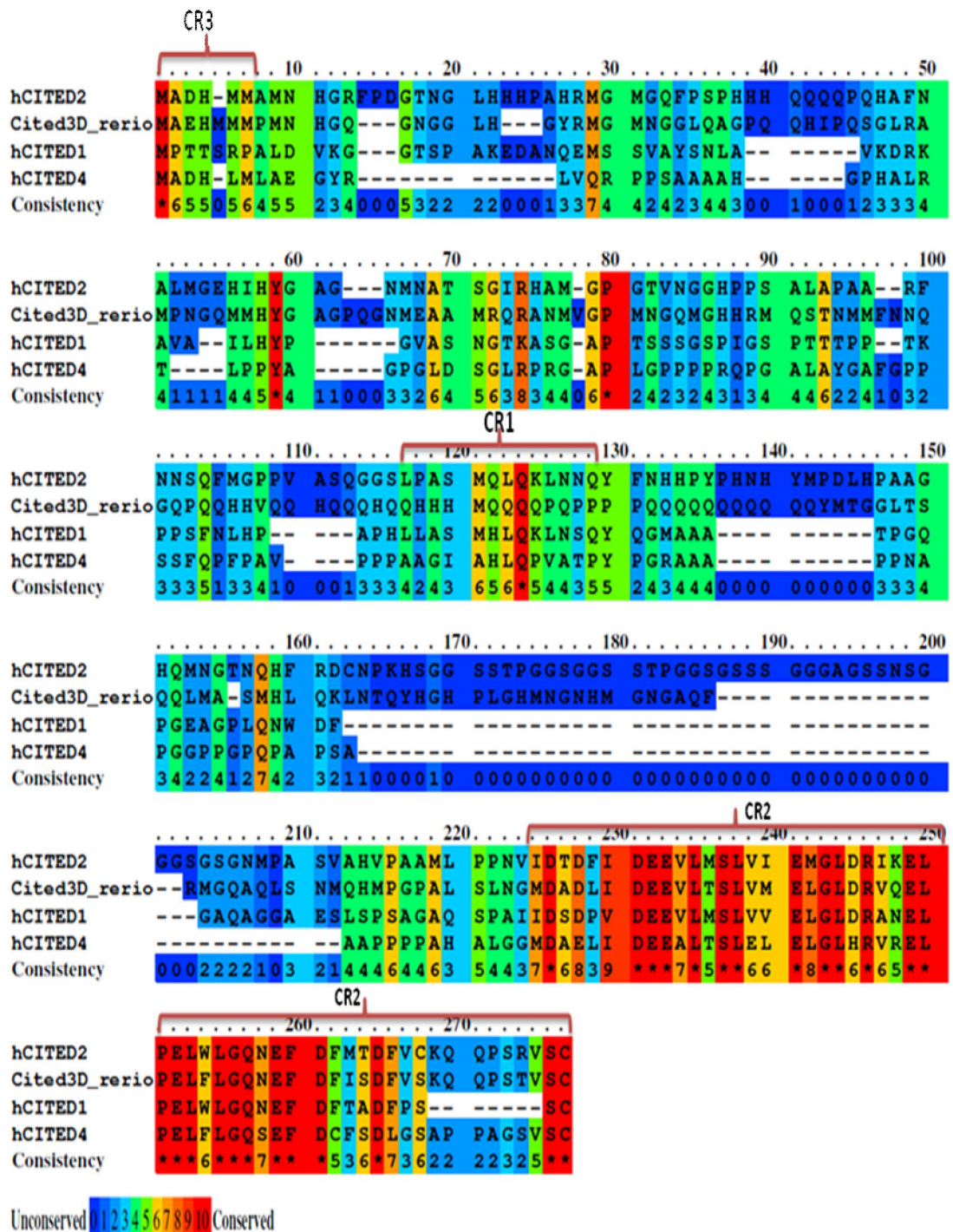
Estos hallazgos nos permitieron proponer a *CDKN1B* como un gen candidato para la FOP y realizar una aproximación experimental en humanos. Este estudio hace parte del desarrollo de esta tesis de maestría y serán expuestos más adelante. Los resultados han sido publicados muy recientemente en la revista *Fertility and Sterility* (Ojeda et al. 2011, ver anexos).

#### 2.5.4.2 CITED2 (Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu / Asp-rich carboxy-terminal domain 2)

*CITED* es una familia de co-activadores transcripcionales sin un dominio típico de unión al ADN. La familia *CITED* está compuesta por cuatro proteínas nucleares: *CITED1* (MSG1), *CITED2* (MRG1), *CITED3* y *CITED4* (MRG2) (**Figura 8**) (Andrews et al. 2000, Shioda et al. 1996, Braganca et al. 2002, Dunwoodie et al. 1998, Shioda et al. 1997, Sun et al. 1998). Las proteínas de la familia *CITED* poseen en la región C-terminal (CR2) una región rica en Glutamato y Aspartato determinante en la función de trans-activación al unirse directamente a CBP-p300 para activar la transcripción (Bhattacharya et al. 1999). La región conservada 1 (CR1) se encuentra altamente conservada únicamente entre *CITED1*, *CITED2* y *CITED3*. En la región N-terminal de la proteína la región CR3 esta conservada entre *CITED2*, *CITED3* y *CITED4* pero no en *CITED1* (Yahata et al. 2002).

*Cited2*, es un gen monoexónico en humanos y roedores, y codifica una proteína que de acuerdo al contexto celular tiene funciones como co-activador o co-represor transcripcional (Braganca et al. 2003, Bhattacharya et al. 1999). Los embriones de ratones *Cited2*<sup>-/-</sup> mueren en útero al presentar malformaciones cardiacas, agenesia adrenal, ganglios craneales anormales y exencefalia. Dentro de los defectos cardiacos observados en los embriones se encuentran defectos septales ventriculares y auriculares y ductus arterioso persistente (Bamforth et al. 2001, Kranc et al. 2003, Yin et al. 2002). Además los embriones *Cited2*<sup>-/-</sup> muestran un aumento de la apoptosis en la región cerebral media y una disminución en la expresión de ErbB3 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 avian) en las células de la cresta neural. Experimentos adicionales determinaron que *Cited2* interactúa y coactiva las isoformas TFAP2A y TFAP2B del factor de transcripción AP2 esenciales para el desarrollo de la epidermis y la migración celular hacia la cresta neural (Bamforth et al. 2001). De acuerdo a datos obtenidos en modelos *in vitro*, la isoforma TFAP2 es

esencial para el desarrollo de la cresta neural, el tubo neural y el desarrollo cardíaco. Por lo tanto, defectos morfológicos observados en el embrión del ratón *Cited2*  $-/-$  pueden ser atribuidos a la no-activación de *Tfap2*, (Bamforth et al. 2001).



**Figura 8. Alineamiento de las proteínas de la familia Cited.** Las secuencias se alinearon con el programa PRALINE. El espectro de color de azul oscuro a rojo representa los aminoácidos menos conservados a los más conservados.

La corteza adrenal y la corteza gonadal son los principales tejidos productores de esteroides en los mamíferos. A pesar de que producen hormonas esteroides diferentes en el adulto, estudios histológicos y moleculares han demostrado que comparten un precursor común durante el desarrollo embrionario. Análisis de expresión *Sf-1* han permitido identificarlo como un factor esencial en el desarrollo de la corteza gonadal y adrenal (Luo et al. 1994, Val et al. 2003) lo que condujo a que originalmente estos dos tejidos fueran llamados primordio adreno-gonadal (AGP) (Hatano et al. 1996, Ikeda et al. 1994). Con respecto al papel de *Cited2* en la formación de la corteza adrenal, al estudiar embriones *Cited2*<sup>-/-</sup> se pensó que la agenesia adrenal dependía específicamente del desarrollo de la cresta neural (Bamforth et al. 2001). Sin embargo estudios posteriores permitieron identificar a *Cited2* como un factor clave en el desarrollo de la corteza adrenal y del AGP. Se evidenció que el desarrollo de la corteza es independiente del desarrollo de la cresta neural y que *Cited2* tiene una función en el desarrollo adrenal al regular la expresión de *Sf1* (Val et al. 2007). Estas conclusiones derivan de una serie de datos que incluyen:

- 1) *Cited2* y *Sf-1* se colocan en el AGP antes del desarrollo adrenal.
- 2) En ratones *Sf1*<sup>-/-</sup>, no se observan eventos de diferenciación adrenal de forma similar a lo observado en embriones *Cited2*<sup>-/-</sup> (Bland et al. 2004, Luo et al. 1994).
- 3) En animales *Cited2*<sup>-/-</sup> los niveles de expresión de *Sf1* son más bajos en un 36%, con respecto al WT en el AGP a 10.5 dpc antes de la diferenciación adrenal.
- 4) Los embriones *Cited2*<sup>+/-</sup> *Sf1*<sup>+/-</sup> muestran un retraso en el desarrollo adrenal en comparación con los embriones *SF-1*<sup>+/-</sup> o *Cited2*<sup>+/-</sup>.
- 5) Se constató la interacción genética física y funcional entre *Cited2* y *Wt1* que permite la co-transactivación del promotor de *Sf1* y el aumento en los niveles de expresión de *Sf1* en el AGP.

Es importante señalar que en ratones *Sf1*<sup>-/-</sup> no se presentó desarrollo adrenal o gonadal mientras que en ratones *Sf1*<sup>+/-</sup> se observó un deterioro en el desarrollo temprano adrenal, lo que dio origen a la formación de glándulas adrenales pequeñas (Bland et al. 2004, Bland et al. 2000). Existe una correlación directa entre los niveles de *Sf1* (y su expresión en el AGP) con la inducción del desarrollo adrenal y gonadal. En embriones *Cited2*<sup>-/-</sup> los niveles de expresión de *Sf1* disminuyeron en un 36% con

respecto al WT, impidiendo el desarrollo adrenal (Val et al. 2007). Sin embargo, el proceso de determinación sexual y el desarrollo gonadal no fueron afectados. Los niveles de expresión de *Sf1* se asocian con diferentes efectos en la gónada en desarrollo. En ratones *Sf1*<sup>-/-</sup>, la ausencia total de *Sf1* impide que la gónada bipotencial se desarrolle debido a que las células inician un proceso de apoptosis inducido por la degeneración de la gónada (Kreidberg et al. 1993). Mutaciones heterocigotas en *SF1* en humanos exhiben una amplia gama de fenotipos que va desde la reversión sexual 46,XY, hasta la disgenesia gonadal. En ratones KO heterocigotos se observa una reversión sexual parcial (Buass et al. 2009) o un retraso en el desarrollo gonadal (Acherman et al. 1999, Correa et al. 2004, Lin et al. 2008, Park et al. 2005). Los niveles de expresión de *Sf1* en ratones *Cited2*<sup>+/-</sup> *Wt1*<sup>+/-</sup>, son suficientes para asegurar la formación adrenal, lo que muestra que *Cited2* y *Wt1* co-transactivan a *Sf1* induciendo niveles de expresión de *Sf1* por encima de un umbral mínimo necesario para el correcto desarrollo del AGP (Bamforth et al. 2001, Val et al. 2007).

Adicionalmente, se ha detectado la expresión de *Cited2* en el epitelio celómico y en el mesénquima de la cresta genital en 10.5-11.5 dpc (Buass et al. 2009). A diferencia de la corteza adrenal, *Cited2* se expresa en niveles bajos en la gónada bipotencial. En ratones *Cited2*<sup>-/-</sup> no se presentó reversión sexual pero sí un retraso transitorio en el desarrollo de las gónadas masculinas y una disminución en la expresión de *Sox9* a 11.5 dpc. Este retraso en el desarrollo fue sutil y no se observaron problemas mayores en el desarrollo murino (Val et al. 2007). Estudios posteriores analizaron ratones XY *Cited2*<sup>+/+</sup> y *Cited2*<sup>-/-</sup>, a los 12.5 dpc (Val et al. 2007). En los ratones XY *Cited2*<sup>+/+</sup> el desarrollo morfológico del testículo se inició normalmente con la formación del vaso celómico y del cordón testicular. En los ratones XY *Cited2*<sup>-/-</sup> no se evidenció la correcta formación del cordón testicular ni del vaso celómico. La morfología testicular se observó interrumpida. Sin embargo, el desarrollo testicular fue restablecido a 13.5 dpc (Val et al. 2007).

Para determinar si las alteraciones en el cordón testicular de las gónadas de ratones dependía de la migración celular o de la ausencia de expresión de *Cited2*, se estableció un modelo experimental de ratones XY *Cited2*<sup>-/-</sup> (Combes et al. 2010). Los resultados mostraron que en las gónadas de estos animales no se alteró la migración celular (Combes et al. 2010). No obstante y de forma sorprendente, se demostró que en ratones XX *Cited2*<sup>-/-</sup> y *Cited2*<sup>+/-</sup> la migración celular estaba interrumpida y se

presentaba de manera ectópica siendo mayor en las gónadas XX *Cited2*<sup>-/-</sup> que en las *Cited2*<sup>+/-</sup> (Combes et al. 2010).

De esta forma, estos experimentos permitieron establecer que en estos ratones la determinación sexual femenina (al igual que la masculina) presentaba un retraso inicial con tendencia hacia una recuperación subsecuente. En 10.5 dpc se presentó la disminución de la expresión de *Wnt4*, *Rspo1* y *Foxl2*. Sin embargo, los niveles de expresión de factores propios de la determinación masculina como *Sox9* y *Fgf9* se incrementaron (Combes et al. 2010). En 12.5 dpc los niveles de *Wnt4*, *Rspo1* y *Foxl2* en las gónadas de *Cited2*<sup>-/-</sup> eran similares a los niveles de las gónadas WT, lo que indica que el programa de determinación sexual femenina fue restaurado (Combes et al. 2010) (**Ver capítulo determinación sexual**).

En conclusión, este estudio demostró que la ausencia de *Cited2* en las gónadas disminuye los niveles de *Sf1* generando un retraso en la determinación sexual femenina, lo que a su vez, ocasiona un aumento transitorio de la expresión de los marcadores masculinos y la inducción de la migración celular ectópica (Combes et al. 2010). A pesar de que este proceso ocurre en una pequeña ventana de tiempo (11,5-12.5 dpc en el embrión del ratón), el programa de diferenciación del ovario se corrige o compensa. Estos datos muestran entonces que *Cited2* es un factor necesario para el desarrollo gonadal temprano en el ovario.

**En este contexto, se planteó la hipótesis de que esta inhibición temporal de genes puede ser suficiente para provocar una deficiencia del desarrollo de las gónadas femeninas, sugiriendo el posible papel de *CITED2* en la patogénesis de la FOP en humanos. Este estudio hace parte del desarrollo de esta tesis de maestría. los resultados han sido sometidos a Human Reproduction.**

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años el aumento sustancial de la incidencia de la infertilidad humana ha convertido esta patología en un problema real de salud pública: alrededor de 15% de las parejas consultan por esta causa (Smith et al. 2003). Entre las causas femeninas de infertilidad, la falla ovárica prematura (FOP) es extremadamente frecuente puesto que afecta entre el 1 y el 3% de las mujeres de la población general (Coulam et al. 1986, Conway et al. 2000).

Clínicamente, la FOP se caracteriza por amenorrea antes de los 40 años y niveles elevados de FSH, hallazgos que traducen una infertilidad precoz. Múltiples etiologías de FOP se han descrito (e.g. autoinmunes, infecciosas, iatrogénicas) pero desafortunadamente en más del 80% de los casos no se conocen las causas (Goswami et al. 2005). Esta alta prevalencia de casos idiopáticos sugiere causas genéticas y ambientales.

Desde el punto de vista genético, deleciones y traslocaciones de tres grandes regiones del cromosoma X se han asociado con la enfermedad. Formas sindrómicas que asocian FOP han sido descritas (e.g. síndrome de Turner) (Laissue et al. 2008). Las mutaciones en algunos genes autosómicos y ligados al X se han relacionado igualmente con la etiopatología (Laissue et al. 2006, 2008). Sin embargo, la complejidad de los procesos fisiológicos, celulares y genéticos subyacentes a la foliculogénesis y la ovulación sugieren la participación de numerosos genes regulados de una manera sutil y precisa en cada etapa del desarrollo. Esta situación se ha documentado extensamente en los últimos años puesto que una cantidad importante de genes candidato se han identificado (Matzuk et al. 2002, 2008).

Entre ellos, el gen que codifica para la ciclina dependiente de quinasa-1B (*CDKN1B* o *p27KIP1*) ha revelado un particular interés en la fisiología ovárica de los roedores (Rajareddy et al. 2007, Liu et al. 2007, Pelusi et al. 2008). De manera más precisa, se ha demostrado que *Cdkn1b* participa en la regulación y la activación del stock folicular así como en la activación de su apoptosis (Rajareddy et al. 2007). La invalidación murina del gen simula de cerca las condiciones fisiopatológicas de la FOP en humanos lo que lo convierte en un excelente candidato susceptible de ser estudiado.

En los últimos años factores específicos de la determinación femenina han sido identificados (Veitia, 2010). Diferentes estudios permitieron describir mutaciones en genes que actúan en las primeras etapas de la determinación sexual asociados a la FOP (*FOXL2*, *SF1*) (Qin et al. 2007, Zhao et al. 2008, Beysen et al. 2009, Lourenco et al. 2010). Un estudio reciente reveló que la invalidación genética del gen *Cited2* ocasiona un retraso temporal en la determinación sexual femenina (Combes 2010), sugiriendo un papel potencial de este gen en la patogénesis de la FOP en humanos.

Por consiguiente el estudio de genes potencialmente candidatos en la etiología de la FOP por aproximaciones gen candidato, entre ellos *CDKN1B* y *CITED2*, es de especial interés en la comprensión de los mecanismos subyacentes de esta enfermedad. Además, es una etapa necesaria en la búsqueda de nuevo marcadores de esta patología que permitan en un futuro mejorar el asesoramiento genético y proponer alternativas terapéuticas.

## 4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Este estudio pretende, en primer lugar, ofrecer nuevos elementos para la comprensión de los mecanismos genéticos responsables del desarrollo folicular, a partir del estudio puntual de los genes *CDKN1B* y *CITED2* en pacientes con FOP no-sindrómica e idiopática. Además busca que los resultados sean útiles en la sensibilización de la comunidad médica sobre la importancia creciente de la exploración genómica de patologías frecuentes (en este caso la infertilidad femenina) aplicada al diagnóstico, pronóstico y potencial tratamiento.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer la frecuencia de las variaciones (sustituciones sinónimas y no-sinónimas) de los genes *CDKN1B* y *CITED2* en mujeres FOP, al igual que en grupos controles. Esta aproximación permitirá observar si existen variaciones exclusivas de las pacientes que pudieran estar asociadas al fenotipo. Además, por aproximaciones *in silico* queremos evaluar el impacto funcional (el potencial patogénico) de las mutaciones. Las mutaciones que sugieran una asociación con la etiopatología servirán para el inicio, en proyectos posteriores, de experimentos *in vitro* que confirmen (o invaliden) su carácter deletéreo. Buscamos publicar así los primeros artículos en la literatura que describan variantes de *CDKN1B* y *CITED2* en pacientes FOP.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIALES Y MÉTODOS: SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE *CDKN1B*

#### 5.1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio se incluyeron 87 mujeres tunicinas diagnosticadas con FOP idiopática, provenientes del Hospital Farhat Hached University Teaching de la ciudad de Sousse en Túnez (**Tabla 3**). Se incluyeron además 263 controles de dos orígenes étnicos distintos con el objetivo de comparar las variantes del gen *CDKN1B* con las del grupo FOP.

#### **Criterios de inclusión del grupo FOP:**

- Amenorrea mayor a 6 meses. Se incluyeron únicamente mujeres que presentaron amenorrea primaria o secundaria antes de los 40 años.
- Niveles séricos de FSH mayores de 40 IU/ml.
- Cariotipo normal 46,XX.

#### **Criterios de exclusión**

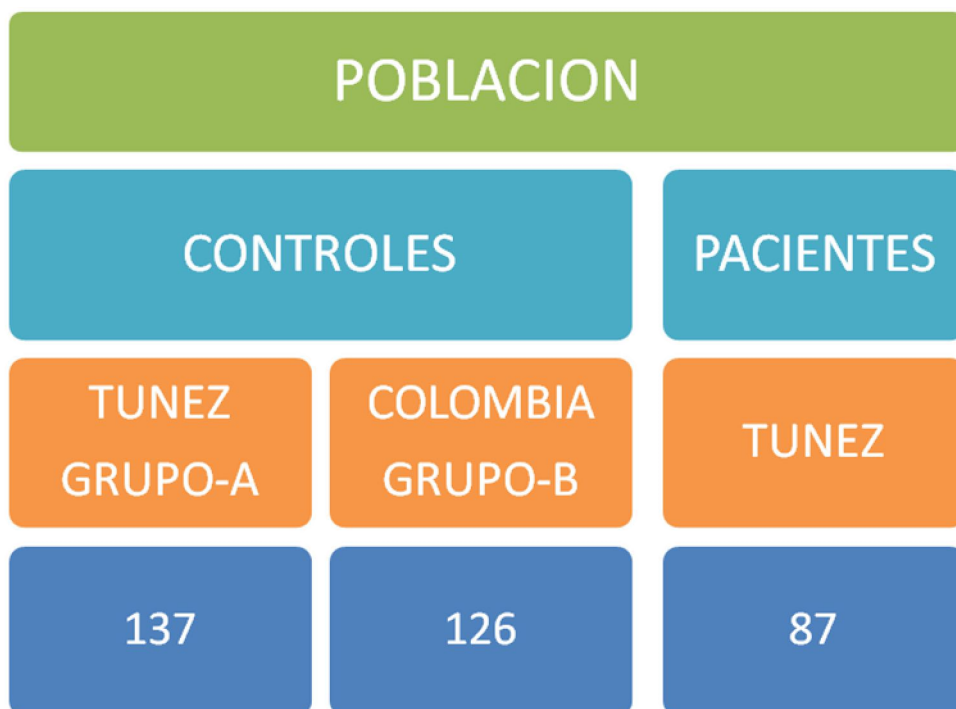
- Presentar antecedentes de: enfermedad autoinmune, intervenciones quirúrgicas en cavidad pélvica, infertilidad, disfunción ovárica y quimio o radioterapia.

El grupo de pacientes fue constituido por 43 mujeres con amenorrea primaria y 44 con amenorrea secundaria. La población control fue constituida por dos grupos poblacionales:

- El grupo A: Conformado por 137 mujeres tunicinas.
- El grupo B: Conformado por 126 mujeres colombianas.

Todos los participantes del estudio, firmaron un consentimiento informado y previamente avalado por el Comité de Ética de la Universidad del Rosario.

**Tabla 3.** Población de estudio *CDKN1B*



### 5.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Se tomaron de cada individuo participante 10 ml de de sangre periférica en tubos con EDTA. Se efectuó la extracción de ADN genómico total a partir de la técnica de Probe. En un tubo falcón de 15 ml, se midieron 6.0 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y sobre este se adicionaron 5 ml de sangre total. Luego de centrifugación, se descartó el sobrenadante y conservó el *pellet*. Se agregaron 2.5 ml de una solución de lisis celular y se adicionaron 10 µl de proteinasa K (10mg/ml). Se incubó por cuatro 4 horas a 55°C. Transcurrido este tiempo se añadió a cada tubo 800 µl de solución precipitante de proteínas para luego centrifugar. Finalmente, todo el sobrenadante fue vertido sobre un tubo de 15 ml que contenía 2.4 ml de isopropanol frío. Se dejó en reposo 5 minutos. Utilizando una pipeta pasteur de vidrio se extrajo el ADN y fue suspendido en 300µl de TE 1X. La concentración del ADN se cuantificó en un espectrofotómetro NANODROP 2000c (Thermo SCIENTIFIC©).

### 5.1.3 DISEÑO DE PRIMERS

Las secuencias de oligonucleotidos, para amplificar los 2 exones de *CDKN1B*, se diseñaron empleando el programa Primer3. Primer3 es una herramienta bioinformática que permite diseñar *primers* para una gran cantidad de aplicaciones como por ejemplo STSs (sequence tagged sites) y para amplificar por PCR secuencias de interés. El programa primer 3 considera ciertos parámetros como: temperatura de *melting*, longitud del primer, contenido de GCs, estabilidad del extremo 3', la formación de estructuras secundarias y la formación de dímeros. De igual forma permite seleccionar el tamaño del fragmento que se quiere amplificar (Rozen S y Skaletsky. 2000). Para el desarrollo de este trabajo se diseñaron dos pares de primers para cada fragmento genómico utilizando los parámetros por defecto del programa. Los primers de PCR se diseñaron fuera de la región codificante para poder secuenciar todo el marco abierto de lectura del gen *CDKN1B*. Para la secuenciación se diseñó un primer interno de secuenciación para cada fragmento (**Tabla 4 y 5**). Los primers se verificaron por medio de BLASTN para asegurar que no fueran complementarios a otras secuencias del genoma.

**Tabla 4.** Primers de amplificación *CDKN1B*.

Gen	Exón	Secuencia del Primer	
<b><i>CDKN1B</i></b>	1	<b>Forward</b>	5' -AGTACCCCTCCAGCAGTCAC- 3'
		<b>Reverse</b>	5' -TCTGATTTAGCTTTGGGAGAGC- 3'
<b><i>CDKN1B</i></b>	2	<b>Forward</b>	5' -CGGAGAATGCACTTTCTGTTT- 3'
		<b>Reverse</b>	5' -TGGTTGCTGGCAAATTA AAA- 3'

**Tabla 5.** Primers de secuenciación *CDKN1B*

Gen	Exón	Secuencia del Primer	
<b><i>CDKN1B</i></b>	1	<b>Forward</b>	5' -CTCTCCGCTTGCCTGGTC- 3'
<b><i>CDKN1B</i></b>	2	<b>Forward</b>	5' -CCTCCTGGCTAGGGAAAGAG- 3'

#### 5.1.4 AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Para amplificar toda la región codificante (dos exones) del gen *CDKN1B* se utilizaron los oligonucleótidos anteriormente mencionados. Los fragmentos amplificados tienen las siguientes longitudes.

1. Exón1 un fragmento: 1259pb.
2. Exon2 un fragmento: 610pb

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µl con 100ng de ADN. Se utilizó el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Promega) 1x que contiene el tampón y la Taq polimerasa. Se utilizó 1µM de cada uno de los primers y agua hasta completar 25µl. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador **MJ Research PTC-100®** con un programa específico para cada uno de los fragmentos a amplificar. (Tabla 6 y 7)

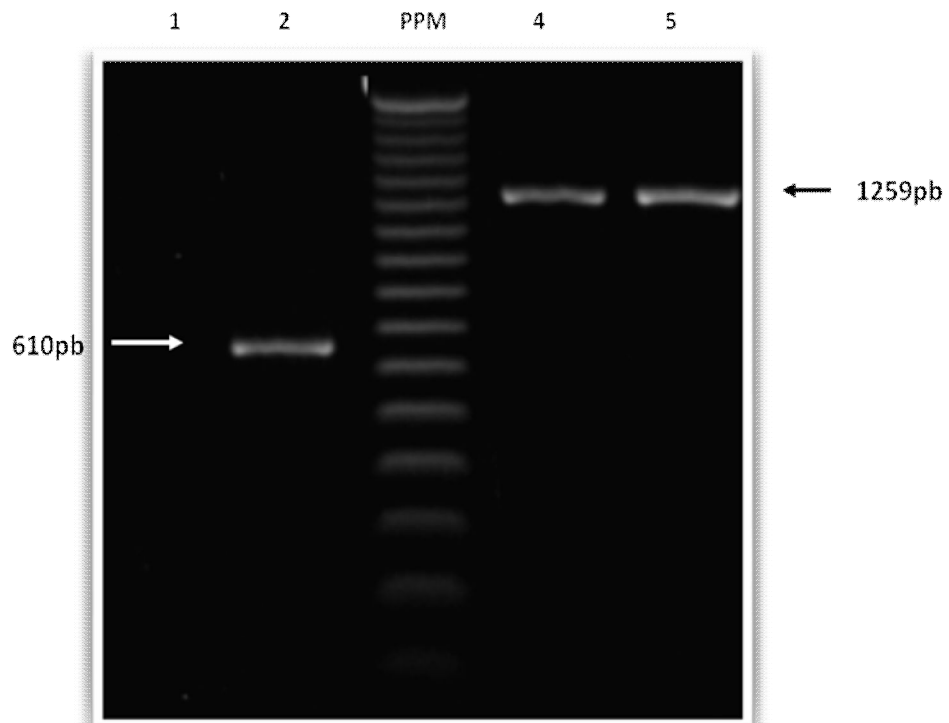
**Tabla 6.** Programa de PCR para el exón 1.

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		Tiempo
A. Denaturación Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	35	
B1. Denaturación	95°C	40 segundos
B2. Anillamiento	64°C	30 segundos
B3. Elongación	72°C	1:30 minutos
C. Elongación final	72°C	10 minutos
D. 4°C		

**Tabla 7.** Programa de PCR para el exón 2.

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		Tiempo
A. Denaturación Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	35	
B1. Denaturación	95°C	40 segundos
B2. Anillamiento	64°C	30 segundos
B3. Elongación	72°C	40 segundos
C. Elongación final	72°C	10 minutos
D. 4°C		

Para la detección del producto amplificado se analizaron 5µl del producto de cada reacción por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Se compararon las tallas de los fragmentos amplificados con las de un patrón de peso molecular (100pb, Invitrogen) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Amplificación región codificante *CDKN1B*. (1) Blanco. (2) Exón 1. Fragmento 610pb (3) Marcador de peso molecular. (4 y 5) Exón 1. Fragmento 1259pb

### 5.1.5 SECUENCIACIÓN DIRECTA

Los productos de PCR fueron purificados antes de la secuenciación usando fosfatasa alcalina y exonucleasa I (remoción enzimática del exceso de nucleótidos y primers) (USB, Cleveland, Ohio, USA). Este protocolo permite de forma sencilla la purificación de los productos de PCR antes de la secuenciación. Disminuye además la probabilidad de contaminación de los productos de PCR ya que la reacción se lleva a cabo dentro del mismo tubo de PCR. La exonucleasa I remueve el exceso de primers, mientras que la fosfatasa alcalina elimina el exceso de dNTPs. El protocolo de purificación se realizó de la siguiente manera:

En cada reacción de PCR de 25µL se añadieron 10 µL de un mix de purificación compuesto por: 0.250µL de fosfatasa alcalina (1U/µL), 0.025 µL de exonucleasa I (20U/µL) y 9.725 µL de agua milliQ. Se incubaron las muestras a 37 °C por 30 minutos y luego a 95°C por 5 minutos en el termociclador para inactivar las enzimas.

La secuenciación directa se realizó utilizando primers internos (**Tabla 8**) a la secuencia de PCR utilizando un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La presencia de cada variante fue confirmada por una nueva amplificación/secuenciación.

**Tabla 8.** Primers de secuenciación *CDKN1B*

Gen	Exón	Secuencia del Primer	
<b><i>CDKN1B</i></b>	<b>1</b>	<b>Forward</b>	5' -CTCTCCGCTTGCCTGGTC- 3'
<b><i>CDKN1B</i></b>	<b>2</b>	<b>Forward</b>	5' -CCTCCTGGCTAGGGAAAGAG-3'

### 5.1.6 ALINEAMIENTOS DE SECUENCIA

Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa ClustalW. ClustalW es una de las herramientas bioinformáticas más usadas. Permite el alineamiento simultáneo de secuencias nucleotídicas o aminoácidas. Se compararon las secuencias de nucleótidos y proteínas mutantes de los pacientes con la secuencia WT de *CDKN1B* (GI: 4757962)

De igual forma esta herramienta se utilizó para realizar el alineamiento de secuencias proteicas mutantes CDKN1B humanas con las de diferentes especies como *C. familiaris*, *R. norvegicus*, *M. musculus*, *S. scrofa*, *F. catus* y *B. taurus*.

## 6. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo experimental sobre *CDKN1B* y FOP han sido publicados en la revista *Fertility and Sterility*. Los resultados sobre el estudio de *CITED2*, han sido enviados para evaluación a la revista *Human Reproduction*. Finalmente, un estudio adicional sobre *FOXO4* y mujeres FOP ha sido sometido a *Clinical Endocrinology*. Los dos primeros artículos mencionados hacen parte integral de este manuscrito. El tercer artículo no ha sido incluido para evaluación durante el proceso de defensa de esta tesis. Los tres artículos están incluidos como anexos.

### 6.1 RESULTADOS *CDKN1B*

El análisis de la región codificante del gen *CDKN1B* en los pacientes mostró dos variantes no-sinónimas localizadas en el primer exón del gen (**Tabla 9**).

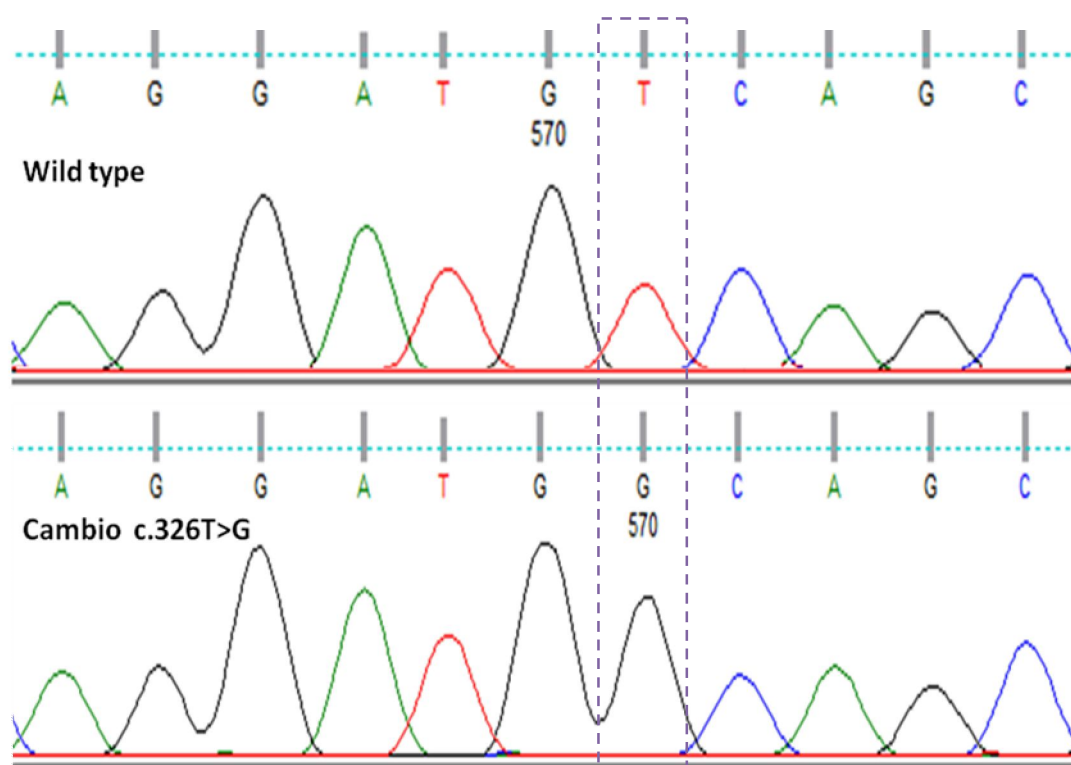
**Tabla 9.** Resultados del análisis de secuenciación de 87 pacientes FOP.

CAMBIO EN LA SECUENCIA			c.326T>G	c.356T>C
dbSNP-ID			rs2066827	-----
REGIÓN			Exón 1	Exón 1
CAMBIO DE AMINOÁCIDO			p.Val109Gly	p.Ile119Thr
POBLACIÓN	PACIENTES FOP	AS	39/44 (88,6%)	0/44
		AP	37/43 (86%)	1/43 (2,3%)
		TOTAL	76/87 (87,4%)	1/87 (1,1%)
	CONTROLES	GRUPO A	111/137 (81,02%)	0/137
		GRUPO B	29/126 (23,01%)	0/126

Cambio en la secuencia de nucleótidos (**CN**). La numeración hace referencia a la región codificante, cambio de aminoácido (**AA**), número de pacientes y controles utilizados y la frecuencia de cada variante. **AS**: amenorrea secundaria **AP**: amenorrea primaria **dbSNP-ID**: código de SNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)).

### 6.1.1 EXÓN 1 VARIANTE c.326T>G (p.Val109Gly)

La variante **c.326T>G**, es un cambio de una timina por una guanina en el nucleótido situado en la posición 326 de la región codificante del gen (**Figura 10**).



**Figura 10. Cromatograma con el cambio c.326T>G.** Parte superior secuencia WT. Parte inferior secuencia con el cambio homocigoto c.326T>G.

Este cambio se encontró en 76 pacientes FOP es decir, en el 87.4% de los casos. En el grupo control A se analizaron 137 mujeres, de las cuales el 81,02% eran portadoras de esta variante. En el grupo control B el 23.01% de las mujeres presentaron este cambio en la secuencia. Este cambio había sido anteriormente reportado en la base de datos de SNPs del NCBI (rs2066827).

La variante c.326T>G genera un cambio no-sinónimo. Produce una sustitución de una valina por una glicina en la posición 109. Al realizar el alineamiento múltiple para

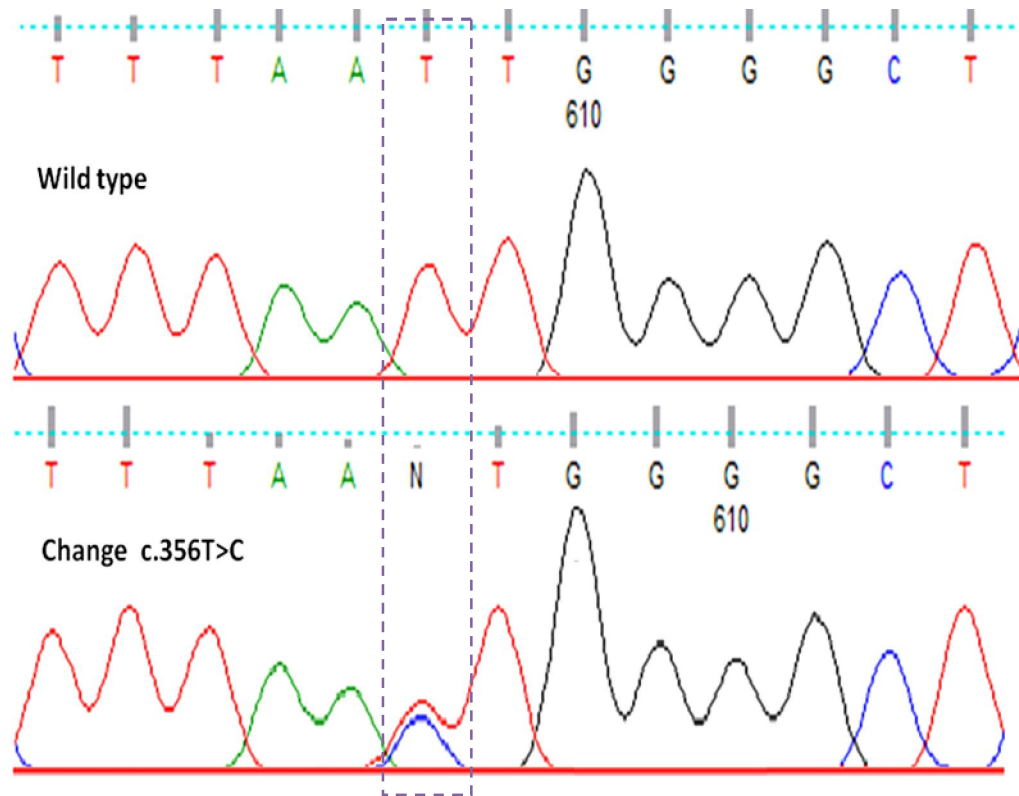
verificar si la posición de este aminoácido se encuentra conservada durante la evolución (**Figura 11**), se evidenció una alta conservación. Estas secuencias corresponden a todas las especies cuya región codificante se encuentra disponible y validada.

<i>Homo sapiens</i>	PPRPPKGACK	VPAQESQDVS	GSRPAAPLIG
<i>Homo sapiens</i> (p.Val109Gly)	PPRPPKGACK	VPAQESQDGS	GSRPAAPLIG
<i>Rattus norvegicus</i>	PPRPPKSACK	VPAQESLDVS	GSRQAVPSIG
<i>Mus musculus</i>	PPRPPKSACK	VLAQESQDVS	GSRQAVPLIG
<i>Sus scrofa</i>	PPRPPKGACK	VPAQEGQGVV	GTRQAVPLIG
<i>Felis catus</i>	PPRPPKGACK	VPAQESQDVS	GNRQAVPLIG
<i>Canis familiaris</i>	PPRPPKGACK	VPAQESQDVS	GTRQAGPLLG
<i>Bos taurus</i>	PPRPPKGACK	VPAQEGQDAS	GARPAVPLLG

**Figura 11. Alineamiento de la Proteína CDKN1B.** Alineamiento del aminoácido 91 hasta el aminoácido 120 en diferentes especies. Con una línea punteada y en negrilla se resalta la posición 109.

### 6.1.2 EXÓN 1 VARIANTE c.356T>g (p.Ile119Thr)

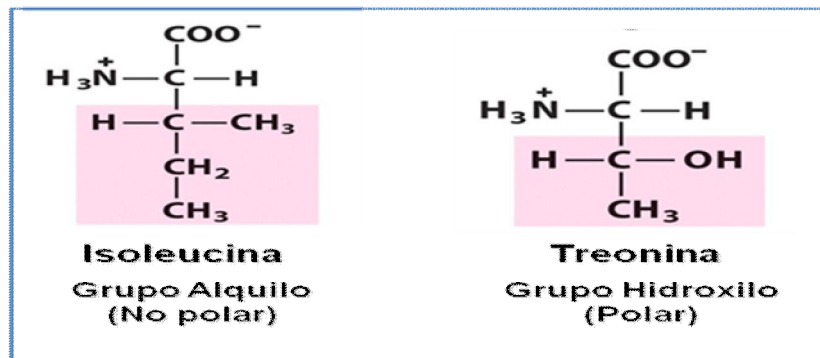
La variante **c.356T>G**, corresponde a un cambio de una timina por una guanina en el nucleótido situado en la posición 356 de la región codificante del gen (**Figura 12**).



**Figura 12. Cromatograma con la variante c.356T>G.** Parte superior: secuencia WT. Parte inferior: secuencia con el cambio heterocigoto c.356T>G.

Esta segunda variante se encontró exclusivamente en una paciente con amenorrea primaria, en estado heterocigoto como se observa en la **figura 12**. Debido a que esta variante no se encontró en el grupo control A, la población control se expandió a un segundo grupo étnico. De esta forma, se analizaron 126 mujeres control colombianas (Grupo B). De igual forma, la mutación c.356T>G no se encontró en el grupo control B. Esta variante no se encontró en las bases de datos de SNPs.

La variante c.356T>G genera un cambio no-sinónimo y se traduce en una mutación de una isoleucina por una treonina en la posición 119. La sustitución de una isoleucina por una treonina implica un cambio de hidrofobicidad puesto la cadena lateral de la isoleucina es no polar mientras que la de la treonina es polar (**Figura 13**).



**Figura 13.** Estructuras de los aminoácidos Isoleucina y Treonina.

Se realizó un alineamiento múltiple (**Figura 14**) utilizando las secuencias de CDKN1B de diferentes especies disponibles en las bases de datos. Se observó una alta conservación evolutiva de la isoleucina en la posición 119 (*Homo sapiens*, *Sus scrofa*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Felis catus*). Sin embargo algunas especies (*Bos taurus* and *Canis lupus familiaris*) presentan en esta posición una leucina.

<i>Homo sapiens</i>	SGSRPAAPLI	GAPANSEDTH	LVDPKTDPSD
<i>Homo sapiens</i> (Ile119Thr)	SGSRPAAPLT	GAPANSEDTH	LVDPKTDPSD
<i>Rattus norvegicus</i>	SGSRQAVPSI	GSQANSEDRH	LVDQMPDSSD
<i>Mus musculus</i>	SGSRQAVPLI	GSQANSEDRH	LVDQMPDSSD
<i>Sus scrofa</i>	SGTRQAVPLI	GSQANSEDTH	LVDQKTDAPD
<i>Felis catus</i>	SGNRQAVPLI	GSQANTEDTH	LVDQKTDTS
<i>Canis familiaris</i>	SGTRQAGPLL	GSQANSEDTH	LVDQKTDAPD
<i>Bos taurus</i>	SGARPAVPLL	GSQANPEDTH	LVDQKTDAPD

**Figura 14. Alineamiento de la Proteína CDKN1B.** Alineamiento del aminoácido 110 hasta el aminoácido 139 en diferentes especies. En línea punteada y en negrilla se resalta la posición 119.

## 6.2 CONCLUSIONES *CDKN1B*

En el ovario, *Cdkn1b* es expresado en el núcleo de los ovocitos de los folículos primordiales, primarios y secundarios (Zhang et al., 1999). De manera interesante, la sobre-activación de los folículos que se presenta en los ovarios *Cdkn1b*<sup>-/-</sup> se asocia con una depleción folicular precoz, es decir con una FOP. Debe anotarse que a pesar de que un número importante de modelos murinos se han asociado a infertilidad femenina pocos de ellos presentan un fenotipo tan claro como este de disfunción ovárica, análogo a la FOP en humanos. Por lo tanto, estos hallazgos permitieron proponer a *CDKN1B* como un gen candidato para la falla ovárica prematura en humanos.

Este estudio describe dos variantes no-sinónimas del gen *CDKN1B* en pacientes con FOP. El primero de ellos es c.326T>G (p.Val109Gly). Este cambio está presente en las mujeres de los dos grupos control (A y B). Esta variante ha sido recientemente descrita en pacientes con FOP y en mujeres con fertilidad normal lo que sugiere que no existe una relación con el fenotipo (Wang B et al.2010). Por consiguiente, la variante c.326T>G (p.Val109Gly) no tiene asociación con la patogénesis de la FOP.

Por el contrario, la segunda mutación, p.Ile119Thr, sugiere un potencial efecto deletéreo. En efecto esta variante no se encontró en los controles, no ha sido reportada en las bases de datos de SNPs y se localiza en una región conservada en términos evolutivos, lo que sugiere un impacto funcional. Además, la sustitución de una isoleucina por una treonina implica un cambio importante en cuanto a propiedades de hidrofobicidad. Es importante señalar que a pesar de que la proteína *CDKN1B* no ha sido cristalizada, en la posición 119 de la estructura secundaria *CDKN1B* adopta una conformación de una hoja beta (Russo et al. 1996). Esta mutación podría entonces afectar el adecuado plegamiento y funcionamiento de la proteína. En este contexto, sugerimos que de manera análoga a lo que se observa en modelos murinos esta mutación pueda afectar el desarrollo folicular y producir FOP.

Sin embargo, para confirmar la implicación de esta nueva mutación en la etiología de la FOP estudios funcionales *in vitro* y/o *in vivo* son necesarios. Sobre este punto hemos previsto realizar pruebas funcionales *in vitro* (**ver más adelante perspectivas**)

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS *CITED2*

### 7.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio se incluyeron 116 mujeres tunicinas diagnosticadas con FOP idiopática (**tabla 10**), provenientes del Hospital Farhat Hached University Teaching de la ciudad de Sousse, Túnez. Se incluyeron además 290 controles de dos orígenes étnicos diferentes.

**Tabla 10.** Población de estudio *CITED2*.

POBLACION		
CONTROLES		PACIENTES
TUNEZ GRUPO-A	COLOMBIA GRUPO-B	TUNEZ
140	150	116

Los criterios de inclusión y exclusión utilizados en este trabajo son idénticos a los utilizados para el tamizaje de variantes en *CDKN1B* en mujeres FOP (**Ver materiales y métodos *CDKN1B***).

## 7.2 DISEÑO DE PRIMERS

Estas secuencias se diseñaron con el programa Primer3 (Tabla 11 y 12) (Ver materiales y métodos CDKN1B). Los primers se verificaron por medio de BLASTN para asegurar que no fueran complementarios a otras secuencias del genoma.

**Tabla 11.** Primers de Amplificación *CITED2*.

Gen	Fragmento	Secuencia del Primer	
<b><i>CITED2</i></b>	1	<b>Forward</b>	5' -GGTGCACAGGCTGTTAGTGG-3'
		<b>Reverse</b>	5' -GGGTAGGGGTGATGGTTGAAAT- 3'
<b><i>CITED2</i></b>	2	<b>Forward</b>	5' -ATTTCAACCATCACCCCTACCC-3'
		<b>Reverse</b>	5' -TTGTTTCCAAGTTCTCAAACCTTTC- 3'

**Tabla 12.** Primers de secuenciación *CITED2*.

Gen	Fragmento	Secuencia del Primer	
<b><i>CITED2</i></b>	1	<b>Forward</b>	5' - GGCAGAGGCGAGCAAAAGTGG -3'
<b><i>CITED2</i></b>	2	<b>Reverse</b>	5' - GTTCTCAAACCTTTCAAGATCTG-3'

## 7.3 AMPLIFICACIÓN DEL DNA

Para amplificar toda la región codificante del gen *CITED2* se utilizaron los oligonucleótidos anteriormente mencionados. Los fragmentos amplificados tienen las siguientes longitudes.

1. Fragmento 1: 545pb.
2. Fragmento 2: 574pb

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µl con 100ng de ADN. Se utilizó el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Promega) 1x que contiene el tampón y Taq polimerasa. Se utilizó 1µM de cada uno de los primers y agua hasta completar 25µl. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador **MJ Research PTC-100®** con un programa específico para cada uno de los fragmentos a amplificar (**Tabla 13 y 14**).

Para el fragmento 2 de *CITED2* se estandarizó una PCR de variación *touchdown*. En esta técnica se utiliza una temperatura inicial de annealing de 5–10°C por arriba de la temperatura de *annealing* de los primers que permitiría, en un caso hipotético, la hibridación óptima de los primers para obtener una banda única en gel. En los siguientes ciclos la temperatura de annealing se reduce progresivamente de 1-2 °C/Ciclo, tratando de igualar a la *Tm* inicial de los primers o 2-5°C por debajo de esta.

En este estudio se utilizó este tipo de PCR por la obtención de productos inespecíficos en la estandarización con una PCR convencional. La PCR *touchdown* permitió aumentar la especificidad del producto esperado y la eliminación de productos inespecíficos para finalmente purificar y secuenciar una banda única.

**Tabla 13.** Programa de PCR para el Fragmento 1.

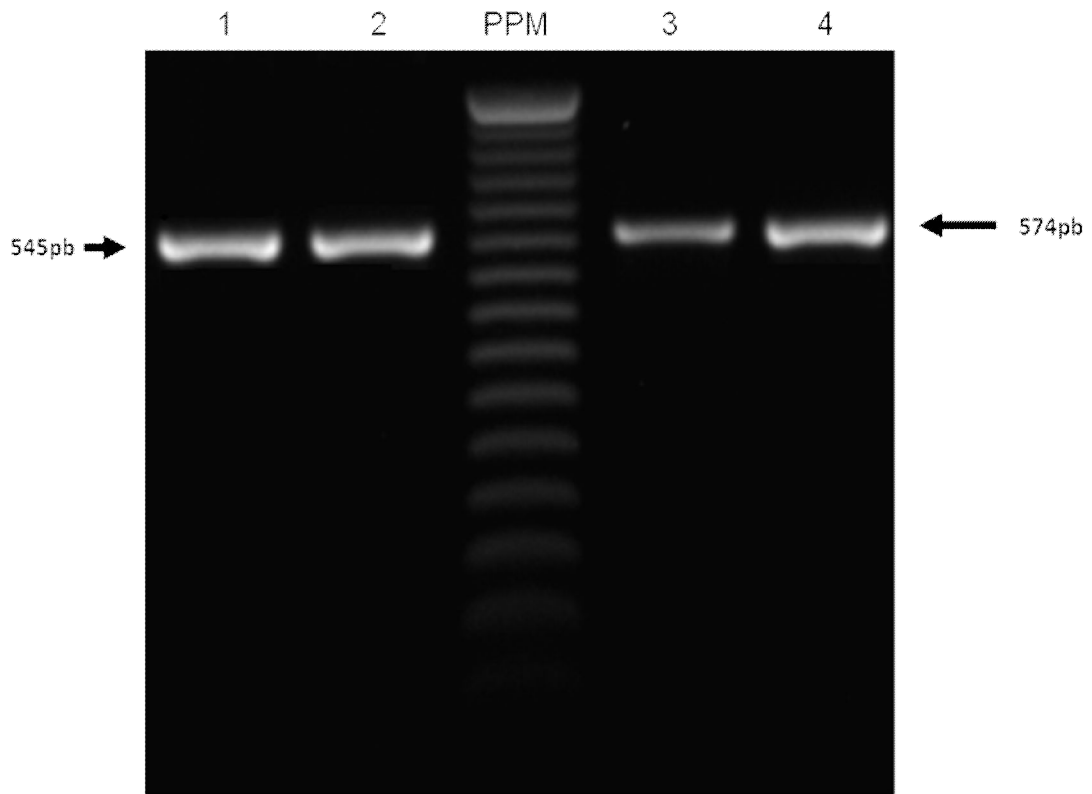
Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		Tiempo
A. Denaturación Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	35	
B1. Denaturación	95°C	40 segundos
B2. Anillamiento	64°C	30 segundos
B3. Elongación	72°C	40 segundos
C. Elongación final	72°C	10 minutos
D. 4°C		

**Tabla 14.** Programa de PCR-touchdown para el Fragmento 2.

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>		<b>Tiempo</b>
<b>A. Denaturación Inicial</b>	<b>95°C</b>	<b>10 minutos</b>
<b>B. Numero de ciclos</b>	<b>06</b>	
<b>B1. Denaturación</b>	<b>95°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>B2. Anillamiento</b>	<b>68°C</b>	<b>30 segundos</b>
<b>B3. Elongación</b>	<b>72°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>C. Numero de ciclos</b>	<b>03</b>	
<b>C1. Denaturación</b>	<b>95°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>C2. Anillamiento</b>	<b>66°C</b>	<b>30 segundos</b>
<b>C3. Elongación</b>	<b>72°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>D. Numero de ciclos</b>	<b>02</b>	
<b>D1. Denaturación</b>	<b>95°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>D2. Anillamiento</b>	<b>64°C</b>	<b>30 segundos</b>
<b>D3. Elongación</b>	<b>72°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>E. Numero de ciclos</b>	<b>04</b>	
<b>E1. Denaturación</b>	<b>95°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>E2. Anillamiento</b>	<b>62°C</b>	<b>30 segundos</b>
<b>E3. Elongación</b>	<b>72°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>F. Numero de ciclos</b>	<b>19</b>	
<b>F1. Denaturación</b>	<b>95°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>F2. Anillamiento</b>	<b>60°C</b>	<b>30 segundos</b>
<b>F3. Elongación</b>	<b>72°C</b>	<b>40 segundos</b>
<b>G. Elongación final</b>	<b>72°C</b>	<b>10 minutos</b>
<b>H. 4°C</b>		

Para la detección del producto amplificado se analizaron 5µl del producto de cada reacción en una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Se

compararon las tallas de los fragmentos amplificados con las de un patrón de peso molecular de 50pb (Invitrogen) (**Figura 15**).



**Figura 15. Amplificación region codificante *CITED2*.** (1 y 2) Fragmento 1. 545pb (3) Marcador de peso molecular. (4 y 5) Fragmento 2. 574pb

#### 7.4 SECUENCIACIÓN DIRECTA

Los productos de PCR fueron purificados antes de la secuenciación usando fosfatasa alcalina y exonucleasa I, siguiendo el protocolo del proveedor (USB, Cleveland, Ohio, USA) (**Ver materiales y métodos *CDKN1B***). La secuenciación directa se realizó utilizando primers internos a la secuencia de PCR y utilizando un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La presencia de cada variante fue confirmada por una nueva amplificación/secuenciación.

## 7.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

### 7.5.1 ALINEAMIENTOS DE SECUENCIA

Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa ClustalW. Se compararon las secuencias de nucleótidos y de proteínas mutantes de los pacientes con la secuencia WT de CITED2.

Las secuencias de las proteína mutantes CITED2 humanas, se alinearon con las de diferentes especies: *R. norvegicus*, *M. musculus*, *B. taurus*, *S. labiatus*, *G.gallus*, *X. laevis*, *X. silurana\_tropicalis*, *D. rerio* y *C. idella*.

### 7.5.2 PREDICCIÓN DE EFECTO DELETÉREO

El análisis del potencial efecto deletéreo de los cambios no-sinónimos se evaluó utilizando el programa Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei et al. 2010).

Polyphen-2 predice el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína. Polyphen-2 es diferente a la versión anterior PolyPhen1 principalmente en los algoritmos empleados y en los parámetros de clasificación para evaluar el resultado (Adzhubei et al. 2010). Algunos parámetros que utiliza Polyphen-2 son: la comparación de secuencias de proteínas de diferentes especies tanto ortólogas como parálogas y las características fisicoquímicas del cambio del residuo.

Utilizamos Polyphen 2 puesto que representa una herramienta bioinformática robusta respecto a otros programas predictores de efectos deletéreos, como Polyphen1, SIFT, SNAP Y SNPs3D (Adzhubei et al. 2010). La tasa de falsos positivos de Polyphen-2 es menor y la tasa de verdaderos positivos mayor con respecto a los demás predictores (Adzhubei et al. 2010).

## 8. RESULTADOS Y CONCLUSIONES *CITED2*

El análisis de la región codificante del gen *CITED2* en los pacientes FOP permitió establecer la presencia de ocho variantes de las cuales cinco son sinónimas y tres no-sinónimas, como se observa a continuación (**Tabla 15**).

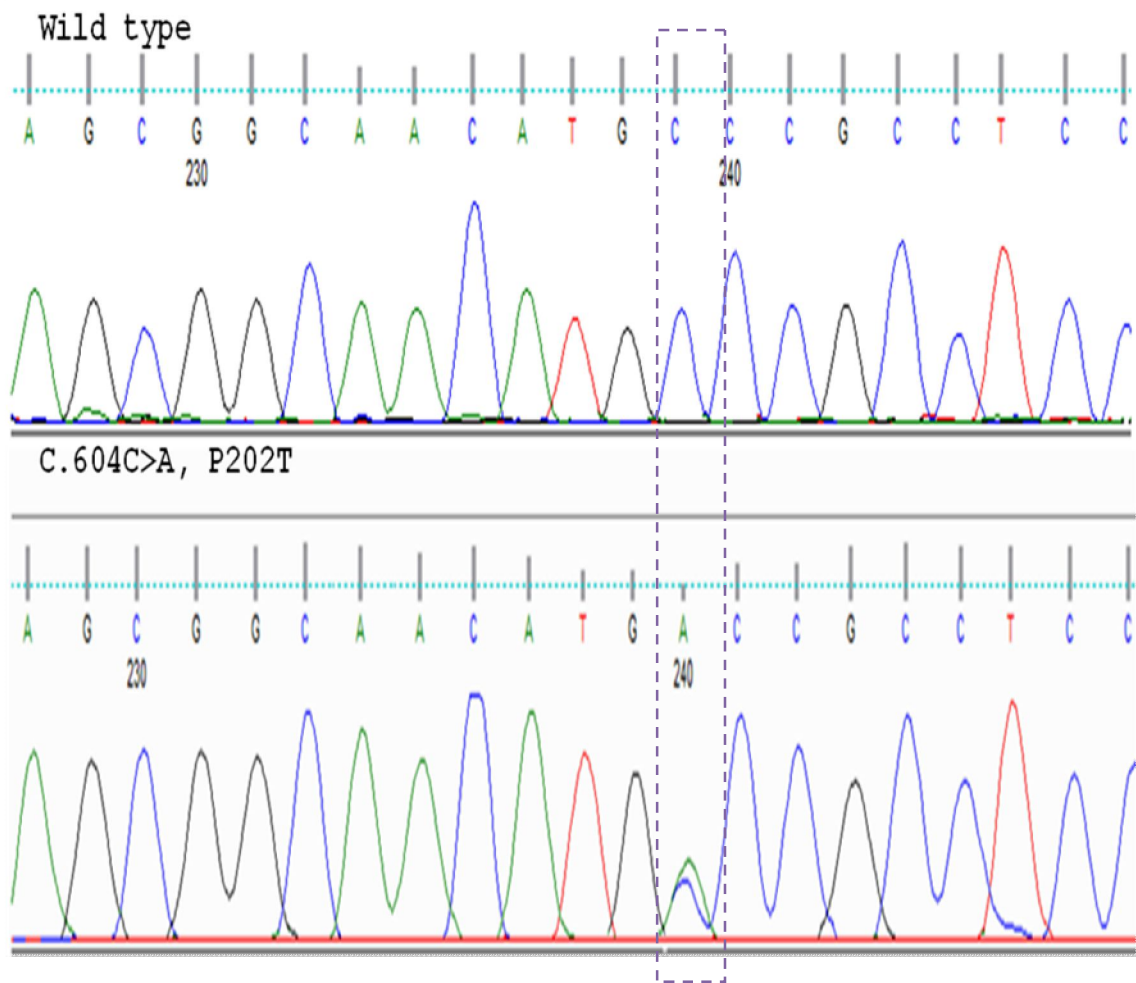
De las ocho variantes reportadas en este estudio, solamente una (p.Ala7Ala) se encontró reportada en las bases de datos de SNPs (rs1131400). Las demás variantes son nuevas: c.510G>C (p.Ser170Ser), c.582C>T (p.Gly194Gly), c. 612C>G, (p.Ser204Ser), c.630T>A, (p.Ala210Ala), c.539A>G, (p.Gly180Asp) y c.574A>G, (p.Ser192Gly). Entre ellas, p.Pro202Thr fue seleccionada como potencialmente patogénica puesto que se encontró exclusivamente en mujeres FOP, no ha sido reportada en bases de datos públicas y los análisis *in silico* (ver más adelante) sugieren un impacto funcional.

Variación en la Secuencia	dbSNP-ID	Cambio AA	Población				
			Túnez			Controles	
			Total pacientes FOP	Pacientes FOP			
				AP	AS	Grupo A	Grupo B
<b>c.21C&gt;A</b>	rs1131400	p.Ala7Ala	30/116 (25,9%)	14/57(24,6%)	16/59 (27,1%)	33/140 (23,6%)	47/150 (31,3%)
<b>c.510G&gt;C</b>	-----	p.Ser170Ser	1/116 (0.86%)	1/57 (1.8%)	0/59	1/140 (0,71%)	0/150
<b>c.539A&gt;G</b>	-----	p.Gly180Asp	0/116	0/57	0/59	0/140	1/150 (0,7%)
<b>c.574A&gt;G</b>	-----	p.Ser192Gly	0/116	0/57	0/59	0/140	8/150 (5,3%)
<b>c.582C&gt;T</b>	-----	p.Gly194Gly	1/116 (0.86%)	0/57	1/59 (1.7%)	1/140 (0,7%)	0/150
<b>C.604C&gt;A</b>	-----	p.Pro202Thr	1/116 (0.86%)	0/57	1/59 (1.7%)	0/140	0/150
<b>C.612C&gt;G</b>	-----	p.Ser204Ser	0/116	0/57	0/59	0/140	1/150 (0,7%)
<b>c.630T&gt;A</b>	-----	p.Ala210Ala	0/116	0/57	0/59	0/140	1/150 (0,7%)

**Tabla 15. Resultados del análisis de secuenciación de *CITED2*.** La numeración hace referencia a la región codificante, cambio de aminoácido (AA), **AP**: amenorrea primaria **AS**: amenorrea secundaria. **dbSNP-ID**: código de SNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)).

### 8.1 VARIANTE c.604C>A (p.Pro202Thr)

La variante **c.604C>A**, representa el cambio de una citosina por una adenina en el nucleótido situado en la posición 604 de la región codificante del gen (**Figura 16**).



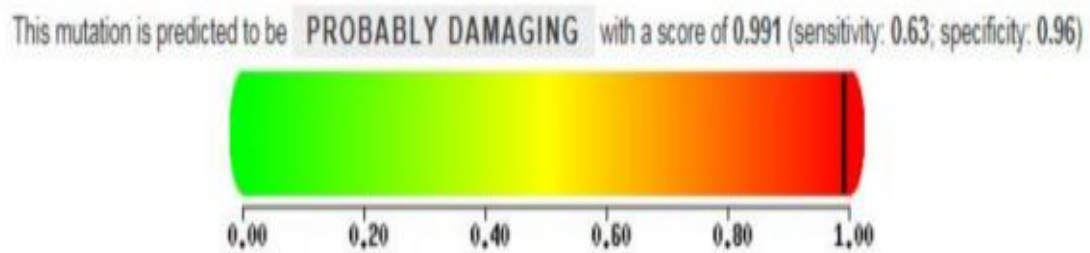
**Figura 16. Cromatograma con el cambio c.604C>A.** Parte superior secuencia WT. Parte inferior secuencia con el cambio heterocigoto c.604C>A.

La variante c.604C>A genera una mutación a nivel el proteico. Una prolina es sustituida por una treonina en la posición 202. La prolina en la posición 202 se encontró fuertemente conservada en las diferentes especies analizadas (**Figura 17**).

<b>H.sapiens (WT)</b>	GGSGSGN	<b>MPASVAH</b>	VPAAML P	PNVIDTD
<b>H.sapiens (Pro202Thr)</b>	GGSGSGN	<b>MTASVAH</b>	VPAAML P	PNVIDTD
<b>R.norvegicus</b>	GSGGGST	<b>MPASVAH</b>	VPAAML P	PNVIDTD
<b>M.musculus</b>	GSGGGST	<b>MPASVAH</b>	VPAAML P	PNVIDTD
<b>S.labiatus</b>	GGSGSSN	<b>MPASVAH</b>	VPAAML P	PNVIDTD
<b>M.mulatta</b>	GGSGSSN	<b>MPASVAH</b>	VPAAML P	PNVIDTD
<b>B.taurus</b>	GGGSSSN	<b>MPASVAH</b>	VPAAVLP	PNVIDTD
<b>G.gallus</b>	-----	<b>LPPAVPH</b>	VPAAML P	PNVIDTD
<b>X.laevis</b>	-----	<b>LPPSVSH</b>	VPAAILP	PGVIDTD
<b>D.rerio</b>	-----	<b>VPLPGHH</b>	MPAAML P	PNVIDTD

**Figura 17. Alineamiento de la proteína CITED2.** Alineamiento del aminoácido 194 hasta el aminoácido 221 en diferentes especies. En línea punteada y en negrilla se resalta la posición 202.

La sustitución de una prolina por una treonina implica un cambio importante en términos de estructura e hidrofobicidad. La prolina es un aminoácido no-polar mientras que la treonina es un aminoácido polar. El cambio p.Pro202Thr podría eventualmente tener un efecto deletéreo en la función de la proteína teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos intercambiados. Para evaluar el potencial efecto deletéreo de esta mutación se utilizó el programa Polyphen2 obteniéndose un score de 0.991, compatible con un efecto patogénico (**Figura 18**).



**Figura 18. Resultados programa Polyphen2.** Score de 0.991 compatible con un efecto patogénico

Los datos clínicos de la historia reproductiva de la paciente portadora de la mutación p.Pro202Thr son los siguientes: menarquia a los 13 años, seguida por tres ciclos menstruales normales y tres años de espaniomenorrea. El cese de los ciclos menstruales ocurrió a los 16 años con niveles elevados de FSH (63 IU/mL), LH (90 IU/mL). La ecografía pélvica mostró un útero hipoplásico y ovarios pequeños sin folículos. Ningún antecedente familiar de FOP o infertilidad fue reportado.

## 8.2 CONCLUSIONES *CITED2*

En los últimos años factores específicos de la determinación femenina han sido identificados (Veitia, 2010). Diferentes estudios permitieron describir mutaciones en genes que actúan en las primeras etapas del desarrollo gonadal asociados a FOP (FOXL2, SF1, Nobox, FIGLA) (Qin et al. 2007, Zhao et al. 2008, Beysen et al. 2009, Lourenco et al. 2010). Un estudio reciente reveló que la invalidación genética del gen *Cited2* ocasiona el retraso temporal en la determinación sexual femenina (Combes 2010). Sugiriendo el posible papel de este gen en la patogénesis de la FOP en humanos.

En este estudio, el análisis de la región codificante del gen *CITED2* permitió identificar ocho variantes en la secuencia (**Tabla 14**). Se consideró que las variantes c.21C>A,

c.510G>C, c.539A>G, c.574A>G, c.582C>T, c.612C>G y c.630T>A no se relacionan con la etiología de la enfermedad. Estas variantes no se asociaron porque algunas estaban presentes en pacientes y en controles, las demás eran sustituciones sinónimas y/o se han identificado sólo en mujeres con fertilidad normal.

La variante c.604C>A (p.Pro202Thr) se observó en una paciente con FOP y no se observó en el grupo control (Grupo A y Grupo B). El análisis genético de *CITED2* se realizó en las hermanas de la paciente. Las hermanas de la paciente no son portadoras de la variante p.Pro202Thr y no presentan disfunción ovárica. Estas características sugieren el posible papel de la variante p.Pro202Thr en la patogénesis de la FOP.

El análisis *in silico* de la proteína *CITED2* mutante mostró un potencial efecto patogénico. La prolina en la posición 202 se encuentra altamente conservada entre especies de vertebrados. Lo que sugiere un papel crucial de la prolina en la función de la proteína (Figura XX). La sustitución de una prolina por una treonina implica modificaciones importantes en términos de estructura e hidrofobicidad. De hecho, la prolina es un residuo hidrofóbico no polar mientras que la treonina es un aminoácido polar que posee propiedades hidrofílicas. Estas diferencias pueden alterar el plegamiento de la proteína y su función. Por ende, en la herramienta PolyPhen-2 se obtuvo un score de 0.991, compatible con un efecto patogénico.

La mutación p.Pro202Thr se encuentra próxima a la región serine-glycine rich junction (SGJ) de la proteína (aminoácidos 162-199), que se ha descrito como un hot spot mutacional (Sperling et al. 2005). De hecho, tres mutaciones heterocigotas en esta región (p.Ser170\_Gly178del, p.Gly178\_Ser179ins9 y p.Ser198\_Gly199del) se identificaron en pacientes afectados por cardiopatías congénitas (Sperling et al. 2005). En el estudio de Sperling, las tres proteínas mutantes mostraron reducción en la capacidad de tran-represión de *CITED2* sobre HIF1A. Por otra parte, la mutación p.Ser170\_Gly178del se asoció con niveles de expresión disminuidos de TFAP2C. Estos resultados llevaron a proponer que mutaciones en la región SSJ podrían alterar la capacidad de unión o interacción de *CITED2* con cofactores esenciales (Sperling et al. 2005). De este modo, la mutación p.Pro202Thr podría interferir con el plegamiento

normal de la SGJ o con la conformación de la proteína, modificando sus propiedades de trans-represión/trans-activación.

La paciente aquí mencionada presenta amenorrea secundaria a la edad de 16 años. En el contexto del ovario, el fenotipo observado argumenta un efecto drástico funcional de la mutación p.Pro202Thr. Por lo tanto proponemos que la haploinsuficiencia de *CITED2* puede afectar la expresión normal de factores esenciales que participan en el programa de desarrollo gonadal femenino como SF1, FOXL2, RSPO1 y WNT4.

Esta hipótesis es probable, puesto que se ha demostrado que el desarrollo gonadal de los mamíferos (así como la cascada de regulación Cited2-WT1, SF1) es extremadamente sensible a la dosis génica (Barrionuevo et al. 2006, Bouma et al. 2007, Buaas et al. 2009, Veitia 2010). Además, mutaciones en *SF1* y *FOXL2* se han relacionado con casos no sindrómicos e idiopáticos de FOP (Beysen et al. 2009, Lourenco et al. 2010). Sin embargo para confirmar el impacto funcional de esta nueva mutación (p.Pro202Thr) en la etiología de la FOP estudios funcionales *in vitro* son necesarios (**ver más adelante, perspectivas**).

## 9. DISCUSIÓN GENERAL

La FOP es una patología frecuente que conduce a la infertilidad. Se estima que entre el 1% y el 3% de las mujeres sufren de esta enfermedad (Coulam et al. 1986, Conway et al. 2000). La alta incidencia de casos idiopáticos (más del 60%) sugiere factores genéticos subyacentes y su interacción con el medio ambiente. Esta patología se ha observado asociada tanto a presentaciones sindrómicas, acompañando a otros hallazgos clínicos, como a casos esporádicos. La descripción de mutaciones puntuales asociadas a la patogénesis de la FOP se inició en 1994 cuando, a partir de un estudio realizado en familias finlandesas se cartografió una región, en el cromosoma 2p (llamada-*ODG1* para *ovarian dysgenesis*-), asociada al fenotipo (Aittomaki et al. 1994). A partir de estos resultados se identificaron mutaciones en dos genes, *FSHR* y *LHR*, localizados en el fragmento cromosómico de interés (Aittomaki et al. 1995, Latronico et al. 1996). Más recientemente se han definido mutaciones en otros genes como etológicas de FOP. Es el caso, por ejemplo, de los genes *BMP15*, *GDF9*, *INHA*, *GALT*, *NOBOX*, ***FIGURALA***, *FOXL2*, *SF-1* (Crisponi et al. 2001, Goswami et al. 2005, Laissue et al. 2006, 2008, Mounné et al. 2008, Qin et al. 2007, Zhao et al. 2008, Lakhal et al. 2009, Lourenço et al. 2009).

A pesar de que las mutaciones confirmadas como causales de FOP se han identificado en un número relativamente bajo de genes, desde la implementación en 1989 de la técnica de recombinación homóloga para crear ratones KO, por lo menos 300 modelos murinos que presentan disfunciones reproductivas han sido descritos (Matzuk et al. 2002, Roy et al. 2006). Estos estudios evidentemente sugieren genes candidatos relevantes para la FOP. Además, modelos murinos transgénicos (e.g. KI) han permitido conocer de manera más precisa la función de numerosos factores genéticos implicados en cada etapa del desarrollo folicular (Barnett et al. 2006). Este es el caso de los dos genes estudiados durante este trabajo de tesis que ha permitido proponer nuevas asociaciones genéticas etiológicas de la enfermedad. A pesar de que las dos mutaciones descritas como potencialmente patológicas revelan que variantes en estos genes son infrecuentes, los resultados son similares a otros descritos anteriormente. Sobre este aspecto es importante señalar que nuestros resultados confirman la utilidad de las aproximaciones

gen candidato en la búsqueda de factores etiológicos de la infertilidad. Es evidente que frente a enfermedades complejas esta aproximación es relativamente costosa puesto, que desde un inicio, se esperan encontrar variantes que expliquen cerca del 1% de los casos. Esta situación se ve agravada por los fenotipos estudiados. Es evidente que los genes y las cascadas moleculares implicadas en estos procesos fisiológicos se superponen como consecuencia de mecanismos de selección natural destinados a conservar las especies. Sobre este aspecto, es importante señalar que nuevas técnicas de secuenciación a gran escala permitirán próximamente avanzar sustancialmente en la búsqueda de genes FOP (**ver más adelante, perspectivas**).

En síntesis, nuestros resultados son prometedores puesto que permiten proponer un nuevo punto de partida para el estudio de las vías regulatorias (tanto *upstream* como *downstream*) de los genes *CDKN1B* y *CITED2* en la fisiología y patología ovárica. Así, proponemos estudios funcionales in vitro que permitan primero validar la implicación funcional de las mutaciones descritas en este estudio (Ver más adelante, **perspectivas**), para luego profundizar en los mecanismos de desregulación ovárica resultantes y en la búsqueda de nuevos mecanismos causales de la enfermedad.

## 10. PERSPECTIVAS

Nuestro grupo pretende próximamente identificar, con ayuda de técnicas de secuenciación a gran escala, nuevas mutaciones y genes causales de FOP. Para esto hemos diseñado un microarreglos de secuenciación que incluye las regiones codificantes de 70 genes candidato (250kb). De manera similar, buscaremos entender mejor cómo estos genes están regulados al analizar sus regiones promotoras mínimas (1000bp). En lo concerniente a las mutaciones de *CDKNB1* realizaremos el clonaje de las versiones WT y mutante para la mutación **p.Ile119Thr** con el objetivo de observar, en un sistema celular *in vitro*, el impacto sobre procesos como la apoptosis (ensayo de TUNNEL). De manera análoga, clonaremos la mutación **p.Pro202Thr** de *CITED2* (y la versión WT) con el objetivo de cotranfectarlas con vectores que permitan la expresión de algunos de sus cofactores. De esta forma, podremos observar si existe una modificación en la colocalización de la proteína (con ayuda de proteínas fluorescentes tipo GFP y RFP situadas en los vectores). Adicionalmente por ensayos de luciferasa determinaremos si existe una modificación de la expresión de genes blanco directos. Para las dos mutaciones de estos genes planeamos igualmente efectuar ensayos de transcriptómica global con el objetivo de estudiar su efecto sobre las cascadas moleculares *downstream*.

## **11. ANEXOS**

### **11.1 ANEXO 1.**

**Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype.**

**Ojeda D**, Lakhali B, Fonseca DJ, Braham R, Landolsi H, Mateus HE, Restrepo CM, Elghezal H, Saâd A, Laissue P.

**Fertil Steril. 2011 May 14. ARTICLE IN PRESS**

# Sequence analysis of the *CDKN1B* gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype

Earlier reports demonstrated a key role of *Cdkn1b* during mouse ovarian development. In this study, the sequencing analysis of the complete coding region of this gene in a panel of premature ovarian failure patients and control subjects reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. (Fertil Steril® 2011; ■: ■–■. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Premature ovarian failure (POF), *CDKN1B*, mutations, sequencing

Premature ovarian failure (POF) is one of the most common diseases that lead to female infertility. It is estimated that POF prevalence can reach ~1.5% (1). Clinically, POF is defined as ≥6 months of amenorrhea that occurs before 40 years of age and is associated with elevated plasma levels of FSH (>40 IU/mL) (2). The hypergonadotropic hypogonadism observed in these patients indicates the lack of ovarian responsiveness to inhibit pituitary gonadotropin synthesis, an essential regulatory step of the

hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Several etiologies have been related to POF, such as autoimmune and infectious diseases, chemotherapy, metabolic disorders, and pelvic surgery. Nevertheless, the majority of cases are considered as idiopathic, which suggests genetic, epigenetic, and environmental etiologic factors.

From a genetic point of view, in syndromic and nonsyndromic POF cases, X and autosomal abnormalities have been identified (3). In Turner syndrome (45,X monosomy), the haploinsufficiency of pseudoautosomal loci, as well as the unspecific meiotic breakdown, has been proposed as molecular causative mechanisms (4). In the X fragile syndrome, premutations and microdeletions of, respectively, *FMR1* and *FMR2*, are considered to be predisposing factors (5, 6). In addition, rearrangements and deletions of the X chromosome led to identifying candidate POF regions (named *POF-1*, *POF-2*, and *POF-3*) (7–10). Some sequence variants in X-linked and autosomal genes have also been related to POF pathogenesis, as is the case for *BMP15*, *GDF9*, *FOXL2*, *LHR*, *FSHR*, *NOBOX*, *FIGLA*, *SF-1*, and *FOXO3A* (11–20).

Owing to the intrinsic difficulty in identifying familial POF cases (that allow genetic linkage analysis), the study of candidate genes issued from genetically modified mouse models is particularly interesting (21). Early studies demonstrated that *Foxo3a*, a *forkhead* transcription factor, has a key role during the earlier stages of follicular growth, because it negatively regulates their activation (22). *Foxo3a*<sup>-/-</sup> female mice showed massive follicular activation which results in premature follicular stock depletion and, in fine, to infertility (22). In these animals, the phenotype mimics the ovarian dysfunction observed in POF cases. More recent studies reported *FOXO3A* sequence variants potentially related to POF pathogenesis (19, 20). Interestingly, in the ovarian context, *FOXO3A* is a downstream mediator of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway which has an important regulatory function during mammalian follicular development (23, 24). In 2007, Liu et al. (25) created a transgenic (Tg) mouse model constitutively expressing *Foxo3a* in oocytes. Females showed infertility due to a delay in the oocyte growth, especially those of secondary follicles. In *Foxo3a*-Tg oocytes, the expression of *Cdkn1b* (a negative regulator of the cell cycle) was

Diego Ojeda, M.Sc.<sup>a</sup>

Besma Lakhal, Ph.D.<sup>b</sup>

Dora Janneth Fonseca, M.Sc.<sup>a</sup>

Rim Braham, M.D.<sup>c</sup>

Hanène Landolsi, Ph.D.<sup>b</sup>

Heidi Eliana Mateus, M.D.<sup>a</sup>

Carlos Martín Restrepo, M.D., Ph.D.<sup>a</sup>

Hatem Elghezal, M.D.<sup>b</sup>

Ali Saâd, M.D., Ph.D.<sup>b</sup>

Paul Laissue, M.D., Ph.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Unidad de Genética, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia*

<sup>b</sup> *Department of Cytogenetics and Reproductive Biology, Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia*

<sup>c</sup> *Department of Endocrinology, Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia*

Received November 23, 2010; revised April 9, 2011; accepted April 13, 2011.

D.O. has nothing to disclose. B.L. has nothing to disclose. D.J.F. has nothing to disclose. R.B. has nothing to disclose. H.L. has nothing to disclose. H.E.M. has nothing to disclose. C.M.R. has nothing to disclose. H.E. has nothing to disclose. A.S. has nothing to disclose. P.L. has nothing to disclose.

D.O. and B.L. contributed equally to this work.

Supported by Fundación Banco de la República, Bogotá, Colombia (grant 2666) and by Universidad del Rosario (Grant CS/Genetics).

Reprint requests: Paul Laissue, M.D., Ph.D., Unidad de Genética, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Carrera 24 N° 63C-69, Bogotá, Colombia (E-mail: paul.laissue@urosario.edu.co).

**TABLE 1**

**Results of the sequence analysis of *CDKN1B* in 87 premature ovarian failure (POF) patients.**

	Sequence variation	
	c.326T > G	c.356T > C
dbSNP-ID	rs2066827	—
Region	Exon 1	Exon 1
AA change	p.Val109Gly	p.Ile119Thr
Population		
POF		
PA	37/43 (86%)	1/43 (2.3%)
SA	39/44 (88.6%)	0/44
Total	76/87 (87.4%)	1/87 (1.1%)
Control		
A	111/137 (81%)	0/137
B	29/126 (23.01%)	0/126

Note: The overview includes base substitutions at the genomic level. Amino acid (AA) change refers to number of patients and control subjects tested and the frequency of each variant. dbSNP-ID = single-nucleotide polymorphism code ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)); PA = primary amenorrhea; SA = secondary amenorrhea.

Ojeda. Correspondence. Fertil Steril 2011.

maintained, preserving its growth-inhibitory function. Subsequent studies, performed in *p27<sup>-/-</sup>* female mice, demonstrated a key role of this factor during ovarian development, because it suppresses follicular formation and activation, as well as stimulating physiologic follicular atresia before puberty (26). These animals displayed an overactivation and premature depletion of the follicular stock, leading to infertility. Therefore, *CDKN1B* is a coherent candidate gene in POF pathogenesis.

Therefore, the aim of the present study was to identify *CDKN1B* mutations that could explain the POF phenotype. For this purpose, we analyzed the complete coding sequences of the gene in a panel of 87 POF patients. The results were compared with a control population (see below). POF women were recruited from Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia. Inclusion criteria were primary (43 individuals) or secondary (44 individuals) amenorrhea, occurring before the age of 40 years, with elevated plasma levels of FSH (>40 IU/mL) and normal 46,XX karyotype. Patients with clinical antecedents of autoimmune disease, anticancer treatments, and pelvic surgery were excluded from the study. The control population group included 137 Tunisian (group A) and 126 Colombian (group B) women >50 years old without clinical antecedents of autoimmune pathology, infertility, or ovarian dysfunction. In addition, control individuals had at least one child. The study was approved by the Institutional Review Board of each participant institution. Each of the patients and control subjects signed a written informed consent.

Genomic DNA was obtained from whole blood samples using the standard phenol-chloroform protocol. The complete coding region of *CDKN1B* was amplified in all patients and control subjects

using 5' and 3' flanking oligonucleotides. Primer sequences and polymerase chain reaction conditions are available on request. Each amplicon was purified by using shrimp alkaline phosphatase and exonuclease I, as described by the manufacturer (USB). Direct sequencing was performed with internal primers using an ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems). Alignments of the wild type (GI: 4757962) and mutant proteins were performed by using ClustalW software.

The analysis of the coding sequence of *CDKN1B* in POF patients revealed two nonsynonymous variants, both located on the first exon of the gene (Table 1). These results were first compared with those from control group A. The c.326T>G (p.Val109Gly) variant was found in, respectively, 76 (87.4%) POF and 111 (81%) control women. This substitution was previously reported in single-nucleotide polymorphism (SNP) databases (rs2066827) as well as in women with normal fertility (see below). The second variant (c.356T>C, p.Ile119Thr) was present in one patient in heterozygous state. Because we did not find this variant in women from control group A, we expanded its screening to women with normal fertility from a distinct ethnical origin (control group B). Similarly, the p.Ile119Thr mutation was absent in the control population from Colombian origin. This variant was not found in SNP public databases. Protein alignments of this region, using available sequences at public databases, revealed that the isoleucine residue at position 119 is strictly conserved among the majority of mammalian species (*Homo sapiens*, *Sus scrofa*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Felis catus*; Supplemental Fig. 1, available online at [www.fertstert.org](http://www.fertstert.org)). The remaining mammalian species (*Bos taurus* and *Canis lupus familiaris*) displayed at this position a leucine instead of an isoleucine.

The present study describes two nonsynonymous variants of *CDKN1B* present in nonsyndromic idiopathic POF cases. One of them (p.Val109Gly) can be considered to be an SNP that lacks an association with POF pathogenesis, because it is present in women from control populations of two distinct ethnical origins. In addition, this variant has been recently described in Chinese POF cases and women with normal fertility (27).

The novel p.Ile119Thr mutation suggests a potential deleterious effect, as the substitution Ile-to-Thr implicates a relevant change in hydrophobicity (Ile > Thr) and modifications in terms of structure. This mutation, which is located on a predicted beta-sheet region, could affect the adequate folding of the protein and its function. Furthermore, protein alignments argue in favor of a functional role of the Ile at this position, because it is conserved among mammalian species. In this context, the presence of a Leu instead of an Ile in some species may not disturb the protein function, because both have very similar structures and properties in terms of hydrophobicity.

We estimate that, to confirm the implication of *CDKN1B* in POF etiology, the new potentially deleterious mutation described here deserves further functional studies. Finally, additional screening of mutations in this gene in large panels of patients and control subjects should reveal new insights into POF pathogenesis.

## REFERENCES

- Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod* 2003;18:199–206.
- Coulam CB. Premature gonadal failure. *Fertil Steril* 1982;38:645–55.
- Laissue P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M. Recent advances in the study of genes involved in nonsyndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:101–11.
- Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 2004;351:1227–38.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJA, Yang KT, Lee C, et al. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the international collaborative POF in fragile X study—preliminary data. *Am J Med. Genet* 1999;83:322–5.
- Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N. Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *J Med Genet* 1999;36:767–70.
- Tharapel AT, Anderson KP, Simpson JL, Martens PR, Wilroy RS, Llerena JC, et al. Deletion (X)(q26.1→q28) in a proband and her mother: molecular characterization and phenotypic karyotypic deductions. *Am J Hum Genet* 1993;52:463–71.
- Davison RM, Fox M, Conway GS. Mapping of the POF1 locus and identification of putative genes for premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 2000;6:314–8.
- Marozzi A, Manfredini E, Tibiletti MG, Furlan D, Villa N, Vegetti W. Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure. *Hum Genet* 2000;107:304–11.
- Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, Muller JM, Nelson SF, et al. Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2006;79:113–9.
- Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004;75:106–11.
- Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttent F, Ritvos O, Aittomaki K, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol* 2006;154:739–44.
- de Baere E. Role of FOXL2 impairment in syndromic and nonsyndromic premature ovarian failure (POF). *Ann Endocrinol (Paris)* 2010;71:214.
- Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, Perheentupa J. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995;82:959–68.
- Latronico AC, Anast J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, et al. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 1996;334:507–12.
- Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2007;81:576–81.
- Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, et al. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2008;82:1342–8.
- Lourenço D, Brauner R, Lin L, de Perdigo A, Weryha G, Muresan M, et al. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2009;360:1200–10.
- Watkins WJ, Umbers AJ, Woad KJ, Harris SE, Winship IM, Gersak K, et al. Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2006;86:1518–21.
- Gallardo TD, John GB, Bradshaw K, Welt C, Reijopera R, Vogt PH, et al. Sequence variation at the human FOXO3 locus: a study of premature ovarian failure and primary amenorrhea. *Hum Reprod* 2008;23:216–21.
- Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;14:1197–213.
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003;301:215–8.
- Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, et al. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol* 2005;281:160–70.
- Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G, et al. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. *Dev Biol* 2006;299:1–11.
- Liu L, Rajareddy S, Reddy P, Du C, Jagarlamudi K, Shen Y, et al. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development* 2007;134:199–209.
- Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W, et al. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol* 2007;21:2189–202.
- Wang B, Ni F, Li L, Wei Z, Zhu X, Wang J, et al. Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor 1B mutation in Han Chinese women with premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online* 2010;21:212–4.

## SUPPLEMENTAL FIGURE 1

Multiple protein sequence alignments of *CDKN1B* between mammalian species displaying human Ile at position 119 (*bold*).

<i>Homo sapiens</i>	SGSRPAAP <b>I</b>	GAPANSEDT <b>H</b>	LVDPKTDPS <b>D</b>
<i>Rattus norvegicus</i>	SGSRQAVPS <b>I</b>	GSQANSEDR <b>H</b>	LVDQMPDSS <b>D</b>
<i>Mus musculus</i>	SGSRQAVPL <b>I</b>	GSQANSEDR <b>H</b>	LVDQMPDSS <b>D</b>
<i>Sus scrofa</i>	SGTRQAVPL <b>I</b>	GSQANSEDT <b>H</b>	LVDQKTDAP <b>D</b>
<i>Felis catus</i>	SGNRQAVPL <b>I</b>	GSQANTEDT <b>H</b>	LVDQKTDTS <b>D</b>
<i>Canis familiaris</i>	SGTRQAGPL <b>L</b>	GSQANSEDT <b>H</b>	LVDQKTDAP <b>D</b>
<i>Bos taurus</i>	SGARPAVPL <b>L</b>	GSQANPEDT <b>H</b>	LVDQKTDAP <b>D</b>

Ojeda. Correspondence. Fertil Steril 2011.

## 11.2 ANEXO2

**A *CITED2* mutation in a patient affected by idiopathic premature ovarian failure**

**Ojeda D**, Lakhali B, Braham R, Eggers S, Turbitt E, Fonseca DJ, Landolsi H, Elghezal H, Saâd A, Restrepo CM, Fellous M, Sinclair A, Koopman P and Laissue P.

**Human Reproduction/Original Article. ARTICLE SUBMITTED**

## Human Reproduction/Original Article

### **A *CITED2* mutation in a patient affected by idiopathic premature ovarian failure**

Besma Lakhal <sup>1\*</sup>, Diego Ojeda <sup>2\*</sup>, Rim Braham <sup>3</sup>, Steffi Eggers <sup>4</sup>, Erin Turbitt <sup>4</sup>, Dora Janeth Fonseca <sup>2,5</sup>, Hanène Landolsi <sup>1</sup>, Hatem Elghezal <sup>1</sup>, Ali Saâd <sup>1</sup>, Carlos Martín Restrepo <sup>2,5</sup>, Marc Fellous <sup>6</sup>, Andrew Sinclair <sup>4</sup>, Peter Koopman <sup>7</sup> and Paul Laissue <sup>2,5</sup>.

<sup>1</sup>Department of Cytogenetics and Reproductive Biology, Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia.

<sup>2</sup>Unidad de Genética, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup>Department of Endocrinology, Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia.

<sup>4</sup>Murdoch Children Research Institute, Royal Children's Hospital, Melbourne, Victoria, Australia

<sup>5</sup>Genética Molecular de Colombia. Departamento de Fertilidad Humana. Bogotá, Colombia.

<sup>6</sup>Laboratoire de Génétique et Épigenétique des Pathologies Placentaires. Institut Cochin, Paris, France.

<sup>7</sup> Division of Molecular Genetics and Development, Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

\* Both authors contributed equally to this work.

**Running Title:** A *Cited2* mutation potentially related with POF etiology.

**Corresponding author: Paul Laissue**

Unidad de Genética, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia.

Address: Carrera 24 N° 63C-69, Bogotá, Colombia

Tel : +57 1 3474570

Fax : +57 1 3474570

email: [paul.laissue@urosario.edu.co](mailto:paul.laissue@urosario.edu.co)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Anomalies in gonadal development in a mouse knock-out model of *Cited2* have been described previously. In *Cited2*<sup>-/-</sup> female gonads, ectopic cell migration was observed and the molecular program of gonadal development was transiently delayed. We hypothesize that, in humans, a similar transient delay might be sufficient to provoke a developmental impairment of the female gonads, conducive to premature ovarian failure (POF). In order to establish whether *CITED2* mutations are a common cause of the disease, we performed a mutational analysis of this gene in a panel of POF patients and in a group of control woman with normal fertility.

**METHODS:** We amplified and directly sequenced the complete open reading frame of *CITED2* in 149 POF patients and 290 controls.

**RESULTS:** This study revealed five synonymous and three non-synonymous variants. Among these, seven are novel. The non-synonymous variant c.604C>A (p.Pro202Thr) was found uniquely in one woman from the POF group and was not previously described. *In silico* analysis of this mutation indicated a potential deleterious effect.

**CONCLUSIONS:** Our results suggest a novel role of *CITED2* during human female gonadal development and POF origin. Furthermore, we provide novel data that potentially relates *CITED2* mutations with POF pathogenesis.

**Key words:** *CITED2*, female infertility, premature ovarian failure.

## Introduction

Premature ovarian failure (POF) is a frequent pathology which affects up to ~1.5% of women (Luborsky et al. 2003). POF is defined as at least 6 months of amenorrhea associated with elevated plasma levels of FSH (>40 IU/mL) in women under 40 years old (Coulam et al. 1982). From an etiological point of view, several causative factors have been described such as infectious process (e.g. viral oophoritis), autoimmune conditions (diabetes), iatrogeny (pelvic surgery) and anti-cancer treatments. Nevertheless, despite advances in diagnosis and treatment of human infertility, the majority of cases are considered idiopathic, suggesting the participation of genetic, epigenetic and environmental factors.

Some genetic abnormalities have been identified in syndromic and non-syndromic forms of POF (Laissue et al. 2008, Persani et al. 2010). Concerning syndromic POF cases, distinct mechanisms have been related with the pathogenesis of the disease. In Turner's Syndrome, the haploinsufficiency of pseudoautosomal loci that escape inactivation should be the cause of the ovarian dysfunction (Zinn and Ross 1998, Sybert and McCauley 2004). In Fragile X Syndrome, premutations and microdeletions of *FMR1* and *FMR2* have been proposed as molecular mechanisms that predispose to the phenotype (Allingham-Hawkins et al 1999, Murray et al. 1999, Allen et al. 2007). In BPES syndrome, mutations in a *forkhead* transcription factor (*FOXL2*) have been identified as causative of the premature depletion of follicles and ultimately of POF (Crisponi et al. 2001, Beysen et al. 2009). In addition, sequence variants in autosomal and X linked genes (e.g. *FSHR*, *LHR*, *FIGLA*, *NOBOX*, *FOXO3A*, *GDF9*, *BMP15*) have been associated with the etiology of non-syndromic POF cases (reviewed by Laissue et al. 2008 and Persani et al. 2010).

Up to now, genetic linkage analysis of affected families has been frequently employed in order to identify POF candidate genes. However, familial POF cases are uncommon. Therefore, in recent years the study of genes identified from genetically modified mouse models displaying reproductive dysfunctions has expanded the repertoire of etiological genes in human (Barnett et al. 2006, Matzuk et al. 2008, Jagarlamudi et al. 2010).

Recently, Combes and coworkers described anomalies in gonadal development in a mouse knock-out (KO) model of *Cited2* (Combes et al. 2010). *Cited2* is a transcriptional co-activator without classical DNA-binding domain which acts in diverse physiological cascades in order to co-regulate, with transcription factors, the expression of target genes (Bhattacharya et al. 1999, Braganca et al. 2003). In mice, *Cited2* has been related with distinct developmental process such as adrenal gland, neural tube and heart morphogenesis (Bamforth et al. 2001, Yin et al. 2002).

During testis development, *Cited2* cooperates with *Wt1* (Wilms Tumor 1) to increase the expression of *Sf1* and *Sry* (Buaas et al. 2009). *Sf1* (*Steroidogenic Factor 1*, also known as *Nr5a1*), is an orphan nuclear receptor which modulates the expression of genes belonging to the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (Luo et al. 1994, Lin et al. 2008). This gene exhibits a crucial function during male sex determination. It participates with *Sry* (the *sex determining region of the Y chromosome*) in *Sox9* regulation, which in turn, stimulates the expression of specific genes responsible for testis differentiation (Vidal et al. 2001, Sekido and Lovell-Badge 2008). Unfortunately, due to the rapid gonadal regression observed in the *Sf1*-KO animals the study of the gene remained difficult. In order to overcome these features Combes et al. used a KO model of *Cited2* that displays reduced levels of *Sf1* (Combes et al. 2010). Interestingly, in *Cited2*<sup>-/-</sup> females gonads ectopic cell migration was observed and the female program

of gonadal development was transiently delayed. In fact, at 10.5 days post coitum (dpc) the expression levels of pro-ovarian genes (*Foxl2*, *Rspo1* and *Wnt4*) were decreased but subsequently restored at 12.5 dpc. In this context, we hypothesize that this temporary inhibition of genes should be sufficient to provoke a developmental impairment of the female gonads, conducive to POF.

Here, in order to establish whether *CITED2* mutations are a common cause of the disease, we performed a mutational analysis of this gene in a panel of 143 idiopathic POF patients and in a group of 290 control woman with normal fertility. We find the first mutation in POF patients potentially related with the etiology. Our results argue in favor of a previously unrecognized role for *CITED2* during human female gonadal development.

## **Materials and Methods**

### *Patients and controls*

The POF patient group comprised 143 women. One hundred and six were of Tunisian origin and attended the Farhat Hached University Teaching Hospital (Sousse, Tunisia). Twenty-seven were of Australian origin and were recruited from the Murdoch Research Institute, Melbourne, Australia. All patients displayed a normal 46, XX karyotype, primary or secondary amenorrhea occurring before the age of 40 and FSH plasma levels under 40 IU/mL. Patients presenting antecedents of pelvic surgery, chemotherapy or radiotherapy treatments, and/or autoimmune diseases were excluded from the study. The control group included 290 women over 50 years old, who lack antecedents of ovarian and autoimmune diseases as well as infertility of any type. Additionally, these

women had at least one living child. Among these, 140 were of Tunisian and 150 of Colombian origin. All clinical and experimental steps of this study were approved by the Institutional Ethics Committee of each participant institution. Patients and controls provided written informed consent.

#### *CITED2 mutational analysis*

Genomic DNA from patients and controls were extracted from whole blood samples using the standard phenol-chloroform procedure. In all patients and controls the complete open reading frame of *CITED2* was amplified by PCR using exon-flanking oligonucleotides. Primer sequences and PCR conditions are available on request. Each amplicon was sequenced with internal primers in an ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The presence of each non-synonymous variant was confirmed by an additional PCR and sequencing assay. *In silico* analysis of mutant proteins from patients was performed using ClustalW and PolyPhen2 software. We aligned human wild type (WT) sequence (GI: 270288756) with those from numerous vertebrate species (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Saguinus labiatus*, *Macaca mulatta*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*). The potential pathogenic effect of non-synonymous variants was evaluated using PolyPhen2 software (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). The PolyPhen2 prediction values are the result of an algorithm which includes distinct features such as comparative analysis of proteins sequences from different species, physicochemical characteristics of the exchanged amino acids and mapping of residue replacement to available 3D structures. Its positive predictive rate ranges between 73% and 92% (Adzhubei et al. 2010).

PolyPhen results are assessed as a quantitative value (probability of being deleterious) and as qualitative feature (benign, possibly damaging, or probably damaging).

## Results

Sequence analysis of the complete *CITED2* coding region in patients and controls revealed five synonymous and three non-synonymous variants (**Table 1**). Among these, seven are novel and one (p.Ala7Ala) was previously reported in public SNP databases (rs1131400). The three synonymous variants were found in both POF and control groups: c.21C>A (p.Ala7Ala), c.510G>C (p.Ser170Ser) and c.582C>T (p.Gly194Gly). Two synonymous (c. 612C>G, p.Ser204Ser and c.630T>A, p.Ala210Ala) and two non-synonymous (c.539A>G, p.Gly180Asp and c.574A>G, p.Ser192Gly) variants were found only in control individuals from Colombian origin.

The non-synonymous variant (c.604C>A, p.Pro202Thr) was found uniquely in one woman from the POF group and was not previously described. Comparative protein analysis between vertebrate species demonstrated a strict conservation of the Pro residue at position 202 (**Figure 1**). Polyphen2 analysis of this mutation displayed a score of 0.991 (probably damaging).

The patient carrying the p.Pro202Thr mutation is a 34-year-old woman of Tunisian origin presenting with secondary amenorrhea. External genitalia and pubertal development were normal. Menarche appeared at 13 years of age, with three menstrual cycles followed by 3 years of spaniomenorrhea. Amenorrhea and abnormal high levels of FSH (63 IU/mL), LH (90 IU/mL) were recorded at 16 years. Pelvic ultrasonography showed a hypoplastic uterus and small ovaries lacking follicles. An echocardiogram performed at 34 years of age displayed minimal mitral insufficiency. The father of the patient suffered a mitral valve prolapse. Subsequently, he was affected by rheumatoid

arthritis of the heart, which finally led to the replacement of both mitral valves. Unfortunately, we could not obtain clinical data and biological samples from the mother. No additional familial antecedents of cardiac or fertility dysfunctions were recorded. *CITED2* sequence analysis in the father and two unaffected sisters of the patient did not reveal the p. Pro202Thr mutation.

## Discussion

Ovarian and testicular morphogenesis is initiated during early embryo development from a common tissue, the genital ridge. At this stage, the gonads are considered bipotential since their cell lineages (somatic and germ) can differentiate into ovarian or testic types. From a genetic point of view, it has been demonstrated in the early 90's that the *SRY* gene located on the Y chromosome is responsible for activating the molecular pathway leading to the formation of the male gonads (Koopman et al. 1991). In addition, some specific pro-ovarian molecules have been identified in recent years (Veitia, 2010). As a result, causative POF mutations in genes participating in early stages of gonadal development have also been identified (e.g. *FOXL2*, *SF1*, *NOBOX*, *FIGLA*) (Qin et al. 2007, Zhao et al. 2008, Beysen et al. 2009, Lourenco et al. 2010). The recent findings of Combes et al. (Combes et al. 2010) revealing a temporary delay of the female pathway caused by *Cited2* gene deletion strongly suggests the potential role of this gene during human POF pathogenesis.

In the present study, sequence analysis of the *CITED2* coding region in a panel of POF women and control individuals revealed eight sequence variants, seven of which are novel (**Table 1**). Most of these are unlikely to be related with the etiology of the disease

since they are present in POF and control groups, they are silent substitutions and/or they have been identified only in women with normal fertility.

The remaining c.604C>A (p.Pro202Thr) variant was observed in one POF patient and was absent in control woman of two distinct ethnical origins. Two sisters of this patient, who did not show ovarian dysfunction, lacks p.Pro202Thr variant. Although we could not definitely establish the parental origin of the variant, these features suggest its potential role during POF pathogenesis. Furthermore, *in silico* analysis of the mutant protein argues in favor of a pathogenic effect since the proline residue at position 202 is strictly conserved among vertebrate species suggesting its crucial functional role (**Figure 1**). The presence of a Pro instead a Thr is predicted to alter both structure and hydrophobicity of the encoded protein. Indeed, proline is a non-polar hydrophobic residue while threonine is a polar aminoacid possessing hydrophilic properties. These differences might alter the protein folding and its function. Accordingly, the PolyPhen bioinformatic tool displayed a score compatible with a potential pathogenic effect (score 0.991, probably damaging). The *CITED2* p.Pro202Thr mutation found in our case is located in the vicinity of the serine-glycine rich junction (SGJ) of the protein (residues 162 to 199) which has been previously described as a mutational hotspot. Indeed, three heterozygous mutations in this region (p.Ser170\_Gly178del, p.Gly178\_Ser179ins9, and p.Ser198\_Gly199del) identified in patients affected by cardiac defects have been functionally characterized (Sperling et al. 2005). In the study by Sperling and coworkers, all three mutant proteins displayed a reduction in HIF1A transcriptional repressive capacity of *CITED2*. Moreover, the p.Ser170\_Gly178del mutation was associated with diminished levels of TFAP2C coactivation. These results led to the proposal that mutations of the SJS could alter the capacity of the *CITED2*-EP300

binding domain to recruit or interact with essential cofactors (Sperling et al. 2005). Similarly, the mutation found in our case might interfere with the normal folding of the SGJ or with the protein conformation itself, modifying its transrepression/transactivation properties when coupled with transcriptions factors.

In the ovarian context, the phenotype observed in our case argues in favor of a drastic functional effect of the p.Pro202Thr mutation since the patient presented secondary amenorrhea at the age of 16. Thus, we hypothesize that the haploinsufficiency of *CITED2* might affect the normal expression of further essential factors which participates of the female gonadal differentiation program such as SF1, FOXL2, RSPO1 and WNT4. This assumption is plausible since it has been demonstrated that mammalian gonadal development (as well as the Cited2-WT1-SF1 regulatory cascade) is extremely sensitive to gene dosage (Barrionuevo et al. 2006, Bouma et al. 2007, Buaas et al. 2009, Veitia 2010). Furthermore, mutations in *SF1* and *FOXL2* have been related with non-syndromic and idiopathic POF cases (Beysen et al. 2009, Lourenco et al. 2010). In our patient, mild cardiac dysfunction has been recorded since the echocardiogram revealed a minimal insufficiency of the mitral valve. This observation differs from those of other patients carrying *CITED2* mutations, in which distinct morphological impairments were described such as atrial and ventricular septal defects, and abnormal pulmonary venous return to the right atria (Sperling et al. 2005). Since the father of the patient, who does not carry the mutation, was affected by mitral valve pathology we estimate that the p.Pro202Thr mutation might not be related to the phenotype. However, it could be possible that the p.Pro202Thr, as well as other *CITED2* mutations, possesses differential pathogenic effects during cardiac or ovarian development due to a distinct proteomic environment between these tissues. In this

context, it would be interesting to know whether the patients described by Sperling and coworkers display reproductive dysfunctions.

Taken together, our results suggest a novel role of *CITED2* during human female gonadal development. Furthermore, we provide novel data that potentially relates *CITED2* mutations with POF pathogenesis. Thus, in order to validate the functional impact of *CITED2*-p.Pro202Thr mutation, further *in vitro* and animal model studies are required. Finally, we propose that the sequencing analysis of *CITED2* in largest panels of POF patients, affected or not by cardiac phenotypes, would expand the spectrum of variants and should permit to establish an accurate genotype/phenotype correlation.

### **Authors' roles**

Paul Laissue (PL) and Peter Koopman (PK) were involved in conception and design. Besma Lakhali, Rim Braham, Hanène Landolsi, Hatem Elghezal and Ali Saâd performed the clinical research. Diego Ojeda, Steffi Eggers, Erin Turbitt, Carlos Martín Restrepo and Dora Janeth Fonseca performed the experimental approaches. PL, PK, Andrew Sinclair and Marc Fellous were involved in drafting the article.

### **Funding**

This study was supported by The Universidad del Rosario (Grant CS/Genetics).

## References

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;**7**:248-249

Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, Charen K, He W, Taylor KC, Sherman SL. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod* 2007;**22**: 2142–2152.

Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A, et al. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study-preliminary data. *Am J Med Genet* 1999;**83**:322-325.

Bamforth SD, Bragança J, Eloranta JJ, Murdoch JN, Marques FI, Kranc KR, Farza H, Henderson DJ, Hurst HC, Bhattacharya S. Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfap2 co-activator. *Nat Genet* 2001;**29**:469-474.

Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:537-555.

Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C, Scherer G. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 2006;**74**:195-201.

Beysen D, De Paepe A, De Baere E. FOXL2 mutations and genomic rearrangements in BPES. *Hum Mutat* 2009;**30**:158-169.

Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 1999;**13**:64-75.

Bouma GJ, Washburn LL, Albrecht KH, Eicher EM. Correct dosage of Fog2 and Gata4 transcription factors is critical for fetal testis development in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2007;**104**:14994-14999.

Bragança J, Eloranta JJ, Bamforth SD, Ibbitt JC, Hurst HC, Bhattacharya S. Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2. *J Biol Chem* 2003;**278**:16021-16029.

Buaas FW, Val P, Swain A. The transcription co-factor CITED2 functions during sex determination and early gonad development. *Hum Mol Genet* 2009;**18**:2989-3001

Combes AN, Spiller CM, Harley VR, Sinclair AH, Dunwoodie SL, Wilhelm D, Koopman P. Gonadal defects in Cited2-mutant mice indicate a role for SF1 in both testis and ovary differentiation. *Int J Dev Biol* 2010;**54**:683-689.

Coulam CB. Premature gonadal failure. *Fertil Steril* 1982;**38**:645–655.

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

Jagarlamudi K, Reddy P, Adhikari D, Liu K. Genetically modified mouse models for premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol* 2010;**315**:1-10.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991;**351**:117-121.

Laissue P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M. Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 2008;**282**:101-111.

Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev* 2008;**2**:200-209.

Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC et al. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2009;**360**:1200-1210.

Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod* 2003;**18**:199-206.

Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994;**77**:481-90.

Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;**14**:1197-213.

Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N. Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *J Med Genet* 1999;**36**:767-770.

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

Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2007;**8**:576-581.

Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nat* 2008;**453**:930-934.

Sperling S, Grimm CH, Dunkel I, Mebus S, Sperling HP, Ebner A, Galli R, Lehrach H, Fusch C, Berger F et al. Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital heart defects. *Hum Mutat* 2005;**26**:575-582.

Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 2004;**351**:1227-1238.

Veitia RA. FOXL2 versus SOX9: a lifelong "battle of the sexes". *Bioessays* 2010;**32**:375-380.

Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 2001;**28**:216-7.

Yin Z, Haynie J, Yang X, Han B, Kiatchoosakun S, Restivo J, Yuan S, Prabhakar NR, Herrup K, Conlon RA et al. The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1alpha, in heart development and neurulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:10488-10493.

Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, Simpson JL, Rajkovic A. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 2008;**82**:1342-1348.

Zinn AR, Ross JL. Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr Opin Genet Dev* 1998;**8**:322-327.

## Tables and Figures

**Table 1:** Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients affected by POF.

Sequence variation	dbSNP-ID	AA change	Population				
			Total POF patients	Tunes		Controls	
				POF Patients			
				PA	SA	Group A	Group B
c.21C>A	rs1131400	p.Ala7Ala	30/116 (25,9%)	14/57(24,6%)	16/59 (27,1%)	33/140 (23,6%)	47/150 (31,3%)
c.510G>C	-----	p.Ser170Ser	1/116 (0.86%)	1/57 (1.8%)	0/59	1/140 (0,71%)	0/150
c.539A>G	-----	p.Gly180Asp	0/116	0/57	0/59	0/140	1/150 (0,7%)
c.574A>G	-----	p.Ser192Gly	0/116	0/57	0/59	0/140	8/150 (5,3%)
c.582C>T	-----	p.Gly194Gly	1/116 (0.86%)	0/57	1/59 (1.7%)	1/140 (0,7%)	0/150
C.604C>A	-----	p.Pro202Thr	1/116 (0.86%)	0/57	1/59 (1.7%)	0/140	0/150
C.612C>G	-----	p.Ser204Ser	0/116	0/57	0/59	0/140	1/150 (0,7%)
c.630T>A	-----	p.Ala210Ala	0/116	0/57	0/59	0/140	1/150 (0,7%)

**Figure 1:** Protein alignment of the region including the p.Pro202Thr mutation.

<b>H. sapiens (WT)</b>	NSG--- GSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTD
<b>H. sapiens (P202T)</b>	NSG--- GSGSGNMTASVAHVPAAMLPPNVIDTD
<b>R. norvegicus</b>	SAG--- GSGGGSTMPASVAHVPAAMLPPNVIDTD
<b>M. musculus</b>	SAG--- GSGGGSTMPASVAHVPAAMLPPNVIDTD
<b>S. labiatus</b>	NSGGGS GSGGSSNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTD
<b>M. mulatta</b>	NSGGGS GSGGSSNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTD
<b>B. taurus</b>	NSGGGS GGGSSSNMPASVAHVPAAVLPPNVIDTD
<b>G. gallus</b>	-----LPAVPHVPAAMLPPNVIDTD
<b>X. laevis</b>	-----LPPSVSHVPAAILPPGVIDTD
<b>D. rerio</b>	-----VPLPGHHMPAAMLPPNVIDTD

### 11.3 ANEXO3

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

Fonseca DJ, Garzón E, Lakhali B, Braham R, Ojeda D, Elghezal H, Saâd A, Restrepo CM and Laissue P.

**CLINICAL ENDOCRINOLOGY. ARTICLE SUBMITTED**



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



Journal:	<i>Clinical Endocrinology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	11 Letter
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fonseca, Dora; Universidad del Rosario, Genetics Garzón, Eliana; Universidad del Rosario, Genetics Lakhal, Bisma; Farhat Hached University Teaching Hospital, Department of Cytogenetics and Reproductive Biology Braham Guezal, Rim; Farhat Hached Hospital, Endocrinology Ojeda, Diego; Universidad del Rosario, Genetics Elghezal, Hatem; Farhat Hached University Teaching Hospital, Department of Cytogenetics and Reproductive Biology Saâd, Ali Asghar; Farhat Hached University Teaching Hospital, Department of Cytogenetics and Reproductive Biology Restrepo, Carlos; Universidad del Rosario, Genetics Laissue, Paul; Universidad del Rosario, Genetics
Key Words:	Female infertility < Conditions: < Ovary, Ovarian failure, premature < Conditions: < Ovary, Premature Menopause

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

Dora Janeth Fonseca<sup>1,2</sup>, Eliana Garzón<sup>1</sup>, Besma Lakhali<sup>3</sup>, Rim Braham<sup>4</sup>, Diego Ojeda<sup>1</sup>  
Hatem Elghezal<sup>3</sup>, Ali Saâd<sup>3</sup>, Carlos Martín Restrepo<sup>1,2</sup> and Paul Laissue<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Genética, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup>Genética Molecular de Colombia. Departamento de Fertilidad Humana. Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup>Department of Endocrinology, Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia.

<sup>4</sup>Department of Endocrinology, Farhat Hached University Teaching Hospital, Sousse, Tunisia.

### Abstract

Premature ovarian failure (POF) is a common disease leading to female infertility. In recent years, the study of genes encoding proteins belonging to the forkhead (fkh) family of transcription factors has demonstrated their crucial role during several mouse and human physiological processes, including gonadal development and fertility. It has been proposed that the FOXO modulation of reactive oxygen species may have a regulatory role during oocyte maturation and folliculogenesis. Since *FOXO4* is expressed in granulosa cells of the immature mice as well as in human luteinized mural granulosa cells we estimate that this gene constitutes a coherent candidate associated with POF pathogenesis. In this study we analyzed the complete open reading frame of *FOXO4* in a panel of 116 POF patients and 143 controls. We identify the IVS2+41T>G sequence variant located on the second intron of the gene. This nucleotide change, which was previously reported in public databases of SNPs is present at similar frequencies in both POF and control groups. The results do not reveal further sequence variants. We conclude that mutations in the coding region of *FOXO4* should not be a common cause of the disease. However, we do not exclude that sequence variations located on the regulatory regions of the gene might modify its expression and cause the disease.

1  
2  
3  
4  
5  
6 Premature ovarian failure (POF) is a frequent pathology which affects 1% of women.  
7 Clinically, POF is defined as at least six months of amenorrhea occurring under 40  
8 years old associated with elevated plasma levels of FSH (>40IU/l). Up to now, several  
9 etiologies have been related with POF pathogenesis such as infectious agents,  
10 autoimmune conditions and iatrogenic injuries. However, in the majority of cases POF  
11 is considered as idiopathic indicating a potential involvement of genetic factors.  
12 Chromosomal abnormalities (e.g. Turner's syndrome) as well as mutations in autosomal  
13 and X linked genes have been identified as causative of the phenotype. In recent years,  
14 the study of genes encoding proteins belonging to the *forkhead* (fkh) family of  
15 transcription factors has demonstrated their crucial role during several mouse and  
16 human physiological processes, including gonadal development and fertility. At least  
17 1800 fkh proteins have been described and classified in subfamilies. These factors share  
18 a highly conserved ~100 aminoacid region, the *forkhead* domain, responsible to identify  
19 and bind to specific DNA sequences located on the promoter regions of target genes. In  
20 the ovarian context, *FOXL2* and members of the *FOXO* subfamily have been implicated  
21 in distinct normal and pathological conditions. Mutations in *FOXL2* have been related  
22 with the etiology of an autosomal dominant disease, the blepharophimosis, ptosis,  
23 epicanthus-inversus (BPES) syndrome. BPES is characterized by eyelid abnormalities  
24 associated (BPES type I) or not (BPES type II) with POF. In addition, mutations in  
25 *FOXL2* have been reported in isolated idiopathic POF cases. These findings are  
26 consistent with those observed in *Foxl2*<sup>-/-</sup> mice models in which morphological  
27 granulosa cell impairment and premature massive follicle atresia were observed.<sup>1</sup>  
28 Among members of the FOXO subfamily, *FOXO3A* and *FOXO1* have been particularly  
29 well studied since they have been related with ovulation and oocyte maturation in mice  
30 and human. *Foxo3a*<sup>-/-</sup> female mice showed massive follicular activation leading to  
31 premature depletion of follicles and infertility.<sup>2</sup> Indeed, *FOXO3A* screening for  
32 mutations led to identify sequence variants potentially related with the premature aging  
33 of the ovary observed in POF women. Interestingly, these findings reinforce the role of  
34 FOXO factors during aging tissue progression. Indeed, some observations suggested  
35 that a subset of ROS (reactive oxygen species) genes is regulated by members of the  
36 *FOXO* subfamily.<sup>3</sup> It has been proposed that ROS may have a regulatory role during  
37 oocyte maturation and folliculogenesis.<sup>4</sup> Concerning *FOXO4*, it has been shown that it

1  
2  
3 is expressed in granulosa cells of the immature mice as well as in human luteinized  
4 mural granulosa cells.<sup>5,6</sup> Thus, we estimate that *FOXO4* constitutes a coherent candidate  
5 gene associated with POF pathogenesis.  
6  
7

8  
9  
10 In order to establish whether *FOXO4* sequence variants are a common cause of  
11 idiopathic POF, we analyzed its complete open reading frame in a panel of 116 POF  
12 patients who attended the Farhat Hached University Teaching Hospital, (Sousse,  
13 Tunisia). Inclusion criteria were primary or secondary amenorrhea occurring before the  
14 age of 40 years, normal 46,XX karyotype and elevated plasma levels of FSH (>40IU/l).  
15 We exclude from the study patients presenting clinical antecedents of pelvic surgery,  
16 autoimmune diseases and anticancer treatments. The control group population was  
17 composed of 143 women under 50 years old having at least one child and lacking  
18 antecedents of reproductive dysfunctions. Furthermore, they displayed regular  
19 menstrual cycles ranging from 28 to 32 days. The study was approved by the  
20 Institutional Review Board of each participant institution. Genomic DNA from patients  
21 and controls was obtained from whole blood samples using the standard phenol-  
22 chloroform procedure. The complete coding region of the gene (three exons) was  
23 amplified by PCR using exon-flanking primers. Each amplicon was first purified using  
24 exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase, and subsequently sequenced with  
25 internal primers. Sequences of each patient were aligned and compared with those of the  
26 *FOXO4* wild type version which are available at public databases (NCBI reference  
27 sequence: NM\_005938.3). Since we amplified and sequenced the coding region of the  
28 gene using exon-flanking oligonucleotides we were able to identify the IVS2+41T>G  
29 sequence variant located on the second intron of the gene. This nucleotide change,  
30 which was previously reported in public databases of SNPs (rs5980742), is present at  
31 similar frequencies in both POF and control groups. The results do not reveal further  
32 sequence variants. We conclude that mutations in the coding region of *FOXO4* should  
33 not be a common cause of the disease. However, we do not exclude that sequence  
34 variations located on the regulatory regions of the gene might modify its expression and  
35 cause the disease.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

## 55 56 57 58 59 60 **References**

1 Moumné, L., Dipietromaria, A., Batista, F. *et al.* (2008) Differential aggregation and  
functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription

1  
2  
3 factor involved in cranio-facial and ovarian development. *Human Molecular Genetics*,  
4 **17**, 1010-1019.

5  
6  
7  
8 2 Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R. *et al.* (2003) Suppression of ovarian follicle  
9 activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, **301**, 215-218.

10  
11  
12  
13 3. Tothova, Z & Gilliland, G. (2007) FoxO Transcriptions Factors and Stem Cell  
14 Homeostasis: Insights from the Hematopoietic System. *Cell Stem Cell*, **1**, 140-152.

15  
16  
17  
18 4. Agarwal, A., Gupta, S & Sharma, R. (2005) Role of Oxidative Stress in female  
19 reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **3**, 28-49

20  
21  
22  
23 5 Richards, J.S., Sharma, S.C., Falender, A.E. *et al.* (2002) Expression of FKHR,  
24 FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I,  
25 estrogen, and the gonadotropins. *Molecular Endocrinology*, **16**, 580-599.

26  
27  
28  
29  
30  
31 6 Pisarska, M.D., Kuo, F.T., Tang, D. *et al.* (2009) Expression of forkhead transcription  
32 factors in human granulosa cells. *Fertility & Sterility*, **91**, 1392-1394.

33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 12. REFERENCIAS

- Achermann J.C, Ito M, Hindmarsh P.C. Jameson J.L.** A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat. Genet* 1999; 22: 125–126.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR.** *Nat Methods* 2010; 7:248-249
- Agoulnik IU, Krause WC, Bingman WE 3rd, Rahman HT, Amrikachi M, Ayala GE, Weigel NL.** Repressors of androgen and progesterone receptor action. *J Biol Chem* 2003; 278: 31136–31148.
- Aittomaki K, Lucerna JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen JS, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehvaslaiho H. Engel AR.** Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995;82: 959–968.
- Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, Charen K, He W, Taylor KC. Sherman SL.** Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Human Reproduction* 2007;22: 2142–2152.
- Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P, Kotlar TJ, Huhtaniemi IT, Jameson JL, Cheetham TD. Ball SG.** A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotrophic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Human Reproduction* 2003;18: 251–256.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A, Jenkins EC, Brown WT, Howard-Peebles PN, Becchi C, Cummings E, Fallon L, Seitz S, Black SH, Vianna-Morgante AM, Costa SS, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Murray A, Webb J, Vieri F.** Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet* 1999;83:322-325.
- Altschul S.F, Gish W, Miller W, Myers E.W. and Lipman D.J.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215: 403-410. <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> [Consulta: 08 junio. 2011].
- Anderson E, Albertini DF.** Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 1976; 71:680-686.
- Andrews J.E, O'Neill M.J, Binder M, Shioda T, Sinclair A.H.** Isolation and expression of a novel member of the CITED family. *Mech Dev* 2000; 95: 305- 308.
- Arango N, Lovell-Badge R, Behringer R.** Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 1999; 99: 409– 419.

**Arden K, Biggs W.** Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 403: 292–298.

**Attisano L, Silvestri C, Izzi L, Labbe E.** The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGF $\beta$  and activin signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001;180:3–11.

**Baker B.S, and Belote J.M.** Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. *Ann. Rev. Genet.* 1983; 77: 345-393.

**Baker TG.** A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* . 1963;158:417-433.

**Bamforth S.D, Braganca J, Eloranta J.J, Murdoch J.N, Marques F.I, Kranc K.R, Farza H, Henderson D.J, Hurst H.C. Bhattacharya S.** Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking *Cited2*, a new *Tfap2* co-activator. *Nat. Genet* 2001; 29: 469–474.

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

**Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G.** A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet* 1994; 7: 497–501.

**Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D.** *Atm*-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 1996;12:159–171.

**Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C, Scherer G.** Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 2006; 74: 195–201.

**Barsoum I & Yao H.H.** The road to maleness: from testis to Wolffian duct. *Trends Endocrinol Metab.* 2006; 17: 223–228.

**Bashamboo A & McElreavey K.** NR5A1/SF-1 and development and function of the ovary. *Annales d'Endocrinologie* 2010;71:177–182.

**Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, Milgrom E, Kuttann F, Misrahi M.** A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *Journal of Clinical Investigation* 1998;102:1352–1359.

**Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL.** Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell.* 1994;79:415-425.

**Behringer RR.** The in vivo roles of mullerian-inhibiting substance. *Curr Top Dev Biol* 1994; 29: 171–187.

- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M.** Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene. *Nature* 1990;348: 448–450.
- Betterle C, Coco G, Zanchetta R.** Adrenal cortex autoantibodies in subjects with normal adrenal function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*; 2005; 19:85-99
- Beysen D, Vandesompele J, Messiaen L, De Paepe A, De Baere E.** The human FOXL2 mutation database. *Hum Mutat.* 2009;24:189-93.
- Bharath R, Unnikrishnan AG, Thampy MV, Anilkumar A, Nisha B, Praveen VP, Nair V, Jayakumar RV, Kumar H.** Turner syndrome and its variants. *Indian Journal of Pediatrics* 2010;77:193–195.
- Bhattacharya S, Michels C.L, Leung M.K, Arany Z.P, Kung A.L, Livingston D.M.** Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 1999; 13:64-75.
- Bione S, Rizzolio F, Sala C, Ricotti R, Goegan M, Manzini MC, Battaglia R, Marozzi A, Vegetti W, Dalpra L, Crosignani PG, Ginelli E, Nappi R, Bernabini S, Bruni V, Torricelli F, Zuffardi O, Toniolo D.** Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, DACH2 and POF1B. *Hum Reprod.* 2004;19:2759-2766.
- Bland M.L, Fowkes R.C. Ingraham H.A.** Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function. *Mol. Endocrinol* 2004;18: 941-952
- Bland M.L, Jamieson C.A, Akana S.F, Bornstein S.R, Eisenhofer G, Dallman M.F. and Ingraham H.A.** Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97:14488-14493.
- Block E.** A quantitative morphological investigation of the follicular system in the newborn females infants. *Acta anal.* 1953; 17:201-206
- Blume-Jensen P, Hunter T.** Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001;411: 355–365.
- Boder E.**Ataxia-telangiectasia: some historic, clinical and pathologic observations. *Birth Defects Original Article Series* 1975;11: 255–270.
- Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P.** A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology* 2007;148:393–400.
- Bondy CA, Nelson LM, Kalantaridou SN.** The genetic origins of ovarian failure. *J Womens Health.* 1998;7:1225-1229.

- Bouma GJ, Albrecht KH, Washburn LL, Recknagel AK, Churchill GA, Eicher EM.** Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. *Development* 2005; 132: 3045–3054.
- Bowles J, Berkman J, Cooper L, Koopman P.** Sry requires a CAG repeat domain for male sex determination in *Mus musculus*. *Nature Genet* 1999; 22: 405–408.
- Braganca J, Eloranta J.J, Bamforth S.D, Ibbitt J.C, Hurst H.C. Bhattacharya S.** Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2. *J. Biol Chem* 2003; 278: 16021–16029.
- Braganca J, Swingler T, Marques F.I, Jones T, Eloranta J.J, Hurst H.C, Shioda T, Bhattacharya S.** Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 8559-8565
- Brennan J, Capel B.** One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 509-21.
- Bretherick KL, Metzger DL, Chanoine JP, Panagiotopoulos C, Watson SK, Lam WL, Fluker MR, Brown CJ, Robinson WP.** Skewed X-chromosome inactivation is associated with primary but not secondary ovarian failure. *Am J Med Genet A.* 2007;143:945-951.
- Bridges C.B.** Triploid intersexes in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1921;54: 252–254.
- Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, Kipp JL, Shea LD, Mayo KE, Woodruff TK.** Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Dev Biol.* 2006;298:132-148.
- Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB.** A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006;12:685-718.
- Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, Fauser BC.** Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19:340-347.
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF.** A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991;349:38-44.
- Buaas F, Val P, Swain A.** The transcription co-factor CITED2 functions during sex determination and early gonad development. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 989–3001.
- Buescher M, Hing FS, Chia W.** Formation of neuroblasts in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster* is controlled by Sox. *Neuro Development* 2002; 129:4193-4203.
- Burgering B, Medema R.** Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukocyte Biol.* 2003; 73, 689–701.

- Burgoyne P, Thornhill A.** The genetic basis of XX-XY differences present before gonadal sex differentiation in mice. In: *Sex Chromosomes and Sex-Determining Genes*, edited by Reed K and Graves J. Chur: *Harwood Academic* 1993; p. 369–372.
- Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY.** Eggs forever? *Differentiation*. 2005;73:438-446.
- Calderon FRO, Phansalkar AR, Crockett DK, Miller M & Mao R.** Mutation database for the galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) gene. *Human Mutation* 2007;28: 939–943.
- Canipari R.** Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* 1994; 2:343-345.
- Canning C, Lovell-Badge R.** Sry and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet* 2002; 18: 111–113,
- Cantley L.** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296: 1655–1657.
- Capel B.** Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu. Rev. Physiol.* 1998;60: 497-523.
- Carlson MB.** Human embryology and developmental biology. *Ed Philadelphia Mosby*. 2004.p.411.
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA.** Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003;301:215–218.
- Cattanach B. M.** XXY mice. *Genet. Res.* 1961; 2, 156—158.
- Cederroth CR, Pitetti JL, Papaioannou MD, Nef S.** Genetic programs that regulate testicular and ovarian development. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266:3-9.
- Cervato S, Mariniello B, Lazzarotto F, Morlin L, Zanchetta R, Radetti G, De Luca F, Valenzise M, Giordano R, Rizzo D et al.** Evaluation of the autoimmune regulator (AIRE) gene mutations in a cohort of Italian patients with autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasisectodermal- dystrophy (APECED) and in their relatives. *Clinical Endocrinology* 2009;70: 421–428.
- Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A.** Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 2004; 131: 1891–1901,
- Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN.** Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*. 2006;86:1009-1012.
- Chand AL, Robertson DM, Shelling AN, Harrison CA.** Mutational analysis of betaglycan/TGF-betaRIII in premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2007;87:210-212.

- Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocrine Reviews* 2002;23: 787–823.
- Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC.** Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1264-1277.
- Christin-Maitre S, Vasseur C, Portnoi MF, Bouchard P.** Genes and premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;145:75-80
- Cohen DR, Sinclair AH, McGovern JD.** Sry protein enhances transcription of Fos-related antigen 1 promoter constructs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 4372–4376,
- Colvin J, Green R, Schmahl J, Capel B, Ornitz D.** Male-tofemale sex reversal in mice lacking Fibroblast Growth Factor 9. *Cell.* 2001; 104: 875–889.
- Colvin JS, Feldman B, Nadeau JH, Goldfarb M, Ornitz DM.** Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene. *Dev Dyn* 1999; 216: 72–88.
- Combes A, Spiller C, Harley V, Sinclair A, Dunwoodie S, Wilhelm D and Koopman P.** Gonadal defects in Cited2 -mutant mice indicate a role for SF1 in both testis and ovary differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 2010;54: 683-689
- Combes A, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A, Koopman P.** Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol* 2009; 326: 112-120.
- Conway GS, Kaltsas G, Patel A, Davies MC, Jacobs HS.** Characterization of idiopathic premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 1996; 65:337–341.
- Conway GS.** Premature ovarian failure. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1997; 9:202–206.
- Correa R.V, Domenice S, Bingham N.C, Billerbeck A.E, Rainey W.E, Parker K.L, Mendonca B.B.** A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J. Clin. Endocrinol Metab* 2004; 89: 1767–1772.
- Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF.** Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; 67:604–606.
- Coulam CB, Stringfellow S, Hoefnagel D.** Evidence for a genetic factor in the etiology of premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 1983;40:693-695.
- Coulam CB.** Premature gonadal failure. *Fertil Steril.* 1982; 38:645–655.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G.** The putative forkhead

transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genet* 2001; 27: 159–166.

**Crisponi L, Uda M, Deiana M, Loi A, Nagaraja R, Chiappe F, Schlessinger D, Cao A, Pilia G.** FOXL2 inactivation by a translocation 171 kb away: analysis of 500 kb of chromosome 3 for candidate long-range regulatory sequences. *Genomics*. 2004;83:757-764.

**Cunningham M, Zhu Q, Hammond J.** FoxO1a can alter cell cycle progression by regulating the nuclear localization of p27kip in granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 2004; 18, 1756–1767.

**da Fonte Kohek MB, Batista MC, Russell AJ, Vass K, Giacaglia LR, Mendonca BB, Latronico AC.** No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 1998;70: 565–567.

**Datta S, Brunet A, Greenberg M.** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999; 13: 2905-2927.

**Davis CJ, Davison RM, Payne NN, Rodeck CH & Conway GS.** Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: opinion. *Human Reproduction* 2000; 15: 2418–2422.

**Davis GH.** Fecundity genes in sheep. *Animal Reproduction Science* 2004;82: 247–253.

**De Baere E, Dixon MJ, Small KW, Jabs EW, Leroy BP, 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.** Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype-phenotype correlation. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1591-1600.

**Desclozeaux M, Poulat F, Barbara PD, Capony JP, Turowski P, Jay P, Mejean C, Moniot B, Boizet B, Berta P.** Phosphorylation of an N-terminal motif enhances ADN-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 7988–7995,

**Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L.** Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet*. 2004;75:106-111.

**Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M et al.** Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006;91:1976–1979.

**Diehl J, Cheng M, Roussel M, Sherr C.** Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*. 1998; 12, 3499–3511

- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P.** Impairing folliclestimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:13612-13617.
- Dijkers P, Medema R, Pals C, Banerji L, Thomas N, Lam EWF et al.** Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(kip1). *Mol Cell Biol* 2000; 20:9138–9148.
- Dixit H, Deendayal M, Singh L.** Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure. *Hum Reprod.* 2004;19:1760-1764.
- Dixit H, Rao KL, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty BN, Singh L.** Mutational analysis of the betaglycan gene-coding region in susceptibility for ovarian failure. *Hum Reprod.* 2006;21:2041-2046.
- Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty B. Singh L.** Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause* 2005;12: 749–754.
- Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L.** Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet.* 2006;119:408-415.
- Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, Aittomaki K.** A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002;87:1151–1155.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.** Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 1996;383:531-535.
- Dorfman DM, Genest DR, Reijo Pera RA.** Human DAZL1 encodes a candidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells. *Hum Reprod.* 1999;14:2531-2536.
- Du X, Hublitz P, Gunther T, Wilhelm D, Englert C, Schule R.** The LIM-only coactivator FHL2 modulates WT1 transcriptional activity during gonadal differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1577: 93–101,
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM.** The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology* 1998;12:1809–1817.
- Dubin RA, Coward P, Lau YFC, Ostrer H.** Functional comparison of the *Mus musculus molossinus* and *Mus musculus domesticus* *Sry* genes. *Mol Endocrinol* 1995; 9:1645–1654.
- Dubin RA, Ostrer H.** *Sry* is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol* 1994; 8:1182–1192.

**Dunwoodie S.L, Rodriguez T.A, Beddington R.S.** Msg1 and Mrg1, founding members of a gene family, show distinct patterns of gene expression during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 1998; 72, 27-40.

**Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP.** Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999;140:5789-5796.

**Edelmann W, Cohen PE, Kneitz B, Winand N, Lia M, Heyer J, Kolodner R, Pollard JW, Kucherlapati R.** Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat Genet*. 1999;21:123-127.

**Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ.** Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 2006;441:1109-1114.

**Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM.** Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol*. 1999;13:1018-1034.

**Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, Monget P & Monniaux D.** Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006;4: 20.

**Faddy M, Gosden R.** Numbers of ovarian follicles and testing germ line renewal in the postnatal ovary: facts and fallacies. *Cell Cycle*. 2007;6:1951-1952.

**Fechner PY, Davenport ML, Qualy RL, Ross JL, Gunther DF, Eugster EA, Huseman C, Zagar AJ, Quigley CA, Toddler.** Turner Study Group. Differences in follicle-stimulating hormone secretion between 45,X monosomy Turner syndrome and 45,X/46,XX mosaicism are evident at an early age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006;91:4896–4902.

**Fero M, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow C, Firpo E, Polyak K, Tsai L, Broudy V, Perlmutter R et al.** A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*. 1996; 85: 733-744.

**Fleming A, Vilain E.** The endless quest for sex determination genes. *Clin Genet*. 2005; 67:15-25.

**Fogli A, Gauthier-Barichard F, Schiffmann R, Vanderhoof VH, Bakalov VK, Nelson LM, Boespflug-Tanguy O.** Screening for known mutations in EIF2B genes in a large panel of patients with premature ovarian failure. *BMC Womens Health*. 2004;4:8.

**Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF.** Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec*. 1991;231:201-208

**Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH.** A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* .1959; 1: 711–713.

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

**Gallardo TD, John GB, Bradshaw K, Welt C, Reijo-Pera R, Vogt PH, Touraine P, Bione S, Toniolo D, Nelson LM, Zinn AR, Castrillon DH.** Sequence variation at the human *FOXO3* locus: a study of premature ovarian failure and primary amenorrhea. *Hum Reprod*. 2007;23:216-221.

**Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luirio K, Dodds KG, Montgomery GW et al.** Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*bmp15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosagesensitive manner. *Nature Genetics* 2000;25: 279–283.

**Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A.** Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet*. 2000;355:308-311.

**Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, Boizet-Bonhoure B.** A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of *SOX9* during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:11199-11204.

**Gersak K, Harris SE, Smale WJ, Shelling AN.** A novel 30 bp deletion in the *FOXL2* gene in a phenotypically normal woman with primary amenorrhoea: case report. *Human Reproduction* 2004;19: 2767–2770.

**Giese, K, Cox, J. and Grosschedl, R.** The HMG domain of the lymphoid enhancer factor I bends ADN and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*, 1992; 69:185-195.

**Gilbert, S.F.** *Developmental Biology*, 8th ed, pag, 17-19. 2006 (Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts).

**Groff A, Covington S, Halverson L, Fitzgerald O, Vanderhoof V, Calis K & Nelson LM.** Assessing the emotional needs of women with spontaneous premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*. 2005; 83 1734–1741.

**Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R.** A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346:245-250.

**Gubbay J, Koopman P, Collignon J, Burgoyne P, Lovell-Badge R.** Normal structure and expression of *Zfy* genes in XY female mice mutant in *Tdy*. *Development* 1990; 109: 647–653.

**Hanley N, Hagan D, Clement-Jones M, Ball S, Strachan T, Salas-Cortés L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson D.** *SRY*, *SOX9*, and *DAX1* expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 2000; 91: 403–407.

- Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, et al.** Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev* 1999;87:175-80.
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM.** Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*. 2004;70: 900–909.
- Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN.** ADN binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 1992; 255: 453–456.
- Harley V. R, Lovell-Badge R. and Goodfellow P. N.** Definition of a consensus ADN binding site for SRY. *Nucl. Acids Res.* 1994; 22: 1500-1501
- Harris S, Chand A, Winship I, Gersak K, Aittomaki K, Shelling A.** Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*. 2002;8:729-733.
- Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S.** Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *PNAS*. 2005;102: 5426–5431.
- Heikkila M, Prunskaitė R, Naillat F, Itaranta P, Vuoristo J, Leppaluoto J, Peltoketo H, Vainio S.** The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology* 2005; 146: 4016–4023.
- Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA.** Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity. *Endocr Rev*. 1997;18:107-134.
- Holter E, Kotaja N, Makela S, Strauss L, Kietz S, Janne OA, Gustafsson JA, Palvimo JJ, Treuter E.** Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 515–528.
- Hosaka T, Biggs W, Tieu D, Boyer A, Varki N, Cavenee W, Arden K.** Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 101, 2975–2980
- Hoyer PB.** Damage to ovarian development and function. *Cell Tissue Res*. 2005;322:99-106.
- Hunter MG.** Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* 2000; 5:122-130.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB.** Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science* 2005;118: 5257–5268.

- Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB.** Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology*. 2006;296: 514–521.
- Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai K, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL.** Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol* 1996;10: 1261–1272.
- Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Morohashi K.** Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn* 2001; 220: 363–376.
- Irvine WJ.** Premature menopause in autoimmune diseases. *Lancet*. 1969; 1:264.
- Ito M, Yu R, Jameson JL.** DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1476–1483.
- Jacobs PA, Strong JA.** A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959; 183: 302–303.
- Jaeken J, Kint J & Spaapen L.** Serum lysosomal enzyme abnormalities in galactosaemia. *Lancet* 1992;340:1472–1473.
- Jager R, Harley V, Pfeiffer R, Goodfellow P, Scherer G.** A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet* 1992; 90: 350–355.
- Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G.** A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 1990; 348: 452–454.
- Jiang M, Aittomaki K, Nilsson C, Pakarinen P, Iitia A, Torresani T, Simonsen H, Goh V, Pettersson K, de la Chapelle A et al.** The frequency of an inactivating point mutation (566C/T) of the human follicle-stimulating hormone receptor gene in four populations using allele-specific hybridization and time-resolved fluorometry. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998;83: 4338–4343.
- Jin X, Han C, Yu F, Wei P, Hu Z, Liu Y.** Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol Reprod Dev*. 2005; 70, 82–90.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL.** Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 2005;122:303-315.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru J, Tilly J.** Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;428:145-150.

**Johnson J, Skaznik-Wikiel M, Lee H, Niikura Y, Tilly J, Tilly J.** Setting the record straight on data supporting postnatal oogenesis in female mammals. *Cell Cycle*. 2005;4:1471-1477.

**Jordan B, Mohammed M, Ching S, De'lot E, Chen X, Dewing P, Swain A, Rao P, Elejalde B, Vilain E.** Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1102–1109.

**Jost A, Vigier B, Prepin J. and Perchellet J. P.** Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm. Res* 1973; 29, 1-41.

**Kalantaridou SN, Nelson LM.** Premature ovarian failure is not premature menopause. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;900:393-402.

**Karl J, Capel B.** Three-dimensional structure of the developing mouse genital ridge. *Philos Trans R Soc Lond* 1995; 350: 235–242.

**Kastan MB & Bartek J.** Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432:316–323.

**Katayama S, Ashizawa K, Fukuhara T, Hiroyasu M, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K.** Differential expression patterns of Wnt and beta-catenin/TCF target genes in the uterus of immature female rats exposed to 17alpha-ethynyl estradiol. *Toxico Sci* 2006.91: 419-430.

**Katoh K, Miyata T.** A heuristic approach of maximum likelihood method for inferring phylogenetic tree and an application to the mammalian SOX-3 origin of the testis-determining gene SRY. *FEBSLett* 1999; 463: 129–132.

**Kent J, Wheatley S.C, Andrews J.E, Sincalir A.H, Koopman P.** A male specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 1996; 122:2813-2822.

**Keri RA, Nilson JH.** A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone beta subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice. *J Biol Chem* 1996;271:10782-95.

**Kidokoro T, Matoba S, Hiramatsu R, Fujisawa M, Kanai-Azuma M, Taya C, Kurohmaru M, Kawakami H, Hayashi Y, Kanai Y, Yonekawa H.** Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Dev. Biol* 2005; 278: 511–525

**Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier M-C, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R & Capel B.** Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 2006; 4, e187

**Kobayashi, A. & Behringer, R.R.** Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Gene*. 2003; 4, 969–980.

**Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R.** Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; 351: 117–121.

**Kosaki K, Sato S, Hasegawa T, Matsuo N, Suzuki T, Ogata T.** Premature ovarian failure in a female with proximal symphalangism and Noggin mutation. *Fertil Steril.* 2004;81(4):1137-1139.

**Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA.** Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 2007;87:143–146.

**Kovanci E, Simpson JL, Amato P, Rohozinski J, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA.** Oocyte-specific Gprotein- coupled receptor 3 (GPR3): no perturbations found in 82 women with premature ovarian failure (first report). *Fertil Steril.* 2007;90:1269-1271.

**Kreidberg J.A, Sariola, H, Loring, J.M, Maeda, M, Pelletier, J,Housman, D. and Jaenisch, R.** WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; 74: 679–691

**Kumar KA, Rao KL, Vedula SV, Kanakavalli MK, Vaddamani PV, Deendayal M, Gupta N, Chakravarthy BN, Singh L.** Screening of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene in Indian women with ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* 2005;11:444-448.

**Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, Muller J-M, Nelson SF, Salameh W, Vilain E.** Disruption of POF1B Binding to Nonmuscle Actin Filaments Is Associated with Premature Ovarian Failure. *Am J Hum Genet.* 2006;79:113-119.

**Laissue P, Christin-Maitre S, Bouchard P, Fellous M, Veitia RA.** Mutations in the NOG gene are not a common cause of nonsyndromic premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66:900.

**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 RA.** Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol.* 2006;154:739-744.

**Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R et al.** Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology* 2006;154: 739–744.

**Laissue P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M.** Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:101-11.

**Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O.** A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanisms of Development.* 1998;78(1-2):135-140.

**Lakin ND, Weber P, Stankovic T, Rottinghaus ST, Taylor AM, Jackson SP.** Analysis of the ATM protein in wild-type and ataxia telangiectasia cells. *Oncogene* 1996 13 2707–2716.

**Lalli E, Bardoni B, Zazopoulos E, Wurtz JM, Strom TM, Moras D, Sassone-Corsi P.** A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1950–1960.

**Lami T, Preyer O, Umek W, Hengstschlager M, Hanzal H.** Genetic disorders in premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*. 2002;8:483-491.

**Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, Valentin F, Wallace I, Wilm A, Lopez R, Thompson J, Gibson T. and Higgins D.G.** ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007;23(21): 2947-2948. <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>> [Consulta: 06 junio. 2011].

**Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, Castro M, Tsigos C. Chrousos GP.** Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *New England Journal of Medicine* 1996;334: 507–512.

**Latronico AC, Chai Y, Arnhold IJ, Liu X, Mendonca BB. Segaloff DL.** 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* 1998;12: 442–450.

**Lavorgna G, Ueda H, Clos J, Wu C.** FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* 1991;252:848-51

**Layman LC.** BMP15 – the first true ovarian determinant gene on the X-chromosome? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006;91:1673–1676.

**Ledent C, Demeestere I, Blum D, Petermans J, Hamalainen T, Smits G, Vassart G.** Premature ovarian aging in mice deficient for Gpr3. *PNAS*. 2005;102:8922-8926.

**Ledig S, Ropke A, Haeusler G, Hinney B, Wieacker P.** BMP15 mutations in XX gonadal dysgenesis and premature ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;198:84.

**Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL.** Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol*. 2007;25:3198-3204.

**Lee K, Pisarska MD, Ko JJ, Kang Y, Yoon S, Ryou SM, Cha KY, Bae J.** Transcriptional factor FOXL2 interacts with DP103 and induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336:876-881.

**Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S.** Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod*. 2001;65:994-999.

**Lei Z, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV.** Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol.* 2001;15:184-200.

**Liao K, Wood N & Conway G.** Premature menopause and psychological well-being. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology.* 2000; 21 167–174.

**Lin L, Achermann JC.** Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev* 2008; 2:200-9.

**Lin L, Hron J, Peng S.** Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity.* 2004; 21, 203–213.

**Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, Homfray T, Albanese A, Molini V, Sebire NJ, Einaudi S, Conway GS et al.** Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007;92:991–999.

**Lin L. and Achermann J.C.** Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev.* 2008; 2: 200–209.

**Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, De Miguel MP, Tessarollo L, Donovan PJ.** Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet.* 2002;30:446-449.

**Liu G, Hale GE, Hughes CL.** Galactose metabolism and ovarian toxicity. *Reproductive Toxicology* 2000;14: 377–384.

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

**Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, and Scheithauer BW.** P27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999; 154:313–323.

**Lnenicek-Allen M, Read CM, Crane-Robinson C.** The DNA bend angle and binding affinity of an HMG box increased by the presence of short terminal arms. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:1047-1051.

**Lofrano-Porto A, Barra GB, Giacomini LA, Nascimento PP, Latronico AC, Casulari LA, da Rocha Neves Fde A.** Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women. *N Engl J Med.* 2007;357:897-904.

**Lourenço D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC et al.** Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine* 2009;360:1200–1210.

- Loutradis D, Patsoula E, Stefanidis K, Drakakis P, Antonakis G, Bletsas R, Antsaklis A, Michalakis S.** Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are not evident in Greek women with premature ovarian failure and poor responders. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2006;61: 56–60.
- Lovell-Badge R, Canning C, Sekido R.** Sex-determining genes in mice: building pathways. In *The Genetics and Biology of Sex Determination* (Chadwick, D. and Goode, J, eds), pp. 4–22, Wiley 2002.
- Lovell-Badge R, Robertson E.** XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine primary testis determining gene, Tdy. *Development* 1990;109:635-646.
- Luborsky J, Thiruppathi P, Rivnay B, Roussev R, Coulam C, Radwanska E.** Evidence for different etiologies of low estradiol response to FSH: age related accelerated luteinization of follicles or presence of ovarian autoantibodies. *Human Reproduction* 2002; 17: 2641-2649.
- Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N.** Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod.* 2003;18:199-206.
- Luborsky JL.** Ovarian autoimmune disease and ovarian autoantibodies: a review. *J Womens Health & Gender Based Medicine* 2002; 11: 585-599.
- Lucchesi J.C, and Skripsky T.** The link between dosage compensation and sex differentiation in *Drosophila melanogaster*: *Chromosoma* 1981; 82: 217-227.
- Lucchesi J.C.** Dosage compensation in *Drosophila*. *Annu Rev Genet.* 1973; 7:225–237
- Ludbrook LM, Harley VR.** Sex determination: a “window” of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15: 116–121.
- Luo X, Ikeda Y & Parker KL.** A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 1994;77: 481–490.
- Luoh SW, Bain PA, Polakiewicz RD, Goodheart ML, Gardner H, Jaenisch R, Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A.** Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet.* 2004;364:875-882.
- Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B.** Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* 2008; 17:2949-2955
- MacLaughlin DT, Donahue PK.** Sex determination and differentiation. *N Engl J Med.* 2004, 350:367-378

**Mandon-Pepin B, Touraine P, Kuttenn F, Derbois C, Rouxel A, Matsuda F, Nicolas A, Cotinot C, Fellous M.** Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol.* 2008;158:107-115.

**Maroni G, Plaut W.** Dosage Compensation in DROSOPHILA MELANOGASTER Triploids. II. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity. *Genetics* 1973; 74:331-42.

**Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, Casagrande S, Tedeschini G, Benedetti A, Chatterjee VK.** Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet.* 1993;5:83-86.

**Mattison D, Evans M, Schwimmer W, White B, Jensen B, Schulman J.** Familial premature ovarian failure. *Am J Hum Genet.* 1984;36:1341-1348.

**Matzuk M, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A.** Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature.* 1995;374:360-363.

**McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, Smith P, Groome N, Tisdall DJ.** Control of early ovarian follicular development. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54:3-16.

**McNatty KP, Galloway SM, Wilson T, Smith P, Hudson NL, O'Connell A, Bibby AH, Heath DA, Davis GH, Hanrahan JP et al.** Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics, Selection, Evolution* 37 2005;(Suppl 1) S25–S38.

**Medema R, Kops G, Bos J, Burgering B.** AFX-like forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27. *Nature.* 2000; 404:782–787.

**Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, Morohashi K, Weiss J, Jameson JL.** Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development* 2003; 130: 1029–1036.

**Meeks JJ, Weiss J, Jameson JL.** Dax1 is required for testis determination. *Nat Genet* 2003; 34: 32–33.

**Menke DB, Page DC.** Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns.* 2002;2:359-367.

**Meyer W, Lavy G, DeCherney A, Visintin I, Economy K, Luborsky J.** Evidence of gonadal and gonadotropin antibodies in women with a suboptimal ovarian response to exogenous gonadotropin. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 795-799.

**Miller ME & Chatten J.** Ovarian changes in ataxia telangiectasia. *Acta Paediatrica Scandinavica* 1967;56; 559–561.

**Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K.** Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X

chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 507–519.

**Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R.** Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in the testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet* 1996; 14:62-68.

**Moumné L, Batista F, Benayoun BA, Nallathambi J, Fellous M, Sundaresan P, Veitia RA.** The mutations and potential targets of the forkhead transcription factor FOXL2. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 30:282:2-11

**Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N.** Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *J Med Genet.* 1999;36:767-770.

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

**Nakamura Y, Maekawa R, Yamagata Y, Tamura I, Sugino N.** A novel mutation in exon8 of the follicle-stimulating hormone receptor in a woman with primary amenorrhea. *Gynecological Endocrinology* 2008;24: 708–712.

**Nelson LM, Bakalov VK.** Mechanisms of follicular dysfunction in 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003;32:613-637.

**Ogata T & Matsuo N.** Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. *Human Genetics* 1995;95: 607–629.

**Ohtsuka S, Takaki S, Iseki M, Miyoshi K, Nakagata N, Kataoka Y, Yoshida N, Takatsu K, Yoshimura A.** SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3066-3077.

**Ornstein KS, McGuire EJ, Berry GT, Roth S, Segal S.** Abnormal galactosylation of complex carbohydrates in cultured fibroblasts from patients with galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Pediatric Research* 1992;31: 508–511.

**Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D.** Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet* 2007; 16:2795- 2804

**Overton PM, Meadows LA, Urban J, Russell S.** Evidence for differential and redundant function of the Sox genes Dichaete and SoxN during CNS development in Drosophila. *Development* 2002; 129:4219-4228.

**Pailhoux E, Vigier B, Vaiman D, Servel N, Chaffaux S, Cribiu EP, Cotinot C.** Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Dev Dyn* 2002; 224: 39–50.

- Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas NE, Fellous M.** Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 1989; 342: 937–939.
- Pamilo P, O'Neill RJW.** Evolution of the *Sry* genes. *Mol Biol Evol* 1997; 14: 49–55.
- Panay N & Kalu E.** Management of premature ovarian failure. Best Practice & Research. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2009; 23 129–140
- Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, Zhao Y, Westphal H, Matzuk MM, Rajkovic A.** Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:8090-8095.
- Park S.Y, Meeks J.J, Raverot G, Pfaff L.E, Weiss J, Hammer G.D, Jameson J.L.** Nuclear receptors *Sf1* and *Dax1* function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development* 2005; 132: 2415–2423.
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G.** R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006; 38:1304-1309.
- Paterson P & Peltonen L.** Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) 963 and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 2005;25:49–55.
- Persani L, Rossetti R, Cacciatore C & Bonomi M.** Primary ovarian insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 2009; 33:35–41.
- Persani L, Rossetti R, Cacciatore C.** Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol* 2010; 45: 257–279
- Picton HM.** Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 2001;55:1193-1210.
- Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC.** Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell*. 1998;1:697-705.
- Polanco J.C. and Koopman P.** *Sry* and the hesitant beginnings of male development. *Dev. Biol*. 2007; 302: 13–24
- Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME.** Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-ADN complexes. *EMBO J* 1994; 13: 6115–6124.
- Prakash GJ, Kanth VV, Shelling AN, Rozati R, Sujatha M.** Absence of 566COT mutation in exon 7 of the FSHR gene in Indian women with premature ovarian failure. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2009;105: 265–266.

**Prueitt RL, Chen H, Barnes RI, Zinn AR.** Most X;autosome translocations associated with premature ovarian failure do not interrupt X-linked genes. *Cytogenet Genome Res.* 2002;97:32-38.

**Qin Y, Bishop CE.** Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1221–1229.

**Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A.** NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *American Journal of Human Genetics* 2007;81: 576–581.

**Qin Y, Zhao H, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A.** Analysis of LHX8 mutation in premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2007;89:1012-1014.

**Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM.** NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004;305:1157-1159.

**Rannikko A, Pakarinen P, Manna PR, Beau I, Misrahi M, Aittomaki K, Huhtaniemi I.** Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Molecular Human Reproduction* 2002;8:311–317.

**Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, Lindgren P, Liu Y, Sun Q, Liu K.** Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev. Biol.* 2005; 281, 160–170.

**Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL, Josso N.** Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious development. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77:1220-1226.

**Reynaud K, Cortvrint R, Verlinde F, De Schepper J, Bourgain C, Smits J.** Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45,X karyotype. *Fertility and Sterility* 2004;81:1112–1119.

**Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, Nelson LM, Beck-Peccoz P, Persani L.** BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Human Mutation* 2009;30:804–810.

**Rozen S and Skaletsky H.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: **Krawetz S, Misener S (eds)** *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. pp 365-386

**Rubio-Gozalbo ME, Gubbels CS, Bakker JA, Menheere PP, Wodzig WK & Land JA.** Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Human Reproduction* 2010;16: 177–188.

**Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ.** The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature.* 1997;389:73-77.

**Russo A, Jeffrey P, Patten A, Massague J, Pavletich N.** Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*. 1996; 382: 325–331.

**Sato K, Uehara S, Hashiyada M, Nabeshima H, Sugawara J, Terada Y, Yaegashi N, Okamura K.** Genetic significance of skewed X-chromosome inactivation in premature ovarian failure. *Am J Med Genet*. 2004;130:240-244.

**Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S et al.** A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. 1995;268: 1749–1753.

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

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

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

**Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwasser P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G.** Two novel SRY missense mutations reducing ADN binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 862–869.

**Sebastian NT, Bystry EM, Becker NA, Maher LJ 3rd.** Enhancement of DNA flexibility in vitro and in vivo by HMGB box A proteins carrying box B residues. *Biochemistry*. 2009;48:2125-34.

**Sedgwick RP & Boder E.** Ataxia-telangiectasia. In *Handbook of Clinical Neurology*, 1991;pp 347–423. Eds P Vinken, G Bruyn & H Klawans. New York: Elsevier.

**Sekido R & Lovell-Badge R.** Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 2008; 453: 930–934.

**Sekido R & Lovell-Badge R.** Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet* 2009; 25:19–29.

**Sekido R, Bar I, Narváez V, Penny G, Lovell-Badge R.** SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* 2004; 274:271–279

**Shen J, Ingraham H.** Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 529– 540.

**Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S.** Premature ovarian failure in androgen receptordeficient mice. *PNAS*. 2005;103:224-229.

**Shiloh Y.** ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer* .2003;3:155–168.

**Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF.** The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*. 2004;25: 72–101.

**Shin I, Rotty J, Wu F, Arteaga C.** Phosphorylation of p27Kip1 at Thr-157 interferes with its association with importin alpha during G1 and prevents nuclear re-entry. *J Bio. Chem.* 2005; 280, 6055–6063.

**Shioda T, Fenner M.H, Isselbacher K.J.** Msg1, a novel melanocytespecific gene, encodes a nuclear protein and is associated with pigmentation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93, 12298-12303.

**Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-badge R & Goodfellow P.** A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1991;346: 240-244.

**Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN.** A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved ADN-binding motif. *Nature*. 1990; 346: 240–244.

**Singareddy R, Pradeep R, Chun D, Lian L, Krishna J, Wenli T, Yan S, Cyril B, Stanford LP, Philipp K, Kui L.** p27kip1 (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B) Controls Ovarian Development by Suppressing Follicle Endowment and Activation and promoting Follicle Atresia in Mice. *Mol Endocrinol*. 2007 21:2189-2202.

**Soyal SM, Amleh A, Dean J.** FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 2000;127:4645-4654.

**Speroff L, Fritz MA.** The Ovary - Embryology and Development. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Philadelphia, US: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

**Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP.** Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 1994; 372: 679–683.

**Steve Rozen and Helen J. Skaletsky.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds). 2000: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. <<http://frodo.wi.mit.edu>> [Consulta: 08 junio. 2011].

**Stewart B and Merriam J.** Dosage compensation. In *The Genetics and Biology of Drosophila*. Eds. M. Ashburner and T. R. F. Wright, eds. (New York: Academic Press). 1980. Vol 2d, pp. 107-140.

- Stewart B.R. and Merriam J.R.** In *The Genetics and Biology of Drosophila*. eds. M. Ashburner and T. R. F. Wright (London: Academic Press) 1978; Vol. 2d, p. 107
- Stokoe D.** The phosphoinositide 3-kinase pathway and cancer. *Expert Rev Mol Med*. 2005; 7, 1–22.
- Sun H.B, Zhu Y.X, Yin T, Sledge G, Yang Y.C.** MRG1, the product of a melanocyte-specific gene related gene, is a cytokine-inducible transcription factor with transformation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95, 13555-13560.
- Sundblad V, Chiauzzi VA, Andreone L, Campo S, Charreau EH, Dain L.** Controversial role of inhibin {alpha}- subunit gene in the aetiology of premature ovarian failure. *Hum. Reprod*. 2006;21:1154-1160.
- Suzuki T, Kasahara M, Yoshioka H, Morohashi K, Umesono K.** LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 238–249.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R.** Dax-1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 1998; 391:761-767
- Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G.** Mouse *Dax1* expression is consistent with a role in sex determination as well as adrenal and hypothalamus function. *Nat Genet*. 1996; 12: 404–409.
- Sybert VP & McCauley E.** Turner's syndrome. *New England Journal of Medicine* 2004.351 1227–1238.
- Takahashi K, Ozaki T, Okada M, Kurioka H, Kanasaki H, Miyazaki K.** Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 1999;71:96-101.
- Takayama K, Sasano H, Fukaya T, et al.** Immunohistochemical localization of Ad4-binding protein with correlation to steroidogenic enzyme expression in cycling human ovaries and sex cord stromal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:2815-21.
- Tedesco TA & Miller KL.** Galactosemia: alterations in sulfate metabolism secondary to galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Science* 1979;205: 1395–1397.
- Telfer EE, Gosden RG, Byskov AG, Spears N, Albertini D, Andersen CY, Anderson R, Braw-Tal R, Clarke H, Gougeon A, McLaughlin E, McLaren A, McNatty K, Schatten G, Silber S, Tsafiriri A.** On regenerating the ovary and generating controversy. *Cell*. 2005;122:821-822.
- Themmen APN & Huhtaniemi IT.** Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary–gonadal function. *Endocrine Reviews* 2000;21: 551–583.

**Thibault C, Szollosi D, Gerard M.** Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev.* 1987; 27:865-896.

**Tibiletti MG, Testa G, Vegetti W, Alagna F, Taborelli M, Dalpra` L, Bolis PF & Crosignani PG.** The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. *Human Reproduction* 1999; 14; 2731–2734.

**Tiotiu D, Mercadal BA, Imbert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, Englert Y, Vassart G, Costagliola S, Delbaere A.** Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Human Reproduction* 2010;25: 1581–1587.

**Tommerup N, Schempp W, Mienecke P, Pedersen S, Bolund L, Brandt C, Goodpasture C, Guldberg P, Held KR, Reinwein H, Saaugstad OD, Scherer G, Skjeldal O, Toder R, Westvik J, van der Hagen CB, Wolf U.** Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat Genet* 1993; 4: 170–174.

**Toniolo D.** X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Current Opinion in Genetics&Development* 2006; 16: 293–300.

**Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, Detoef M, Paniel B, Prieur M, Zorn JR et al.** New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Molecular Endocrinology* .1999;13:1844–1854.

**Toyooka Y, Tanaka SS, Hirota O, Tanaka S, Takagi N, Yamanouchi K, Tojo H, Tachi C.** Wilms' tumor suppressor gene (*WT1*) as a target gene of SRY function in a mouse ES cell line transfected with SRY. *Int J Dev Biol.* 1998; 42: 1143–1151,

**Tucker PK, Lundrigan BL.** Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. *Nature* .1993; 364: 715–717.

**Tung J, Rosen M, Nelson L, Turek P, Witte J, Cramer D, Cedars M, Reijo-Pera R.** Novel missense mutations of the Deleted-in-AZOospermia-Like (DAZL) gene in infertile women and men. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2006;4:40.

**Tyfield L, Reichardt J, Fridovich-Keil J, Croke DT, Elsas LJ, Strobl W, Kozak L, Coskun T, Novelli G, Okano Y.** Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene. *Human Mutation* 1999;13: 417–430.

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

**Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP.** Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 1999;397:405-409.

**Val P, Martinez-Barbera JP, Swain A.** Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development*. 2007;134:2349-58.

**Van Disseldorp J, Faddy M, Themmen AP, De Jong F, Peeters P, Van der Schouw Y, Broekmans F.** Relationship of serum antimullerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:2129-2134.

**Vegetti W, Grazia Tibiletti M, Testa G, de Lauretis Yankowski, Alagna F, Castoldi E, Taborelli M, Motta T, Bolis PF, Dalpra L et al.** Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases. *Human Reproduction* 1998;13:1796–1800.

**Veitia R, Gluckman E, Fellous M, Soulier J.** Recovery of Female Fertility After Chemotherapy, Irradiation, and Bone Marrow Allograft: Further Evidence Against Massive Oocyte Regeneration by Bone Marrow-Derived Germline Stem Cells. *Stem Cells*. 2007; 25:1334–1335

**Veitia R, Ion A, Barboux S, Jobling MA, Souleyreau N, Ennis K, Ostrer H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellous M, McElreavey K.** Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet*. 1997;99: 648-652.

**Viglietto G, Motti M, Bruni P, Melillo R, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsihchlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M.** Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med*. 2002; 8, 1136–1144

**Vinci G, Christin-Maitre S, Pasquier M, Bouchard P, Fellous M, Veitia RA.** FOXO3a variants in patients with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;68:495-497.

**Waggoner DD, Buist NR & Donnell GN.** Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1990;13: 802–818.

**Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G.** Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*. 1994; 79: 1111–1120.

**Wang B, Ni F, Li L, Wei Z, Zhu X, Wang J, et al.** Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor 1B mutation in Han Chinese women with premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21:212-4.

**Wang B, Wen Q, Ni F, Zhou S, Wang J, Cao Y, Ma X.** Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology* 2010;72: 135–136.

**Watkins WJ, Umbers AJ, Woad KJ, Harris SE, Winship IM, Gersak K, Shelling AN.** Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 2006;86:1518–1521.

**Weck J, Mayo KE.** Switching of NR5A proteins associated with the inhibin alpha- subunit gene promoter after activation of the gene in granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 2006;20:1090-103.

**Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson JL.** Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol.* 2003;23:8084-8091.

**Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN.** Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature.* 1993; 364: 713–715.

**Wilhelm D & Englert C.** The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes & Development* 2002; 16:1839-1851.

**Wilhelm D, Palmer S, Koopman P.** Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol Rev* 2007; 87: 1–28.

**Wilson MJ, Jeyasuria P, Parker KL, Koopman P.** The transcription factors steroidogenic factor-1 and SOX9 regulate expression of Vanin-1 during mouse testis development. *J Biol Chem.* 2005; 280: 5917– 5923.

**Wittenberger M, Hagerman R, Sherman S, McConkie-Rosell A, Welt C, Rebar R, Corrigan E, Simpson J, Nelson L.** The FMR1 premutation and reproduction. *Fertility and Sterility.* 2007;87:456-465.

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

**Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P.** The Sry-related gene Sox-9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet.* 1995; 9: 15–20.

**Wymann M, Pirola L.** Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1436: 127-150.

**Yahata T, Takedatsu H, Dunwoodie S.L, Braganca J, Swingler T, Withington S.L, Hur J, Coser K. R, Isselbacher K.J, Bhattacharya S, Shioda, T.** Cloning of mouse Cited4, a member of the CITED family p300/CBP-binding transcriptional coactivators: induced expression in mammary epithelial cells. *Genomics* 2002; 80, 601-613.

**Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL .** Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology* 2001;115: 854–866.

**Yang J, Medvedev S, Yu J, Tang LC, Agno JE, Matzuk MM, Schultz RM, Hecht NB.** Absence of the DNA-/RNA-binding protein MSY2 results in male and female infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:5755-5760.

- Yao HHC.** The Pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 230: 87-93
- Yoon S, Choi Y, Hong M, Kang B, Kim J, Min E, Kim J, Moon S.** X chromosome inactivation patterns in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2008;23:688-692.
- Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T.** The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell.* 1998;1:707-718.
- Yu J, Hecht NB, Schultz RM.** Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod.* 2001;65:1260-1270.
- Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL.** Role of *Ahch* in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet.* 1998; 20: 353–357.
- Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ERB, Meltinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G.** An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for Xlinked adrenal hypoplasia congenita. *Nature.* 1994; 372: 635–641.
- Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P.** DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature.* 1997; 390: 311–315.
- Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I.** Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol.* 2001;15:172-183.
- Zhang H, Thomsen JS, Johansson L, Gustafsson JA, Treuter E.** DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem.* 2000; 275: 39855–39859.
- Zhang J, McCauley MJ, Maher LJ 3rd, Williams MC, Israeloff NE.** Mechanism of DNA flexibility enhancement by HMGB proteins. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:1107-14.
- Zhang Q, Wang X, Wolgemuth D.** Developmentally regulated expression of cyclin D3 and its potential in vivo interacting proteins during murine gametogenesis. *Endocrinology.* 1990; 140, 2790–2800.
- Zhao GQ, Deng K, Labosky PA, Liaw L, Hogan BL.** The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev.* 1996;10:1657- 1669.
- Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, Simpson JL, Rajkovic A.** Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet.* 2008;82:1342-1348.
- Zhao H, Li Z, Cooney AJ, Lan ZJ.** Orphan nuclear receptor function in the ovary. *Front Biosci.* 2007;12:398-405

**Zhao H, Qin Y, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A.** Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2007;88:1474-1476.

**Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B.** Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 1997; 209: 377–386,

**Zhao X, Suzumori N, Yamaguchi M, Suzumori K.** Mutational analysis of the homeobox region of the human NOBOX gene in Japanese women who exhibit premature ovarian failure. *Fertility and Sterility.* 2005;83:1843- 1844.

**Zinn AR & Ross JL.** Turner syndrome and haploinsufficiency. *Current Opinion in Genetics and Development* 1998;8: 322–327.

**Zinn AR.** The X chromosome and the ovary. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2001;8: 34–36.