

IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES PROTÉICAS DE BMPR2 EN UN CONTEXTO
OVÁRICO Y ESTUDIO DE LA POTENCIAL IMPLICACIÓN DE BMPR2 p.Ser987Phe EN
LA ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA

YOHJANA CAROLINA SUAREZ USECHE

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C., OCTUBRE DE 2019

IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES PROTÉICAS DE BMPR2 EN UN CONTEXTO
OVÁRICO Y ESTUDIO DE LA POTENCIAL IMPLICACIÓN DE BMPR2 p.Ser987Phe EN
LA ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA

YOHJANA CAROLINA SUAREZ USECHE

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA

DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD, HDR

CO-DIRECTOR

DORA FONSECA MSc, PhD

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C., OCTUBRE DE 2019

NOTA DE ADVERTENCIA

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

Nota de Aceptación

Director

Co-Director

Jurado

Jurado

Bogotá, D.C. Octubre de 2019

Agradecimientos

A mis padres, y principalmente a mi madre por ayudarme con su espiritualidad y lo más importante por cuidar a Martín.

A Martín, hijo te amo y gracias por tu paciencia.

A mis hermanos, desde la distancia gracias por los mensajes de fortaleza y cariño.

Al Dr. Paul Laissue y la Dra. Dora Fonseca por la paciencia y por entregarme su experiencia y conocimiento para crecer intelectualmente durante la elaboración de esta tesis

A la Universidad del Rosario por la oportunidad que me brindaron al abrir sus puertas y poder culminar el trabajo de investigación.

Tabla de contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Justificación.....	4
4. Marco teórico	5
4.1 Foliculogénesis	5
4.2 Ovulación y luteogénesis	11
4.3 Insuficiencia ovárica primaria (IOP)	14
4.3.1. Definición	14
4.3.2. Epidemiología.....	14
4.3.3. Etiología de la IOP.....	15
4.3.4. Insuficiencia ovárica primaria sintomática.....	17
4.3.5. Insuficiencia ovárica primaria no sintomática.....	19
4.4 BMPR2	26
5. Preguntas de investigación	33
6. Objetivos	33
6.1 Objetivo general	33
6.2 Objetivos específicos	33
7. Materiales y métodos.....	34
7.1 Identificación de las potenciales proteínas de interacción con BMPR2	34
7.1.1. Ensayo de doble híbrido (<i>yeast two-hybrid system</i> , Y2H)	34
7.2 Sistema doble híbrido en células eucariotas. <i>ChakeMate™ Mammalian Two-Hybrid System</i>	37
7.2.1. Construcciones plasmídicas de BMPR2 wild type y mutante con secuencias humanas	39
7.2.2. Generación de la mutación c.2960C>T de BMPR2 mediante mutagénesis dirigida	39
7.2.3. Transformación	42
7.2.4. PCR para clonaje en pCR™4-TOPO® TA Vector.....	42
7.2.5. Clonaje del ADNc de BMPR2 wild type y mutante	44
7.2.6. Transformación.....	45
7.2.7. Digestión con enzimas de restricción	46
7.2.8. Ligación de amplicones BMPR2 WT y BMPR2 mut en el vector pACT	47
7.2.9. Transformación.....	48
7.2.10. Construcciones plasmídicas con insertos de LIMK1 y p120	48

7.2.11. PCR para el clonaje en el plásmido pCR TM 4-TOPO [®] TA Vector	50
7.2.12. Clonaje de <i>LIMK1</i> y <i>p120</i> en pCR4-TOPO y transformación bacteriana	51
7.2.13. Clonaje de los fragmentos de LIMK1 y p120 en el vector pBIND mediante digestión- ligación.	52
7.2.14. Co-transfección de las construcciones plasmídicas	52
7.2.15. Ensayo: Gen reportero luciferasa	54
8. Resultados	55
8.1 Ensayo de doble híbrido en levaduras (<i>yeast two-hybrid system</i> , Y2H)	55
8.2 Sistema de doble híbrido en células eucariotas - CheckMate TM Mammalian Two-Hybrid System con secuencias humanas.	57
9. Discusión	59
10. Perspectivas.....	63
11. BIBLIOGRAFÍA	64
12. Anexo 1.....	77
13. Anexo 2	78
14. Anexo 3	79
15. Anexo 4.....	80

Figuras

Figura 1. Figura representativa de algunos factores involucrados en la formación de las células germinales primordiales, la oogénesis y la foliculogénesis.	9
Figura 2. Cascada de señalización mediada por BMP y BMPR2.....	27
Figura 3. Mutaciones de BMPR2 validadas experimentalmente.....	28
Figura 4. Posibles mecanismos celulares y proteínas que interactúan con el dominio citoplasmático de BMPR2.....	30
Figura 5. Fundamento de sistema doble híbrido Y2H.....	35
Figura 6. Sistema CheckMateMT Mammalian Two-Hybrid System (Promega)	37
Figura 7. Mapa de los vectores pACT, pBIND y pG5luc. (Promega).....	39
Figura 8. Vector pCR TM 4-TOPO [®] TA. (Invitrogen)	44
Figura 9. Resultados expresados en URL (unidades relativas de luciferasa) en el ensayo CheckMate TM Mammalian Two-Hybrid System. *P< 0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001.	58

Tablas

Tabla 1. Categoría de las interacciones entre proteínas, según el Global PBS.....	36
Tabla 2. Condiciones para la mutagénesis.....	40
Tabla 3. Programación del termociclador para la mutagénesis dirigida	41
Tabla 4. Reacción de recombinación.....	41
Tabla 5. Primers para amplificación de BMPR2	43
Tabla 6. Condiciones de PCR para el clonaje en plásmido pCR TM 4-TOPO [®] TA	43
Tabla 7. Condiciones de clonaje en pCR4-TOPO	45
Tabla 8. Cálculos para la ligación de BMPR2 WT y BMPR2 mut en el vector pACT.....	47
Tabla 9. Condiciones de reacción de ligación de BMPR2 WT y BMPR2 mut en el vector pACT.	47
Tabla 10. Preparación de la mezcla para la síntesis de ADNc con el kit Superscript III First- strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen).....	49
Tabla 11. Primers para la amplificación de LIMK1 y p120.....	50
Tabla 12. Condiciones de PCR para el clonaje en el plásmido pCR TM 4-TOPO [®] TA Vector.....	51
Tabla 13. Cálculos para la co-transfección.....	53
Tabla 14. Proteínas identificadas en el ensayo Y2H con Categoría A(PBS) (Modificado de Hybrigenics).....	56

Anexos

Anexo 1. *p120* en humano (ENST00000361391). Las letras rojas corresponden a la secuencia que se clonó en vector pCR4-TOPO (Invitrogen), que contiene 999pb y va desde la posición 1545 hasta la posición 2543.

Anexo 2. *LIMK1* en humano (ENST00000336180.7). Las letras rojas corresponden a la secuencia que se clonó en vector pCR4-TOPO (Invitrogen), que contiene 397 pb y va desde la posición 77 hasta la posición 477.

Anexo 3. Alineamiento de *LIMK1* en humano y en ratón. En azul la secuencia de los clones reportados en el ensayo de Y2H en levaduras.

Anexo 4. Alineamiento de *p120* en humano y en ratón. En azul la secuencia de los clones reportados en el ensayo de Y2H en levaduras.

1. Resumen

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) se caracteriza por la pérdida de la función ovárica antes de los 40 años y es una de las principales causas de infertilidad en la mujer. La prevalencia de la IOP es cercana al 1% y se ha relacionado etiológicamente con eventos iatrogénicos, agentes infecciosos, condiciones autoinmunes, desórdenes metabólicos y causas ambientales. Sin embargo, la mayoría de los casos son idiopáticos. Se ha sugerido un origen genético y epigenético de la enfermedad. Hasta la fecha, se ha identificado un número limitado de mutaciones que han sido validadas por ensayos funcionales.

En el grupo investigación de la Universidad del Rosario, CIGGUR, Fonseca et al., realizaron un estudio utilizando secuenciación de siguiente generación (NGS), en 12 pacientes afectadas por IOP, identificando la mutación c.2960C>T (p. Ser987Phe) en el gen *BMPR2*. En el contexto del ovario, *BMPR2* se expresa en células de la granulosa, se une a ligandos como BMP15 Y GDF9 y participa en la vía de señalización de BMP/SMAD. Se ha sugerido una relación funcional entre esta mutación y la etiología de la IOP.

En el presente trabajo de tesis se buscaron las potenciales proteínas de interacción con *BMPR2*, mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras (Y2H), utilizando una librería de ovario de ratón. Se identificaron cuatro proteínas con una alta probabilidad de interacción: *Limk1*, *Ctnnd1*, *Fasn* y *Fnl*. Posteriormente, para la validación de los resultados se efectuó un ensayo de doble híbrido en células CHO, entre las versiones de *BMPR2 wild type*/mutante y las secuencias de *LIMK1* y *p120*. Este ensayo permitió identificar que existe una potencial interacción entre los segmentos proteicos de *LIMK1* y *BMPR2 wild type* en un contexto ovárico. Sin embargo, no se evidenció una perturbación en la interacción proteica entre *BMPR2* mutante y *LIMK1*. Respecto a *p120*, no se

logró replicar los hallazgos obtenidos en Y2H para su interacción proteica con BMPR2. Estos resultados no excluyen las posibles interacciones de BMPR2 con LIMK1 y p120. Se recomienda considerar otras técnicas de validación de interacción proteína-proteína (e.g. co-inmunoprecipitación) y evaluar los posibles efectos sobre las vías de señalización asociadas a BMPR2.

2. Introducción

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) afecta aproximadamente el 1% de las mujeres menores de 40 años. Esta enfermedad se caracteriza por niveles elevados de gonadotropinas (FSH >40UI/L), disminución de los niveles de estrógenos y amenorrea. Numerosas causas han sido consideradas, incluyendo las infecciosas, iatrogénicas, autoinmunes y genéticas. Recientes estudios han utilizado la secuenciación de siguiente generación (NGS) como una alternativa para la detección de nuevos genes candidatos para IOP. *BMPR2* es un gen que codifica para un receptor quinasa tipo II de la proteína morfogénica ósea, que se expresa en las células de la granulosa y participa en las vías de señalización SMAD. Se ha demostrado que la mutación de *BMPR2* p. Ser987Phe tiene un posible efecto sobre la localización subcelular de la proteína. En este trabajo de tesis, se realizaron estudios para identificar las posibles interacciones proteicas de *BMPR2* a través de ensayos de doble híbrido en levaduras y en células CHO. Los resultados permitieron proponer la posible interacción de *LIMK1* y *BMPR2* en un contexto ovárico.

3. Justificación

Este proyecto se enmarca en el estudio y la búsqueda de nuevos marcadores moleculares de insuficiencia ovárica primaria (IOP) de potencial uso clínico. Esta enfermedad es frecuente y podría beneficiarse de abordajes clínicos tempranos que permitan la preservación de la fertilidad. BMPR2 y sus variantes constituyen potenciales biomarcadores de la enfermedad, los cuales deben ser validados funcionalmente para su potencial uso clínico. La mutación Ser987Phe es candidata para ser validada por test in vitro.

4. Marco teórico

4.1 Foliculogénesis

La foliculogénesis se define como la transformación de pequeños folículos primordiales en folículos preovulatorios que ingresan al ciclo menstrual. La foliculogénesis se puede dividir en dos fases principales. La primera fase, denominada preantral o independiente de gonadotropina, se caracteriza por el crecimiento y la diferenciación del oocito. Está controlada principalmente por factores de crecimiento producidos localmente a través de mecanismos autocrinos y paracrinos. La segunda fase, denominada antral o dependiente de gonadotropina, se caracteriza por el aumento del tamaño del folículo (hasta aproximadamente 25-30 mm) y está regulada principalmente por la FSH, la LH y factores de crecimiento (Williams & Erickson, 2012).

En la especie humana el desarrollo folicular comienza aproximadamente en el cuarto mes de la vida intra-uterina (Baker, 1963). Las células germinales primordiales han migrado desde el endodermo del saco vitelino a la cresta gonadal en la semana séptima de gestación, sometiéndose a divisiones mitóticas. En la cresta gonadal, las oogonias inician la primera división meiótica alrededor de la semana 11-12 de gestación y se convierten en oocitos primarios. Las células somáticas que se originan en la gónada primitiva (células epiteliales superficiales, células foliculares de la granulosa y teca, células intersticiales, fibroblastos) rodean la oogonia, formando folículos ováricos rudimentarios (de 0,1 mm de diámetro) (Gougeon, 1979). Los folículos que contienen oocitos detenidos en la etapa diploteno de la meiosis I, constituyen la reserva folicular ovárica. El número de folículos que ocupan la reserva folicular se estima en aproximadamente 7 millones a las 20 semanas de gestación (Baerwald et al., 2012). El número total de oocitos disminuye a menos de 1 millón al nacer, aproximadamente 300,000 a 500,000 restantes por ovario.

Los oocitos que no están dentro de los folículos primordiales se pierden, probablemente por atresia folicular (Adhikari & Liu, 2009).

La activación o el reclutamiento inicial de los folículos primordiales se define a partir del crecimiento del propio oocito, acompañado de proliferación y diferenciación de las células de la pregranulosa. Un folículo primordial consiste en un pequeño oocito (15µ de diámetro), una capa de células escamosas de la granulosa y una lámina basal delgada que encierra ambos tipos de células (Conti & Chang, 2016). A medida que una mujer envejece, el proceso de reclutamiento continúa de forma regular hasta que se agota la reserva total de folículos primordiales, evento llamado menopausia, el cual ocurre en la mayoría de las mujeres a los ~50 años de edad (Erickson & Chang, 2007).

El proceso de transición de un folículo primordial a uno primario comienza con el cambio en la forma de las células de granulosa de una morfología escamosa a una cuboidal, lo que a su vez está asociado a una división de las estructuras de la granulosa (Gougeon, 1996). Entre los factores relacionados con el crecimiento folicular temprano, se encuentra el kit ligando, el cual es producido por las células de la granulosa, mientras que las células germinales primordiales, los oocitos y las células de teca expresan el receptor para el kit ligando, (c-kit) (Fortune et al., 2000).

Se han utilizado modelos animales, especialmente murinos, dirigidos a estudiar la vía PI3K / AKT involucrada en el crecimiento y la supervivencia celular lo que ha proporcionado algunas pistas sobre los mecanismos que controlan la transición de folículo primordial a folículo primario. Los factores locales que activan este camino no se conocen del todo (Reddy et al., 2005). En contraste, varios factores como GDF-9, BMP-7 Y BMP-15, han sido estudiados funcionalmente en varias etapas tempranas de la foliculogénesis humana (Di Pasquale et al., 2006). En ovarios de rata, se ha demostrado que BMP-7 activa la progresión del crecimiento del folículo primordial (Lee et al.,

2001). En las ovejas, pero no en ratones, BMP-15 tiene un rol esencial en la progresión folicular en etapas tempranas de la foliculogénesis y en la proliferación de las células de la granulosa. En ovinos portadores de una mutación homocigota se produce un bloqueo en la etapa primaria de la foliculogénesis e infertilidad (Hutt & Albertini, 2007). En ratones, se puede detectar GDF-9 en todas las etapas del desarrollo de los oocitos. Un knockout (KO) de *Gdf-9* en ratones, mostró un desarrollo folicular comprometido, que no avanzó más allá de la etapa primaria de la foliculogénesis (Fortune, 2003). Los hallazgos anteriores son importantes, ya que varios estudios han asociado mutaciones en BMP-15 y GDF-9 en mujeres con insuficiencia ovárica. Las mutaciones de BMP-15 se han definido como eventos genéticos mayores en la etiología de la IOP pues han demostrado un impacto funcional (Laissue, 2018; Laissue et al., 2008; Patiño et al., 2017a).

Durante la diferenciación del folículo primario, múltiples eventos toman relevancia, como la expresión de receptores de la FSH en las células de la granulosa. La evidencia en modelos animales indica que la activina producida por las células de la granulosa puede incrementar la expresión de receptores de FSH por mecanismos autocrinos (Erickson & Chang, 2007). La formación de uniones gap entre el oocito y las células de la granulosa es otro evento importante durante el desarrollo del folículo primario (Fragouli et al., 2014). Las uniones gap son formadas por una familia de proteínas llamadas *conexinas*, expresadas en etapas más tempranas del crecimiento del folículo primario. Estas uniones permiten el intercambio de moléculas de bajo peso molecular (e.g.: adenosín monofosfato cíclico (AMPC), guanosín monofosfato cíclico (GMPc)) y nutrientes entre las células de la granulosa y el oocito, los cuales son requeridos para la correcta función y el crecimiento del oocito. A medida que el oocito crece, sintetiza y secreta matriz extracelular, la zona pelúcida (ZP), que a su vez encapsula el oocito (Conti & Chang, 2016).

El oocito rodeado de una zona pelúcida completa, de 2 a 8 capas de células de la granulosa cuboidales o columnares y una capa de teca inmediatamente periférica a la lámina basal, son las características del desarrollo del folículo secundario. La teca consiste en varias capas de células de tipo fibroblastos elongados que están alrededor de todo el folículo. Este crecimiento está acompañado de angiogénesis y de una exposición del folículo a hormonas sanguíneas como LH, FSH e insulina (Feher, 2012). Las células de la granulosa o posiblemente el oocito, producen factores que dirigen este proceso. Entre los factores que se han considerado se incluyen el Kit Ligando, GDF-9, el factor de crecimiento insulina (IGF-1), IGF-2 y la activina (Magoffin & Magarelli, 1995).

Durante los estadios tardíos del crecimiento del folículo secundario, un fluido comienza a acumularse entre algunas células de la granulosa, el cual se colecciona dentro de un espacio llamado *antrum*. A partir de este momento el folículo es llamado Folículo de Graaf o folículo terciario. Este proceso es conocido como cavitación o comienzo de la formación del antrum, y es dependiente de gonadotropina (Feher, 2012). Al mismo tiempo, se produce la diferenciación de las células de la teca, que se caracteriza por un cambio en una subpoblación de células que rodean el folículo, convirtiéndose en células epiteliales y adquiriendo características funcionales endocrinas (Conti & Chang, 2016). Esta capa celular es llamada teca interna y expresa receptores de LH (LHCGR). En la periferia de la teca interna esta una capa de células fusiformes que tiene características funcionales y ultraestructurales de células del musculo liso, constituyendo la teca externa del folículo terciario. La teca externa está inervada por fibras autonómicas que parecen desempeñar una función en su contracción, la cual ha sido implicada en los procesos de ovulación y atresia (Conti & Chang, 2016).

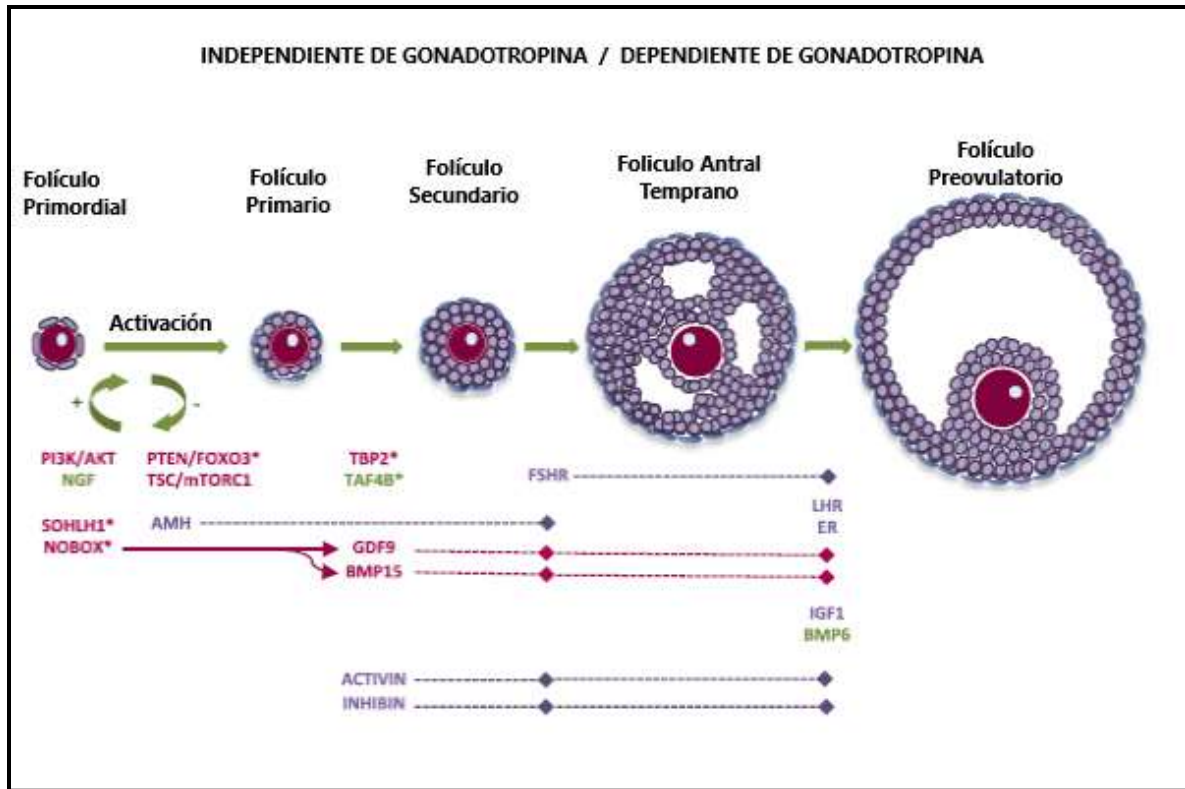


Figura 1. Figura representativa de algunos factores involucrados en la formación de las células germinales primordiales, la oogénesis y la foliculogénesis. Modificado de: (Sánchez & Smitz, 2012)

En la parte interna de la teca se encuentra la lámina basal que funciona como una barrera del tejido vascular, y también múltiples capas heterogéneas de células de la granulosa dentro de la pared del folículo. La posición de las células de la granulosa crea cuatro dominios diferentes: 1) un dominio externo o de membrana que comprende un epitelio pseudoestratificado, que hace contacto con la lámina basal; 2) un dominio interno o periantral, que hace contacto con las células de la membrana; 3) el dominio cumulus oophorus, que hace contacto con las células periantrales; y 4) un dominio corona radiata, que hace contacto con las células del cúmulo, así como con la zona pelúcida y el oocito (Conti & Chang, 2016; Erickson & Shimasaki, 2000).

Los folículos de Graff pueden ser divididos en 2 tipos: el folículo dominante (sano) y el folículo no dominante (atrésico). La principal diferencia entre ellos consiste en la presencia o no de apoptosis en las células de la granulosa. Este proceso depende de la expresión de genes específicos que conducen a la diferenciación y la proliferación de las células del folículo o que produzcan una detención del crecimiento y la activación de la apoptosis (Craig et al., 2007; Erickson & Chang, 2007). Un pequeño grupo de folículos de Graff son reclutados durante la fase luteínica de ciclo previo, en los cuales se produce un aumento de la actividad mitótica en las células de la granulosa incrementando el crecimiento del folículo dominante, mientras que la tasa de mitosis es baja en el folículo no dominante (Erickson, 2008; Gougeon, 2004).

El incremento en el plasma de la FSH es importante para la selección del folículo dominante. En mujeres, la FSH plasmática comienza a incrementarse al tiempo que la progesterona (P4), mientras que el estradiol (E2) disminuye al final de la fase lútea. El aumento de la FSH ocurre de manera paralela con la disminución de la inhibina A secretada por el cuerpo lúteo, lo que sugiere un efecto de la inhibina A en la regulación de los niveles de FSH en el plasma (McGee & Hsueh, 2000; Welt et al., 1997). El incremento de la FSH en el plasma refleja un aumento progresivo de la concentración de FSH en el líquido folicular (McNatty et al., 1975).

Como resultado, si la FSH alcanza el umbral en el microambiente folicular, esta estructura se convierte en el folículo dominante el cual continuará su crecimiento hasta llegar a la fase ovulatoria. Por el contrario, si la FSH no alcanza el umbral en el microambiente folicular, cae la tasa mitótica y se desarrollan los folículos no dominantes, los cuales avanzan a la fase de atresia (Lew, 2018).

La foliculogénesis antral se caracteriza por la participación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG), siendo la FSH esencial para proliferación de las células de la granulosa, la producción de

estradiol y la expresión de los receptores de la LH. El mecanismo celular para la biosíntesis del E2 folicular requiere de dos tipos de células (células de la teca intersticial y células de la granulosa), y dos gonadotropinas (la FSH y la LH) (Anttonen, 2005).

Las células intersticiales de la teca producen androstenediona en respuesta a la estimulación de la LH. La unión de la LH con el receptor de LH activa la vía de señalización de AMPc/PKA, que a su vez activa genes que codifican enzimas esteroidogénicas (citocromo P450 (P450c22), 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), y la P450 17 α -hidroxilasa (P450c17). El resultado final es la producción de androstenediona, la cual se acumula en altas concentraciones en el fluido folicular (Edson, Nagaraja, & Matzuk, 2009).

Los receptores de FSH ubicados en las células de la granulosa interactúan con la FSH, activando la vía de señalización de AMPc y PKA, lo cual conduce a la expresión de genes específicos que controlan la producción de estradiol, la expresión de la aromatasas de la familia P450 (*P450arom*) y la 17 α – hidroxiesteroide deshidrogenasa (*17 α -HSD*). De esta manera, las células de la granulosa del folículo dominante tienen la capacidad de convertir la androstenediona a testosterona, y posteriormente a estradiol por acción de la P450 aromatasas.

El estímulo de la FSH sobre las células de la granulosa del folículo dominante incrementa la expresión de genes específicos de receptores de LH, los cuales tienen una función importante en el proceso de la ovulación al promover la inducción de los receptores de progesterona dependiente de LH.

4.2 Ovulación y luteogénesis

El folículo preovulatorio rompe la superficie del ovario y libera el complejo cúmulo-oocito (COC) a través de un proceso denominado ovulación. Este proceso ocurre en respuesta a la oleada

preovulatoria de LH (“pico de LH”). Durante la ovulación, los oocitos experimentan una reanudación de la meiosis.

Los oocitos completamente desarrollados permanecen detenidos en la primera profase debido a la baja actividad del factor promotor de la maduración (MPF), que es un complejo formado CDK1 y ciclina B que regula la transición G2 / M del ciclo celular. La baja actividad de CDK1 en oocitos detenidos en meiosis I se mantiene mediante concentraciones relativamente altas de AMPc y GMPc (Adhikari & Liu, 2009).

El aumento de la LH en fase preovulatoria hace que el nivel de AMPc en el ovocito disminuya al bloquear la producción de GMPc en las células de la granulosa, y permitir la reanudación de la meiosis. El oocito alcanza posteriormente la segunda metafase meiótica o la primera etapa del cuerpo polar. El proceso meiótico no avanza a menos que el oocito sea fertilizado (Richards, 2018). Concomitantemente, las células de la granulosa del cúmulo experimentan una serie de cambios en la función y estructura llamados mucificación, en respuesta a la oleada preovulatoria de la LH. Las células del cúmulo comienzan a secretar grandes cantidades de ácido hialurónico en los espacios extracelulares lo que produce la dispersión de las células del cúmulo y hace que el complejo cúmulo oocito se expanda. El proceso de mucificación es fisiológicamente importante para el transporte y la fertilización del óvulo dentro de la trompa de Falopio (Dekel, Lawrence, Gilula, & Beers, 1981).

La liberación del complejo cúmulo-oocito está ligada a la producción de proteasas que degradan los tejidos ováricos en un área pequeña llamada mácula pelúcida. Estudios en animales han demostrado que la producción de P4 y prostaglandina por la pared del folículo desempeña una función importante en las actividades proteolíticas que ocurren durante la ovulación. Los datos más relevantes provienen de experimentos de ratones knockout que mostraron que las hembras

que carecían del gen para el receptor de P4 o del gen de la prostaglandina, no ovulaban y eran infértiles (Lydon et al., 1995).

Después de la ovulación, el folículo se transforma en el cuerpo lúteo. Las células intersticiales de la teca y la granulosa restantes en el folículo roto se diferencian en células del cuerpo lúteo. Esta estructura es altamente vascularizada y sirve como sitio de producción de P4 y E2 durante la fase lútea del ciclo. Los cambios importantes que se producen durante el inicio y el final del desarrollo del cuerpo lúteo constituyen un proceso denominado luteogénesis. Típicamente, este proceso se divide en dos etapas: luteinización y luteolisis (Conti & Chang, 2016).

La LH es un regulador importante de la luteinización. En respuesta a la oleada preovulatoria de la LH, los genes que codifican StAR, P450c22, 3 β -HSD y P450arom se expresan a altos niveles en las células del cuerpo lúteo. Como consecuencia, se activan vías bioquímicas que conducen a la producción de grandes cantidades de P4 y E2 (Piprek, 2016).

Si se produce la fecundación, el cuerpo lúteo aumenta de tamaño para convertirse en un cuerpo lúteo del embarazo; éste puede permanecer durante aproximadamente 6 semanas, después de lo cual disminuye su tamaño y función.

La luteólisis, o muerte del cuerpo lúteo, se produce en dos fases. La primera es funcional y se asocia con una disminución marcada en la producción de progesterona. Posteriormente continúa una fase de regresión estructural, caracterizada por la muerte celular programada de las células lúteas. El cuerpo lúteo disminuye en tamaño y eventualmente se convierte en una cicatriz conocida como cuerpo albicans (Stocco et al., 2007).

4.3 Insuficiencia ovárica primaria (IOP)

4.3.1. Definición

La insuficiencia ovárica primaria (IOP) es una patología que tiene implicaciones para la salud y el bienestar general de las mujeres, así como para su salud sexual y reproductiva. La IOP se describe como el cese prematuro de la función ovárica antes de los 40 años y se caracteriza por la ausencia de menarquia (amenorrea primaria) o 4-6 meses de amenorrea (amenorrea secundaria) y aumento de los niveles séricos de la FSH ($>40\text{IU/l}$) e hipoestrogenismo (Chapman et al., 2015).

Como consecuencia del hipoestrogenismo, la IOP se ha asociado con un mayor riesgo de osteoporosis, osteoartritis y enfermedad cardiovascular (Podfigurna-Stopa et al., 2016). Las mujeres diagnosticadas con IOP experimentan síntomas similares a la menopausia. Sin embargo, estos síntomas también están acompañados por una pérdida temprana de la fertilidad. Esta pérdida de fertilidad puede deberse a una pérdida acelerada de los folículos, a la incapacidad de los folículos restantes para responder a las señales ovulatorias, a una reserva ovárica inicialmente reducida en el momento del nacimiento o a una combinación de todas (Shelling, 2008). Puesto que el desarrollo de la IOP se produce sin signos ni síntomas tempranos, el diagnóstico de la IOP se produce en la etapa final de la enfermedad (Chapman et al., 2015).

4.3.2. Epidemiología

El riesgo de padecer insuficiencia ovárica prematura (IOP) antes de los 40 años es del 1% en la población general (Coulam et al., 1986). La IOP se relaciona con presentaciones familiares en aproximadamente el 15% de los casos, lo que sugiere la participación de factores genéticos (Franić et al., 2016). Estudios epidemiológicos han mostrado diferencias en la aparición de IOP según el

origen étnico, y es más frecuente en mujeres caucásicas, afroamericanas e hispanas (Luborsky et al., 2003).

4.3.3. Etiología de la IOP

4.3.3.1. Causas no genéticas

Causas autoinmunes: entre el 4% y el 30% de los casos de IOP están relacionados con mecanismos autoinmunes (Conway et al., 1996). Algunos casos pueden deberse a un funcionamiento anormal por parte del sistema inmunológico. El mecanismo exacto permanece desconocido, pero se ha propuesto que factores genéticos o ambientales inicien la respuesta inmune. El complejo mayor de histocompatibilidad, las citocinas, la inmunidad mediada por células y la inmunidad mediada por anticuerpos tendrían funciones importantes (Nelson, 2001.).

Existen algunas evidencias del origen autoinmune de la IOP: 1. Presencia de ooforitis linfocítica (Bakalov et al., 2005), 2. Evidencia de autoanticuerpos ováricos (para células productoras de esteroides, para la enzima 3β -HSD) (Hoek et al., 1997), 3. Varios trastornos autoinmunes se han asociado a IOP, el hipotiroidismo es el más frecuente. Otros trastornos autoinmunes de tipo endocrinos (hipoparatiroides, diabetes mellitus, hipofisitis) y no endocrinos (candidiasis crónica, púrpura trombocitopénica idiopática, vitiligo, alopecia, anemia hemolítica autoinmune, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, anemia perniciosa, artritis reumatoidea, síndrome de Crohn, cirrosis biliar primaria y hepatitis activa crónica) (Betterle et al., 2002).

Causas iatrogénicas: La quimioterapia y la radioterapia pueden conducir a IOP en pacientes que desarrollan una enfermedad maligna. La IOP iatrogénica ha aumentado con el tiempo, debido al crecimiento exitoso del tratamiento del cáncer en niños, adolescentes y mujeres en edad reproductiva y al aumento en la práctica de la ooforectomía bilateral profiláctica en el momento

de la histerectomía (Sklar, 2005). La edad del individuo, el tipo de fármaco (uso de agentes alquilantes) la dosis, y la adición de radiación al tratamiento son los principales factores predictivos en el desarrollo de la disfunción ovárica después de la quimioterapia (Oktem & Oktay, 2007). Se ha identificado un marcador bioquímico de la reserva ovárica, la hormona antimuleriana sérica (AMH), que puede ser útil para evaluar la gonadotoxicidad de los regímenes de quimioterapia (Anderson et al., 2006). En el cáncer de ovario y cervical se requiere de tratamiento quirúrgico el cual incluye salpingo-ooforectomía bilateral (SOB), lo que representa aproximadamente el 25% de los casos de IOP iatrogénica (Maclaran & Panay, 2015).

Causas infecciosas: La ooforitis producida por parotiditis se ha considerado una causa de IOP. Se desconoce la incidencia real de IOP post-oofritis. También se han descrito casos de infecciones virales y microbianas, como tuberculosis, varicela, citomegalovirus, malaria y shigella, seguidos de IOP (Ebrahimi & Akbari Asbagh, 2011).

Toxinas ambientales: el cigarrillo es la toxina más estudiada que altera la función ovárica y, en promedio, las fumadoras experimentan la menopausia más tempranamente que las no fumadoras, lo que sugiere un posible efecto perjudicial sobre la función ovárica (Di Prospero et al, 2004).

4.3.3.2. Causas genéticas

La identificación de casos familiares con IOP indica una potencial relación de los trastornos genéticos en su patogénesis (Rudnicka et al., 2018). Además de los defectos genéticos de origen cromosómico principalmente en las regiones del X, también se ha descrito la participación de los cromosomas autosómicos. Además, varios mecanismos genéticos implicados en la fisiopatología de IOP afectan el proceso de meiosis. Las causas genéticas de la IOP pueden conducir a insuficiencia ovárica causando una disminución en la cantidad de folículos primordiales, un

aumento de la atresia de los folículos ováricos debido a la apoptosis, o falla de la maduración folicular (Goswami & Conway, 2005).

4.3.4. Insuficiencia ovárica primaria sindrómica

Síndrome de Turner

Es el defecto cromosómico más común en los humanos, caracterizado por la ausencia completa o parcial de un cromosoma X. El síndrome de Turner afecta 1:2,500 mujeres nacidas vivas. La monosomía (45,X) está presente en aproximadamente el 45% de los casos, mientras que el resto muestra una variedad de quimeras y anomalías estructurales (Yang, 2017). Este síndrome conduce a disgenesia ovárica caracterizada por amenorrea primaria, baja estatura y otras características fenotípicas como cuello corto y tórax ancho. En las mujeres con síndrome de Turner, la pérdida de oocitos generalmente comienza en la niñez como resultado de la atresia folicular acelerada (Chapman, 2015). La tasa de mortalidad para los pacientes con síndrome de Turner es mayor que la de las personas normales debido a la mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares y autoinmunes (Ebrahimi & Akbari Asbagh, 2011).

Galactosemia

Es un trastorno autosómico recesivo debido a la deficiencia en la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT). Estos pacientes desarrollan daños hepatocelulares, oculares, renales y neurológicos como resultado de la acumulación de galactosa y sus metabolitos. La complicación más común a largo plazo reportada en niñas y mujeres con deficiencia de GALT es la IOP, con una incidencia del 80%-90% (Fridovich-Keil et al., 2011). La fisiopatología del daño ovárico en la galactosemia puede deberse al efecto tóxico de la galactosa (o uno de los metabolitos) en las estructuras foliculares, a la disminución del número inicial de oogonias durante la vida fetal, a la

atresia folicular acelerada después del nacimiento y antes de la pubertad, y a la función defectuosa de las gonadotropinas. El mecanismo relacionado con la insuficiencia ovárica no se ha establecido en pacientes con galactosemia e IOP (Rudnicka et al., 2018).

Síndrome de X frágil

Es un trastorno hereditario dominante ligado al cromosoma X, con penetrancia incompleta y una prevalencia de 1/4000 en hombres y 1/6000 en mujeres. Es la forma más común de discapacidad intelectual hereditaria y es causada por un incremento de las repeticiones del trinucleótido CGG en la región 5' UTR del gen *FMRI* (Fragile X mental retardation 1), el cual se localiza en Xq27.3 (Ebrahimi & Akbari Asbagh, 2011). En individuos normales existen aproximadamente 45 repeticiones de CGG, mientras que 200 repeticiones se considera una mutación completa que conduce al silenciamiento completo de *FMRI*, debido a la hipermetilación de la región regulatoria causando el síndrome de X frágil. La cantidad de repeticiones dentro del rango de 55–199 se conoce como premutación y se asocia con un mayor riesgo de sufrir IOP (Chapman et al., 2015). Entre las mujeres portadoras de la premutación, aproximadamente 15% al 24% tiene IOP (Mailick et al., 2014).

El mecanismo que conduce a la IOP en el X frágil aun no es claro. A medida que aumenta la longitud de la premutación, se incrementa un efecto de silenciamiento de la transcripción y disminución o ausencia de la proteína resultante FMRP. Se ha demostrado en estudios de expresión de FMRP en ovarios fetales que la proteína está altamente expresada en células germinales del ovario fetal (Rifé et al., 2004). Por lo tanto, FMRP puede desempeñar una función en la proliferación de la oogonia y la determinación del tamaño de la reserva ovárica. Otro mecanismo propuesto es el efecto tóxico acumulativo que pueden ejercer las premutaciones en

las células de la granulosa , lo que conduce a un aumento de la tasa de atresia folicular en la vida reproductiva de una mujer (Rossetti et al., 2017).

Síndrome Blefarofimosis-Ptoxis-Epicanto inverso (BPES)

Esta es una condición autosómica dominante para la cual se han descrito dos tipos: en el tipo 1 las anomalías palpebrales están asociadas con infertilidad femenina debido a anomalías en los ovarios y menopausia precoz. En el tipo 2, solamente se observan anomalías palpebrales. El gen *FOXL2* (*forkhead box L2*) localizado en 3q23, se expresa principalmente en las células de la granulosa de los ovarios desde la embriogénesis hasta la vida adulta. Mutaciones en el gen *FOXL2* fueron identificadas en los dos tipos de BPES (Crisponi et al., 2001). *FOXL2* cumple una función en la diferenciación celular de la granulosa, lo cual está respaldado por estudios in vitro que muestran su expresión en células indiferenciadas. En modelos murinos *knockout* para *Foxl2*^{-/-} se evidenció una ausencia de la diferenciación de células de la granulosa, lo que condujo a la activación y reducción prematura de los folículos primordiales (Uda et al., 2004).

4.3.5. Insuficiencia ovárica primaria no sindrómica

FSHR y LHCGR

Los receptores de la FSH y la LH pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), los cuales tienen una función importante en el reclutamiento y el desarrollo de los folículos ováricos durante la foliculogénesis. Los genes *FSHR* y *LHCGR* se localizan en 2p16.3. Las mutaciones de pérdida de función que afectan a estos receptores causan resistencia a las gonadotropinas con hipogonadismo hipergonadotrófico (Laissue, 2018; Themmen & Huhtaniemi, 2000)

Se reportó una mutación *missense* homocigota p.A189V localizada en el dominio extracelular de *FSHR* que causa amenorrea primaria, hipogonadismo hipergonadotrópico y ovarios hipoplásicos con crecimiento folicular deteriorado. Sin embargo, esta mutación parece ser particularmente frecuente en la población finlandesa, como resultado de un efecto fundador. En los estudios *in vitro*, el receptor mutante mostró una importante reducción de la capacidad de unión y de transducción de la señal, lo que provocó una resistencia completa a la FSH (Aittomäki et al., 1995).

Otras mutaciones en diferentes regiones del gen *FSHR* han sido reportadas en mujeres con el fenotipo clásico de insuficiencia ovárica prematura (Doherty et al., 2002; Meduri et al., 2003; Touraine et al., 1999). Las variantes homocigotas del gen *LHCGR* son una causa rara de IOP en mujeres con cariotipo 46, XX. Se caracterizan por presentar hipogonadismo hipergonadotrópico caracterizado por niveles de LH más altos que los de la FSH (Latronico et al., 1996). La resistencia a la LH causa un fenotipo de IOP caracterizado por oligomenorrea o amenorrea secundaria y la presencia de múltiples folículos en diferentes etapas de maduración que no llegan a la etapa de ovulación (Goswami & Conway, 2005; Rossetti et al., 2017).

FIGLA

El gen *FIGLA* (*factor in the germline α*) localizado en el cromosoma humano 2p13.3, codifica una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción bHLH (*basic helix-loop-helix*), la cual regula múltiples genes específicos de los oocitos principalmente durante la formación del folículo primordial y de la zona pelúcida (glucoproteínas ZP1, ZP2, ZP3) (Huntriss et al., 2002; Laissue, 2015b). Las proteínas bHLH son un grupo de factores de transcripción que específicamente se unen a una secuencia consenso (CANNTG) llamada E-box, localizada en la zona promotora de genes específicos (Han Zhao et al., 2008). *FIGLA* se expresa en los folículos primordiales en

humanos y en ratones. La proteína se une al E-box de la región promotora de los genes de la zona pelúcida ZP para promover su transcripción (Bayne et al., 2004; Liang et al., 1997).

En los modelos murinos knockout para *Figla*, la formación de los folículos primordiales es reducida y existe una pérdida rápida de oocitos después del nacimiento. Las hembras son estériles, mientras que los machos no se ven afectados (Huntriss et al., 2002; Soyal et al., 2000). El fenotipo de falla ovárica en el ratón sugirió que *FIGLA* podría ser un candidato de IOP en humanos (Huntriss et al., 2002; Han Zhao et al., 2008). En un estudio, efectuado en 100 mujeres chinas con diagnóstico de IOP, se realizó la amplificación por PCR y secuenciación del gen *FIGLA*, identificando 3 nuevas variantes heterocigotas. Entre las variantes identificadas se encontraba la mutación p.Asn140del, de la cual se realizó análisis funcionales en los que se demostró que la mutación limitaba la interacción de *FIGLA* con TCF3-HLH (Zhao et al., 2008). Esta interacción es importante para la formación de heterodímeros que posteriormente se unen a la E-box de la región promotora del gen *ZP2* humano (Bayne et al., 2004).

NOBOX

El gen *NOBOX* (*newborn ovary homeobox*), localizado en el cromosoma 7q35 en la especie humana, codifica un factor de transcripción que contiene un dominio proteico denominado homeodominio (homeobox), altamente conservado con la de los roedores (Suzumori et al., 2002). *NOBOX* se une a segmentos de ADN localizados en la región promotora de los genes blanco, para regular la expresión de otros genes específicos del oocito, además de ser esencial para la foliculogénesis (Rajkovic et al., 2004; Suzumori et al., 2002).

Se han descrito algunos genes involucrados en el desarrollo folicular que son regulados de forma indirecta o directa por *Nobox*, entre los que se encuentran: *Gdf9*, *Bmp15*, *Pou5f1*, *Oog1*, *Pad6*, *Oospl*,

Jag1 y *Ast1* (Paul Laissue, 2015a; Rajkovic et al., 2004). Ratones hembras knockout para *Nobox*^{-/-} recién nacidos, mostraron una cantidad normal de células germinales y de folículos primarios, los cuales no progresaron a las siguientes etapas de maduración durante el periodo postnatal, lo que condujo a una disminución prematura de los folículos y a infertilidad (Laissue, 2018; Rajkovic et al., 2004).

En un estudio en el que se secuenció el gen *NOBOX* en un grupo de 96 mujeres americanas con diagnóstico de IOP, se identificó 2 mutaciones tipo *missense* en el homeodominio: p.Arg355His y p.Arg360Gln (Qin et al., 2007). Estudios funcionales confirmaron que la mutación p.Arg355His genera alteraciones en la unión del homeodominio de *NOBOX* con los elementos de unión de ADN de los genes blanco (Qin et al., 2007).

En una cohorte de 178 mujeres con diagnóstico de IOP, en la que se realizó la secuenciación directa de *NOBOX*, se identificaron 19 variantes, de las cuales 5 demostraron un efecto sobre la unión y la transactivación del promotor de *GDF9* (Bouilly et al., 2011). Así mismo, se planteó que la haploinsuficiencia podría ser el mecanismo genético responsable de la IOP (Bouilly et al., 2011).

NR5A1

El gen *NR5A1* (*nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*), codifica para un factor de transcripción llamado SF-1 (steroidogenic factor 1), localizado en el cromosoma 9q33.3. *NR5A1* es un factor de transcripción perteneciente a una superfamilia de receptores nucleares, el cual se une al promotor de múltiples genes involucrados en la diferenciación gonadal y en la modulación de la esteroidogénesis a través del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal/ovario (Paul Laissue, 2015b; Lourenço et al., 2009). SF-1 tiene una estructura que incluye, en la región N-terminal un dominio de unión al ADN de tipo dedos de zinc, una A-box, un dominio de unión a ligandos, una región

rica en prolina y un dominio de activación AF-2 ubicado en la región C-terminal de la proteína (Paul Laissue, 2015a). *SF-1* se expresa durante la vida fetal y adulta en tejidos como la corteza de la suprarrenal, en las células de Sertoli, en las células de Leydig y en el ovario en las células de la granulosa, en las células de la teca y en el cuerpo lúteo, en la hipófisis, el hipotálamo y en el hipocampo (Schimmer & White, 2010).

SF-1 regula la transcripción de importantes genes involucrados en el desarrollo sexual y la reproducción, como *STAR*, *CYP17A1*, *CYP11A1*, *LHB*, *AMH*, *CYP19A1*, *INHA NR0B1*, *3 β -HSD*, *SCP-2*, *HDL-R* y *NP-C1* (Paul Laissue, 2015a; Lourenço et al., 2009). Modelos knockout para *Sf-1* mostraron en ratones recién nacidos, agenesia gonadal y de las glándulas suprarrenales, disminución de la expresión de las gonadotropinas, letalidad a los 8 días de nacidos por insuficiencia suprarrenal (Zhao et al., 2007). En otro modelo de ratón knockout de *Sf-1* se observó una marcada disminución de la expresión de *SF-1* específicamente en las células de la granulosa, lo que condujo a una disminución en el número de oocitos, ausencia de cuerpo lúteo y aun a hipoplasia de los ovarios, seguido de infertilidad (Pelusi et al., 2008).

Se han identificado mutaciones de *SF-1* en pacientes con diagnóstico de insuficiencia suprarrenal primaria, disgenesia gonadal 46,XX y 46, XY (Ferraz-de-Souza et al., 2011; Laissue, 2015b). Posteriormente, se identificaron varias mutaciones en *NR5A1* causales de IOP, las cuales se encontraron en mujeres con amenorrea primaria o secundaria: una mutación puntual heterocigota (c.3G>A) y otra homocigota (c.877G>A) y dos deleciones heterocigotas (c.390delG y c.666delC). Estas dos deleciones conducen a una proteína truncada de 295 aminoácidos que carece del dominio de unión a ligandos y el dominio AF-2 (Lourenço et al., 2009). Otros estudios han

descrito mutaciones en *NR5A1* en mujeres con IOP, pero solo algunas de ellas han sido validadas a través de estudios funcionales (Camats et al., 2012).

BMP15

BMP15 (también conocido como *GDF9B*), está localizado en el cromosoma Xp11.22. Codifica para una proteína que pertenece a la familia de factores de crecimiento TGF- β . *BMP15* (*bone morphogenetic protein 15*) está involucrada en la regulación de la foliculogénesis y la ovulación. Puede considerarse como uno de los factores más importantes en la biología del ovario y la fertilidad de los mamíferos (Chang et al., 2002; Laissue, 2018). *BMP15* es expresado en el oocito desde las etapas tempranas de la foliculogénesis participando en el desarrollo folicular, en el crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa (Laissue, 2015b; Persani et al., 2014; Shimasaki et al., 2004).

BMP15 es sintetizado como una molécula precursora inactiva (pre-propéptido) que contiene un péptido señal en la región de N-terminal seguido de un prodominio (propéptido) y un dominio maduro en la región de C-terminal (Chang et al., 2002; Persani et al., 2014). Durante la síntesis, el prodominio conduce el plegamiento y la dimerización de la región madura (Hashimoto et al., 2005). Luego del clivaje del péptido maduro, *BMP15* es secretado extracelularmente desde el oocito para posteriormente unirse a los receptores tipo I (ALK6) y tipo II (BMPRII) en la superficie de las células de la granulosa (Moore et al., 2003; Patiño et al., 2017c; Persani et al., 2014). La unión al receptor produce la activación de la vía de señalización intracelular Smad1/5 y la expresión de genes como *Ptx3*, *Has2*, and *Ptgs2* involucrados en la expansión de las células del cumulus (Moore et al., 2003; Liliana C. Patiño et al., 2017; Peng et al., 2013).

BMP15 se co-expresa con GDF9, un factor que también pertenece a la familia de TGF- β y es sintetizado por el oocito, y participa conjuntamente en la foliculogénesis. Existe evidencia de interacciones sinérgicas entre BMP15 y GDF9 a nivel genético, bioquímico y funcional (Mottershead et al., 2015; Patiño et al., 2017a). BMP15 puede formar homodímeros (BMP15:BMP15) o heterodímeros (BMP15:GDF9). Se ha demostrado que en humanos los heterodímeros tienen mayor potencial regulador sobre las funciones de las células de la granulosa (Peng et al., 2013). Los heterodímeros BMP15:GDF9 requieren un complejo de señalización (BMPRII, ALK4/5/7, ALK6) con el cual se unen los heterodímeros y estimulan la fosforilación de SMAD2/3 regulando genes blanco (Laissue, 2015a; Peng et al., 2013).

Se ha demostrado que las mutaciones de *BMP-15* y *GDF-9* en diferentes especies de mamíferos conducen a diferentes fenotipos (Juengel et al., 2004; Shimasaki et al., 2004). En modelos animales se demostró por primera vez la importancia de BMP15 en la foliculogénesis y su participación como una probable causa de patologías ováricas. La identificación de mutaciones en *BMP15* en ovejas mostró fenotipos de infertilidad en estado homocigotos, mientras que los portadores heterocigotos mostraron mayores tasas de ovulación y un aumento en el número de las crías (Galloway et al., 2002; Raffaella Rossetti et al., 2009).

La primera mutación en el gen *BMP15* en humanos fue identificada en dos hermanas con insuficiencia ovárica caracterizada por amenorrea primaria y disgenesia ovárica. La mutación heterocigota c.704A>G (p.Tyr235Cys), mostró un efecto dominante negativo comprometiendo la proliferación de las células de la granulosa en humanos (Di Pasquale et al., 2004). Hasta la fecha han sido identificadas numerosas mutaciones en BMP15 pero únicamente algunas se han validado como etiología de IOP (Laissue, 2015b; Patiño et al., 2017a; Persani et al., 2014).

4.4 BMPR2

Los receptores de proteínas morfogénicas óseas (BMPR) pertenecen a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β). Estos receptores transmembranales serina/treonina quinasa están divididos en dos grupos: tipo I (BMPR1) y tipo II (BMPR2) (Machado et al., 2003). El gen de *BMPR2* está localizado en el cromosoma 2q33, el cual contiene 13 exones y codifica para una proteína de 1038 aminoácidos. BMPR2 está formada por un dominio de unión a ligandos extracelular, un dominio transmembrana y un dominio serina/treonina quinasa intracelular. Además, contiene una larga cola citoplasmática que es una característica única entre los receptores TGF- β (Machado et al., 2006).

BMPR2 es expresado en varios tejidos y órganos como el endotelio vascular pulmonar, músculo liso vascular pulmonar, cerebelo, hipocampo, glándula tiroides, corazón, hígado, páncreas y riñón. Adicionalmente, en el ovario BMPR2 se expresa en células de la granulosa (Kim et al., 2017; Shimasaki et al., 2004). BMPR2 es el receptor de las proteínas morfogénicas óseas, (BMPs), las cuales regulan el crecimiento y diferenciación celular, la apoptosis en diferentes líneas celulares (células mesenquimales y epiteliales) y participan en procesos como el mantenimiento y reparación de tejidos y la embriogénesis (Morrell, 2006).

BMPR2 tiene una mayor respuesta a ligandos específicos como: BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-15, GDF-9, GDF-5 y GDF-6. En general, se ha reportado que los heterodímeros de BMP son más potentes activadores de la vía de señalización que los homodímeros. La unión de BMPs con BMPR2, produce la fosforilación del receptor de tipo I, formando un complejo receptor que, a su vez, activa el proceso de señalización intracelular a través de la fosforilación de las proteínas R-SMAD, es decir, SMAD1, SMAD5 o SMAD8 (Gomez-Puerto et al., 2019). R-SMAD forma un complejo con Smad4 (Co-SMAD) el cual funciona como un activador de transcripción al

localizarse en el núcleo donde el complejo regula la transcripción de varios genes diana a través de su asociación con otros factores de transcripción (Kim et al., 2017; Zilberberg et al, 2007).

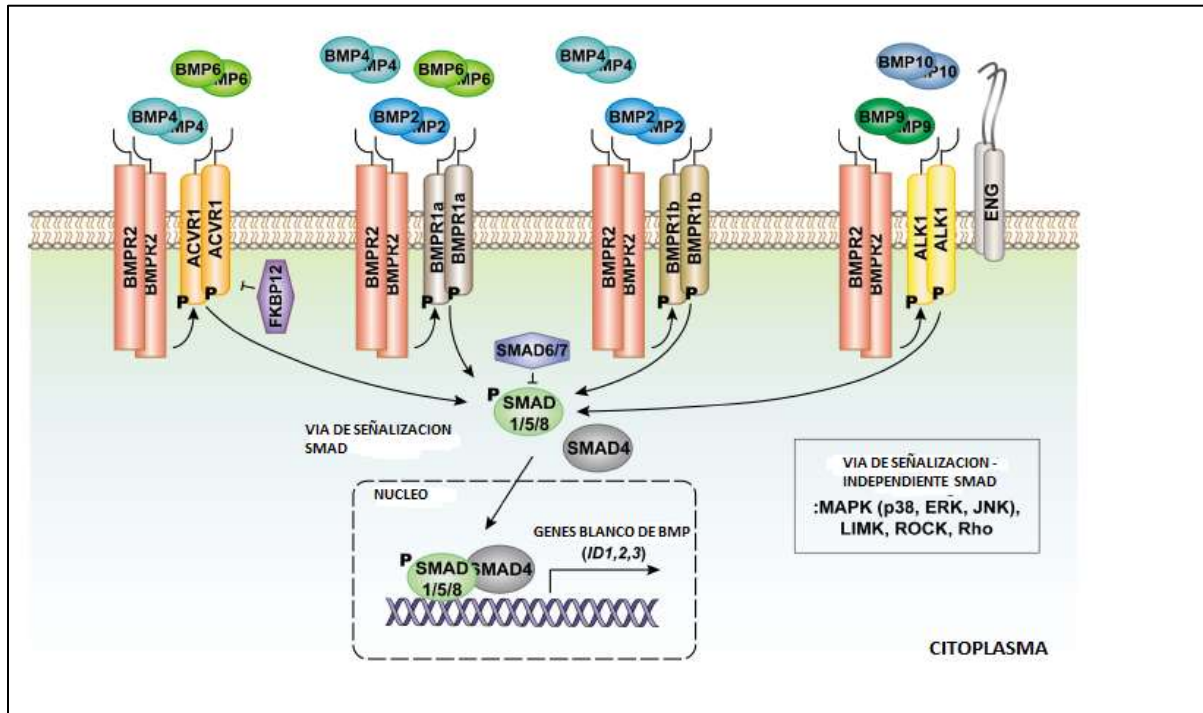


Figura 2. Cascada de señalización mediada por BMP y BMPR2. Modificado de (Kim et al., 2017))

Por el contrario, las rutas de señalización de TGF- β y activina reclutan a Smad2 y Smad3, los cuales pueden formar complejos heteroméricos con Smad4. Una característica importante es la activación de factores independientes de la vía de señalización de SMAD como son MAPK, LIMK, ROCK, Rho, que regulan la transcripción de genes que intervienen en la diferenciación y el crecimiento celular (Machado et al., 2006).

La identificación de variantes del gen *BMPR2* ha tomado gran relevancia dado su posible relación con enfermedades como Hipertensión pulmonar, cáncer, obesidad entre otras. Se han encontrado mutaciones sinónimas, sin sentido, cambio del marco de lectura, mutaciones del sitio de corte y

empalme, lo cual puede resultar en algunos casos en la alteración en la señalización mediada por BMPR2 (Wang et al., 2014). Las mutaciones de *BMPR2* han sido encontradas en un 75% de los pacientes con Hipertensión pulmonar hereditaria (HPH) y solo en un 15% de los pacientes con Hipertensión pulmonar idiopática (HPI). La HPH ha sido definida como una enfermedad autosómica dominante con penetrancia incompleta. Solo un 20% de las personas que tienen una mutación en el gen *BMPR2* desarrollan HPH, lo que sugiere que se requieren de otros factores genéticos, y la presencia de agentes ambientales para desarrollar la enfermedad (Kim et al., 2017).

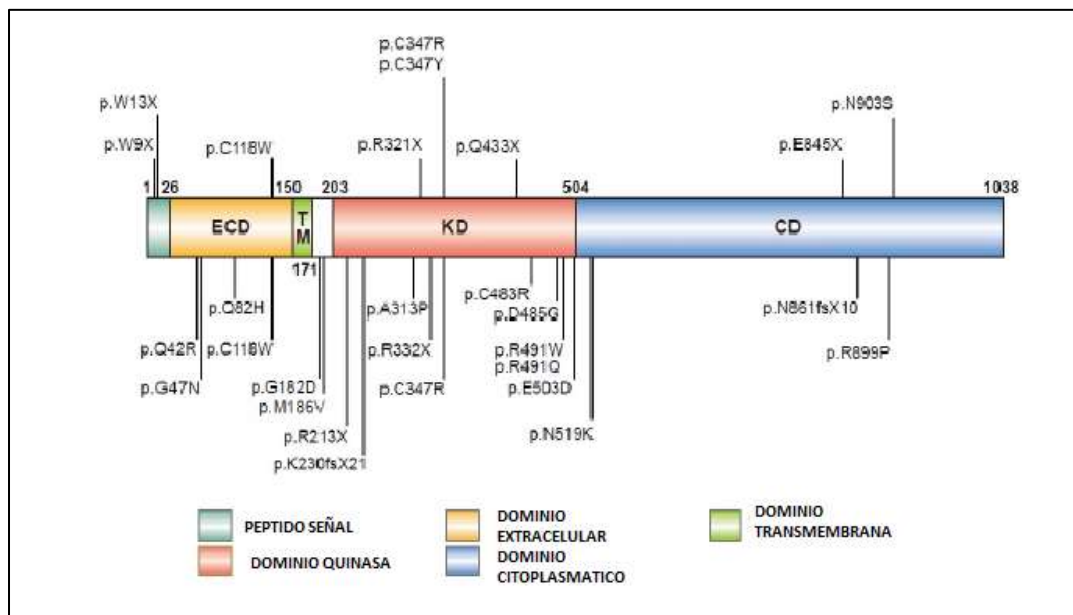


Figura 3. Mutaciones de *BMPR2* validadas experimentalmente. Modificado de (Kim et al., 2017).

Las mutaciones en *BMPR2* están localizadas con mayor frecuencia en el dominio de unión del ligando y en el dominio quinasa. Hasta hoy en día, se han reportado aproximadamente 400 mutaciones en pacientes con hipertensión pulmonar primaria (HPP) y solo algunas han sido validadas mediante ensayos funcionales. La mayoría de estos ensayos han reportado que las

mutaciones de *BMPR2* existen alteraciones en la cascada de señalización mediada por SMAD (Kim et al., 2017; Machado et al., 2006)

Se ha demostrado en estudios previos la importancia de la cola citoplasmática del receptor *BMPR2* en la interacción con otras proteínas. En el caso de *LIMK1*, por medio de experimentos de inmunoprecipitación, se demostró que mutaciones en esta región de *BMPR2*, relacionadas a HPP, pueden alterar de forma parcial o total la interacción entre estas dos proteínas (Foletta et al., 2003). En el análisis de las funciones de la cola citoplasmática de *BMPR2* se ha tratado de establecer su relación con la vía de señalización SMAD. Investigadores compararon la actividad transcripcional de *BMPR2* dependiendo de la ubicación de la mutación en los diferentes dominios, encontrando que hay una pérdida de la actividad transcripcional relacionada con las mutaciones en los dominios extracelular y quinasa, mientras que en las mutaciones del dominio citoplasmático, se mantiene la actividad de la proteína pero con menos eficiencia en comparación con *BMPR2 wild type* (WT) (Nishihara et al, 2002).

Se ha identificado otro tipo de proteínas que interactúan con el dominio citoplasmático de *BMPR2*, utilizando como metodología la electroforesis en gel bidimensional y la espectrometría de masas. Se identificaron aproximadamente 11 proteínas que se encontraron en interacción con el dominio citoplasmático, sugiriendo que este dominio puede tener una función de sitio de acoplamiento para múltiples proteínas regulatorias de vías de señalización independiente de SMAD (Hassel et al., 2004). En otros estudios funcionales, se utilizó como método un ensayo de doble híbrido en levaduras, el que se identificó una nueva interacción entre el dominio citoplasmático de *BMPR2* y la proteína *Tctex-1*. Estos dos factores están localizados en el endotelio y el músculo liso vascular, por lo que se han relacionado en la fisiopatología de HPH (Machado et al., 2003).

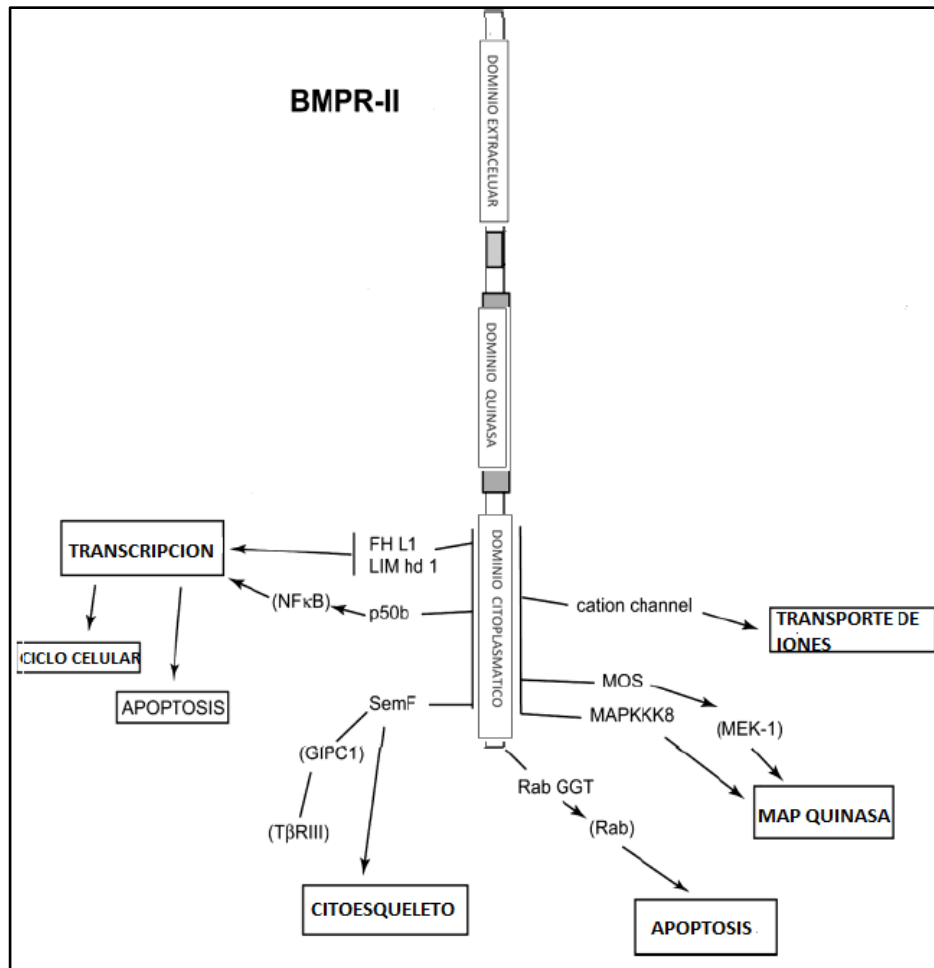


Figura 4. Posibles mecanismos celulares y proteínas que interactúan con el dominio citoplasmático de BMPR2. Modificado de (Hassel et al., 2004)

En otras patologías, se ha demostrado una importante relación entre las mutaciones de BMPRs y la progresión de algunos tipos de cáncer. Las alteraciones en la expresión de estos receptores se relaciona con un pobre pronóstico en pacientes con cáncer de próstata y colon, aunque el mecanismo relacionado es un poco conocido (Gomez-Puerto et al., 2019). Las vías de señalización de BMPs se han relacionado igualmente con el control de la diferenciación de los adipocitos, por lo que BMPR2 fue propuesto en la fisiopatología de la obesidad (Kim et al., 2017).

En el contexto del ovario, un estudio de Fonseca et al., 2015, en 12 mujeres afectadas por IOP, se utilizó la secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés *Next Generation Sequencing*) de 70 genes candidatos. Se identificaron varias mutaciones, una de ellas en el gen *BMPR2*, en una paciente de 37 años con amenorrea secundaria y sin signos clínicos ni paraclínicos de hipertensión pulmonar primaria.

En este estudio, en cual participé durante mis actividades de la presente tesis de maestría, se realizaron predicciones de patogenicidad (SIFT y PolyPhen2) de esta variante, la cual sugirió un posible efecto deletéreo. No se encontró esta variante en el grupo control y su frecuencia alélica mínima fue menor del 1% ($MAF < 0.01$). Además, en el alineamiento de las secuencias proteicas con diferentes especies de vertebrados, se observó que la mutación *BMPR2* p.Ser987Phe afectaba un residuo altamente conservado durante la evolución (Fonseca et al., 2015). En la paciente afectada por mutación *BMPR2* c.2960C>T se identificó una variante en el gen *LHCGR* c.296A>G con una baja predicción de patogenicidad. Al estudiar la segregación familiar, se evidenció que únicamente la paciente con IOP portaba las dos mutaciones *BMPR2* c.2960C>T y *LHCGR* c.296A>G, y que los miembros de la familia son portadores sanos de cada una de las mutaciones. Esto sugirió que las dos variantes podrían tener un efecto aditivo.

Estudios funcionales posteriores, se focalizaron en la evaluación del posible efecto deletéreo sobre la localización subcelular de la mutación p. Ser987Phe en *BMPR2* en células CHO (células de ovario de hámster chino). Se identificó que esta mutación conduce a una localización anormal y a una retención de *BMPR2* mutante en el retículo endoplásmico, lo que podría ser el resultado de una alteración de la conformación tridimensional y el plegamiento de la proteína (Patiño et al., 2017a). Lo anterior puede estar asociado igualmente a una alteración en la interacción del dominio citoplasmático de *BMPR2* con otras proteínas, afectando la vía de señalización intracelular

SMAD, contribuyendo con la etiología de la IOP (Foletta et al., 2003; Fonseca et al., 2015; Machado et al., 2003; Patiño et al., 2017)

Por último, es importante señalar que numerosas publicaciones del Centro de investigación en Genética y Genómica de la Universidad del Rosario fundamentan y complementan los abordajes teóricos y experimentales citados en el trabajo presentado (Caburet et al., 2012; Carlosama et al., 2017, 2018; Delcour et al., 2019; Fonseca et al., 2014, 2015; Fonseca, Garzón, et al., 2012; Fonseca, Ojeda, et al., 2012; Laissue, L'Hôte, et al., 2009; Laissue, 2015a, 2018; Laissue et al., 2016; Lakhal et al., 2008; Lakhal et al., 2009, 2010; Ojeda et al., 2011; Patiño et al., 2017; Patiño et al., 2017, 2019; Patiño et al., 2017; Prada y Laissue, 2014; Quintero-Ronderos et al., 2017, 2019, Quintero-Ronderos y Laissue, 2018, 2019; Vatin et al., 2012, 2014).

5. Preguntas de investigación

- ¿Cuáles son las posibles proteínas que interactúan con el dominio citoplasmático de BMPR2 en el contexto ovárico?
- ¿Puede la mutación p. S987F en BMPR2 alterar la interacción proteína-proteína, contribuyendo con la etiología de la IOP?

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Identificar potenciales proteínas de interacción de BMPR2.

6.2 Objetivos específicos

- Establecer si las nuevas interacciones proteicas de BMPR2 se producen en tejido ovárico
- Determinar si la mutación p. Ser987Phe en BMPR2 afecta la interacción con sus *partners* proteicos.

7. Materiales y métodos

7.1 Identificación de las potenciales proteínas de interacción con BMPR2

7.1.1. Ensayo de doble híbrido (*yeast two-hybrid system*, Y2H)

El sistema de doble híbrido en levaduras (Y2H), se desarrolló por primera vez en 1989, se realiza *in vivo*, siendo un método útil y sensible para detectar proteínas de interacción estable, débil y transitoria (Fields & Song, 1989; Lin & Lai, 2017). Este sistema se basa en la detección de una interacción entre dos proteínas mediante la reconstitución funcional de un factor de transcripción que activa uno o más genes reporteros. Un factor de transcripción contiene un dominio de unión al ADN (DBD, *DNA-binding domain*) y un dominio de activación (AD, *activation domain*). En un típico sistema de doble híbrido, una proteína “X” de la cual se quiera determinar su interacción con otras proteínas, es fusionada al DBD del factor de transcripción Gal4 de la levadura, es lo que se define como *bait*. Los fragmentos de proteínas derivados de las librerías de cDNA son fusionados a AD de Gal4, es lo que se denomina *prey*. El DBD puede unirse a la secuencia de activación corriente abajo (UAS, *upstream activating sequence*) de un promotor que solo puede activarse con la presencia de un AD. La interacción entre el *bait* y el *prey* reconstruye el factor de transcripción funcional que activará la expresión de gen reportero. Un gen reportero comúnmente utilizado es *His3*, el cual codifica para una enzima que sintetiza la histidina. Si se expresa hay crecimiento de colonias en medios de cultivo carentes de histidina. A partir de estas colonias se realiza extracción de ADN que posteriormente es

secuenciado y analizado para identificar una parte de la secuencia del ADN que codifica la proteína de interacción (*partner*)(Mehla et al., 2015).

El Y2H es un sistema complementario de métodos bioquímicos como la co-inmunoprecipitación, seguido por un análisis con western o espectrometría de masas que permite incrementar la precisión en la determinación de las interacciones (Lin & Lai, 2017).

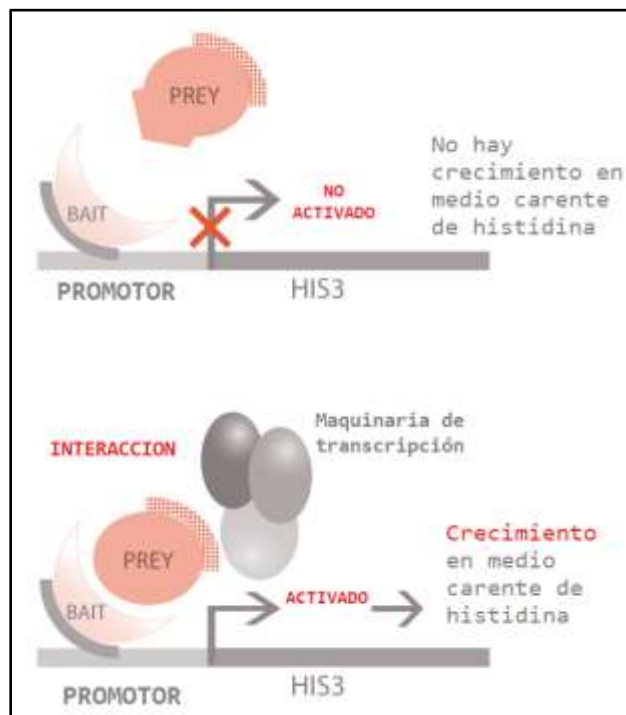


Figura 5. Fundamento de sistema doble híbrido Y2H. Modificado de (*Hybrigenics*)

El ensayo de Y2H, en el cual yo participé durante el presente trabajo de tesis, se encuentra descrito en la tesis de Daniel Silgado, el cual se realizó en el laboratorio *Hybrigenics*, en París, Francia (Silgado, 2017). En estos experimentos se utilizaron, el fragmento para el *bait*, parte del dominio C-terminal de Bmpr2 de ratón (*Mus Musculus*) que corresponde a los nucleótidos 1534 hasta el 3114,

región codifica para los aminoácidos Lys⁵¹² hasta Leu¹⁰³⁸. El *bait* fue clonado en el vector pB27 (N-LexA-bait-C fusión). La región clonada en el *bait* corresponde a la región homóloga de BMPR2 en humano y en la que se encuentra la mutación en estudio p. Ser987Phe. Las proteínas *prey* fueron fragmentos producidos de una librería de ADNc de ovario de ratón y cada uno fue clonado en plásmidos pP6. Fueron procesados 318 clones y se analizaron 70,1 millones de posibles interacciones. El crecimiento de clones positivos en medios carentes de histidina, se analizó realizando la amplificación por PCR de los fragmentos encontrados en el *prey*, con posterior secuenciación de sus extremos 3' y 5' (Silgado, 2017).

La clasificación de la interacción está distribuida en 6 categorías que miden las interacciones de alta confiabilidad (A) hasta interacciones de menor confiabilidad (E), de acuerdo con el Porcentaje Biológico Predictivo (PBS). Además, el Y2H determina la secuencia de la proteína mínima del *prey* para la interacción con el *bait*, llamado SID (*Selection Interaction Domain*).

Tabla 1. Categoría de las interacciones entre proteínas, según el Global PBS.

CATEGORIA	Global PBS
A	Muy alta confiabilidad en la interacción
B	Alta confiabilidad en la interacción
C	Buena confiabilidad en la interacción
D	Moderada confiabilidad en la interacción
E	Baja confiabilidad en la interacción
F	Artefactos técnicos probados experimentalmente

7.2 Sistema doble híbrido en células eucariotas. *ChakeMateTM Mammalian Two-Hybrid System*

Los resultados del sistema Y2H (*Hybrigenics*) fueron realizados sobre ADNc de una librería de ovario de ratón. Buscamos comprobar que la interacción proteína-proteína se presentara también entre proteínas humanas. Se utilizó para esto el sistema doble híbrido en células eucariotas *CheckMAte Mammalian Two-Hybrid System* (Promega). En este sistema el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de activación transcripcional (DA), se encuentran en plásmidos separados. De esta manera una proteína (“X”) es fusionada al DBD y la segunda proteína (“y”) es fusionada al DA. La interacción entre las proteínas X y Y resulta en la transcripción de del gen reportero de luciferasa.

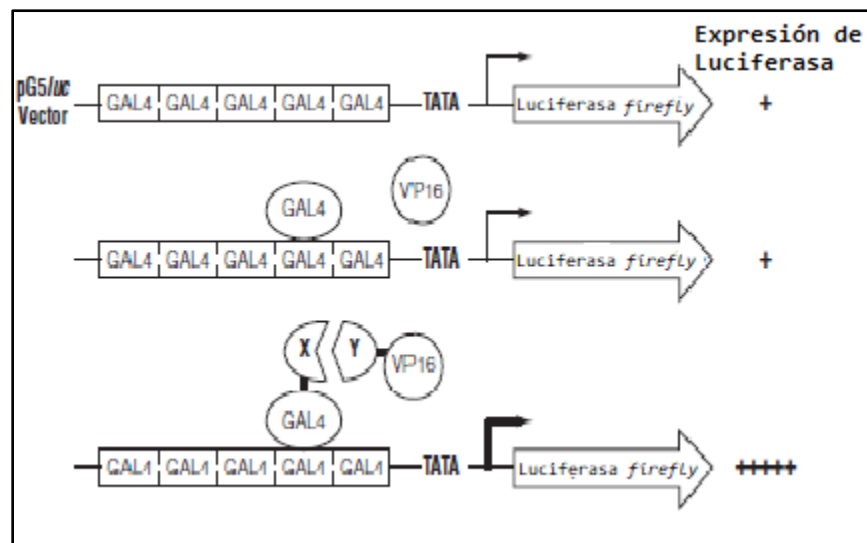


Figura 6. Sistema CheckMateMT Mammalian Two-Hybrid System (Promega)

En este sistema los ADNc que codifican para las proteínas X y Y deben ser clonados en los vectores pBIND y pACT. El vector pBIND contiene el DBD de GAL4 (aminoácidos 1-147) que se encuentra corriente abajo a la región de clonaje múltiple. Este vector expresa la luciferasa de *Renilla reniformis* que permite normalizar las diferencias en la eficiencia de transfección. El vector pACT contiene el DA de VP16 (aminoácidos 411-456) encontrándose corriente debajo de la región de clonaje múltiple. Contiene el gen de la fosfotransferasa de neomicina que le confiere la propiedad de resistencia a análogos de la neomicina. El vector pG5luc contiene 5 sitios de unión corriente abajo de la caja TATA, y posee el gen reportero de la luciferasa *firefly* (*luc+*).

Las construcciones de los vectores pBIND y pACT son transfectadas junto con el vector pG5luc en células eucariotas. Después de 2 -3 días de la transfección, las células son lisadas para posteriormente realizar la cuantificación de *Renilla* y luciferasa *firefly* usando Dual-Luciferase® Reporter Assay System. La interacción entre las dos proteínas resulta en un incremento en la expresión de luciferasa *firefly* en comparación a los controles negativos.

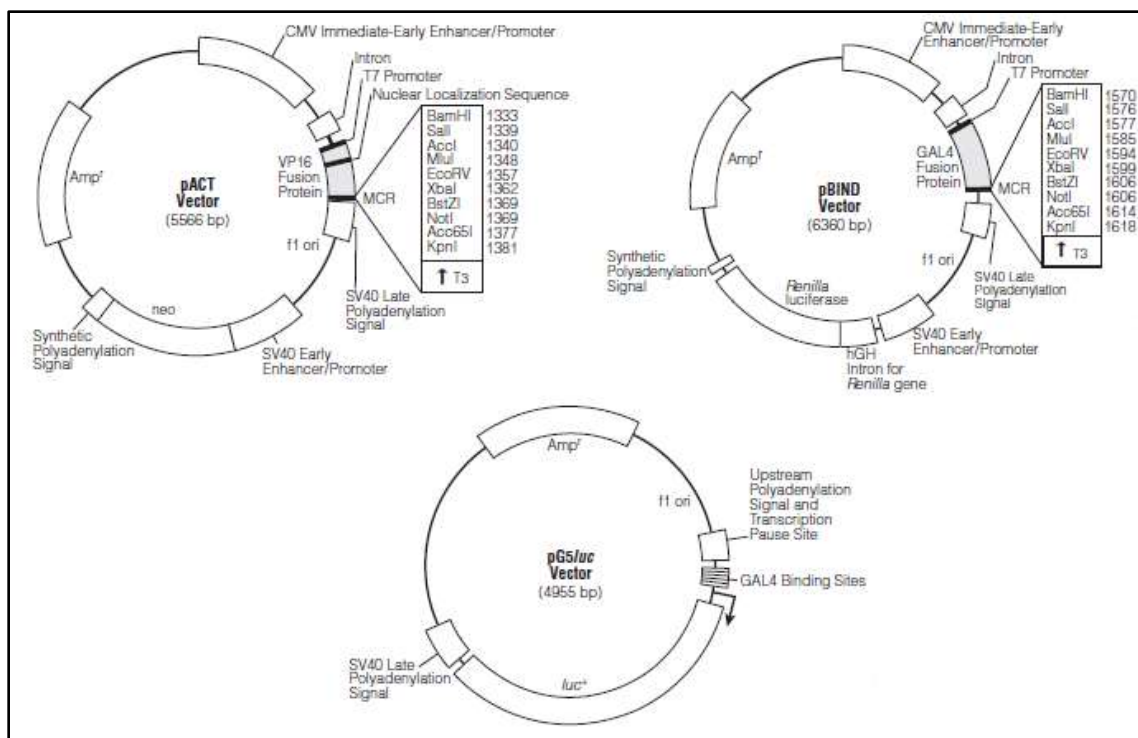


Figura 7. Mapa de los vectores pACT, pBIND y pG5luc. (Promega)

7.2.1. Construcciones plasmídicas de BMPR2 wild type y mutante con secuencias humanas

Se utilizó el plásmido pEGFP-N1-BMPR2 WT - 3' GFP, que contiene la región codificante completa de *BMPR2 wild type* (WT), el cual fue proporcionado por el profesor Nicholas Morrel (Cambridge, UK) (Rudarakanchana et al., 2002).

7.2.2. Generación de la mutación c.2960C>T de *BMPR2* mediante mutagénesis dirigida

La mutación en *BMPR2* c.2960C>T que afecta la región C-terminal de la proteína BMPR2 p. Ser987Phe fue insertada mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit GeneArt® Site

Mutagenesis System (Thermo Fisher Scientific) y siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.

La técnica consiste en la metilación del ADN plasmídico (plásmido utilizado: pEGFP-N1-BMP2 WT – 3' GFP) y amplifica el plásmido en una reacción de mutagénesis con 2 *primers* que contengan la mutación:

- BMP2-m2960c-t-F: 5'TAAGCGGTGGCGCCCCTTACACCTGGGTCATCTCCA3'
- BMP2-m2960c-t-R: 5'TGGAGATGACCCAGGTGAAGGGGCGCCACCGCTTA3'

Para esta técnica se requiere la mezcla de los reactivos que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Condiciones para la mutagénesis.

	Por cada tubo
10X Accuprime	5µl
10X Enhancer	5 µl
Primer mix (10 µM c/u)	1,5 µl
ADN plasmídico (50ng): pEGFP-N1-BMP2 WT – 3' GFP	2,5 µl
ADN metilasa	1 µl
SAM 25X	2 µl
ACCUPRIME (2,5u/µ) ADN polimerasa	0,5 µl
Agua de PCR	32,5 µl

La mezcla es sometida a una PCR con las siguientes condiciones descritas a continuación:

Tabla 3. Programación del termociclador para la mutagénesis dirigida

	Temperatura	Tiempo
Metilación	37°C	20min
	94°C	7min
Ciclos 18		
Desnaturalización	94°C	30seg
Anillamiento	55°C	40seg
Extensión	68°C	6min
Extensión final	68°C	5min

Después de obtener el producto de PCR (tamaño del inserto: 3.5Kb + tamaño del vector: 4.7 Kb, tamaño del producto total: 8,2Kb), se realizó la mezcla para la reacción de recombinación (Tabla 4) y se dejó en incubación por 10 minutos. Se detuvo la reacción adicionando 1 µl de 0.5M EDTA y se introdujeron los tubos en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se procedió a la transformación siguiendo el procedimiento descrito a continuación (apartado 6.2.3.)

Tabla 4. Reacción de recombinación.

	Por cada tubo
5X Buffer (-80°C)	4 µl
Agua de PCR	10 µl
Producto de PCR	4 µl
10X Enzima Mix (-80°C)	2 µl

7.2.3. Transformación

Se realizó la transformación con el vector pEGFP-N1-BMP2 c.2960C>T-mut – 3' GFP en células competentes One Shot® MAX Efficiency® DH5 α TM-T1 *E.coli* las cuales son suministradas en el kit GeneArt® Site Mutagenesis System (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó un vial de 50 μ l de bacterias y se adicionó 2 μ l del producto de la reacción de recombinación, se incubaron en hielo durante 12 minutos. Luego se realizó un choque térmico a 42°C por 30 segundos, y rápidamente se colocó 2 minutos en hielo. Después, a la mezcla se le adicionó 250 μ l de medio S.O.C y se dejó en agitación continua a 250rpm por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se sembraron 100 μ l en placas de agar LB con kanamicina y se dejaron en incubación durante toda la noche a 37°C.

El día siguiente se picaron las colonias y se sembraron en 5ml de medio de cultivo líquido LB Broth con kanamicina y se dejó en agitación a 250rpm y 37°C durante toda la noche. Luego se realizó la extracción del ADN plasmídico de acuerdo con el protocolo de QIAprep Spin Miniprep Kit. Adicionalmente se realizó verificación mediante secuenciación de Sanger utilizando un primer *forward* T7 (específico del plásmido) y un *primer* interno que se une a BMP2 (HuBMP2-2118F: 5' GCTTTACCCACTCATAAACTTG CAG 3').

7.2.4. PCR para clonaje en pCRTM4-TOPO® TA Vector

Se realizó una PCR sobre los plásmidos pEGFP-N1-BMP2 WT – 3' GFP y pEGFP-N1-BMP2 mut– 3' GFP con dos *primers* que contienen secuencias de reconocimiento para las dos enzimas de restricción SalI y NotI (Tabla 5, Tabla 6), presentes también en el sitio de clonaje múltiple de los vectores pACT y pBIND.

Tabla 5. Primers para amplificación de BMPR2

Primer	Secuencia
BMPR2-SalI-2F	5' ACG CGT CGA CAC AAA TCT GTG AGC CCA ACA GTC AA 3'
BMPR2-NotI-2R	5'AAG GAA AAA AGC GGC CGC TCA CAG ACA GTT CAT TCC TAT ATC TT 3'

Tabla 6. Condiciones de PCR para el clonaje en plásmido pCR™4-TOPO® TA

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95°	10 min
Ciclos 15		
Desnaturalización	95°	40 seg
Anillamiento	57°	40 seg
Extensión	72°	1 min
Extensión final	72°	10 min

El producto amplificado corresponde a un fragmento de ADNc de 1586 pb (desde nucleótido 1534 hasta el nucleótido 3114) que codifica 526 aminoácidos de BMPR2 (desde Lys⁵¹² hasta Leu¹⁰³⁸) y contiene el sitio en el que se encuentra la mutación en estudio *BMPR2* c.2960C>T (p.S987F).

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE IX y bromuro de etidio (4%) para comprobar la amplificación de la región de interés. Para la purificación del ADN amplificado se usó el kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen).

7.2.5. Clonaje del ADNc de *BMPR2 wild type* y mutante

Para este proceso se utilizaron, los fragmentos de ADNc de *BMPR2* obtenidos en la PCR anterior y el sistema TOPO-TA Cloning (Invitrogen) (Figura 8.). Los productos de PCR deben tener extremos poliadenilados, para lo cual se utilizó para la amplificación la *taq* polimerasa que tiene una actividad terminal no dependiente de la secuencia molde e incorpora el nucleótido deoxiaminidasa (A) al extremo 3' del producto de PCR. El vector linealizado pCR4TM4-TOPO[®] TA tiene un residuo deoxitimidina (T) en el extremo 3'. Esto permite que el producto de PCR (con cola poli A en 3') se ligue eficientemente con el vector pCRTM4-TOPO[®] TA (Invitrogen, 1953). Con este clonaje se obtuvo finalmente las construcciones pCR-TOPO4/*BMPR2 wild type* y pCR-TOPO4/*BMPR2 c.2960C>T*, con los respectivos sitios de restricción de las enzimas *SalI* y *NotI* (Tabla 7).

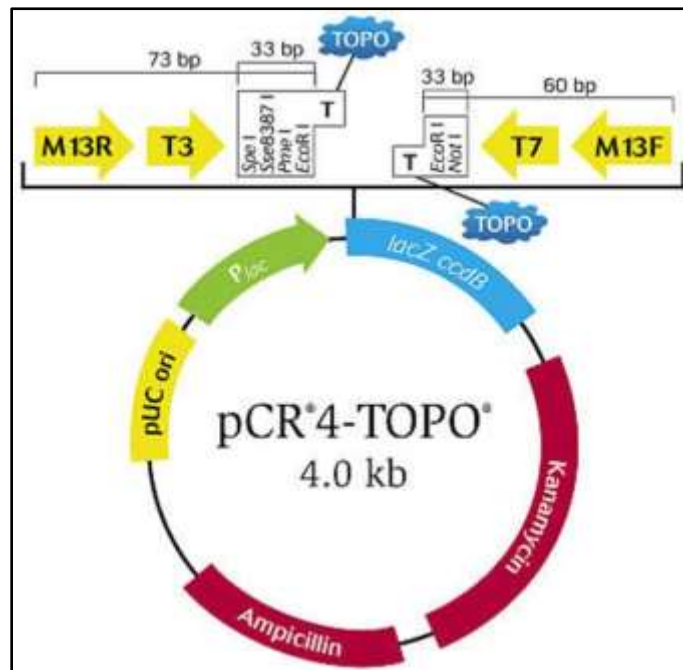


Figura 8. Vector pCRTM4-TOPO[®] TA. (Invitrogen)

Tabla 7. Condiciones de clonaje en pCR4-TOPO

	<i>BMPR2 wild type</i>	<i>BMPR2 c.2960C>T</i>
Producto PCR (100ng/ µl)	1,6µl	1,6 µl
Vector pCR4-TOPO	1 µl	1 µl
Solución salina	1 µl	1 µl
Agua libre de endonucleasas	2,4 µl	2,4 µl
Tiempo incubación (T° ambiente)	1 hora	1 hora

7.2.6. Transformación

Se realizó transformación utilizando los vectores pCR-TOPO4/*BMPR2 wild type* y pCR-TOPO4/*BMPR2 c.2960 C>T* y las células *Escherichia coli* quimio-competentes *One Shot TOP10 Competent Cells* (Invitrogen). Se utilizó un vial de 50µl de bacterias y se adicionó 2µl del producto de clonaje, se incubaron en hielo durante 30 minutos. Luego se realizó choque térmico a 42°C por 30 segundos, y rápidamente se colocó 5 minutos en hielo. Después, a la mezcla se le adicionó 250µl de medio S.O.C y se dejó en agitación continua a 250rpm por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se sembraron 100µl en placas de agar LB con ampicilina y se dejaron en incubación durante toda la noche a 37°C.

El día siguiente se picaron las colonias y se sembraron en 5ml de medio de cultivo LB Broth con ampicilina y se dejó en agitación a 250rpm y 37° C durante toda la noche. Luego de realizo extracción del ADN plasmídico de acuerdo con el protocolo de *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen).

Adicionalmente se realizó PCR de verificación con el *primer forward* T7 que se une al plásmido y dos *primers* internos (BMPR2-SalI-2F y BMPR2-NotI-2R) que hibrida con el fragmento específico de BMPR2.

7.2.7. Digestión con enzimas de restricción

Se tomaron las construcciones plasmídicas pCR-TOPO4/BMPR2 *wild type* y pCR-TOPO4/BMPR2 c.2960 C>T, que contienen los sitios de restricción en 5' y 3', y el vector pACT para realizar un proceso de digestión con las enzimas SalI y NotI. Se utilizó el NEBuffer 3.1, en el cual ambas enzimas presentan una actividad del 100% (New England BioLabs).

Las condiciones para la reacción de digestión fueron las siguientes:

Buffer 3.1 (10X)	5µl
NotI (10X)	1µl
SalI (20X)	0,5µl
Producto para digerir (100ng/µl)	10µl
Agua	33,5 µl
Vol. Final reacción	50µl

Se realizó una incubación a 37°C por 4 horas. El producto final de digestión se pasa por electroforesis en un gel de agarosa (1%) en buffer TBE 1X (*Tris/Borato/EDTA*). Luego se realizó la extracción de los amplicones correspondientes con el kit *PureLink Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

7.2.8. Ligación de amplicones *BMPR2 WT* y *BMPR2 mut* en el vector pACT

Para la ligación del fragmento de *BMPR2 wild type* y *BMPR2 mut* en el vector pACT se utilizó T4 ligasa de ADN (Invitrogen), que liga los fragmentos de ADN de interés al vector mediante enlaces covalentes. Teniendo en cuenta que el tamaño del vector es de 5566 pb y el del inserto de 1586 pb se calculó la cantidad de ADN del inserto con la siguiente fórmula:

$$\text{ng Inserto} = \frac{100\text{ng Vector} \times \text{tamaño del inserto (pb)}}{\text{Tamaño del vector (pb)}} \times 3$$

Se realizaron los siguientes cálculos para cada inserto y las condiciones para la reacción ligación:

Tabla 8. Cálculos para la ligación de *BMPR2 WT* y *BMPR2 mut* en el vector pACT.

	<i>BMPR2 WT</i>	<i>BMPR2 mut</i>
ng del inserto	84	84
[] del producto de extracción de banda (ng/μl)	20,66	23,29
Cantidad del producto utilizado en la ligación (μl)	4	3,6

Tabla 9. Condiciones de reacción de ligación de *BMPR2 WT* y *BMPR2 mut* en el vector pACT.

	<i>BMPR2 WT</i>	<i>BMPR2 mut</i>
Agua	9 μl	9,4 μl
Inserto μl	4 μl	3,6 μl

Buffer Ligasa	4 µl	4 µl
Vector pACT	1 µl	1 µl
T4 ADN ligasa	2 µl	2 µl
Incubación en termociclador a 16°C por 16 horas		

7.2.9. Transformación

Se realizó la transformación siguiendo el protocolo descrito previamente (apartado 1.2.1.6), utilizando 2 µl del producto de ligación y 50 µl de bacterias *Escherichia coli* quimio-competentes *One Shot TOPO 10 Competent Cells* (Invitrogen).

Se realizó PCR sobre el ADN de las colonias para verificar la ligación de los fragmentos (*BMPR2* WT y *BMPR2* mut) en el vector pACT. Se utilizó un *primer reverse* T3 que se une al plásmido y un *primer* interno (*forward*) que se hibrida con un fragmento específico de las dos versiones de *BMPR2* (hu*BMPR2*_2118F: 5' GCTTTACCCACTCATAAACTTGCAG 3').

Las construcciones plasmídicas fueron enviadas a secuenciación con *primers* internos y sobre el vector. Finalmente, se realizaron minipreps empleando el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) y se conservaron a -20°C.

7.2.10. Construcciones plasmídicas con insertos de *LIMK1* y *p120*

Para la obtención de la región codificante de *LIMK1* y *p120* en humano (ver anexo 1 y 2), se realizó la extracción de ARN total a partir de una muestra de tejido de placenta almacenada en trizol (TRIzol® Reagent), la cual se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para

permitir la disociación completa del tejido y del complejo nucleoproteína. Luego, se adicionó 200µl de cloroformo frío por cada ml de Trizol, y se agitó vigorosamente durante 15 segundos a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifugó a 12000rpm por 15 minutos a 8°C. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo *Eppendorff* de 2ml, al cual se le adicionaron 500 µl de isopropanol frío por cada ml de Trizol, y se dejó en incubación a 20°C durante 10 minutos. Después, se centrifugó a 12000rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1mL de etanol frío al 75% por cada ml de Trizol, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 7500rpm por 5 minutos a 4°C y luego se descartó el sobrenadante. Finalmente, se dejó secar el tubo boca abajo sobre una toalla de papel a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se adicionó 50µl de agua libre de RNAasa y se resuspendió suavemente, se realizó una incubación final a 55°C durante 10 minutos. Se cuantificó y se almacenó a -80°C de forma inmediata.

Luego se obtuvo el ADNc utilizando el kit *Superscript III First-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen). Siguiendo el protocolo, inicialmente se realizó una mezcla con: ARN (750ng/µl) 3µl + oligo DT 1µl + dNTPs 1µl + H₂O 7µl. Se incubó la mezcla a 65°C por 5 minutos y luego en hielo 1 min. Luego se preparó la mezcla para la síntesis de ADNc de la siguiente manera:

Tabla 10. Preparación de la mezcla para la síntesis de ADNc con el kit *Superscript III First-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen).

	1x
Buffer RT 10X	2µl
MgCl ₂ (25mM)	4µl
DTT 0.1M	2µl
RNaseOUT™ (40U/µL)	1µl

SuperScript® III RT (200U/μL)	1μl
----------------------------------	-----

De la anterior mezcla se agregaron 10μl por reacción, se mezcló e incubó a 50°C por 50 minutos y luego se incubó a 85°C por 5 minutos y posteriormente se mantuvo en hielo. Se adicionó 1μl de RNase H dejando la mezcla a 37° por 20 minutos. El producto se almacenó a -20°.

7.2.11. PCR para el clonaje en el plásmido pCR™4-TOPO® TA Vector

Se amplificó el ADNc de *LIMK1* y *p120* con dos primers que incluían en sus extremos secuencias de reconocimiento para las enzimas SalI y NotI. Para *LIMK1* el producto amplificado correspondía a un fragmento de 397pb (desde la posición 77 hasta la posición 473) el cual codifica para 131 aminoácidos (desde Ser²⁷ hasta Ser¹⁵⁷) y para *p120* el producto amplificado correspondía a un fragmento de 999 pb (desde la posición 1545 hasta la posición 2543) que codifica para 334 aminoácidos (desde Asp⁵¹⁵ hasta Asn⁸⁴⁸) (anexo 1, 2). En la Tabla 11 se muestra la secuencia de los primers y en la Tabla 12 las condiciones de la PCR:

Tabla 11. Primers para la amplificación de LIMK1 y p120

	Secuencias de <i>primers</i>	
<i>LIMK1</i>	hLIMK1cMat_SalI_IF	5'-acgcGTCGACACGTGTGTGCAAGCTGCGGCCA-3'
	hLIMK1cMat_NotI_IR	5'- atagttaGCGGCCGCCAGGTGGGAGCCAGGGGAGT -3'
<i>p120</i>	hCTNND1cMat_SalI_IF	5'-acgcGTCGACACCATTCTGGTTGGGAGCGGG-3'
	hCTNND1cMat_NotI_IR	5'- atagttaGCGGCCGCTGAATGACTGCTCTGGCTT-3'

Tabla 12. Condiciones de PCR para el clonaje en el plásmido pCR™4-TOPO® TA Vector

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°	10 min
Ciclos (n=20)		
Desnaturalización	95°	40 seg
Anillamiento	57°	40 seg
Extensión	72°	40 seg
Extensión final	72°	10 min

Ambos fragmentos amplificados son ortólogos de los clones reportados en el ensayo doble híbrido en levaduras (Tabla 14, ver anexo 3 y 4), cuya interacción con la región C-terminal de Bmpr2 en ratón fue determinada en la categoría A (alto porcentaje de probabilidad) (detalles en el apartado Resultados). Se realizó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X para comprobar la amplificación de la región de interés. Para la purificación del ADN amplificado se usó el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

7.2.12. Clonaje de *LIMK1* y *p120* en pCR4-TOPO y transformación bacteriana

Los fragmentos de ADNc de *LIMK1* y *p120* amplificados fueron clonados usando el sistema TOPO-TA Cloning (vector pCR4-TOPO) (Invitrogen). Para la transformación, se utilizaron células de *Escherichia coli* quimio-competentes One Shot TOP10 Competent Cells (Invitrogen). Se utilizó el mismo protocolo descrito previamente (apartado 6.2.9.). Posteriormente, se realizó una PCR de

colonia con un *primer forward* T7 que se une al plásmido y un primer interno (reverse) que se hibrida sobre LIMK1 o p120.

A las construcciones plasmídicas positivas se les extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo del kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Quiagen) y fueron enviadas a secuenciación con *primers* internos y localizados sobre el vector (hLIMK1cMat_Sall_1F, hCTNND1cMat_Sall_1F y *primer forward* T7).

7.2.13. Clonaje de los fragmentos de LIMK1 y p120 en el vector pBIND mediante digestión-ligación.

Para los procesos de digestión de los productos amplificados y ligación en el vector pBIND se siguió la metodología descrita en 6.2.7. y 6.2.8., respectivamente.

7.2.14. Co-transfección de las construcciones plasmídicas

Para este ensayo se utilizaron células CHO (Chinese Hamster Ovary), las cuales fueron sembradas 24 horas antes de la transfección. Se utilizaron cajas de 24 pozos (80.000 células por pozo) utilizando 40 pozos, medio DMEM-F12 con 10% SFB (Suero Fetal Bovino) y Pen/strep (Penicilina/Streptomicina) 1% (Invitrogen-Gibco). Las células se encontraban en confluencia del 80% al momento de la transfección.

Se realizó el protocolo de transfección de *CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System* (Promega), manteniendo una proporción de 1:1:1 (200ng) para cada una de las construcciones en la transfección. Simultáneamente se co-transfectaron los vectores pACT-MyoD y pBIND-Id que

correspondían a los controles positivos, los cuales codifican y expresan dos proteínas que interactúan in vivo. Los vectores pACT y pBIND vacíos se usaron como control negativo. Las co-transfecciones se efectuaron al menos tres veces en sextuplicado. Para transfectar se utilizó el lípido catiónico FuGENE6 Transfection reagent (Promega) y Opti-MEM (medio libre de SFB y Antibiótico) (Thermo Fisher scientific). Se calculó la cantidad de ADN (μg) y FuGENE6 (μl) necesarios para mantener una proporción de 1:3 (Tabla 13.)

Tabla 13. Cálculos para la co-transfección.

Mezcla	Construcción 1	Construcción 2	pG5luc	FuGENE6	OptiMEM	n
1	BMPR2WT/pACT (200ng/ μl) 14 μl	LIMK1/pBIND (200ng/ μl) 14 μl	(200ng/ μl) 42 μl	12,6 μl	141,4 μl	6
2	BMPR2mut/pACT (200ng/ μl) 14 μl	LIMK1/pBIND (200ng/ μl) 14 μl	(200ng/ μl) 42 μl	12,6 μl	141,4 μl	6
3	BMPR2WT/pACT (200ng/ μl) 14 μl	p120/pBIND (200ng/ μl) 14 μl	(200ng/ μl) 42 μl	12,6 μl	141,4 μl	6
4	BMPR2mut/pACT (200ng/ μl) 14 μl	p120/pBIND (200ng/ μl) 14 μl	(200ng/ μl) 42 μl	12,6 μl	141,4 μl	6
5	pACT/mio (C+) (200ng/ μl) 12 μl	pBIND/Id (C+) (200ng/ μl) 12 μl	(200ng/ μl) 42 μl	12,6 μl	141,4 μl	6
6	pACT vacío (C-) (200ng/ μl) 7	pBIND vacío (C-) (200ng/ μl) 7	(200ng/ μl) 21 μl	6,3 μl	70,7 μl	3

Se realizó la mezcla de FuGENE 6(Promega) y OptiMEM (*Thermo Fisher Scientific*) y se dejó en incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se adicionó el ADN calculado, se mezcló y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, de cada caja de

24 pozos se retiró el medio DMEM (Invitrogen-Gibco) y se reemplazó por 500µl/pozo de medio OptiMEM (Thermo Fisher scientific). De la mezcla de transfección se adicionaron 25µl a cada pozo y se incubó a 37°C durante 48 horas para permitir la expresión proteica. Finalmente, se extrajo el medio OptiMEM y se realizó el lavado de los pozos con PBS. Se añadió 100µl del buffer de lisis a cada pozo y la placa se llevó a agitación a 100 rpm a temperatura ambiente por una hora. Se realizó raspado de las células en cada pozo. Los lisados celulares fueron transferidos a tubos *Eppendorf* (lisado).

7.2.15. Ensayo: Gen reportero luciferasa

Se usó el protocolo Dual Luciferase Reporter Assay System para cuantificar la cantidad de Renilla luciferasa y firefly luciferasa (Promega). Se agregó 100µl del reactivo de ensayo de luciferasa II (LAR II) en cada uno de los tubos *Eppendorf* para lectura más 20µl de lisado celular y se mezcló pipeteando 2 a 3 veces. Se realizó la lectura en un luminómetro GloMax® 20/20 y se registró la medición de la actividad de firefly luciferasa. Después, se retiró la muestra del luminómetro y se añadieron 100 µl del reactivo Stop & Glo®. Se mezcló suavemente y se volvió a colocar la muestra en el luminómetro para realizar la lectura, la cual registró la actividad de Renilla luciferasa. Los resultados fueron reportados en unidades relativas de luciferasa (URL) y la significancia estadística fue estimada con la prueba t-Student.

8. Resultados

8.1 Ensayo de doble híbrido en levaduras (*yeast two-hybrid system*, Y2H)

El ensayo de doble híbrido (Y2H) realizado a partir de una librería de ADNc de ovario de ratón, se identificó 4 proteínas que interactuaron con la región *bait* de Bmpr2, clasificadas en la categoría A según PBS (muy alto porcentaje de probabilidad). Las proteínas identificadas fueron: Limk1 (17 clones), Ctnnd1 (p120, 28 clones), Fn1 (9 clones), Fasn (9 clones), se describen en la Tabla 14.

En los resultados se permitió identificar la región de interacción (SID: *Selected Interaction Domain*) de cada una de las proteínas: Limk1 comprende entre el aminoácido 27 y el 157, Fn1 se encontró entre el aminoácido 835 y el 886, Fasn comprende desde el aminoácido 866 y el 967, y finalmente Ctnnd1 (p120) se encontró desde el aminoácido 415 al 746.

Tabla 14. Proteínas identificadas en el ensayo Y2H con Categoría A(PBS) (Modificado de Hybrigenics)

ID DEL CLON	TIPO DE SECUENCIA	NOMBRE DEL GEN	INICIO-PARADA (nt)	MARCO DE LECTURA	PBS
pB27_C-237	3p	Mus musculus - Fasn	..3165	??	A
pB27_C-364	5p/3p	Mus musculus - Fasn	1905..2901	IF	A
pB27_C-83	5p	Mus musculus - Fasn	2331	IF	A
pB27_C-103	5p	Mus musculus - Fasn	2532	IF	A
pB27_C-69	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2532..3263	IF	A
pB27_C-275	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2541..3129	IF	A
pB27_C-46	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2571..3159	IF	A
pB27_C-317	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2571..3155	IF	A
pB27_C-260	5p/3p	Mus musculus - Fasn	2595..3165	IF	A
pB27_C-213	3p	Mus musculus - Ctnnd1	..2240	??	A
pB27_C-310	3p	Mus musculus - Ctnnd1	..2408	??	A
pB27_C-367	3p	Mus musculus - Ctnnd1	..2637	??	A
pB27_C-308	5p	Mus musculus - Ctnnd1	1077	IF	A
pB27_C-199	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	A
pB27_C-86	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	A
pB27_C-122	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	A
pB27_C-297	5p	Mus musculus - Ctnnd1	1086	IF	A
pB27_C-372	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	A
pB27_C-360	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1086..2240	IF	A
pB27_C-2	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1098..2716	✗ IF	A
pB27_C-90	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1098..2716	✗ IF	A
pB27_C-353	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1098..2716	✗ IF	A
pB27_C-148	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-136	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-163	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-198	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-78	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-336	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-325	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-318	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-376	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-346	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-338	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1110..2651	✗ IF	A
pB27_C-160	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1125..2723	✗ IF	A
pB27_C-74	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1125..2716	✗ IF	A
pB27_C-98	5p	Mus musculus - Ctnnd1	1185	IF	A
pB27_C-305	5p/3p	Mus musculus - Ctnnd1	1242..2263	IF	A

ID DEL CLON	TIPO DE SECUENCIA	NOMBRE DEL GEN	INICIO-PARADA (nt)	MARCO DE LECTURA	PBS
pB27_C-170	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2229..2658	IF	A
pB27_C-91	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2310..2673	IF	A
pB27_C-44	5p	Mus musculus - Fn1	2310	IF	A
pB27_C-61	5p	Mus musculus - Fn1	2397..2658	IF	A
pB27_C-246	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2397..2658	IF	A
pB27_C-218	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2397..2658	IF	A
pB27_C-324	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2442..3433	IF	A
pB27_C-256	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2502..3612	IF	A
pB27_C-202	5p/3p	Mus musculus - Fn1	2502..3612	IF	A
pB27_C-184	5p/3p	Mus musculus - Limk1	-29..473	OOF2	A
pB27_C-10	5p/3p	Mus musculus - Limk1	-29..473	OOF2	A
pB27_C-82	5p	Mus musculus - Limk1	-29..473	OOF2	A
pB27_C-245	3p	Mus musculus - Limk1	10..549	OOF1	A
pB27_C-35	5p/3p	Mus musculus - Limk1	10..549	OOF1	A
pB27_C-286	5p/3p	Mus musculus - Limk1	13..730	OOF1	A
pB27_C-73	5p/3p	Mus musculus - Limk1	13..730	OOF1	A
pB27_C-169	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-101	5p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-133	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-195	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-293	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-307	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-1	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-70	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-79	5p/3p	Mus musculus - Limk1	58..529	OOF1	A
pB27_C-374	5p/3p	Mus musculus - Limk1	77..911	OOF2	A

8.2 Sistema de doble híbrido en células eucariotas - CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System con secuencias humanas.

Los resultados del sistema doble híbrido en células eucariotas CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System se evaluaron según la cuantificación de las unidades relativas de luciferasa, lo que permitió establecer la posible interacción entre las regiones proteicas de LIMK1 y BMPR2, a partir

de la transfección de las construcciones plasmídicas. Los niveles cuantificados de luciferasa fueron aproximadamente 40 veces más altos en las células co-transfectadas con vectores que contenían a BMPR2 WT/MUT y LIMK1 comparado con las células transfectadas con vectores vacíos (Figura 9).

A partir de estos resultados se pudo confirmar la interacción de BMPR2 y LIMK1, observándose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en comparación con los controles negativos. A diferencia de lo que se esperaba, se presentó mayor actividad de la luciferasa en las células co-transfectas con BMPR2 MUT/LIMK1 en comparación con las células co-transfectadas con BMPR2 WT/LIMK1, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

No se demostró interacción de p120 con BMPR2 al observarse una actividad de luciferasa igual o menor en comparación a los controles negativos, siendo estadísticamente no significativo.

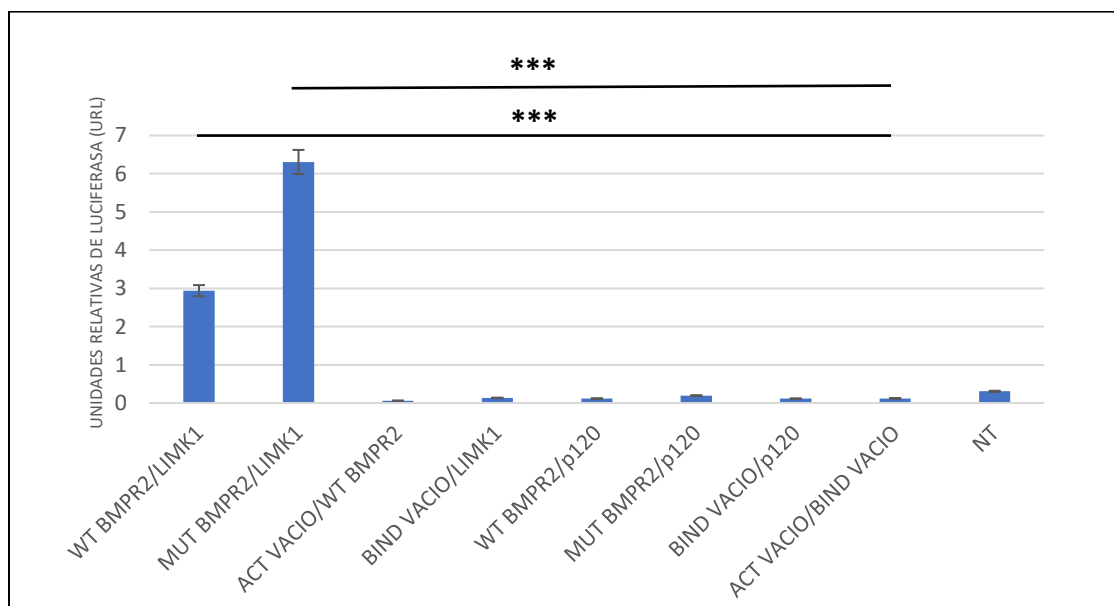


Figura 9. Resultados expresados en URL (unidades relativas de luciferasa) en el ensayo CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

9. Discusión

Este trabajo se fundamentó en la búsqueda de las potenciales interacciones proteicas entre el dominio citoplasmático de BMPR2 y otras proteínas expresadas en un contexto ovárico. Se utilizó el sistema doble híbrido en levaduras (Y2H), como un método de *screening* inicial y una librería de ADNc de ovario de ratón *Mus Musculus*. Este sistema ha demostrado tener una alta sensibilidad para la identificación de potenciales interacciones entre proteínas (Stynen, et al., 2012). La librería elegida es de relevancia biológica para el modelo en humanos puesto que previamente se ha demostrado la expresión de *Bmpr2* en el ovario de ratón. Además su homología con su ortólogo humano es de aproximadamente el 80% en términos de secuencia (Sun et al., 2010). Con el sistema de Y2H usado en nuestro trabajo, logramos tamizar aproximadamente 70 millones de interacciones y procesar al menos 318 clones, logrando identificar cuatro proteínas con probable interacción con *Bmpr2*: *Limk1*, *p120(Ctnnd1)*, *Fasn* y *Fnl*. Estimamos que estas interacciones son relevantes ya que fueron reportadas por el sistema Y2H en categoría de mayor grado de confianza (PBS A).

A pesar de ser un sistema robusto y ampliamente usado como tamizaje inicial en la identificación de interacciones proteicas es importante considerar que este sistema híbrido puede arrojar falsos negativos y/o positivos. Respecto a los falsos negativos se han atribuido a una baja representación del ARNm en la biblioteca utilizada, mientras que los falsos positivos son secundarios principalmente a la activación del gen reportero sin que el *bait* y el *prey* interactúen, o a la interacción de dos híbridos que no tengan una relevancia biológica (artefactos biológicos, que no están presentes en la misma localización subcelular o el mismo tiempo bajo condiciones fisiológicas) (Wilson, et al., 2003). En este caso se empleó el sistema PBS en cada interacción para filtrar posibles falsos positivos.

Es importante resaltar, que de las cuatro proteínas identificadas en el Y2H, LIMK1 se había reconocido previamente como *partner* de BMPR2. En el estudio realizado por Foletta et al., se describió este hallazgo, utilizando el sistema Y2H propuesto en nuestro trabajo, demostrando la importancia del dominio citoplasmático de BMPR2 en la interacción con LIMK1 y de su posible contribución con la etiología de hipertensión pulmonar primaria (Foletta et al., 2003). Teniendo en cuenta que nuestros resultados validan los hallazgos previos, estimamos que el sistema Y2H explorado es adecuado para identificar potenciales interacciones proteína-proteína en el marco de nuestra pregunta de investigación.

Teniendo en cuenta que el sistema doble híbrido en levadura representa un método de *screening*, es necesario realizar otro tipo de ensayos que permitan validar estas interacciones en un entorno más fisiológico en células eucariotas (Luo, et al., 1997). Para esto utilizamos el ensayo CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System. El alcance del presente trabajo permitió evaluar a LIMK1 y p120 como posibles *partners* de BMPR2 (se comentará sobre las otras proteínas en el apartado de perspectivas). Los resultados obtenidos a través del ensayo de CheckMate permitió establecer que existe una potencial interacción entre los segmentos proteicos de LIMK1 y BMPR2 *wild type*, ($p < 0.005$). Por consiguiente, la obtención de resultados similares por dos métodos de identificación de interacción proteína-proteína permiten establecer que LIMK1 interactúa con BMPR2, en este caso en un contexto ovárico (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004).

Referente a los hallazgos de la potencial interacción entre las proteínas BMPR2-MUT y LIMK1, nuestros experimentos mediante CheckMate no permitieron evidenciar una perturbación en la interacción proteína-proteína, lo que dificulta la interpretación de los resultados en el marco de la etiología molecular de la enfermedad. Sin embargo, no se excluye que experimentos adicionales

(co-inmunoprecipitación) muestren resultados diferentes que expliquen, al menos parcialmente, el origen molecular de la disfunción ovárica.

Respecto a p120, el resultado del CheckMate, no logró replicar los hallazgos obtenidos en Y2H para la interacción entre BMPR2 y p120. Brent et al, y Lievens et al., reportaron algunas causas de falsos negativos en el sistema doble híbrido en células eucariotas, como las constantes de disociación débiles y la toxicidad causada por los dominios de activación (Brent, et al.,1997; Lievens, et al.,2009).

Es importante señalar, que previamente se ha demostrado a través de estudios de RT-PCR, la expresión de p120 en múltiples tejidos entre ellos el ovario (Keirsebilck et al., 1998). El gen *p120* se caracteriza por tener varias isoformas como producto de splicing alternativo, principalmente la isoforma I es predominante en cerebro, testículo y ovario (Montonen et al., 2001). De igual manera, p120 participa en la regulación de adhesión celular y también en la interacción con la red de microtúbulos controlando el tráfico intracelular (Kourtidis, et al., 2013). Estas funciones evocan las descritas para LIMK1 en el citoesqueleto por lo que es coherente sugerir a p120 como un potencial *partner* de BMPR2.

Las mutaciones de BMPR2 en el dominio citoplasmático y principalmente la mutación BMPR2 p.Ser987Phe, puede tener por consecuente un efecto deletéreo en las vías independientes de SMAD, justificado por la relación que existe entre BMPR2 y sus potenciales *partners* (Machado et al., 2003, 2006). En un estudio realizado por nuestro grupo de Investigación, Patiño, et al.,2017, evaluó la mutación BMPR2 p. Ser987Phe a través de un ensayo de GFP, observando un efecto sobre la localización subcelular de BMPR2, que llevó a la proteína mutante a una agregación en el retículo endoplásmico, comprometiendo la disponibilidad del receptor en la membrana celular. En conjunto, estos eventos producidos por la mutación mencionada en BMPR2 pueden alterar la

proliferación de las células de la granulosa y contribuir al fenotipo de IOP (Gilchrist, et al., 2008; Patiño; et al., 2017)

Por último, las mutaciones de *BMPR2* se han relacionado con hipertensión pulmonar primaria (HPP), una enfermedad que presenta un patrón de herencia autosómico dominante (Kim et al., 2017). La paciente afectada con IOP (Dora Janeth Fonseca et al., 2015), portadora de la mutación *BMPR2* p.Ser987Phe, no presenta signos clínicos ni paraclínicos de HPP, lo cual puede ser explicado por la baja penetrancia de la enfermedad (20%-30%) y por otros factores como la edad de la paciente (40 años) (Austin et al., 2013; Rabinovitch et al., 2012). Es probable que pueda existir una relación entre las pacientes con HPP e insuficiencia ovárica primaria lo cual aún no ha sido reportado y requeriría realizar un estudio para ello.

10. Perspectivas

Considerando que el sistema doble híbrido en células eucariotas es un método fiable para la evaluación de interacciones proteína- proteína, se recomienda evaluar la interacción proteica entre BMPR2 y los *partners* Fasn y Fnl que no fueron evaluados en el presente trabajo y reevaluar a p120 teniendo en cuenta las isoformas de esta proteína en el tejido ovárico.

Además se sugiere considerar otras técnicas para la validación de la interacción proteína-proteína como la co-inmunoprecipitación, evaluando el efecto de la mutación p.S987F en BMPR2 con cada factor identificado en Y2H. Se proponen realizar ensayos de co-localización subcelular con cada una de las proteínas y BMPR2 en células CHO. Según los resultados, se podrían estudiar los potenciales efectos deletéreos sobre las vías de señalización asociadas a BMPR2 y sugerir una relación entre la IOP y la HPP.

II. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, D., & Liu, K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*. <http://doi.org/10.1210/er.2008-0048>
- Aittomäki, K., Lucena, J. L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J., ... de la Chapelle, A. (1995). Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, 82(6), 959–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7553856>
- Anderson, R. A., Themmen, A. P. N., -Qahtani, A. A., Groome, N. P., & Cameron, D. A. (2006). The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Human Reproduction*, 21(10), 2583–2592. <http://doi.org/10.1093/humrep/del201>
- Anttonen, M. (2014). *Ovarian Development, Function, and Granulosa Cell Tumorigenesis: Role of GATA Transcription Factors and Anti-Müllerian Hormone*. MD/PhD thesis.
- Austin, E., & Loyd, J. (2013). Heritable forms of pulmonary arterial hypertension. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34(5), 568–580. <http://doi.org/10.1055/s-0033-1355443>
- Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2012). Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: A review. *Human Reproduction Update*. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmr039>
- Bakalov, V., Anasti, J., Calis, K., Vanderhoof, V., Premkumar, A., Chen, S., ... Nelson, L. (2005). Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 84(4), 958–965. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.04.060>
- Baker, T. G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 158(972), 417–433. <http://doi.org/10.1098/rspb.1963.0055>
- Bayne, R. A. L., Martins da Silva, S. J., & Anderson, R. A. (2004). Increased expression of the FIGLA transcription factor is associated with primordial follicle formation in the human fetal ovary. *Molecular Human Reproduction*, 10(6), 373–381. <http://doi.org/10.1093/molehr/gah056>
- Betterle, C., Dal Pra, C., Mantero, F., & Zanchetta, R. (2002). Autoimmune Adrenal Insufficiency and Autoimmune Polyendocrine Syndromes: Autoantibodies, Autoantigens, and Their Applicability in Diagnosis and Disease Prediction. *Endocrine Reviews*, 23(3), 327–364. <http://doi.org/10.1210/edrv.23.3.0466>
- Bouilly, J., Bachelot, A., Broutin, I., Touraine, P., & Binart, N. (2011). Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Human Mutation*, 32(10), 1108–1113. <http://doi.org/10.1002/humu.21543>
- Caburet, S., Zavadakova, P., Ben-Neriah, Z., Bouhali, K., Dipietromaria, A., Charon, C., ... Fellous, M. (2012). Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel

- loci on chromosome 7 for non-syndromic familial premature ovarian failure. *PLoS ONE*, 7(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0033412>
- Camats, N., Pandey, A. V., Fernández-Cancio, M., Andaluz, P., Janner, M., Torán, N., ... Flück, C. E. (2012). Ten Novel Mutations in the *NR5A1* Gene Cause Disordered Sex Development in 46,XY and Ovarian Insufficiency in 46,XX Individuals. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(7), E1294–E1306. <http://doi.org/10.1210/jc.2011-3169>
- Carlosama, C., Elzaiat, M., Patiño, L. C., Mateus, H. E., Veitia, R. A., & Laissue, P. (2017). A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene *MSH4* causes primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*, 26(16), 3161–3166. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddx199>
- Carlosama, C., Patiño, L. C., Beau, I., Morel, A., Delemer, B., Young, J., ... Laissue, P. (2018, August 1). A novel mutation in *KHDRBS1* in a patient affected by primary ovarian insufficiency. *Clinical Endocrinology*. Blackwell Publishing Ltd. <http://doi.org/10.1111/cen.13749>
- Chang, H., Brown, C. W., & Matzuk, M. M. (2002). Genetic Analysis of the Mammalian Transforming Growth Factor- β Superfamily. *Endocrine Reviews*, 23(6), 787–823. <http://doi.org/10.1210/er.2002-0003>
- Chapman, C. (2015). The genetics of premature ovarian failure : current perspectives, 799–810.
- Chapman, C., Cree, L., & Shelling, A. N. (2015). The genetics of premature ovarian failure: Current perspectives. *International Journal of Women's Health*. <http://doi.org/10.2147/IJWH.S64024>
- Choi, Y., & Rajkovic, A. (2006). Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of *Gdf9* and *Pou5f1* promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35747–35756. <http://doi.org/10.1074/jbc.M604008200>
- Conti, M., & Chang, R. J. (2016). Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis. *Endocrinology: Adult and Pediatric*, 2179–2191.e3. <http://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00125-6>
- Conway, G. S., Kaltsas, G., Patel, A., Davies, M. C., & Jacobs, H. S. (1996). Characterization of idiopathic premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 65(2), 337–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8566258>
- Coulam, C. B., Adamson, S. C., & Annegers, J. F. (1986). Incidence of premature ovarian failure. *Obstetrics and Gynecology*, 67(4), 604–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3960433>
- Craig, J., Orisaka, M., Wang, H., Orisaka, S., Thompson, W., Zhu, C., ... Tsang, B. K. (2007). Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 12, 3628–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485326>
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., ... Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*, 27(2), 159–166. <http://doi.org/10.1038/84781>
- Dekel, N., Lawrence, T. S., Gilula, N. B., & Beers, W. H. (1981). Modulation of cell-to-cell

- communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology*, 86(2), 356–362. [http://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90193-7](http://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90193-7)
- Delcour, C., Amazit, L., Patino, L. C., Magnin, F., Fagart, J., Delemer, B., ... Beau, I. (2019). ATG7 and ATG9A loss-of-function variants trigger autophagy impairment and ovarian failure. *Genetics in Medicine*, 21(4), 930–938. <http://doi.org/10.1038/s41436-018-0287-y>
- Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P., & Persani, L. (2004). Hypergonadotropic Ovarian Failure Associated with an Inherited Mutation of Human Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP15) Gene. *The American Journal of Human Genetics*, 75(1), 106–111. <http://doi.org/10.1086/422103>
- Di Pasquale, E., Rossetti, R., Marozzi, A., Bodega, B., Borgato, S., Cavallo, L., ... Persani, L. (2006). Identification of New Variants of Human BMP15 Gene in a Large Cohort of Women with Premature Ovarian Failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(5), 1976–1979. <http://doi.org/10.1210/jc.2005-2650>
- Di Prospero, F., Luzi, S., & Iacopini, Z. (2004). Cigarette smoking damages women's reproductive life. *Reproductive Biomedicine Online*, 8(2), 246–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14989811>
- Doherty, E., Pakarinen, P., Tiitinen, A., Kiilavuori, A., Huhtaniemi, I., Forrest, S., & Aittomäki, K. (2002). A Novel Mutation in the FSH Receptor Inhibiting Signal Transduction and Causing Primary Ovarian Failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3), 1151–1155. <http://doi.org/10.1210/jcem.87.3.8319>
- Ebrahimi, M., & Akbari Asbagh, F. (2011). Pathogenesis and causes of premature ovarian failure: an update. *International Journal of Fertility & Sterility*, 5(2), 54–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24963360>
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*. <http://doi.org/10.1210/er.2009-0012>
- Erickson, G. F. (2009). Follicle Growth and Development. *The Global Library of Women's Medicine*. <http://doi.org/10.3843/GLOWM.10289>
- Erickson, G. F., & Chang, R. J. (2007). Basic biology: Ovarian anatomy and physiology. *Menopause*, 49–66. <http://doi.org/10.1016/B978-012369443-0/50006-5>
- ERICKSON, G. F., & CHANG, R. J. (2007). CHAPTER 4 - Basic Biology: Ovarian Anatomy and Physiology. In R. A. B. T.-T. of the P. W. (Third E. Lobo (Ed.), (pp. 49–66). St. Louis: Academic Press. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012369443-0/50006-5>
- Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2000). The Role of the Oocyte in Folliculogenesis, 11(5).
- Feher, J. (2012). Female Reproductive Physiology. *Quantitative Human Physiology*, 846–855. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-382163-8.00092-X>
- Feng, X., Derynck, R. (2001). Mammalian Two-Hybrid Assays. Analyzing protein-protein interactions in transforming growth factor-beta signaling pathway. *Methods in Molecular Biology*, 177: 221–39. DOI: 10.1385/1-59259-210-4:221.
- Ferraz-de-Souza, B., Lin, L., & Achermann, J. C. (2011). Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and

- human disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 336(1–2), 198–205.
<http://doi.org/10.1016/J.MCE.2010.11.006>
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245–246. <http://doi.org/10.1038/340245a0>
- Foletta, V. C., Lim, M. A., Soosairajah, J., Kelly, A. P., Stanley, E. G., Shannon, M., ... Bernard, O. (2003). Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *Journal of Cell Biology*, 162(6), 1089–1098. <http://doi.org/10.1083/jcb.200212060>
- Fonseca, D. J., Garzón, E., Lakhal, B., Braham, R., Ojeda, D., Elghezal, H., ... Laissue, P. (2012). Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(3), 339–341. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.11.017>
- Fonseca, D. J., Ojeda, D., Lakhal, B., Braham, R., Eggers, S., Turbitt, E., ... Laissue, P. (2012). CITED2 mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure. *Translational Research*, 160(5), 384–388. <http://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.006>
- Fonseca, D. J., Ortega-Recalde, O., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Patiño, L. C., Bermúdez, O. M., ... Laissue, P. (2014). BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reproductive Biomedicine Online*, 29(5), 627–33. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.018>
- Fonseca, D. J., Patiño, L. C., Suárez, Y. C., de Jesús Rodríguez, A., Mateus, H. E., Jiménez, K. M., ... Laissue, P. (2015). Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertility and Sterility*, 104(1), 154–162.e2. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.016>
- Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. [http://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](http://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5)
- Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M., & Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1–2), 53–60. [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00240-3](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00240-3)
- Fragouli, E., Lalioti, M. D., & Wells, D. (2014). The transcriptome of follicular cells: Biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Human Reproduction Update*. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmt044>
- Franić, D., Franić, D., Ivović, M., Tančić-Gajić, M., Marina, L., Barac, M., & Vujović, S. (2016). Genetic etiology of primary premature ovarian insufficiency. *Acta Clinica Croatica*, 55(4), 629–635. <http://doi.org/10.20471/acc.2016.55.04.14>
- Fridovich-Keil, J. L., Gubbels, C. S., Spencer, J. B., Sanders, R. D., Land, J. A., & Rubio-Gozalbo, E. (2011). Ovarian function in girls and women with GALT-deficiency galactosemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 357–66. <http://doi.org/10.1007/s10545-010-9221-4>
- Galloway, S. M., Gregan, S. M., Wilson, T., McNatty, K. P., Juengel, J. L., Ritvos, O., & Davis, G. H. (2002). Bmp15 mutations and ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191(1),

- 15–18. [http://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00047-3](http://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00047-3)
- Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors : regulators of cumulus cell function and oocyte quality, *14*(2), 159–177.
- Gomez-Puerto, M. C., Iyengar, P. V., García de Vinuesa, A., ten Dijke, P., & Sanchez-Duffhues, G. (2019). Bone morphogenetic protein receptor signal transduction in human disease. *Journal of Pathology*, *247*(1), 9–20. <http://doi.org/10.1002/path.5170>
- Goswami, D., & Conway, G. S. (2005). Premature ovarian failure. *Human Reproduction Update*, *11*(4), 391–410. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmi012>
- Gougeon, A. (1979). Qualitative changes in medium and large antral follicles in the human ovary during the menstrual cycle . Retrieved from http://rnd.edpsciences.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/rnd/pdf/1979/09/ABABB_0003-388X_1979_19_5_ART0007.pdf
- Gougeon, A. (1999). Regulation of Ovarian Follicular Development in Primats: Facts and hypotheses. *Nature Biotechnology*, *17*(2), 1046. <http://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121>
- Gougeon, A. (2004). Dynamics of Human Follicular Growth : Morphologic , Dynamic , and Functional Aspects, (1).
- Guide, U. (2011). GeneArt ® Site-Directed Mutagenesis System, (January), 2011.
- Hashimoto, O., ... R. M.-P. of the, & 2005, undefined. (n.d.). Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *National Acad Sciences*. Retrieved from <https://www.pnas.org/content/102/15/5426.short>
- Hassel, S., Eichner, A., Yakymovych, M., Hellman, U., Knaus, P., & Souchelnytskyi, S. (2004). Proteins associated with type II bone morphogenetic protein receptor (BMPR-II) and identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, *4*(5), 1346–58. <http://doi.org/10.1002/pmic.200300770>
- Hoek, A., Schoemaker, J., & Drexhage, H. A. (1997). Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity ¹. *Endocrine Reviews*, *18*(1), 107–134. <http://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0291>
- Huntriss, J., Gosden, R., Hinkins, M., Oliver, B., Miller, D., Rutherford, A. J., & Picton, H. M. (2002). Isolation, characterization and expression of the human Factor In the Germline alpha (FIGLA) gene in ovarian follicles and oocytes. *Molecular Human Reproduction*, *8*(12), 1087–1095. <http://doi.org/10.1093/molehr/8.12.1087>
- Hutt, K. J., & Albertini, D. F. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, *14*(6), 758–764. [http://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60679-7](http://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60679-7)
- Invitrogen. (1953). pCR ® 4-TOPO ® 3956, 3956–3956.
- Invitrogen. (2011). PureLink ® Quick Gel Extraction Kit, (25), 24.
- Juengel, J. L., Bodensteiner, K. J., Heath, D. A., Hudson, N. L., Moeller, C. L., Smith, P., ... McNatty, K. P. (2004). Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Animal Reproduction Science*, *82–83*, 447–460. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.021>

- Keirsebilck, A., Bonn  , S., Staes, K., Van Hengel, J., Nollet, F., Reynolds, A., & Van Roy, F. (1998). Molecular cloning of the human p120(ctn) catenin gene (CTNND1): Expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics*, 50(2), 129–146. <http://doi.org/10.1006/geno.1998.5325>
- Kim, M. J., Park, S. Y., Chang, H. R., Jung, E. Y., Munkhjargal, A., Lim, J. S., ... Kim, Y. (2017). Clinical significance linked to functional defects in bone morphogenetic protein type 2 receptor, BMPR2. *BMB Reports*, 50(6), 308–317. <http://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.6.059>
- Kourtidis, A., Ngok, S. P., & Anastasiadis, P. Z. (2013). *P120 catenin: An essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 116). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2>
- Laissue, P. (2015a). Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.005>
- Laissue, P. (2015b). Molecular and Cellular Endocrinology Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure : From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411, 243–257. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.005>
- Laissue, P. (2018a). The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 460, 170–180. <http://doi.org/10.1016/J.MCE.2017.07.021>
- Laissue, P. (2018b). The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 460, 170–180. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.021>
- Laissue, P., L'H  te, D., Serres, C., & Vaiman, D. (2009, January). Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. *Animal*. <http://doi.org/10.1017/S1751731108003315>
- Laissue, P., Lakhal, B., Vatin, M., Batista, F., Burgio, G., Mercier, E., ... Vaiman, D. (2016). Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. *Open Biology*, 6(10). <http://doi.org/10.1098/rsob.160109>
- Laissue, P., Vinci, G., Veitia, R. A., & Fellous, M. (2008). Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure, 282, 101–111. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.005>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Sa  d, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2009, November). A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03571.x>
- Lakhal, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Sa  d, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2010, March). BMP15 and premature ovarian failure: Causal mutations, variants, polymorphisms?

- Clinical Endocrinology*. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03651.x>
- Lakhal, B., Laissue, P., Elghèzal, H., & Fellous, M. (2008). Analyse génétique des insuffisances ovariennes prématurées : implication des gènes forkhead et TGF- β . *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, 36(9), 862–871. <http://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.07.002>
- Latronico, A. C., Anasti, J., Arnhold, I. J. P., Rapaport, R., Mendonca, B. B., Bloise, W., ... Chrousos, G. P. (1996). Testicular and Ovarian Resistance to Luteinizing Hormone Caused by Inactivating Mutations of the Luteinizing Hormone–Receptor Gene. *New England Journal of Medicine*, 334(8), 507–512. <http://doi.org/10.1056/NEJM199602223340805>
- Lee-Hoeflich, S. T., Causing, C. G., Podkowa, M., Zhao, X., Wrana, J. L., & Attisano, L. (2004). Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO Journal*, 23(24), 4792–4801. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600418>
- Lee, W. S., Otsuka, F., Moore, R. K., & Shimasaki, S. (2001). Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*, 65(4), 994–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566718>
- Lew, R. (2018). Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.05.005>
- Liang, L., Soyal, S. M., & Dean, J. (1997). FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development*, 124(24), 4939. Retrieved from internal-pdf://156.160.197.250/4939.full.pdf%0Ahttp://dev.biologists.org/content/124/24/4939.abstract
- Lin, J., & Lai, E. (2017). Bacterial Protein Secretion Systems, 1615, 177–187. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9>
- Lourenço, D., Brauner, R., Lin, L., De Perdigo, A., Weryha, G., Muresan, M., ... Bashamboo, A. (2009). Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *The New England Journal of Medicine*, 360(12), 1200–10. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0806228>
- Luborsky, J. L., Meyer, P., Sowers, M. F., Gold, E. B., & Santoro, N. (2003). Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(1), 199–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525467>
- Luo, Y., Batalao, A., Zhou, H., & Zhu, L. (1997). Mammalian two-hybrid system: A complementary approach to the yeast two-hybrid system. *BioTechniques*, 22(2), 350–352.
- Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., ... O'Malley, B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*, 9(18), 2266–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7557380>
- Machado, R. D., Aldred, M. A., James, V., Harrison, R. E., Patel, B., Schwalbe, E. C., ... Soubrier, F. (2006). Mutations of the TGF- β Type II Receptor BMPR2 in Pulmonary Arterial

- Hypertension, 27(May 2005), 121–132. <http://doi.org/10.1002/humu>
- Machado, R. D., Rudarakanchana, N., Atkinson, C., Flanagan, J. a, Harrison, R., Morrell, N. W., & Trembath, R. C. (2003). Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of Dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Human Molecular Genetics*, 12(24), 3277–86. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddg365>
- Maclaran, K., & Panay, N. (2015). Current concepts in premature ovarian insufficiency, 11, 169–182.
- Magoffin, D. A., & Magarelli, P. C. (1995). Preantral follicles stimulate luteinizing hormone independent differentiation of ovarian theca-interstitial cells by an intrafollicular paracrine mechanism. *Endocrine*, 3(2), 107–112. <http://doi.org/10.1007/BF02990061>
- Mailick, M. R., Hong, J., Greenberg, J., Smith, L., & Sherman, S. (2014). Curvilinear Association of CGG Repeats and Age at Menopause in Women with FMR1 Premutation Expansions. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 0(8), 705. <http://doi.org/10.1002/AJMG.B.32277>
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*. <http://doi.org/10.1210/er.21.2.200>
- McNatty, K. P., Hunter, W. M., MacNeilly, A. S., & Sawers, R. S. (1975). Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human graafian follicles throughout the menstrual cycle. *The Journal of Endocrinology*, 64(3), 555–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1133546>
- Meduri, G., Touraine, P., Beau, I., Lahuna, O., Desroches, A., Vacher-Lavenu, M. C., ... Misrahi, M. (2003). Delayed Puberty and Primary Amenorrhea Associated with a Novel Mutation of the Human Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Clinical, Histological, and Molecular Studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(8), 3491–3498. <http://doi.org/10.1210/jc.2003-030217>
- Mehla, J., Caufield, J. H., & Uetz, P. (2015). The yeast two-hybrid system: A tool for mapping protein-protein interactions. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(5), 425–430. <http://doi.org/10.1101/pdb.top083345>
- Montonen, O., Aho, M., Uitto, J., & Aho, S. (2001). Tissue distribution and cell type-specific expression of p120ctn isoforms. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49(12), 1487–1495. <http://doi.org/10.1177/002215540104901202>
- Moore, R. K., Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2003). Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 304–10. <http://doi.org/10.1074/jbc.M207362200>
- Morrell, N. W. (2006). Pulmonary Hypertension Due to BMPR2 Mutation: A New Paradigm for Tissue Remodeling? *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(8), 680–686. <http://doi.org/10.1513/pats.200605-118SF>
- Mottershead, D., Sugimura, S., ... S. A.-M.-J. of B., & 2015, undefined. (n.d.). Cumulin, an oocyte-

- secreted heterodimer of the transforming growth factor- β family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. *ASBMB*. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/290/39/24007.short>
- Nelson, L. M. (n.d.). Autoimmune ovarian failure: comparing the mouse model and the human disease. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 8(1 Suppl Proceedings), S55-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223375>
- Nishihara, A., Watabe, T., Imamura, T., & Miyazono, K. (2002). Functional Heterogeneity of Bone Morphogenetic Protein Receptor-II Mutants Found in Patients with Primary Pulmonary Hypertension, 13(September), 3055–3063. <http://doi.org/10.1091/mbc.E02>
- Ojeda, D., Lakhal, B., Fonseca, D. J., Braham, R., Mateus, H. E., Mart, C., ... Hospital, T. (2011). Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype, 95(8), 2658–2661. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.045>
- Oktem, O., & Oktay, K. (2007). Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer*, 110(10), 2222–2229. <http://doi.org/10.1002/cncr.23071>
- Patiño, L. C., Silgado, D., & Laissue, P. (2017). A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(3), 145–149. <http://doi.org/10.1080/19396368.2017.1291767>
- Patiño, L. C., Beau, I., Carlosama, C., Buitrago, J. C., González, R., Suárez, C. F., ... Laissue, P. (2017). New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Human Reproduction*, 32(7), 1512–1520. <http://doi.org/10.1093/humrep/dex089>
- Patiño, L. C., Beau, I., Morel, A., Delemer, B., Young, J., Binart, N., & Laissue, P. (2019). Functional evidence implicating NOTCH2 missense mutations in primary ovarian insufficiency etiology. *Human Mutation*, 40(1), 25–30. <http://doi.org/10.1002/humu.23667>
- Patiño, L. C., Walton, K. L., Mueller, T. D., Johnson, K. E., Stocker, W., Richani, D., ... Harrison, C. A. (2017). BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(3), 1009–1019. <http://doi.org/10.1210/jc.2016-3503>
- Pelusi, C., Ikeda, Y., Zubair, M., & Parker, K. L. (2008). Impaired Follicle Development and Infertility in Female Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 in Ovarian Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, 79(6), 1074–1083. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069435>
- Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R. T., ... Matzuk, M. M. (2013). Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), E776–85. <http://doi.org/10.1073/pnas.1218020110>
- Persani, L., Rossetti, R., Di Pasquale, E., Cacciatori, C., & Fabre, S. (2014). The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility

- disorders. *Human Reproduction Update*, 20(6), 869–883. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmu036>
- Piprek, R. P. (2016). *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development* (Vol. 58). <http://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5>
- Podfigurna-Stopa, A., Czyzyk, A., Grymowicz, M., Smolarczyk, R., Katulski, K., Czajkowski, K., & Meczekalski, B. (2016). Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(9), 983–90. <http://doi.org/10.1007/s40618-016-0467-z>
- Prada, C. F., & Laissue, P. (2014). A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics. *Mammalian Genome*, 25(11–12), 618–635. <http://doi.org/10.1007/s00335-014-9537-8>
- Qin, Y., Choi, Y., Zhao, H., Simpson, J. L., Chen, Z.-J., & Rajkovic, A. (2007). NOBOX Homeobox Mutation Causes Premature Ovarian Failure. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 576–581. <http://doi.org/10.1086/519496>
- Quintero-Ronderos, P., Jiménez, K. M., Esteban-Pérez, C., Ojeda, D. A., Bello, S., Fonseca, D. J., ... Laissue, P. (2019). FOXD1 mutations are related to repeated implantation failure, intra-uterine growth restriction and preeclampsia. *Molecular Medicine*, 25(1). <http://doi.org/10.1186/s10020-019-0104-3>
- Quintero-Ronderos, P., & Laissue, P. (2018, August 1). The multisystemic functions of FOXD1 in development and disease. *Journal of Molecular Medicine*. Springer Verlag. <http://doi.org/10.1007/s00109-018-1665-2>
- Quintero-Ronderos, P., & Laissue, P. (2019). Genetic Variants Contributing to Early Recurrent Pregnancy Loss Etiology Identified by Sequencing Approaches. *Reproductive Sciences*. SAGE Publications Inc. <http://doi.org/10.1177/1933719119831769>
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Fukuda, M., González, R., Suárez, C. F., Patarroyo, M. A., ... Laissue, P. (2017). Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. *PloS One*, 12(10), e0186149. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0186149>
- Rabinovitch, M., & Rabinovitch, M. (2012). Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension Find the latest version : Science in medicine Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension, 122(12), 4306–4313. <http://doi.org/10.1172/JCI60658DS1>
- Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N., & Matzuk, M. M. (2004). NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5687), 1157–9. <http://doi.org/10.1126/science.1099755>
- Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., ... Liu, K. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*, 281(2), 160–170. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.013>
- Richards, J. A. S. (2018). *The Ovarian Cycle. Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 107). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.009>

- Rifé, M., Nadal, A., Milà, M., & Willemssen, R. (2004). Immunohistochemical FMRP studies in a full mutated female fetus. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 124A(2), 129–132. <http://doi.org/10.1002/ajmg.a.20342>
- Rossetti, R., Ferrari, I., Bonomi, M., & Persani, L. (2017). Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clinical Genetics*, 91(2), 183–198. <http://doi.org/10.1111/cge.12921>
- Rossetti, R., Ferrari, I., Bonomi, M., & Persani, L. (2017). Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clinical Genetics*, 91(2), 183–198. <http://doi.org/10.1111/cge.12921>
- Rossetti, R., Pasquale, E. Di, Marozzi, A., Bione, S., Toniolo, D., Grammatico, P., ... Persani, L. (2009). BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Human Mutation*, 30(5), 804–810. <http://doi.org/10.1002/humu.20961>
- Rudarakanchana, N., Flanagan, J. A., Chen, H., Upton, P. D., Machado, R., Patel, D., ... Morrell, N. W. (2002). Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension, 11(13), 1517–1525.
- Rudnicka, E., Kruszewska, J., Klicka, K., Kowalczyk, J., Grymowicz, M., Skórska, J., ... Smolarczyk, R. (2018). Premature ovarian insufficiency - aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Przegląd Menopauzalny = Menopause Review*, 17(3), 105–108. <http://doi.org/10.5114/pm.2018.78550>
- Sánchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>
- Schimmer, B. P., & White, P. C. (2010). Minireview: Steroidogenic Factor 1: Its Roles in Differentiation, Development, and Disease. *Molecular Endocrinology*, 24(7), 1322–1337. <http://doi.org/10.1210/me.2009-0519>
- Shelling, A. N. (2008). Premature ovarian failure. <http://doi.org/10.1530/REP-09-0567>
- Shimasaki, S., Moore, R. K., Otsuka, F., & Erickson, G. F. (2004). The Bone Morphogenetic Protein System In Mammalian Reproduction. *Endocrine Reviews*, 25(1), 72–101. <http://doi.org/10.1210/er.2003-0007>
- Silgado Guzmán, D. F., & Humana, M. en C. con É. en G. (2017). Implicación funcional de la mutación BMP2-p.Ser987Phe en la etiología de la insuficiencia ovárica primaria no sindrómica. *Reponame:Repositorio Institucional EdocUR*. Retrieved from <http://repository.urosario.edu.co/handle/10336/14195>
- Sklar, C. (2005). Maintenance of Ovarian Function and Risk of Premature Menopause Related to Cancer Treatment. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 2005(34), 25–27. <http://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgi018>
- Soyal, S. M., Amleh, a, & Dean, J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development (Cambridge, England)*, 127(21), 4645–4654.
- Stocco, C., Telleria, C., & Gibori, G. (2007). The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endocrine Reviews*, 28(1), 117–149.

<http://doi.org/10.1210/er.2006-0022>

- Stynen, B., Tournu, H., Tavernier, J., & Van Dijck, P. (2012). Diversity in Genetic In Vivo Methods for Protein-Protein Interaction Studies: from the Yeast Two-Hybrid System to the Mammalian Split-Luciferase System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 331–382. <http://doi.org/10.1128/mmbr.05021-11>
- Sun, R. Z., Lei, L., Cheng, L., Jin, Z. F., Zu, S. J., Shan, Z. Y., ... Liu, Z. H. (2010). Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. *Journal of Molecular Histology*, 41(6), 325–332. <http://doi.org/10.1007/s10735-010-9294-2>
- Suzumori, N., Yan, C., Matzuk, M. M., & Rajkovic, A. (2002). Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mechanisms of Development*, 111(1–2), 137–141. [http://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00620-7](http://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00620-7)
- Themmen, A. P. N., & Huhtaniemi, I. T. (2000). Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function. *Endocrine Reviews*, 21(5), 551–583. <http://doi.org/10.1210/edrv.21.5.0409>
- Touraine, P., Beau, I., Gougeon, A., Meduri, G., Desroches, A., Pichard, C., ... Misrahi, M. (1999). New Natural Inactivating Mutations of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Correlations between Receptor Function and Phenotype. *Molecular Endocrinology*, 13(11), 1844–1854. <http://doi.org/10.1210/mend.13.11.0370>
- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., ... Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1171–1181. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddh124>
- Vatin, M., Bouvier, S., Bellazi, L., Montagutelli, X., Laissue, P., Ziyyat, A., ... Gris, J. C. (2014). Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss. *American Journal of Pathology*, 184(2), 362–368. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.024>
- Vatin, M., Burgio, G., Renault, G., Laissue, P., Firlej, V., Mondon, F., ... Ziyyat, A. (2012). Refined mapping of a quantitative trait locus on chromosome 1 responsible for mouse embryonic death. *PLoS ONE*, 7(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043356>
- Wang, H., Ji, R., Meng, J., Cui, Q., Zou, W., Li, L., ... Penny, D. J. (2014). Functional changes in pulmonary arterial endothelial cells associated with BMPR2 mutations. *PLoS ONE*, 9(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0106703>
- Welt, C. K., Martin, K. A., Taylor, A. E., Lambert-Messerlian, G. M., Crowley, W. F., Smith, J. A., ... Hall, J. E. (1997). Frequency Modulation of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) during the Luteal-Follicular Transition: Evidence for FSH Control of Inhibin B in Normal Women¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(8), 2645–2652. <http://doi.org/10.1210/jcem.82.8.4138>
- Williams, C., & Erickson, G. (2012). *Morphology and Physiology of the Ovary*. (L. De Groot, G. Chrousos, & K. Dungan, Eds.). Endotext. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/?report=classic>

- Wilson, J. B., May, G. H. W., & Izumi, K. M. (2003). The Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins. *Epstein-Barr Virus Protocols*, 174, 249–258. <http://doi.org/10.1385/1-59259-227-9:249>
- Yang, S. (2017). Diagnostic and therapeutic considerations in Turner syndrome. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 22(4), 226–230. <http://doi.org/10.6065/apem.2017.22.4.226>
- Zhao, H., Chen, Z.-J., Qin, Y., Shi, Y., Wang, S., Choi, Y., ... Rajkovic, A. (2008). Transcription Factor FIGLA is Mutated in Patients with Premature Ovarian Failure. *The American Journal of Human Genetics*, 82(6), 1342–1348. <http://doi.org/10.1016/J.AJHG.2008.04.018>
- Zhao, H., Li, Z., Cooney, A. J., & Lan, Z.-J. (2007). Orphan nuclear receptor function in the ovary. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 12, 3398–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485308>
- Zilberberg, L., ten Dijke, P., Sakai, L. Y., & Rifkin, D. B. (2007). A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity. *BMC Cell Biology*, 8, 41. <http://doi.org/10.1186/1471-2121-8-41>

12. Anexo 1.

p120 en humano (ENST00000361391). Las letras rojas corresponden a la secuencia que se clonó en vector pCR4-TOPO (Invitrogen), que contiene 999pb y va desde la posición 1545 hasta la posición 2543.

```
ATGGACGACTCAGAGGTGGAGTCGACCGCCAGCATCTTGGCCTCTGTGAAGGAACAAGAGGCCAGTTTGAGAAGCTGAC
CCGGGCGCTGGAGGAGGAACGGCGCCACGTCTCGGCGCAGCTGGAACGCGTCCGGGTCTCACCACAAGATGCCAACCCAC
TCATGGCCAACGGGCACACTCACCCGCCGGCATCAGAACGGCCGGTTTGTGGGCGATGCTGACCTTGAAAGACAGAAATTT
TCAGATTTGAAACTCAACGGACCCAGGATCACAGTCACCTTCTATATAGCACCATCCCCAGGATGCAGGAGCCGGGGCA
GATTGTGGAGACCTACACGGAGGAGGATCCTGAGGGAGCCATGTCTGTAGTCTCTGTGGAGACCTCAGATGATGGGACCA
CTCGGCGCACAGAGACCACGGTCAAGAAAGTAGTGAAGACTGTGACAAACACGGACAGTACAGCCAGTCGCTATGGGACCA
GACGGGTTGCCTGTGGATGCTTCATCAGTTTCTAACAACATATATCCAGACTTTGGGTCGTGATTTCCGCAAGAAATGGCAA
TGGGGGACCTGGTCCCTATGTGGGGCAAGCTGGCACTGCTACCTTCTTAGGAACTTCCACTACCTCCTGATGGTTATA
GTCGCCACTATGAAGATGGTTATCCAGGTGGCAGTGATAACTATGGCAGTCTGTCCCGGTGACCCGCATTGAGGAGCGG
TATAGGCCCAGCATGGAAGGCTACCGGGCACCTAGTAGACAGGATGTGTATGGGCCCCAACCCAGGTTTCGGGTAGGTGG
GAGCAGCGTGGATCTGCATCGCTTTCATCCAGAGCCTTATGGGCTAGAGGATGACCAGCGTAGTATGGGCTATGATGACC
TGGATTATGGTATGATGTCTGATTATGGCACTGCCCCGTCGGACTGGGACACCCCTCTGACCCCTCGTCGGCGCCTCAGGAGC
TATGAAGACATGATTGGTGAGGAGGTGCCATCGGATCAATACTACTGGGCTCCTTTGGCCCAGCATGAGCGAGGAAGTTT
AGCAAGCTTGGATAGCCTGCGCAAAGGAGGGCCTCCACCTCCTAATTGGAGACAGCCAGAGCTGCCAGAGGTGATCGCCA
TGCTTGGATTCCGCTTGGATGCTGTCAAGTCCAATGCAGCTGCATACCTGCAACACTTATGCTACCGCAATGACAAGGTG
AAGACTGACGTGCGGAAGCTCAAGGGCATCCCAGTACTGGTGGGATTGTTAGACCATCCCCAAAAAGGAAGTGACCTTGG
AGCCTGTGGAGCTCTCAAGAATATCTCTTTTGGACGTGACCAGGATAACAAGATTGCCATAAAAAACTGTGATGGTGTGC
CTGCCCTTGTGCGATTGCTTCGAAAGGCTCGTGATATGGACCTTACTGAAGTTATTACCGGAACCCGTGGAATCTTTCA
TCCCATGACTCAATCAAAATGGAGATTGTGGACCATGCACTGCATGCCTTGACAGATGAAGTGATCATTCCTCATTTCTGG
TTGGGAGCGGGAACCTAATGAAGACTGTAAGCCACGCCACATTGAGTGGGAATCGGTGCTCACCAACACAGCTGGCTGCC
TTAGGAATGTAAGCTCAGAGAGGAGTGAAGCTCGCCGGAACCTTCGGGAATGTGATGGTTTAGTTGATGCCCTCATTTTC
ATTGTTTCAAGCTGAGATTGGGCAGAAGGATTTCAGACAGCAAGCTTGTAGAGAACTGTGTTTGCCTTCTTCGGAACTTATC
ATATCAAGTTCACCGGGAGATCCCACAGGCAGAGCGTTACCAAGAGGCAGCTCCCAATGTTGCCAACAACTACTGGGCCAC
ATGCTGCCAGTTGCTTTGGGGCCAAGAAGGGCAAAGGGAAAAAACCTATAGAGGATCCAGCAAACGATACAGTGGATTTC
CCTAAAAGAACGAGTCCAGCTCGAGGCTATGAGCTCTTATTTTCAGCCAGAGGTGGTTTCGGATATACATCTCACTTCTTAA
GGAGAGCAAGACTCCTGCCATCCTAGAAGCCTCAGCTGGAGCTATCCAGAACTTGTGTGCTGGGCGCTGGACGTATGGTC
GATACATCCGCTCTGCTCTGCGTCAAGAGAAGGCTCTTTCTGCCATAGCTGACCTCCTGACTAATGAACATGAACGGGTG
GTGAAAGCTGCATCTGGAGCACTGAGAAAACCTGGCTGTGGATGCTCGCAACAAAGAATTAATTGGTAAACATGCTATTCC
TAACTTGGTAAAGAATCTGCCAGGAGGACAGCAGAACTCCTCTTGGAATTTCTCTGAGGACACTGTCTATCTATTTTGA
ACACTATCAACGAGGTTATCGCTGAGAACTTGGAGGCTGCCAAAAAGCTTCGAGAGACACAGGGTATTGAGAAGCTGGTG
TTGATCAACAAATCAGGGAACCGCTCAGAAAAAGAAGTTCGAGCAGCAGCACTTGTATTACAGACAATCTGGGGATATAA
GGAACTGCGGAAGCCACTGGAAAAAGAAGGATGGAAGAAATCAGACTTTCAGGTGAATCTAAACAATGCTTCCCGAAGCC
AGAGCAGTCATTCATATGATGATAGTACTCTCCCTCTCATTTGACCGGAACCAAAAAATCAGATAACAACATATCCACACCA
AATGAGAGAGGAGACCACAATAGAACACTGGATCGATCGGGGGATCTAGGCGACATGGAGCCATTGAAGGGGAACAACACC
CTTGATGCAGGACGAGGGGCAGGAATCTCTGGAGGAAGAGTTGGATGTGTTGGTTTTGGATGATGAGGGGGGCCAAGTGT
CTTACCCCTCCATGCAGAAGATTTAG
```

13. Anexo 2

LIMK1 en humano (ENST00000336180.7). Las letras rojas corresponden a la secuencia que se clonó en vector pCR4-TOPO (Invitrogen), que contiene 397 pb y va desde la posición 77 hasta la posición 477.

```
ATGAGGTTGACGCTACTTTGTTGCACCTGGAGGGAAGAACGTATGGGAGAGGAAGGAAGCGAGTTGCCCGTGTGTGC
AAGCTGCGGCCAGAGGATCTATGATGGCCAGTACCTCCAGGCCCTGAACGCGGACTGGCACGCAGACTGCTTCAGGT
GTTGTGACTGCAGTGCCTCCCTGTGCGACCAGTACTATGAGAAGGATGGGCAGCTCTTCTGCAAGAAGGACTACTGG
GCCCCGCTATGGCGAGTCTGCCATGGGTGCTCTGAGCAAATCACCAAGGGACTGGTTATGGTGGCTGGGGAGCTGAA
GTACCACCCCGAGTGTTTCATCTGCCTCACGTGTGGGACCTTTATCGGTGACGGGGACACCTACACGCTGGTGGAGC
ACTCCAAGCTGTACTGCGGGCACTGCTACTACCAGACTGTGGTGACCCCCGTCATCGAGCAGATCCTGCCTGACTCC
CCTGGCTCCCACGTCCCCACACCGTCACCTGGTGTCCATCCCAGCCTCATCTCATGGCAAGCGTGGAAGTTCAGT
CTCCATTGACCCCCCGCACGGCCACCGGGCTGTGGCACCGAGCACTCACACACCGTCCGCGTCCAGGGAGTGGATC
CGGGCTGCATGAGCCCAGATGTGAAGAATTCCATCCACGTGCGAGACCGGATCTTGGAATCAATGGCACGCCCATC
CGAAATGTGCCCCCTGGACGAGATTGACCTGCTGATTACAGGAAACCAGCCGCTGCTCCAGCTGACCTTCGAGCATGA
CCCTCACGATACACTGGGCCACGGGCTGGGGCTGAGACCAGCCCCCTGAGCTCTCCGGCTTATACTCCCAGCGGGG
AGGCGGGCAGCTCTGCCCCGAGAAACCTGTCTTGAGGAGCTGCAGCATCGACAGGTCTCCGGGCGCTGGCTCACTG
GGCTCCCCGGCCTCCAGCGCAAGGACCTGGGTGCTCTGAGTCCCTCCGCGTAGTCTGCCGGCCACACCGCATCTT
CCGGCCGTGCGACCTCATCCACGGGGAGGTGCTGGGCAAGGGCTGCTTCGGCCAGGCTATCAAGGTGACACACCGTG
AGACAGGTGAGGTGATGGTGATGAAGGAGCTGATCCGGTTCGACGAGGAGACCCAGAGGACGTTCTCAAGGAGGTG
AAGGTCATGCGATGCCTGGAACACCCCCAACGTGCTCAAGTTCATCGGGGTGCTCTACAAGGACAAGAGGCTCAACTT
CATCACTGAGTACATCAAGGGCGGCACGCTCCGGGGCATCATCAAGAGCATGGACAGCCAGTACCCATGGAGCCAGA
GAGTGAGCTTTGCCAAGGACATCGCATCAGGGATGGCCTACCTCCACTCCATGAACATCATCCACCGAGACCTCAAC
TCCCACAACCTGCCTGGTCCGCGAGAACAAGAATGTGGTGGTGGCTGACTTCGGGCTGGCGCGTCTCATGGTGGACGA
GAAGACTCAGCCTGAGGGCCTGCGGAGCCTCAAGAAGCCAGACCGCAAGAAGCGCTACACCGTGGTGGGCAACCCCT
ACTGGATGGCACCTGAGATGATCAACGGCCGAGCTATGATGAGAAGGTGGATGTGTTCTCCTTTGGGATCGTCTCTG
TGCGAGATCATCGGGCGGGTGAACGCAGACCCTGACTACCTGCCCCGCACCATGGACTTTGGCCTCAACGTGCGAGG
ATTCTTGACCGCTACTGCCCCCAAACCTGCCCCCGAGCTTCTTCCCCATCACCGTGCGCTGTTGCGATCTGGACC
CCGAGAAGAGGCCATCCTTTGTGAAGCTGGAACACTGGCTGGAGACCCTCCGCATGCACCTGGCCGGCCACCTGCCA
CTGGGCCCCACAGCTGGAGCAGCTGGACAGAGGTTTCTGGGAGACCTACCGGCGCGGCGAGAGCGGACTGCCTGCCCA
CCCTGAGGTCCCCGACTGAGCCAGGGCCACTCAGCTGCCCCCTGTCCCCACCTCTGGAGAATCACCCCCACCAGATT
CCTCCGCGGGAGGTGGCCCTCAGCTGGGACAGTGGGGACCCAGGCTTCTCCTCAGAGCCAGGCCCTGACTTGCCTTC
TCCCACCCCGTGGACCGCTTCCCCTGCCTTCTCTCTGCGTGGCCAGAGCCGCGCCAGCTGCACACACACACCATG
CTCTCGCCCTGCTGTAACCTCTGTCTTGCGAGGGCTGTCCCCTCTTGCTTCTCCTTGATGAGCTGGAGGGCTGTG
TGAGTTACGCCCCCTTCCACACGCCGCTGCCCCAGCAACCCTGTTACGCTCCACCTGTCTGGTCCATAGCTCCCTG
GAGGCTGGGCCAGGAGGCAGCCTCCGAACCATGCCCCATATAACGCTTGGGTGCGTGGGAGGGCGCACATCAGGGCA
GAGGCCAAGTTCCAGGTGTCTGTGTTCCAGGAACCAAATGGGGAGTCTGGGGCCCGTTTTTCCCCCAGGGGGTGTG
TAGGTAGCAACAGGTATCGAGGACTCTCCAAACCCCCAAAGCAGAGAGAGGGCTGATCCCATGGGGCGGAGGTCCCC
AGTGGCTGAGCAAACAGCCCCCTTCTCTCGCTTTGGGTCTTTTTTTTTGTTTCTTTCTTAAAGCCACTTTAGTGAGAAG
CAGGTACCAAGCCTCAGGGTGAAGGGGGTCCCTTGAGGGAGCGTGAGCTGCGGTGCCCTGGCCGGCGATGGGGAGG
AGCCGGCTCCGGCAGTGAGAGGATAGGCACAGTGGACCGGGCAGGTGTCCACCAGCAGCTCAGCCCCCTGCAGTCATC
TCAGAGCCCCCTTCCCGGGCCTCTCCCCAAGGCTCCCTGCCCCCTCCTCATGCCCCCTCTGTCTCTGCGTTTTTCTG
TGTAATCTATTTTTTAAGAAGAGTTTGTATTATTTTTTTCATACGGCTGCAGCAGCAGCTGCCAGGGGCTTGGGATTT
TATTTTTGTGGCGGGCGGGGTGGGAGGGCCATTTTGTCACTTTGCCTCAGTTGAGCATCTAGGAAGTATTAATAACT
GTGAAGCTTTCTCAGTGCACCTTTGAACCTGGAAAACAATCCCAACAGGCCCGTGGGACCATGACTTAGGGAGGTGGG
ACCCACCCACCCCATCCAGGAACCGTGACGTCCAAGGAACCAACCCAGACGCAGAACAATAAAATAAATTCCGTA
CTCCCCACCCA
```

14. Anexo 3

Alineamiento de *LIMK1* en humano y en ratón. En azul la secuencia de los clones reportados en el ensayo de Y2H en levaduras.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

mLimk1      ATGAGGTTGACGCTACTTTGTTGCACCTGGAGGGAAGAACGTATGGGAGAGGAAGGAAGC
hLIMK1      ATGAGGTTGACGCTACTTTGTTGCACCTGGAGGGAAGAACGTATGGGAGAGGAAGGAAGC
*****

mLimk1      GAGTTGCCTGTGTGTGCGAGCTGTGGCCAGAGGATCTATGACGGCCAGTACCTCCAGGCC
hLIMK1      GAGTTGCCCCGTGTGTGCAAGCTGCGGCCAGAGGATCTATGATGGCCAGTACCTCCAGGCC
*****

mLimk1      CTGAATGCTGACTGGCATGCAGACTGCTTCAGGTGCTGCGAGTGTAGCGTCTCCCTTTCA
hLIMK1      CTGAACGCGGACTGGCACGCAGACTGCTTCAGGTGTTGTGACTGCAGTGCCTCCCTGTGCG
*****

mLimk1      CACCAGTACTACGAGAAGGATGGACAGCTCTTCTGCAAGAAGGACTACTGGGCCCGCTAT
hLIMK1      CACCAGTACTATGAGAAGGATGGGCAGCTCTTCTGCAAGAAGGACTACTGGGCCCGCTAT
*****

mLimk1      GGCGAGTCTTGCCACGGGTGCTCCGAGCACATCACCAAAGGGCTGGTCATGGTGGCTGGG
hLIMK1      GGCGAGTCTTGCCATGGGTGCTCTGAGCAAAACCAAAGGGACTGGTTATGGTGGCTGGG
*****

mLimk1      GAGCTGAAGTACCACCCTGAGTGTTTCATCTGCCTCGCCTGTGGAACTTCATTGGCGAT
hLIMK1      GAGCTGAAGTACCACCCGAGTGTTTCATCTGCCTCACGTGTGGGACCTTTATCGGTGAC
*****

mLimk1      GGGGACACCTACACACTGGTGGAGCACTCCAAGCTGTACTGTGGCCAGTGTACTACCAG
hLIMK1      GGGGACACCTACACGCTGGTGGAGCACTCCAAGCTGTACTGCGGGCACTGTACTACCAG
*****

mLimk1      ACCGTGGTAACTCCAGTCATCGAACAGATCCTACCTGACTCACCCGGCTCCCACTGCCC
hLIMK1      ACTGTGGTGACCCCGTCATCGAGCAGATCCTGCCTGACTCCCCTGGCTCCCACTGCCC
*****

mLimk1      CACACAGTCACCCTCGTGTCTATCCCAGCCTCTGCCCATGGCAAACGAGGCCTGTCTGTC
hLIMK1      CACACCGTCACCCTGGTGTCCATCCCAGCCTCATCTCATGGCAAGCGTGGACTTTTCAGTC
*****

mLimk1      TCCATCGACCCCCCTCACGCCCCACCAGGATGTGGCACGGAGCATTCGCACACTGTCCGA
hLIMK1      TCCATTGACCCCCCGCACGCCCCACCGGGCTGTGGCACCGAGCACTCACACACCGTCCGC
*****

mLimk1      GTCCAAGGAGTGGAACCCAGGCTGCATGAGCCCAGATGTGAAGAATTCCATCCACGTTGGA
hLIMK1      GTCCAGGGAGTGGAATCCGGGCTGCATGAGCCCAGATGTGAAGAATTCCATCCACGTCGGA
*****

mLimk1      GACCGGATCTTGGAATCAATGGCACGCCCATCCGGAATGTGCCGCTGGACGAGATCGAC
hLIMK1      GACCGGATCTTGGAATCAATGGCACGCCCATCCGAAATGTGCCCTGGACGAGATTGAC
*****

mLimk1      TTGCTGATCCAGGAGACCAGCCGCTGTCTCCAGCTGACCTCGAGCACGACCCCCATGAC
hLIMK1      CTGCTGATTCAGGAAACCAGCCGCTGTCTCCAGCTGACCTCGAGCATGACCTCACGAT
*****

```

15. Anexo 4

Alineamiento de *p120* en humano y en ratón. En azul la secuencia de los clones reportados en el ensayo de Y2H en levaduras.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

mCtnnd1      CGAAAGGCTCGTGATATGGACCTGACTGAAGTGATTACTGGAACCCTGTGGAATCTCTCA
hCTNND1      CGAAAGGCTCGTGATATGGACCTTACTGAAGTTATTACCGGAACCCTGTGGAATCTTTCA
*****

mCtnnd1      TCCCATGATTCAATCAAAATGGAGATTGTGGACCATGCGCTACATGCCTTGACAGATGAA
hCTNND1      TCCCATGACTCAATCAAAATGGAGATTGTGGACCATGCACTGCATGCCTTGACAGATGAA
*****

mCtnnd1      GTTATCATTCACATTCTGGTTGGGAGAGAGAACCTAATGAAGACTGTAAGCCACGGCAT
hCTNND1      GTGATCATTCCTCATTCTGGTTGGGAGCGGGAACCTAATGAAGACTGTAAGCCACGCCAC
** *****

mCtnnd1      ATTGAATGGGAGTCAGTGCTTACCAACACTGCTGGCTGCCTTCGGAACGTAAGCTCAGAG
hCTNND1      ATTGAGTGGGAATCGGTGCTACCAACACAGCTGGCTGCCTTAGGAATGTAAGCTCAGAG
*****

mCtnnd1      AGGAGTGAAGCCCGAGGAAACTTCGGAATGTGACGGCTTAGTTGATGCCCTCATTTC
hCTNND1      AGGAGTGAAGCTCGCCGAAACTTCGGAATGTGATGGTTAGTTGATGCCCTCATTTC
*****

mCtnnd1      ATCGTTCAGGCAGAAATGGGCAGAAGGATTCAGACAGTAAGCTTGTGGAGAATTGTGTT
hCTNND1      ATTGTTTCAGGCTGAGATTGGGCAGAAGGATTCAGACAGCAAGCTTGTAGAGAAGTGTGTT
** *****

mCtnnd1      TGCCTCCTCCGGAACCTTATCATACCAAGTTCATCGTGAAATCCACAGGCAGAGCGTTAC
hCTNND1      TGCCTTCTTCGGAACCTTATCATATCAAGTTCACCGGAGATCCACAGGCAGAGCGTTAC
*****

mCtnnd1      CAGGAGGCCCTTCCTACTGTGGCTAACAGTACTGGGCCACACGCTGCCAGTTGCTTTGGA
hCTNND1      CAAGAGGCAGCTCCCAATGTTGCCAACATACTGGGCCACATGCTGCCAGTTGCTTTGGG
** *****

mCtnnd1      GCCAAGAAGGGCAAAGGGAAAAAGCCTACAGAGGATCCAGCAAATGATACAGTGGATTTC
hCTNND1      GCCAAGAAGGGCAAAGGGAAAAAACCTATAGAGGATCCAGCAAACGATACAGTGGATTTC
*****

mCtnnd1      CCTAAAAGAACTAGTCCTGCTCGAGGCTATGAACTCTTATTTAGCCAGAAGTGGTGCGA
hCTNND1      CCTAAAAGAACGAGTCCAGCTCGAGGCTATGAGCTCTTATTTAGCCAGAGGTGGTTCGG
*****

mCtnnd1      ATATACATTTCACTCCTTAAGGAGAGCAAGACGCCTGCCATCTTAGAAGCCTCGGCCGGA
hCTNND1      ATATACATCTCACTTCTTAAGGAGAGCAAGACTCCTGCCATCCTAGAAGCCTCAGCTGGA
*****

mCtnnd1      GCTATCCAGAACTTGTGTGCTGGGCGTTGGACATATGGCAGATACATCCGCTCTGCTCTT
hCTNND1      GCTATCCAGAACTTGTGTGCTGGGCGCTGGACGTATGGTCGATACATCCGCTCTGCTCTG
*****

mCtnnd1      CGTCAGGAGAAGGCTCTCTTGCCATAGCTGAGCTCCTTACGAGTGAGCATGAGCGAGTA
hCTNND1      CGTCAAGAGAAGGCTCTTTCTGCCATAGCTGACCTCCTGACTAATGAACATGAACGGGTG
*****

```

mCtnnd1	GTAAAAGCTGCTTCTGGGGCACTGAGAAATCTGGCTGTGGATGCTCGGAACAAAGAGTTA
hCTNND1	GTGAAAGCTGCATCTGGAGCACTGAGAAACCTGGCTGTGGATGCTCGCAACAAAGAATTA
	** ***** **
mCtnnd1	ATTGGCAAGCATGCTATTCTAACTTGGTAAAGAATCTGCCAGGAGGTCAACAGAACTCC
hCTNND1	ATTGGTAAACATGCTATTCTAACTTGGTAAAGAATCTGCCAGGAGGACAGCAGAACTCC
	***** ** *****
mCtnnd1	TCCTGGAATTTTCTGAAGATACTGTGGTCTCCATATTGAACACCATCAACGAAGTTATC
hCTNND1	TCTTGGAATTTCTCTGAGGACACTGTCATCTCTATTTTGAACACTATCAACGAGGTATC
	** ***** ** ***** ** *****
mCtnnd1	GCTGAGAACTTAGAAGCTGCCAAAAGCTTCGAGAGACGCAGGGTATTGAGAAGCTGGTG
hCTNND1	GCTGAGAACTTGGAGGCTGCCAAAAGCTTCGAGAGACACAGGGTATTGAGAAGCTGGTG
	***** ** *****
mCtnnd1	TTGATCAACAAATCAGGGAATCGTTCAGAAAAAGAAGTCCGGGCAGCAGCTCTTGTCTTG
hCTNND1	TTGATCAACAAATCAGGGAACCGCTCAGAAAAAGAAGTTCGAGCAGCAGCACTTGTATTA
	***** ** ***** ** *****
mCtnnd1	CAGACAATCTGGGGCTATAAGGAGCTTCGGAAGCCACTGGAAAAAGAAGGATGGAAGAAA
hCTNND1	CAGACAATCTGGGGATATAAGGAACTGCGGAAGCCACTGGAAAAAGAAGGATGGAAGAAA
	***** ***** ** *****
mCtnnd1	TCAGACTTCCAGGTGAATCTAAA
hCTNND1	TCAGACTTTCAGGTGAATCTAAA
	***** ***** ** *****
mCtnnd1	GATAGCACTCTCCCCCTCATTGACCGGAATCAAAAATCAGATAAGAAA---CCTGACC-
hCTNND1	GATAGTACTCTCCCTCTCATTGACCGGAACCAAAAATCAGATAACAACCTATTCACACCA
	***** ***** ***** ***** ** **
mCtnnd1	-----GGGAAGAAATTCCAAT-GAGCAATAT-----GGGGTCAA----ACACAAAA
hCTNND1	AATGAGAGAGGAGACCACAATAGAACACTGGATCGATCGGGGGATCTAGGCGACATGGAG
	* ** *