

**LA VARIANTE c.-9C>G DEL PROMOTOR DE *BMP15* ESTÁ ASOCIADADA A
LA ETIOLOGÍA DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA NO-SINDRÓMICA**

ANGELA MARÍA ORTIZ VANEGAS

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C.

NOVIEMBRE DE 2015

**LA VARIANTE c.-9C>G DEL PROMOTOR DE *BMP15* ESTÁ ASOCIADADA A
LA ETIOLOGÍA DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA NO-SINDRÓMICA**

ANGELA MARÍA ORTIZ VANEGAS

TRABAJO DE GRADO

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

DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD., MSc., PhD

CODIRECTORA

DORA FONSECA Biol., MSc., PhD(c)

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C.

NOVIEMBRE DE 2015

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

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

**LA VARIANTE c.-9C>G DEL PROMOTOR DE *BMP15* ESTÁ ASOCIADADA A
LA ETIOLOGÍA DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA NO-SINDRÓMICA**

ANGELA MARÍA ORTIZ VANEGAS

APROBADO

PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD

DIRECTOR

JURADO

JURADO

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y a Cesar, por hacer todo cuanto estuvo a su alcance para ayudarme.

A la universidad del Rosario, por haberme dado la oportunidad de realizar la maestría y desarrollar este trabajo de investigación.

A la Dra. Dora Fonseca y al Dr. Paul Laissue, por sus enseñanzas, guía y apoyo a lo largo de la realización de esta tesis.

A mis amigos que me acompañaron y me ayudaron a construir este camino que nos condujo a lograr este objetivo importante de nuestras vidas.

CONTENIDO

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	1
2.1 Introducción a la fisiología ovárica	1
2.1.1 Reproducción sexual: células germinales primordiales, origen de los gametos femeninos y Foliculogénesis.....	1
2.1.2 Células germinales primordiales y determinación del sexo femenino	2
2.1.3 Población y atresia folicular	4
2.1.4 La foliculogénesis	5
2.1.5 Ovulación	7
2.2 Infertilidad femenina	8
2.2.1 Epidemiología y definiciones.....	8
2.2.2 Etiología de la infertilidad.....	10
2.3 Falla ovárica prematura	12
2.3.1 Epidemiología	12
2.3.2 Definición y diagnóstico	12
2.3.3 Etiología	13
2.4 Falla ovárica prematura de origen genético.....	14
2.4.1 Causas sindrómicas	15
2.5 Causas no-sindrómicas	21
2.5.1 Receptores de gonadotrofinas	21
2.5.2 Factores de transcripción.....	23
2.5.3 <i>NR5A1</i>	26

2.5.4	<i>STAG3</i>	27
2.5.5	<i>NANOS3</i>	28
2.5.6	<i>SYCE1</i>	29
2.6	Gen <i>BMP15</i>	30
2.7	Proteína BMP15	31
2.7.1	Características estructurales	31
2.7.2	Receptores de BMP.....	33
2.7.3	Función biológica de BMP15.....	34
2.7.4	Modelos naturales y experimentales de <i>BMP15</i>	37
2.7.5	Estudios en humanos	40
2.8	La variante -9C>G en el promotor de <i>BMP15</i> y la proteína PITX1.....	44
2.8.1	<i>PITX1</i>	45
3.	PREGUNTA CIENTÍFICA	47
4.	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	47
4.1	Objetivo general	47
4.2	Objetivos específicos	48
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	48
5.1	Análisis <i>in-silico</i> del promotor de <i>BMP15</i>	48
5.1.1	Identificación de potenciales sitios de unión a factores de transcripción en las secuencias nucleotídicas de la región 5' del gen <i>BMP15</i>	48
5.1.2	Alineamiento múltiple de la región promotora de <i>BMP15</i>	49
5.2	Construcciones plasmídicas.....	49
5.2.1	Promotor de <i>BMP15</i> en pGL4.22[luc2CP/Puro].....	49
5.2.2	Construcción pcDNA3.1- <i>PITX1</i>	58
5.3	Cultivos celulares, transfección y ensayo reportero de luciferasa.....	64
5.3.1	Línea celular COS-7.....	64

5.4	Transfección	65
5.4.1	Eficiencia de la transfección	66
5.4.2	Co-transfección de los constructos BMP15-prom-C o BMP15-prom-G con pcDNA-PITX1.....	67
5.5	Co-expresión de <i>BMP15</i> y <i>PITX1</i> en oocitos humanos y ovario de ratón	68
5.5.1	Extracción de mRNA de oocitos humanos	68
5.5.2	Síntesis de cDNA mediante RT-PCR.....	70
5.5.3	Amplificación por RT-PCR de <i>PITX1</i> en oocitos humanos	70
5.5.4	Extracción de mRNA y obtención de cDNA de ovarios de ratón adulto.....	71
5.5.5	Amplificación por RT-PCR de <i>Pitx1</i> de ovarios de ratón adulto.....	71
5.5.6	Amplificación por RT-PCR de <i>BMP15</i> en oocitos humanos y ovarios de ratón.....	72
6.	RESULTADOS.....	73
6.1	Análisis <i>in-silico</i> del promotor de <i>BMP15</i>	73
6.2	Co-expresión de <i>BMP15</i> y <i>PITX1</i> en oocitos y en ovarios de ratón	75
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	77
8.	DISCUSIÓN GENERAL.....	82
9.	PERSPECTIVAS	85
10.	BIBLIOGRAFÍA	88
11.	ANEXOS	108
11.1	Anexo 1 Análisis <i>In-silico</i> del promotor del <i>BMP15</i> . Tabla de TFBS.....	108
11.2	Anexo 2 Artículo	120

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Interacción de BMP15 y KL en la regulación de la mitosis de las células de la granulosa.....	36
Figura 2 Esquema de las variantes identificadas en el gen BMP15 asociadas con FOP no-sindrómica.....	43
Figura 3 Amplificación del promotor de <i>BMP15</i>	51
Figura 4. Electroforetograma que corresponde a la secuenciación del fragmento del promotor de BMP15 con la letra C o G en la posición -9.	52
Figura 5. Mapa del vector pGL4.22[luc2CP/Puro] (Promega).	53
Figura 6. PCR de verificación de los clones positivos. Carril 1,2,3 y 5: fragmentos que corresponden a la amplificación de BMP15 con primers sobre vector. Carril 6: blanco. Carril 7, 9, 10 y 12: fragmentos que corresponden a la amplificación de BMP15 con primers sobre el fragmento. Carril 8: marcador de peso molecular. Carril 13 : blanco.	58
Figura 7. Mapa del vector pcDNA TM 3.1(+).	61
Figura 8 Alineamiento múltiple de las secuencias del promotor de <i>BMP15</i> de especies de mamíferos vertebrados.....	74
Figura 9. Activación del promotor de <i>BMP15</i> -9C/G por PITX1	74
Figura 10. Co-expresión de <i>BMP15</i> y <i>PITX1</i> en oocito de humano y ovario de ratón.....	76

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1 Sitios putativos de unión a <i>Pitx1</i> presentes en los promotores hipófisis-específicos.	46
Tabla 2 Primers de amplificación del promotor de <i>BMP15</i>	50
Tabla 3 Programa de PCR para el fragmento del promotor de <i>BMP15</i>	50
Tabla 4. Primers de amplificación del vector PGL4.22[luc2CP/Puro].....	55
Tabla 5 Programa de PCR para amplificación del vector PGL4.22[luc2CP/Puro]	55
Tabla 6 Condiciones de la reacción de ligación del fragmento del promotor de <i>BMP15</i> con la letra C o G en la posición -9 en el vector pGL4.....	56
Tabla 7 Programa de PCR para la verificación de los clones positivos.....	57
Tabla 8 Primers de amplificación de <i>PITX1</i>	59
Tabla 9 Programa de PCR para la amplificación de <i>PITX1</i>	59
Tabla 10 Primers para la amplificación de <i>PITX1</i> con sitios de restricción	60
Tabla 11 Programa de PCR para la amplificación de <i>PITX1</i> con sitios de restricción.....	60
Tabla 12 Primers para la amplificación del vector pcDNA3.1(+)	62
Tabla 13 Programa de PCR para la amplificación de pcDNA3.1(+).....	62
Tabla 14 PCR de amplificación del plásmido PITX1 en pcDNA3.1.....	63
Tabla 15 Primers de amplificación de cDNA de PITX1.....	71
Tabla 16 Programa de PCR para la amplificación de cDNA de PITX1	71
Tabla 17 Primers de amplificación de cDNA de <i>Pitx1</i>	72
Tabla 18 Programa de PCR para la amplificación de cDNA de <i>Pitx1</i>	72
Tabla 19 Primers de amplificación de cDNA de <i>BMP15</i>	73

Tabla 20 Programa de PCR para la amplificación de cDNA de *BMP15*..... 73

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Análisis In-silico del promotor del BMP15. Tabla de TFBS.

ANEXO 2: Artículo: *BMP15* c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. Dora Janeth Fonseca a,b, Oscar Ortega-Recalde a, Clara Esteban-Perez c, Harold Moreno-Ortiz c, Liliana Catherine Patiño a, Olga María Bermúdez a, Angela María Ortiz a, Carlos M Restrepo a,b, Elkin Lucena a, Paul Laissue a,b,*

RESUMEN

La infertilidad es una patología que afecta aproximadamente el 15% de las parejas en el mundo con un fuerte impacto en el bienestar psicológico y social de las mismas. La falla ovárica prematura es una enfermedad común que conduce a la infertilidad femenina y cuya etiología no es identificable en más del 50% de los casos, lo cual sugiere un origen genético en la patogénesis de esta enfermedad. La función crucial del gen *BMP15* en la biología de la reproducción fue propuesta cuando modelos KO de ratón y mutaciones naturales en ovejas revelaron fenotipos ováricos específicos. Aunque la secuenciación de la región codificante de *BMP15* en grandes paneles de pacientes afectadas con Falla Ovárica Prematura (FOP) ha identificado algunas mutaciones, estas variaciones explican una baja proporción de casos. Nosotros hipotetizamos que una variante en la secuencia reguladora (promotor *BMP15*) podrían estar asociada a la etiología de la FOP no-sindrómica. Con la evidencia de los estudios previos que sugirieron la potencial implicación de la variante de secuencia c.-9C>G del promotor de *BMP15* en los fenotipos reproductivos incluyendo FOP, evaluamos si este polimorfismo podría modificar las propiedades de transactivación de un factor de transcripción específico. Empleamos aproximaciones *in-silico* para predecir potenciales sitios de unión a factores de transcripción (TFBS: *Transcription Factor Binding Sites*) en la región 5' de *BMP15*. El ensayo reportero de luciferasa se usó para determinar la modificación de la transactivación del promotor de *BMP15* causada por la variante de c.-9C>G. Se demostró que aunque los dos constructos del promotor de *BMP15* (BMP15-prom-G and BMP15-prom-C) fueron transactivados por el factor de transcripción PITX1, el constructo BMP15- prom-G aumentó 1.6 veces la actividad transcripcional del factor de transcripción de una manera estadísticamente significativa. Por otro lado, se demostró por

primera vez que *BMP15* y *PITX1* son co-expresados en tejido ovárico de humano y de ratón.

1. INTRODUCCIÓN

La falla ovárica prematura es una enfermedad asociada con infertilidad femenina que afecta el 1% a 2% de las mujeres menores de 40 años de edad. Diversas causas han sido asociadas con la etiología de la FOP, sin embargo la alta incidencia de casos idiopáticos (más del 50%) apoya una participación genética en la patogénesis de esta enfermedad. *BMP15* tiene una función crucial en la biología de la reproducción que fue propuesta por modelos KO de ratón y mutaciones naturales en ovejas. La región codificante de este gen ha sido secuenciada en grandes paneles de pacientes y solo 4 mutaciones han sido validadas por estudios funcionales *in-vitro* como causales de la enfermedad. Este estudio busca proponer nuevos elementos que permitan la mejor comprensión de las bases genéticas de la FOP no sindrómica a partir del estudio de una variante de secuencia en el promotor del gen *BMP15*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción a la fisiología ovárica

2.1.1 Reproducción sexual: células germinales primordiales, origen de los gametos femeninos y Foliculogénesis

La reproducción sexual se desarrolla en organismos diploides, en los cuales cada célula somática esta compuesta por 2 juegos de cromosomas, cada uno heredado de un progenitor (Smith and Maynard-Smith, 1978). En la especie humana, el número diploide es 46. Para que se produzca el proceso de reproducción se requieren células germinales haploides con

23 cromosomas originadas a partir de células precursoras diploides en un tipo especial de división celular llamado meiosis (Mazia, 1961; Tjio and Levan, 1956). Las células que se generan a partir de la meiosis sufren un proceso de diferenciación en gametos especializados: oocitos (gametos femeninos) y espermatozoides (gametos masculinos), que se fusionan durante la fecundación para dar origen a una célula diploide (oocito maduro fecundado o cigoto) (Stein, et al., 2004). A partir del cigoto, luego de divisiones mitóticas consecutivas y procesos de especialización celular, se desarrolla un nuevo individuo con dos juegos completos de cromosomas y con diversidad genética, secundaria a la recombinación meiótica (Crow, 1994).

Durante este proceso se establece una clara distinción entre las células de la línea germinal (incluyen los gametos y sus precursores diploides) y las células somáticas que forman el resto del organismo y que proliferan mediante mitosis (Mazia, 1961).

2.1.2 Células germinales primordiales y determinación del sexo femenino

Durante la etapa embrionaria, se efectúa la selección temprana de determinadas células como progenitoras de los gametos (McLaren, 1999). El proceso inicia con las células madres totipotentes del cigoto, que dan origen tanto a los componentes embrionarios (tres capas embrionarias, la línea germinal y los componentes que darán lugar al saco vitelino) como los extraembrionarios (la placenta). Las células resultantes de las primeras divisiones del cigoto, son pluripotentes, es decir que no pueden formar un organismo completo pero si cualquier otro tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (Stein, et al., 2004). De este tipo celular pluripotente hacen parte las células madre embrionarias (ESC: *embryonic stem cells*) localizadas en la masa celular interna del blastocisto (Evans and

Kaufman, 1981). A partir de ellas, se realiza la selección de las células germinales primordiales (PGC: *primordial germ cells*). Esta selección es guiada por señales procedentes de células vecinas que determinan qué estructuras inhibirán la expresión de genes somáticos y activarán la expresión de genes responsables de mantener las características específicas de las células germinales (McLaren, 1999). Las PGC se originan tempranamente en el epiblasto y posteriormente se localizan en el endodermo de la pared dorsal del saco vitelino entre la tercera y la cuarta semana del desarrollo embrionario humano (Byskov, 1986). Aproximadamente hacia la cuarta semana inician un proceso de migración ameboide que las traslada a través del mesenterio dorsal, a las crestas gonadales (gónadas en desarrollo) situadas a ambos lados del mesonefros (estructura tubular transitoria) donde finalmente darán inicio a la diferenciación de los gametos (Fujimoto, et al., 1977). Durante la migración, varias proteínas extracelulares producidas por las células somáticas adyacentes las conducen para sobrevivir, proliferar y migrar. Ejemplos de estas proteínas son las quimioquinas que se unen a receptores acoplados a proteína G (*GPCR: G-protein coupled receptors*) (McLaren, 1999; McLaren, 2003).

Los cromosomas sexuales de las células somáticas de la cresta genital, son el factor determinante para que las PGC se diferencien en oocitos o en espermatozoides y que la gónada indiferenciada se desarrolle en ovario o en testículo. (Morrish and Sinclair, 2002; Motta, et al., 1997). El gen *SRY (sex-determining region of Y)* del cromosoma Y dirige la determinación testicular y codifica un factor de transcripción que se une al DNA e interviene en la transcripción de genes involucrados en el desarrollo de las células de Sertoli. En ausencia de este gen la cresta gonadal de un embrión se desarrolla en ovario, las

células de soporte se transforman en células foliculares y otras células somáticas se transforman en células de la Teca. Las PGC por lo tanto se diferencian en oocitos, en vez de hacerlo en espermatozoides(Motta, et al., 1997). Una vez localizadas en las gónadas en desarrollo, a partir de la semana 8 de gestación el ácido retinoico producido por el mesonefros induce una fase de división mitótica rápida de cerca de 4.000 PGC (Bowles, et al., 2006; Gosden, 2002). A las células germinales primordiales diploides que proliferan dentro del ovario mediante mitosis sucesivas, antes de que comience la meiosis I, se les denomina oogonias. Posteriormente, el número de oogonias aumentará a 600.000 en las siguientes 3 semanas de gestación para permitir el inicio de la meiosis y el comienzo del proceso que conduce a la producción de oocitos (Sathananthan, et al., 2000).

2.1.3 Población y atresia folicular

Las oogonias durante su desarrollo son susceptibles de: 1. Continuar con las divisiones mitóticas hasta la semana 28 de gestación, 2. Entrar en división meiótica en la semana 9 de gestación, 3. Sufrir atresia a través de la muerte celular programada (Picton, et al., 1998).

El producto de estos tres procesos resulta finalmente en seis a siete millones de células germinales en la semana 20 de gestación. A partir de este periodo, el proceso de atresia se vuelve predominante y solo uno a dos millones de células germinales resultan al momento del nacimiento. Al inicio de la menarquia, el número es de aproximadamente 500.000 con una tasa de disminución constante de alrededor de 1000 células por mes. En condiciones normales sólo 400 folículos alcanzan el estadio pre-ovulatorio maduro y la ovulación (Picton, et al., 1998) .

La muerte celular programada (apoptosis) ocurre, entre otros, por las funciones de la familia de proteínas Bcl2 que comprende tanto miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-B, Bcl-w, Mcl-1, A-1, NR-13, Bcl-xL) como pro-apoptóticos (Bcl-xs, Bax, Bid, Bad, Bik, Bak, Bok, Bim, Bcl-GL, Bcl-GS, Bcl-rambo, Noxa, Hrk). El estímulo natural que inicia este proceso consta de factores que promueven la muerte celular como la superfamilia de Fas ligando o factores de supervivencia que son transferidos a través de vías de segundos mensajeros (Guillemin, et al., 2009).

2.1.4 La foliculogénesis

Las oogonias que inician la primera división meiótica durante el período fetal, reciben el nombre de oocitos primarios, los cuales se forman entre los 3 y 8 meses de gestación y se detienen después del estadio diploteno de la profase I mientras crecen en tamaño y progresa su diferenciación (Gosden, 2002). La división celular no continúa hasta alcanzar la madurez sexual del individuo, completando la meiosis I cuando el oocito es ovulado (Gerton and Hawley, 2005).

En el momento del nacimiento, la mayoría de los dos millones de oocitos disponibles están rodeados por una sola capa de células somáticas planas denominadas células de la granulosa. Estos folículos, llamados primordiales, se desarrollan desde la etapa fetal y corresponden al estadio más inmaduro del desarrollo folicular (o foliculogénesis) (Gosden, 2002). En esta etapa del desarrollo, las células de la granulosa no expresan receptores de FSH (FSHR) hasta que se inicia el crecimiento del folículo (Oktay, et al., 1997). Las células dispuestas alrededor del oocito, están conectadas entre sí mediante uniones estrechas que permiten el paso de moléculas indispensables para la supervivencia y el

crecimiento folicular, la proliferación de las células de la granulosa y el progreso del ciclo ovárico. (Anderson and Albertini, 1976). Una de las vías de señalización más importantes entre el oocito y las células de la granulosa es la vía KIT (tyrosine kinase receptor) y su ligando KIT (KITLG) secretado por las células de la granulosa. Esta vía mantiene la supervivencia del folículo, evita la apoptosis y contribuye con el desarrollo folicular (Gosden, 2002; Matzuk, et al., 2002; Tanghe, et al., 2002).

Los folículos se mantienen en el estadio primordial hasta que una pequeña proporción empieza a crecer, algunas veces antes del nacimiento, convirtiéndose en folículos en desarrollo (Picton, et al., 1998). Este desarrollo se caracteriza por el crecimiento oocitario, la multiplicación de las células de la granulosa y la transformación de su morfología a una forma cúbica. Los folículos primarios tienen dos capas de células de la granulosa con morfología cúbica rodeando el oocito. Las células de la granulosa aumentan en número y se tornan más voluminosas terminando en el desarrollo de los folículos secundarios (Hirshfield, 1991). Estos últimos se caracterizan por la presencia de dos o más capas de células de la granulosa separadas de la capa interna de células tecaes por una lámina basal intermedia. A continuación, se crea una cavidad llena de líquido folicular denominada antra. A partir de este estadio, los folículos se denominan antrales o cavitarios. (Wassarman, et al., 2004)

La fase siguiente de la oogénesis, la maduración de los oocitos, no se produce hasta alcanzar la madurez sexual cuando las hormonas estimulan al oocito. Durante la etapa reproductiva de la mujer, en la fase folicular de cada ciclo menstrual, los folículos que disponen de una cantidad crítica de receptores para la FSH completan el desarrollo en

respuesta a esta hormona (Gougeon and Testart, 1990; Rombauts Ph.D, et al., 1998). Se estima que en esta fase un pequeño número de oocitos (*de 15 a 20*) progresan en el crecimiento y finalmente solo uno se desarrolla por completo. Como resultado, casi la totalidad de los folículos de la población total existente en el ovario, sufren atresia y no llegan a la ovulación (Chun, et al., 1996; Scheele and Schoemaker, 1996).

Diferentes mecanismos aseguran que solo los folículos con oocitos sanos tengan una mejor oportunidad de llegar a la etapa final del desarrollo. Uno de estos mecanismos es la secreción de factores paracrinos derivados del oocito capaces de promover la proliferación y diferenciación de las células somáticas que lo rodean. La proteína morfogenética ósea 15 (BMP15) es un factor del crecimiento y de diferenciación que actúa como regulador crítico del desarrollo folicular y del crecimiento de las células de la granulosa (ver mas adelante en la sección 2.6) (Chang, et al., 2002; Dube, et al., 1998; McNatty, et al., 2004; Shimasaki, et al., 2004).

2.1.5 Ovulación

Junto al crecimiento de las células de la granulosa, se produce un aumento en la densidad de los receptores para la hormona luteinizante (LH: luteizing hormone) en las células de la teca interna. Hacia la mitad del ciclo menstrual, la secreción de FSH y de LH desencadena la ovulación. El folículo antral dominante reanuda y completa entonces la meiosis I. Los cromosomas vuelven a condensarse, se rompe la envoltura nuclear, se ensambla el uso meiótico y los cromosomas homólogos replicados se segregan en la anafase I, en dos juegos, cada uno de los cuales contiene la mitad del número inicial de cromosomas. Al finalizar esta etapa, debido a la división asimétrica del citoplasma, se obtienen dos células

de tamaño diferente que corresponden a un pequeño cuerpo polar y a un gran oocito secundario. En esta etapa cada cromosoma está formado por dos cromátides hermanas, unidas entre sí por sus centrómeros (Nasmyth, 2001; Petronczki, et al., 2003).

El oocito resultante detiene su desarrollo en la metafase II. Este folículo aumenta de volumen y se rompe en la superficie del ovario, liberando el oocito secundario rodeado por una cubierta de células de la granulosa envueltas en una matriz gelatinosa rica en ácido hialurónico (Wassarman, et al., 2004). El oocito liberado solo completa la meiosis II si es fecundado por un espermatozoide. Este oocito secundario se mantiene en esta fase hasta que, estimulado por la fecundación, completa la meiosis e inicia el desarrollo embrionario pre - implantatorio (Nasmyth, 2001).

2.2 Infertilidad femenina

2.2.1 Epidemiología y definiciones

Las diferentes definiciones de la infertilidad humana pueden tener un impacto en la prevalencia estimada de esta enfermedad (Larsen, 2005). Diferentes estudios arrojan valores entre 6.8% y 38.6% para una misma población dependiendo del criterio aplicado (Gurunath, et al., 2011). Por ejemplo, Larsen (2005) exploró 6 definiciones de la infertilidad humana, encontrando una prevalencia de 12.1% cuando se define de acuerdo a la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana: “la imposibilidad de concepción después de mantener relaciones sexuales sin protección durante al menos dos años” (Larsen, 2005).

Si se acepta la definición más comúnmente utilizada como la imposibilidad de concepción (después de un año de relaciones sexuales sin protección) en los Estados Unidos, la infertilidad afecta a más de dos millones de mujeres en edad reproductiva. Datos de la encuesta Demográfica y Salud de éste país (DHS: Demographic and Health Surveys, 2002) reveló una tasa de infertilidad primaria mayor en los países en vía de desarrollo que en los países desarrollados. En estos últimos, el principal aspecto responsable de una mayor tasa de infertilidad primaria se debe a que la edad promedio a la cual la mujer desea quedar embarazada ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. (Lunenfeld, et al., 2004). La infertilidad tiene un fuerte impacto en el bienestar psicológico y social de las parejas lo que conduce a un aumento en la demanda de los servicios de fertilidad (Forti and Krausz, 1998). El acceso a este tipo de evaluación y de tratamiento médico es costoso por lo que los sistemas de salud no cubren los procedimientos (Macaluso, et al., 2010).

La infertilidad es una patología que puede ir desde la fecundidad cercana a la normalidad, hasta la inhabilidad absoluta para concebir. Este rango de severidad hace que sea discutible si un solo término puede abarcar de forma significativa todo el espectro fenotípico de esta condición (Gurunath S, 2011). Además, las interacciones entre los campos clínico y científico han llevado a proponer diversas definiciones de la infertilidad humana (Habbema, et al., 2004; Jenkins, et al., 2004; Lunenfeld, et al., 2004). En la medicina reproductiva, el término clínico de infertilidad se refiere a una enfermedad del sistema reproductivo que conduce a la imposibilidad de concepción o de llevar un embarazo a término, después de un año o más de mantener relaciones sexuales sin protección (Zegers-Hochschild, et al., 2009). En las mujeres mayores de 35 años, la evaluación de infertilidad se debe realizar después de

6 meses de falla para la concepción (Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2013).

La infertilidad primaria se define igualmente como la incapacidad de una pareja que no ha tenido un hijo con anterioridad para lograr un embarazo después de un año de relaciones sexuales sin protección. La infertilidad secundaria es el término aplicado a mujeres con criterios de infertilidad primaria pero con historia previa de embarazo en algún momento de su vida. (Group, 2004; Lunenfeld, et al., 2004)

La fecundidad es la probabilidad que tiene la mujer de lograr un embarazo en un ciclo menstrual después de tener relaciones sexuales durante el periodo periovulatorio (Lunenfeld, et al., 2004).

2.2.2 Etiología de la infertilidad

En el 40% al 60% de las parejas infértiles la etiología se ha asociado a causas femeninas, incluyendo trastornos ovulatorios, enfermedad tubárica y endometriosis (Group, 2004). Los trastornos ovulatorios están presentes en alrededor del 25% de las parejas infértiles (Hull, et al., 1985; Thonneau, et al., 1991). En las mujeres en quienes se sospecha infertilidad anovulatoria, el espectro clínico va desde oligomenorrea y ciclos irregulares hasta la amenorrea (Group, 2004). Las causas más frecuentes incluyen el síndrome de ovario poliquístico. La mayoría de las mujeres con oligomenorrea presenta esta patología endocrina compleja que se caracteriza por anovulación crónica, hiperandrogenismo (hirsutismo, acné y alopecia), ovario poliquístico e irregularidades menstruales (Imani, et al., 2002; Kosova and Urbanek, 2013). La hiperprolactinemia cursa con niveles elevados de prolactina que se asocian a la disminución en la concentración de estradiol y anovulación.

La hiperprolactinemia altera los pulsos de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) llevando a la aparición de manifestaciones clínicas como una fase lútea inadecuada, anovulación y amenorrea (Group, 2004). Aproximadamente el 30% de las mujeres infértiles presentan enfermedad tubárica (Hull, et al., 1985; Thonneau, et al., 1991). Las alteraciones anatómicas y funcionales de las trompas de Falopio se relacionan con la disfunción en la captación de los oocitos, la fertilización, el desarrollo temprano del embrión y su transporte a la cavidad uterina (Shaw, et al., 2010). La endometriosis es responsable del 5% al 10% de los casos de infertilidad, originando alteraciones anatómicas, de la fase lútea y de la ovulación (Hughes, et al., 1993). Se define como la presencia de tejido endometrial (epitelio glandular y estroma) fuera de la cavidad uterina localizándose habitualmente sobre la superficie peritoneal y sobre el ovario (Vinatier, et al., 2001).

Aproximadamente entre el 15% al 30% de las parejas presentan infertilidad inexplicable definida como el resultado normal en las pruebas de evaluación básica de la ovulación, producción de espermatozoides y una permeabilidad tubo-ovárica adecuada (Donderwinkel, et al., 2000). La edad materna es un factor que contribuye en esta categoría idiopática, principalmente cuando la edad de la mujer es mayor de 37 años (Group, 2004).

Además de las alteraciones nombradas anteriormente, la falla ovárica prematura (FOP, OMIM 311360) es una patología común que conduce a infertilidad (Conway, 2000; Coulam, et al., 1986; Luborsky, et al., 2003).

2.3 Falla ovárica prematura

2.3.1 Epidemiología

El 90% de las mujeres desarrollan la menopausia entre los 45 y los 55 años de edad, con una edad media a los 50 años (Do, et al., 1998; Morabia and Costanza, 1998; van Noord, et al., 1997). La menopausia que inicia antes de los 40 años, se considera prematura (Nelson, et al., 2005).

Entre los desórdenes reproductivos que conducen a infertilidad, la FOP es un patología frecuente que afecta entre el 1% al 1.5% de las mujeres menores de 40 años (Conway, 2000; Coulam, et al., 1986; Luborsky, et al., 2003). Esta condición ocurre en el 10% al 28% de las mujeres con amenorrea primaria y en el 14% al 18% de las mujeres que presentan amenorrea secundaria (Anasti, 1998; Conway, 2000).

2.3.2 Definición y diagnóstico

Actualmente, la FOP es definida clínicamente como amenorrea de 4 a 6 meses en una mujer menor de 40 años, asociada a niveles menopáusicos de gonadotropinas séricas (dos valores de FSH, con valor >40 mIU/ml, obtenidas con al menos un mes de diferencia) e hipoestrogenismo (de Moraes-Ruehsen and Jones, 1967; Kalantaridou, et al., 1998; Rebar and Connolly, 1990). Dependiendo de la edad de inicio, la FOP se puede manifestar como amenorrea primaria (sin menarquia) o como amenorrea secundaria, después del desarrollo puberal siguiendo un curso clínico variable que progresa hacia el cese de la función ovárica (Timmreck and Reindollar, 2003). La FOP genera dos tipos de consecuencias. La primera es el hipoestrogenismo prematuro que tiene como resultado el envejecimiento temprano de diferentes tejidos blanco de la acción de los estrógenos. Como consecuencia, hay un

incremento en el riesgo de desarrollar osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Taylor, 2001). La segunda consecuencia es la infertilidad que en conjunto con los efectos sistémicos lleva a profundas consecuencias emocionales y de salud en la mujer (Nelson, et al., 2005; Snowdon, et al., 1989). Los mecanismos que probablemente originan la FOP son a) una disminución en el pool de folículos primordiales iniciales, b) un proceso acelerado de atresia folicular, c) una alteración en el reclutamiento y la maduración de los folículos primordiales (Christin-Maitre, et al., 1998; Persani, et al., 2010). Diferentes etiologías pueden activar estos mecanismos, desembocando en la FOP como fenotipo aislado (forma no sindrómica) o asociada a otras características clínicas (presentación sindrómica).

2.3.3 Etiología

Aunque más del 50% de los casos de FOP son idiopáticos, sin etiología identificable incluso después de una minuciosa evaluación clínica (Conway, 2000; Rebar and Cedars, 1992), diversas causas han sido asociadas: enfermedades autoinmunes, iatrogenia, agentes infecciosos y ambientales, causas metabólicas y genéticas (Goswami and Conway, 2005).

Las causas autoinmunes están involucrados en la patogénesis del 4% al 30% de los casos de FOP (Bakalov, et al., 2005; Conway, et al., 1996). Las citoquinas, el complejo mayor de histocompatibilidad y tanto la inmunidad celular como la humoral representan los principales actores en este mecanismo. La evidencia para una etiología autoinmune está dada por la presencia de la ooforitis linfocítica, la demostración de anticuerpos dirigidos contra el ovario y trastornos autoinmunes asociados (Bakalov, et al., 2005; Hoek, et al., 1997).

Los trastornos endocrinos autoinmunes asociados a FOP incluyen el hipotiroidismo (25%), la enfermedad de Addison (3%) y la diabetes mellitus (2.5%), entre otros. Entre las patologías autoinmunes no-endocrinas, se encuentran la miastenia gravis, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (Dragojević-Dikić, et al., 2010).

Se considera que actualmente alrededor del 25% de todas las formas de FOP son consecuencia de causas iatrogénicas (Persani, et al., 2010). La quimioterapia y la radioterapia pueden conducir a FOP en pacientes con una enfermedad maligna (Howell and Shalet, 1998). El efecto de la radioterapia depende del tipo y de la dosis utilizada, así como de la edad y de la reserva ovárica de la paciente en el momento del tratamiento (Beerendonk and Braat, 2005).

La FOP también es una secuela importante de la quimioterapia citotóxica, debido al daño que ejerce sobre la estructura y la función de las células de la granulosa y de los oocitos. El efecto gonadotóxico de la quimioterapia es en gran medida, dependiente del tipo y de la dosis del medicamento usado (Amato and Roberts, 2001; Koyama, et al., 1977).

Casi cualquier cirugía pélvica tiene un riesgo potencial de daño ovárico, como resultado del compromiso del flujo sanguíneo al órgano o de la inflamación del mismo (Amato and Roberts, 2001).

2.4 Falla ovárica prematura de origen genético

La incidencia familiar de la FOP soporta un papel genético en la patogénesis de esta enfermedad (Conway, et al., 1996). En grandes series de pacientes con FOP, la incidencia

de las formas familiares es del 4% al 31% dependiendo de la población estudiada (Conway, et al., 1996; Vegetti, et al., 1998). El análisis de las genealogías ha demostrado diferentes modos de herencia, incluyendo formas dominantes o recesivas y a través de transmisión materna o paterna (Vegetti, et al., 1998). La presencia en una misma familia de mujeres con amenorrea primaria, FOP o menopausia temprana indica que la FOP puede ser una enfermedad genética con expresividad variable (Tibiletti, et al., 1999), lo cual apoya el hecho de la FOP como una patología compleja y multifactorial (Toniolo, 2006).

La FOP de origen genético está asociada con defectos en el cromosoma X o en los autosomas. Las causas de FOP relacionadas con el cromosoma X son secundarias a mutaciones en genes específicos y a aberraciones cromosómicas que van desde defectos numéricos, como la monosomía o la trisomía del cromosoma X, hasta defectos estructurales como las deleciones, los isocromosomas y las translocaciones balanceadas entre el cromosoma X y los autosomas (Zinn, 2001).

2.4.1 Causas sindrómicas

Síndrome de Turner

Dentro de los defectos cromosómicos localizados en el cromosoma X asociados a FOP sindrómica se encuentra el síndrome de Turner (ST). Esta enfermedad tiene una prevalencia aproximada de 1:2500 a 1:3000 recién nacidos de sexo femenino y ocurre como consecuencia de la ausencia completa o parcial de un cromosoma X en la mujer (Nielsen and Wohlert, 1991; Sybert and McCauley, 2004). Cerca de un 50% de los casos presentan una pérdida completa de un cromosoma X mientras que los casos restantes se deben a

mosaicismos o a anomalías estructurales que resultan en fenotipos más leves (Bharath, et al., 2010).

Las mujeres con ST clásicamente manifiestan talla baja, linfedema congénito, cuello alado, disgenesia gonadal o falla ovárica, entre otros (Sybert and McCauley, 2004). En las mujeres con cariotipo 45,X la pérdida de oocitos ocurre en estadios tempranos de la profase meiótica, resultando en disgenesia gonadal y en amenorrea primaria con niveles elevados de FSH en la infancia temprana (Fechner, et al., 2006; Reynaud, et al., 2004; Zinn, et al., 1993).

La disfunción ovárica es probablemente debida a la haploinsuficiencia de los genes situados en las regiones críticas del cromosoma X que escapan a la inactivación y que requieren una dosis diploide para cumplir una función ovárica adecuada (Elsheikh, et al., 2002; Sybert and McCauley, 2004; Zinn and Ross, 1998). Análisis moleculares y citogenéticos de mujeres con FOP y deleciones o translocaciones balanceadas entre el cromosoma X y los autosomas permitieron la identificación de loci específicos en el brazo largo del cromosoma X (regiones FOP-1 Xq23-q27 y FOP-2 Xq13.3-Xq21.1) (Lacombe, et al., 2006; Tharapel, et al., 1993; Therman, et al., 1990). Las deleciones y los rearrreglos cromosómicos que involucran estas zonas llevan a la disrupción de diferentes genes (*XPNPEP2*, *DACH2*, *DIAPH2*, *POF1B*) candidatos de FOP (Bione, et al., 2004; Prueitt, et al., 2000).

Estudios moleculares en pacientes con FOP y deleciones de diferentes porciones del brazo corto del cromosoma X evidenciaron una tercera región asociada a FOP en Xp11.2-p22.1, denominada FOP-3 (Zinn and Ross, 2001; Zinn, et al., 1998). Se sugiere que algunos genes situados en esta zona son los responsables de la FOP en el ST. El primero es el gen *USP9X*

en Xp11.4, originalmente identificado como el homólogo humano del gen *Faf* (*fat facets*) en la mosca de fruta, donde juega un papel importante en el desarrollo del oocito y en la espermatogénesis en el macho (Jones 1996). Este gen codifica una enzima que remueve la ubiquitina de proteínas conjugadas, protegiéndolas de la degradación proteosómica (Cerutti and Simanis, 2000). Dentro de la región crítica FOP-3 también se encuentra el gen *BMP15* (Xp11.2) que codifica un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta TGF- β (*Transforming growth factor beta*)(Chang, et al., 2002) (Massagué, 1998) del cual se hablará en detalle en la sección 2.6

Síndrome del X frágil

Las disfunciones del gen del retraso mental del X frágil 1 (*FMRI: frágil X mental retardation 1*), localizado en el locus Xq27.3 de la región FOP-1 son las causantes del síndrome X frágil, una enfermedad ligada al X dominante que ocasiona déficit cognitivo moderado a severo (Bell, et al., 1991). La enfermedad se produce como resultado de la expansión de más de 200 repeticiones de los trinucleótidos CGG (mutación completa) en la región 5'UTR del gen, llevando al silenciamiento transcripcional del mismo a través de un proceso de hipermetilación (Pieretti, et al., 1991). Las mujeres portadoras de la pre mutación en el gen (entre 55 y 199 repeticiones) *FMRI* o con microdeleciones en el gen *FMRI2* presentan una predisposición significativa a desarrollar FOP (Allen, et al., 2007; Murray, et al., 1999). La prevalencia de FOP en mujeres con el alelo pre-mutado es alrededor del 16% (Allingham-Hawkins, et al., 1999; Murray, et al., 1998) y un aumento de la transcripción del alelo pre mutado es una posible explicación de la asociación entre la FOP y el estado de pre mutación del gen (Tassone, et al., 2000). El gen *FMRI* se expresa en

las oogonias del ovario fetal entre los días 14 a 16 del desarrollo embrionario normal, durante la fase mitótica de la oogénesis (Bakker, et al., 2000). Su producto es la proteína FMRP (*fragile X mental retardation protein*), la cual se une a diferentes mRNA regulando su traducción a través de un mecanismo supresor (Jin and Warren, 2000). La acumulación de la FMRP podría empeorar la expresión de genes requeridos para el desarrollo del oocito reduciendo dramáticamente su número a través del aumento de la tasa normal de atresia o disminuyendo el número de oogonias (Murray, et al., 1998; Persani, et al., 2010).

Galactosemia

La galactosemia es una enfermedad autosómica recesiva causada por la deficiencia de la enzima GALT (galactosa 1-fosfato uridil transferasa) (Leslie, et al., 1992). Su incidencia en Europa y América del Norte es de alrededor de 1:30000 - 1:50000 nacidos vivos (Rubio-Gozalbo, et al., 2010) y se presenta clínicamente con complicaciones en los órganos donde se requiere de la actividad enzimática (hígado, riñón, ovario y sistema nervioso central, entre otros) (Leslie, 2003). Más de 230 mutaciones han sido descritas en el gen *GALT* (Calderon, et al., 2007 data base 2013). Sin embargo, la mutación más común en la galactosemia clásica es la p.Gln188Arg (Bosch, et al., 2005). La FOP afecta del 75% al 96% de las mujeres con mutaciones homocigotas en el gen *GALT* que suprimen casi completamente la actividad de la enzima y se asocian a un fenotipo severo (Waggoner, et al., 1990). La FOP se presenta con amenorrea primaria y falta del desarrollo de caracteres sexuales secundarios o en casos más leves con irregularidades menstruales, disminución de la reserva ovárica, amenorrea secundaria en la segunda o tercera décadas de la vida y finalmente progreso a FOP (Sanders, et al., 2009; Schwarz, et al., 1984). A nivel

histológico, se observan escasos folículos primordiales con un gran número de folículos atrésicos y ausencia completa de folículos en estadio pre-antral y pre-ovulatorio (Forges, et al., 2006; Kaufman, et al., 1989). El deterioro de la función ovárica puede ser debida a la acumulación tóxica de los metabolitos de la galactosa (lo cual conduce a la apoptosis de los oocitos) (Liu, et al., 2000) o a la deficiencia de las glicoproteínas y galactolípidos como el receptor de la FSH, lo cual disminuye la estimulación ovárica e incrementa la atresia folicular (Rubio-Gozalbo, et al., 2010; Tedesco and Miller, 1979).

Síndrome BPES

Se ha demostrado que mutaciones en *FOXL2* son responsables del síndrome BPES (MIM-110100), una enfermedad autosómica dominante (Crisponi, et al., 2001) caracterizada por malformaciones oculares y FOP (blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso) y FOP (Zlotogora, et al., 1983). A nivel clínico esta enfermedad se clasifica en dos tipos: BPES tipo I en el cual los pacientes presentan telecanto asociado a FOP y BPES tipo II, pacientes con función ovárica y fertilidad normales. El gen *FOXL2* (3q23) codifica la proteína nuclear *forkhead* box L2, un miembro de la familia de factores de transcripción *forkhead*. Estas proteínas se caracterizan por poseer un dominio de unión al ADN de 110 aminoácidos (a.a) en forma de *winged helix* (hélice alada) denominado *forkhead box* además de un tracto de 14 residuos de alanina (dominio Poly Ala) altamente conservado en los mamíferos (Kaestner, et al., 2000; Kaufmann and Knochel, 1996; Lehmann, et al., 2003). Las mutaciones en el gen que originan proteínas truncadas son responsables del BPES tipo I, mientras que las proteínas con expansión del tracto de polialanina conducen al desarrollo de BPES tipo II (De Baere, et al., 2003). *FOXL2* es expresado principalmente en la región

cráneo facial, la glándula hipófisis y el ovario (Lehmann, et al., 2003). Debido a la expresión de *FOXL2* durante la organogénesis de la hipófisis, mutaciones a este nivel podrían perturbar el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Laissue, et al., 2008; Treier, et al., 1998). De la misma manera, la FOP puede ser consecuencia de la disminución en el número de folículos durante el desarrollo del ovario o de un incremento en la tasa de atresia. R ratones *knock-out Foxl2^{-/-}* demuestran que este gen es esencial para la diferenciación de las células de la granulosa y para el mantenimiento del ovario (Schmidt, et al., 2004; Uda, et al., 2004). En ausencia de *Foxl2* la diferenciación de las células de la granulosa es bloqueada en su transición de la forma escamosa hacia la forma cuboidal, lo cual desencadena la ausencia de formación de folículos secundarios. En estos modelos, la infertilidad se produce después de la depleción del pool folicular y de la atresia del ovario (Uda, et al., 2004).

Diferentes estudios señalan la importancia biológica de *FOXL2* en la función del ovario sugiriendo su implicación potencial en la patogénesis de la FOP no sindrómica (Ellsworth, et al., 2003; Ellsworth, et al., 2006; Pannetier, et al., 2006; Pisarska, et al., 2004). No obstante, análisis de secuenciación de la región codificante de *FOXL2* en un total de 290 pacientes con FOP no sindrómica de cinco estudios diferentes (Bodega, et al., 2004; De Baere, et al., 2001; De Baere, et al., 2002; Gersak, et al., 2004; Harris, et al., 2002) revelaron solo una mutación potencialmente deletérea (c. 898–927del), la cual conduce a la delección de 10 alaninas del tracto PolyAla. Esta mutación en estado heterocigoto fue encontrada en una paciente con FOP y amenorrea primaria (Gersak, et al., 2004; Harris, et al., 2002). También se han demostrado mutaciones extragénicas de *FOXL2* en pacientes

con BPES afectando potencialmente regiones reguladoras que podrían estar implicadas en la patogénesis de la FOP (Beysen, et al., 2005; Crisponi, et al., 2004; Laissue, et al., 2008).

2.5 Causas no-sindrómicas

Mutaciones en genes autosómicos (*FSHR*, *LHR*, *NOBOX*, *FIGLA*, *BMP15*, *NR5A1*, *STAG3*, *NANOS3* y *SYCE1*) han sido asociadas a la patogénesis de la FOP no sindrómica (Aittomaki, et al., 1995; Caburet, et al., 2014; Latronico, et al., 1996; Lourenco, et al., 2009; Suzumori, et al., 2002; Zhao, et al., 2008a). Las causas genéticas de la FOP como fenotipo aislado han sido principalmente establecidas, a través de diferentes herramientas como el análisis de ligamiento en familias o a través del screening de mutaciones de genes candidatos basados en modelos animales (Laissue, et al., 2008).

2.5.1 Receptores de gonadotrofinas

Los receptores de hormonas glicoprotéicas FSHR y LHR pertenecen a la familia de receptores unidos a proteína G (GPCR) (Themmen and Huhtaniemi, 2000). Junto con sus ligandos, la FSH y la LH, estos receptores son esenciales para la función reproductiva en ambos sexos. En el año 1995, Aittomaki y colaboradores describieron el primer gen cuyas mutaciones causan FOP no-sindrómica (Aittomaki, et al., 1995). A través de un análisis de ligamiento en 6 familias finlandesas este estudio reveló una asociación entre el locus 2p21 y la disgenesia ovárica hipergonadotrópica (ODG: *hypergonadotropic ovarian dysgenesis*). Dicho locus contiene los genes que codifican para los receptores de la FSH y la LH y corresponde al denominado *locus* ODG1 previamente implicado en una forma autosómica recesiva de disgenesia ovárica hipergonadotrópica observada en una subpoblación aislada de Finlandia (Aittomaki, 1994). El análisis de secuenciación del gen *FSHR* reveló en todas

las pacientes afectadas por ODG una mutación *missense* homocigota (c.C566>T) que determina la sustitución p.Ala189Val en el dominio extracelular del receptor (Aittomaki, et al., 1995). Los estudios funcionales confirmaron la patogenicidad de la mutación c.C566>T al demostrar que interfiere con la señal de transducción del receptor (Aittomaki, et al., 1995). Estudios más recientes caracterizaron el mecanismo molecular de la inactivación del receptor evidenciando que consiste en un plegamiento inadecuado, un secuestro intracelular de éste y la consecuente incapacidad de alcanzar la membrana plasmática, hallazgo que se relaciona con el cuadro clínico que presentan las pacientes (por ejemplo, bloqueo de la maduración folicular) (Rannikko, et al., 2002). Otras mutaciones se han localizado en el dominio transmembranal del receptor afectando parcialmente la cascada de señalización hormonal (Allen, et al., 2003; Beau, et al., 1998; Doherty, et al., 2002; Nakamura, et al., 2008; Touraine, et al., 1999).

Posteriormente, en el año 1996 Latronico y colaboradores reportaron la primera mutación en el gen del receptor de la LH (*LHR*) asociada con un fenotipo ovárico (Latronico, et al., 1996). El análisis de secuenciación del exón 11 del gen *LHR* reveló una mutación *non-sense* en estado homocigoto c.T1660>C (p.Arg554X) en una familia compuesta por tres hermanos con disgenesia gonadal 46,XY e hipoplasia de células de Leydig y una hermana 46,XX con amenorrea, útero pequeño y ovarios quísticos de tamaño desigual (Latronico, et al., 1996). En la mujer las anormalidades del receptor de la LH desarrollaron FOP caracterizada por una foliculogénesis defectuosa, anovulación, ausencia de la fase lútea, retardo o feminización puberal incompleta, amenorrea e infertilidad (Magoffin, et al., 1994). Se ha propuesto que variantes heterocigotas de este gen pueden contribuir al

fenotipo de FOP (Fonseca, et al., 2015). Un estudio reciente permitió por primera vez la secuenciación masiva de la región codificante completa de 70 genes candidatos mediante la técnica de NGS (*Next Generation Sequencing*) en 12 mujeres con FOP. Dos variantes heterocigotas en los genes *BMP2* y *LHCGR* fueron detectadas en una de las pacientes afectadas por amenorrea secundaria y niveles elevados de gonadotropinas. Esta paciente quien cursaba además con oleadas de calor y sofocos era portadora de la mutación c.296A>G (p.Asn99Ser) en el gen *LHCGR*. En el mismo estudio otra paciente también con FOP era portadora de la variante heterocigota *LHCGR* c.526T>C (p.Ser176Pro). Esta mutación ausente en los controles tenía un potencial efecto deletéreo determinado mediante herramientas *in-silico* (SIFT, 0.03) (Fonseca, et al., 2015).

2.5.2 Factores de transcripción

Para la identificación de nuevos genes involucrados en el proceso de la foliculogénesis Suzumori y colaboradores en el año 2002 emplearon una colección de librerías de cDNA murino (Unigene de NCBI: *National Center for Biotechnology Information*) para encontrar marcadores de secuencia expresada (ESTs: *expressed sequence tags*) en las librerías de cDNA de ovario de ratón recién nacido (Suzumori, et al., 2002). *Nobox* (*newborn ovary homeobox-encoding gene*) fue identificado por esta herramienta de “extracción” *in silico* (Suzumori, et al., 2002). Es preferencialmente expresado en el ovario y estudios de hibridación *in situ* revelaron que el mRNA está presente en oocitos primordiales y en crecimiento (Suzumori, et al., 2002) La expresión de *NOBOX* en el tejido humano adulto simula la del ratón con una expresión preferencial en las gónadas y específicamente dentro

del ovario su expresión es oocito-específica desde el estadio primordial hasta el oocito en metafase II (MII) (Huntriss, et al., 2006).

NOBOX pertenece a la familia de los genes homeóticos, los cuales codifican proteínas que actúan como factores de transcripción. Estos reguladores transcripcionales contienen un homeodominio conservado de 60 a.a necesario para la regulación del desarrollo o de la morfogénesis (Gehring, 1993; Gehring, et al., 1994). La ablación de *Nobox* en el ratón *knock-out* homocigoto acelera la pérdida posnatal de oocitos y suprime la transición de folículo primordial a folículo en crecimiento. Los folículos son reemplazados por un tejido fibroso en la hembra con la delección de *Nobox* de una forma similar a la mujer con FOP no-sindrómica (Rajkovic, et al., 2004). De la misma manera, *Nobox* es un regulador crítico de la expresión de genes propios del oocito como *Mos*, *Oct4*, *Rfp14*, *Fgf8*, *Zar1*, *Dnmt1o*, *Gdf9*, *Bmp15*, y *H1oo* (Rajkovic, et al., 2004). Mutaciones causales de FOP fueron investigadas en diferentes poblaciones (Qin, et al., 2007; Qin, et al., 2009; Zhao, et al., 2005). Qin et al. reportó la variante *missense* c.1064G>A (p.Arg355His) en una de 96 pacientes con FOP provenientes de los Estados Unidos (Qin, et al., 2007). Esta mutación, ausente en 278 controles, estaba localizada en la región del homeodominio e impedía la unión de NOBOX al DNA ejerciendo además un efecto dominante negativo sobre la unión de NOBOX *wild type* al DNA (Qin, et al., 2007). Bouilly y colaboradores secuenciaron la región codificante de *NOBOX* en una cohorte de 178 mujeres con FOP idiopática (Bouilly, et al., 2011). Fueron identificadas cuatro variantes *missense* (c.271G>T (p.Gly91Trp), c.349C>T (p.Arg117Trp), c.1025G>C (p.Ser342Tyr), c.1048G>T (p.Val350Leu) y una variante nonsense c.907C>T (p.Arg303X) en estado heterocigoto en 12 pacientes. La

evaluación funcional de estas variantes demostró que comprometen la capacidad de las proteínas para unirse y para transactivar el promotor del gen *GDF9* (Bouilly, et al., 2011). Los mismos autores estudiaron una cohorte de 213 pacientes no relacionadas con amenorrea primaria o secundaria en donde se encontró una prevalencia de 5.6% de mutaciones del gen *NOBOX* (Bouilly, et al., 2015). La secuenciación de la región codificante completa del gen reportó 2 variantes previamente reportadas p.Gly91Trp y p.Arg117Trp y 4 variantes nuevas c.131G>T (p.Arg44Leu), c.331G>A (pGly111Arg), c.1112A>C (p.Lys371Thr) y c.1856C>T (p.Pro619Leu).

El factor alfa de la línea germinal (*FIGLA*) localizado en la región 2p13.3 es un factor de transcripción hélice-bucle-hélice básica (bHLH: *basic helix-loop-helix*), específico de las células germinales, que regula la expresión de los genes de la zona pelúcida, así como también la expresión de otros genes oocito específicos (Bayne, et al., 2004; Huntriss, et al., 2002; Liang, et al., 1997). Las proteínas bHLH son un grupo de factores de transcripción que se unen a la secuencia consenso CANNTG, denominada caja E (Athanihar and Osborne, 1998; Littlewood and Evan, 1995). En el humano y en el ratón el gen *FIGLA* se expresa en las gónadas embrionarias donde forma heterodímeros con la proteína bHLH TCF3 (*Transcription factor 3*) (Bayne, et al., 2004; Liang, et al., 1997). El ratón hembra *knock-out Figla^{-/-}* muestra una pérdida acelerada de los oocitos después del nacimiento y la ausencia de formación de folículos primordiales (Soyal, et al., 2000). El fenotipo de falla ovárica en los ratones sugirió a *FIGLA* como un gen candidato de FOP en humanos. Hasta la fecha, el único estudio del gen *FIGLA* en mujeres FOP permitió identificar deleciones heterocigotas en dos casos de mujeres no relacionadas (Zhao, et al., 2008a). Los análisis

funcionales mostraron que estas variantes pueden tener un papel patogénico: la primera deleción c.15-36del traduce una proteína truncada (p.Gly6fsX66) con ausencia de sus dominios funcionales, lo cual podría explicar la patología ovárica por un mecanismo de haploinsuficiencia. La segunda deleción c.419-421delACA conduce a la pérdida de un aminoácido (p.Asn140del). Los estudios *in vitro* de esta mutación, a través de un ensayo de doble híbrido revelaron una alteración en la heterodimerización de la proteína mutante con el factor de transcripción TCF3, lo cual sugiere un efecto dominante negativo como el mecanismo causal de FOP (Zhao, et al., 2008a).

2.5.3 NR5A1

El gen *NR5A1*, también denominado factor esteroideogénico 1 (*SFI*) codifica un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que se expresa en la gónada bipotencial desde el desarrollo embrionario temprano hasta el ovario posnatal, prepuberal y maduro (Luo, et al., 1994). Es un regulador transcripcional crítico de los genes involucrados en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal esteroideogénico los cuales incluyen *STAR*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *CYP19A1*, *LH/CGR*, e *INHA*. Hasta el año 2008, se describieron 18 mutaciones de *NR5A1* en individuos 46,XY con trastornos del desarrollo sexual (*DSD: disorders of sex development*) (Achermann, et al., 1999; Lin, et al., 2007). Posteriormente 19 mutaciones en el gen incluyendo deleciones y mutaciones missense fueron detectadas en miembros de cuatro familias con historia de DSD 46, XY y FOP 46,XX al igual que en dos de 25 mujeres con FOP aislada (Lourenco, et al., 2009). Las mutaciones fueron asociadas a un gran espectro de anomalías ováricas incluyendo disgenesia gonadal con amenorrea primaria o secundaria. Estudios funcionales demostraron que la proteína mutante tiene

alterada su capacidad de transactivación de promotores de los genes gonadales importantes para el crecimiento y la maduración folicular. Esta alteración transcripcional en el ovario podría desarrollar el trastorno en la foliculogénesis y la falla ovárica (Bashamboo and McElreavey, 2010).

2.5.4 *STAG3*

La cohesión de las cromátidas hermanas durante los procesos de división celular depende de un gran complejo proteico denominado cohesina. El gen *STAG3* (*stromal antigen 3*) codifica una subunidad del complejo de cohesinas específica de meiosis con una estructura proteica en forma de anillo que asegura la cohesión de las cromátidas hermanas y permite la correcta sinapsis y la segregación de los cromosoma homólogos durante la meiosis (Nasmyth, 2011). La expresión de *STAG3* esta restringida a estadios tempranos de la meiosis en el ovario fetal de las mujeres (Garcia-Cruz, et al., 2010; Houmard, et al., 2009) Recientemente, mediante la combinación del análisis de ligamiento y la secuenciación del exoma de una familia consanguínea con FOP se logró identificar una delección, c.968delC en el gen *STAG3* que lleva a un corrimiento del marco de lectura generando un codón de parada prematuro (p.Phe187fs*7) (Caburet, et al., 2014; Caburet, et al., 2012). Todos los miembros afectados de la familia eran homocigotos para la mutación mientras que los miembros no afectados eran portadores heterocigotos. El papel patogénico de las mutaciones en *STAG3* fue funcionalmente validado con un modelo animal de ratón con la pérdida de la función de *Stag3* durante la oogénesis, el cual desarrolló un fenotipo de esterilidad. Estos resultados indican que la FOP en este caso, puede ser atribuida a defectos en la cohesión de cromatides hermanas en la profase del oocito (Caburet, et al., 2014).

2.5.5 NANOS3

Los genes *NANOS* son altamente conservados y están involucrados en el desarrollo y la diferenciación de las células germinales (Mosquera, et al., 1993). Existen tres genes homólogos *Nanos* en el ratón, de los cuales *Nanos3* mantiene la viabilidad de las células germinales primordiales (PGCs) (Suzuki, et al., 2008)(Suzuki, 2008). *Nanos3* se expresa en las PGCs desde su formación hasta poco después de su aparición en las gónadas (Tsuda, et al., 2003). Los ratones hembra *Nanos3*^{-/-} desarrollan ovarios atróficos en los cuales no es posible la detección de PGCs debido a la apoptosis acelerada y a la pérdida de su migración durante la embriogénesis (Tsuda, et al., 2003). Una función similar para las proteínas NANOS se ha demostrado en la especie humana. *NANOS3* se expresa tanto en las gónadas masculinas como femeninas fetales y del adulto. Los estudios *in vitro* sugieren un papel fundamental en el desarrollo de las células germinales humanas (Julaton and Reijo Pera, 2011). Wu y colaboradores efectuaron un análisis mutacional de la región codificante de *NANOS1*, *NANOS2* y *NANOS3* en 100 pacientes chinas con FOP identificando una mutación heterocigota c.457C>T (p.Arg153Trp) en una mujer de 23 años (Wu, et al., 2013). Los estudios *in vitro* de esta mutación demostraron una disminución en la estabilidad de la proteína mutante NANOS3, al igual que se demostró a través de un modelo animal que la población de PGCs es controlada por los niveles de proteína NANOS3 (Wu, et al., 2013). Recientemente, se reportó una mutación homocigota *missense* (p.Glu120Lys) en *NANOS3* en dos hermanas con amenorrea primaria provenientes de una cohorte brasilera de 85 mujeres con FOP. Los análisis *in vitro* evidenciaron un aumento de

la apoptosis, sugiriendo que la pérdida del efecto protector contra la apoptosis, mediado por NANOS3 es el mecanismo subyacente de la FOP en estas pacientes (Santos, et al., 2014).

2.5.6 *SYCE1*

El gen *SYCE1* (*Synaptonemal complex central element 1*) codifica para una de las proteínas que forman parte del elemento central de complejo sinaptonémico, necesario para el proceso de recombinación durante la meiosis (Bolcun-Filas, et al., 2007). En el ratón, *Syce1* es expresado en el complejo sinaptonémico de los cromosomas durante la meiosis tanto en la hembra como en el macho (Costa, et al., 2005). El ratón *Knock-out Syce^{-/-}* demostró infertilidad: las hembras desarrollaron ovarios atróficos, con pérdida casi total de los folículos, evidenciando un bloqueo de la meiosis en la profase I (Bolcun Bolcun, 2009). La primera mutación de *SYCE1* descrita en humanos fue identificada en dos hermanas con FOP (de Vries, et al., 2014). La mutación homocigota *nonsense* c.613C>T (p.Gln205X) estaba presente en las dos hermanas afectadas mientras que los padres y tres hermanos hombres eran heterocigotos para la misma. La mutación no fue identificada en 90 controles evaluados. Hasta la fecha no se disponen de estudios funcionales de esta variante. Estos hallazgos señalan la importancia del complejo sinaptonémico y la meiosis en la función ovárica (Bolcun-Filas, et al., 2009).

A continuación se revisará el gen *BMP15* en el contexto de la fisiología ovárica y la etiología de la FOP. Este gen hace parte de la temática y de los estudios experimentales que sustentan esta tesis. La metodología, los resultados y la discusión serán expuestos más adelante.

2.6 Gen *BMP15*

El gen *BMP15* (*Bone Morphogenetic Protein 15*) (MIM*300247) fue mapeado mediante la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.2) en la región crítica FOP-3 (Dube, et al., 1998; Zinn and Ross, 2001; Zinn, et al., 1998). Esta región cromosómica en la especie humana demostró sintenia conservada con la posición cromosómica de *Bmp15* en el ratón (Dube, et al., 1998). El gen está constituido por dos exones codificantes con una longitud de 1179pb separados por una región intrónica de 4.2Kb. El primer exón codifica una secuencia de 17 aminoácidos (aa) que corresponde al péptido de señalización, seguida de 97 aa de la pro-región. El segundo exón codifica los 158 aa restantes de la pro-región y 125 aa más que corresponden a la región del péptido maduro (Jennifer, et al., 1998). *BMP15* fue propuesto como candidato de FOP por estudios iniciales que indicaron su expresión específica en el ovario (Dube, et al., 1998). Para definir por primera vez el perfil de expresión del mRNA de *Bmp15*, Dube y colaboradores desarrollaron un análisis de Northern Blot usando el RNA total de múltiples tejidos de ratón adulto. La sonda de *Bmp15* detectó un transcrito único de aproximadamente 3.5Kb en el ovario de ratón, no encontrado en el resto de los tejidos examinados (Jennifer, et al., 1998). Posteriormente, estudios de hibridación *in situ* revelaron señales de hibridación para el mRNA de *BMP15* en los oocitos, mientras que no se detectaron señales en otros tipos celulares del ovario (Dube, et al., 1998; Laitinen, et al., 1998). La evaluación de la expresión de *BMP15* a lo largo de la foliculogénesis demostró inicialmente su mRNA en los oocitos de los folículos primarios de las ovejas, los humanos, las ratas y los ratones. Sin embargo no se detectó en los oocitos de los folículos primordiales (Aaltonen, et al., 1999; Dube, et al., 1998; Galloway, et al., 2000; Jaatinen, et al., 1999; Laitinen, et al., 1998). Se

ha demostrado que a medida que avanza la foliculogénesis y crece el número de capas de las células de la granulosa, la expresión de *BMP15* aumenta, con niveles elevados sostenidos a lo largo de la ovulación, hasta sufrir un descenso durante el proceso de atresia folicular. (Aaltonen, et al., 1999; Erickson and Shimasaki, 2003; Otsuka, et al., 2000; Shimasaki, et al., 2004).

La expresión de *Bmp15* también se identificó en la línea celular gonadotropa LβT2 y en el tejido de la glándula hipófisis de ratón donde regula selectivamente la biosíntesis y la secreción de la FSH (Otsuka and Shimasaki, 2002). En este marco es posible que *BMP15* tenga una función central en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

2.7 Proteína BMP15

2.7.1 Características estructurales

La proteína BMP15 es un factor de crecimiento y de diferenciación derivado del oocito que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento transformante β (*TGF- β : transforming growth factor- β*) constituida por más de 35 proteínas que comparten un motivo estructural común (Chang, et al., 2002). Estas proteínas incluyen los miembros de las subfamilias BMP, GDF, activinas/inhibinas, miostatina y la hormona anti-Mülleriana (AMH) (Chang, et al., 2002; Massagué, 1998). La estructura tridimensional común de éstos factores, deducida por estudios de cristalografía del monómero TGF- β 2, reveló la presencia de 2 cadenas β y una hélice- α estabilizada por tres puentes disulfuro (Daopin, et al., 1992; Schlunegger and Grutter, 1992). Una característica común de la mayoría de los miembros de la familia TGF- β es la presencia de 7 residuos conservados de cisteína en la región madura formando un motivo denominado “nudo de cisteínas” (Daopin, et al., 1992;

Schlunegger and Grutter, 1992). Al igual que los otros miembros de la superfamilia TGF- β , la proteína BMP15 es sintetizada como un precursor inactivo (pre-proteína) conformado por un péptido de señalización (N-terminal), una pro-región y un dominio maduro carboxi-terminal biológicamente activo (Chang, et al., 2002; Lin, et al., 2003). Las moléculas inactivas son liberadas después de experimentar diferentes modificaciones post-traduccionales: eliminación del péptido señal, dimerización y clivaje del péptido maduro. La pro-proteína BMP15 forma un complejo homodimérico (BMP15:BMP15) o heterodimérico (BMP15:GDF9, cuando se une a su parólogo GDF9-*growth differentiation factor 9*). La formación de homo- o heterodímeros se efectúa a través de la unión covalente del cuarto residuo conservado de cisteína que está ausente en algunos miembros de la familia como BMP15 y GDF9 donde es sustituido por una serina (Chang, et al., 2002). En estos casos la evidencia de estudios *in vitro* sugiere que tanto GDF9 como BMP15 pueden formar homodímeros y heterodímeros a través de interacciones no-covalentes como los contactos hidrofóbicos (Kingsley, 1994; Liao, et al., 2003; Liao, et al., 2004). La pro-región está separada de la región madura por una secuencia dibásica de clivaje compuesta por 4 aa (RXXR) que es reconocida por una familia de proconvertasas (como la furina) que realizan el clivaje proteolítico específico liberando finalmente los dímeros maduros activos (Hashimoto, et al., 2005; Massagué, et al., 1994; Shimasaki, et al., 2004; Taylor, et al., 2003). Es importante señalar que la pro-región desempeña una función fundamental en la dimerización, la estabilización y la subsecuente secreción de los dímeros maduros (Hashimoto, et al., 2005; Pulkki, et al., 2011).

2.7.2 Receptores de BMP

Los miembros BMP de la familia TGF- β se unen a dos tipos de receptores serina-treonina kinasa (tipo I y II) requeridos para el mecanismo de transducción de señales (Miyazono, et al., 2010; Miyazono, et al., 2005; Nohe, et al., 2004). Siete receptores de tipo I de la familia TGF- β han sido identificados en los mamíferos: los receptores ALK 1-7 (*activin receptor-like kinase*) que comparten propiedades estructurales similares con los receptores de tipo II (el dominio extracelular de unión al ligando, el dominio transmembranal y un dominio intracelular que posee la actividad tirosina quinasa). De los receptores tipo II se han identificado cinco miembros (ActRII, ActRIIB, BMPRII, TGFbRII y AMHRII), de los cuales BMPRII es específico para BMPs, mientras que ActRII y ActRIIB son compartidos por activinas, miostatinas y BMPs (de Caestecker, 2004; Miyazono, et al., 2010).

Los heterodímeros GDF9:BMP15 en los humanos y en el ratón son los reguladores más biopotentes de las funciones de las CG en el ovario, principalmente la proliferación (Peng, et al., 2013). En estudios de expansión del cúmulo, los homodímeros de Gdf9 en el ratón y los homodímeros de BMP15 en el humano pueden regular la expresión de los genes relacionados con la expansión del cúmulo (e.g. *PTX3*, *HAS2*, y *PTGS2*) y promover su expansión *in vitro*, mientras que los homodímeros de Bmp15 en el ratón y los homodímeros de GDF9 en el humano son esencialmente inactivos (Peng, et al., 2013). Los heterodímeros GDF9:BMP15 ejercen su efecto sobre la célula blanco a través de la unión con los receptores BMPRII (Tipo II), el receptor ALK4/5/7 y el co-receptor ALK6 (Tipo I) para inducir la fosforilación de las proteínas efectoras intracelulares SMAD2/3 que finalmente se traslocan al núcleo para regular la expresión de genes específicos (Massagué, et al.,

2005; Peng, et al., 2013). Los homodímeros de BMP15 en el humano, se unen a BMPRII que fosforila a ALK6, el cual a su vez fosforila a SMAD1/5/8 (Moore, et al., 2003; Pulkki, et al., 2011; Sara, et al., 2013). Los homodímeros de *Gdf9* en el ratón se unen a BmprII, lo cual resulta en la fosforilación de Alk4/5/7 y en la posterior fosforilación de Smad2/3 (Peng, et al., 2013).

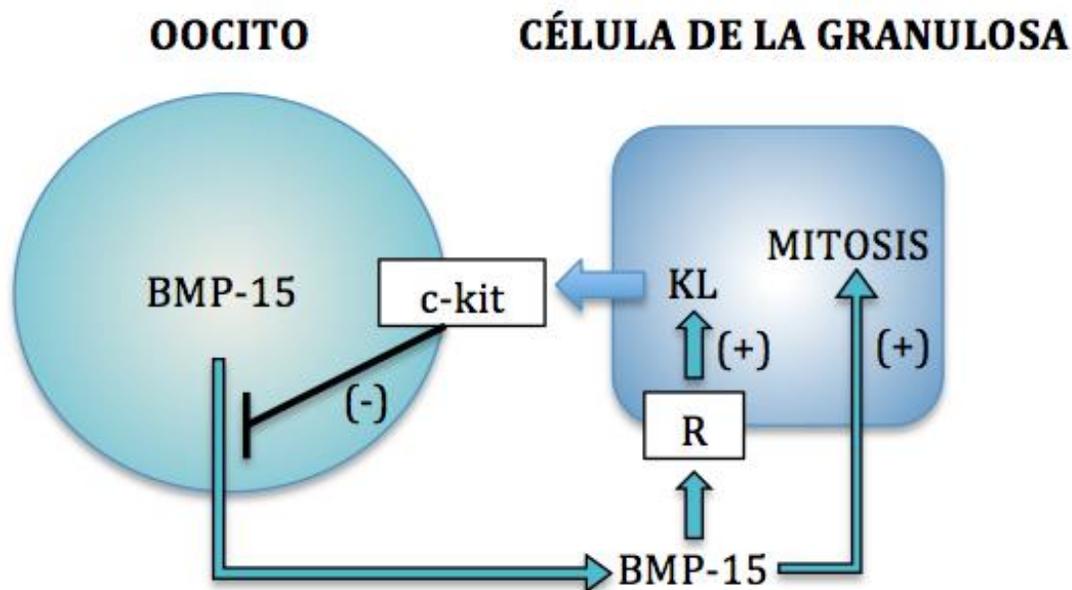
2.7.3 Función biológica de BMP15

Empleando una molécula recombinante de BMP15, Otsuka y colaboradores demostraron que esta proteína es un potente estimulador de la proliferación de las CG (Otsuka, et al., 2000). La actividad mitótica de BMP15 es FSH-independiente, indicando que esta proteína estimula la mitosis de las CG en los folículos pre-antrales durante los estadios FSH-independientes del crecimiento folicular temprano (Otsuka, et al., 2000).

Una de las acciones más importantes de BMP15 es la inhibición de la expresión del receptor de la FSH en las CG (Otsuka, et al., 2001). Como resultado, la expresión inducida por FSH de STAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), P450_{scc} (*side-chain cleavage enzyme*), 3 β -HSD (*3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*), el receptor de la LH y las subunidades de la inhibina/activina (α , β A, y β B) es inhibida por BMP15 (Otsuka, et al., 2001). Aunque BMP15 no tiene un efecto independiente en la producción esteroidea de las CG, es un potente supresor de la síntesis de progesterona inducida por FSH. La ausencia de un efecto en la síntesis de estradiol soporta una función relevante de BMP15 en la promoción del crecimiento y el desarrollo folicular temprano mientras que previene la luteinización prematura (Moore and Shimasaki, 2005). La disminución de la síntesis mediada por FSH de StAR, P450_{scc} y la progesterona demuestra que BMP15 es un

inhibidor de la luteinización (Moore and Shimasaki, 2005; Otsuka, et al., 2001). BMP15 estimula el ligando kit (KITLG), un regulador crucial de la reproducción femenina expresado por las CG durante los estadios tempranos de la foliculogénesis (Ismail, et al., 1996; Laitinen, et al., 1998; Otsuka and Shimasaki, 2002). De manera más precisa, BMP15 ejerce su efecto a través del receptor localizado en las CG para estimular la mitosis y la expresión del KITLG. KITLG, actúa a través de su receptor (c-kit) localizado en la superficie del oocito para inhibir la expresión de *BMP15* en un sistema de retroalimentación negativa. Figura 1. La relevancia funcional del sistema de retroalimentación BMP15/KITLG en la inducción del crecimiento folicular fue demostrada por dos hallazgos importantes: 1) la adición de KITLG a un modelo de co-cultivo de oocitos y CG estimula la mitosis de estas últimas; 2) la inhibición de la señalización a través de c-kit reduce la estimulación de las CG generada por BMP15 (Otsuka and Shimasaki, 2002). En este contexto, la actividad mitótica de BMP15 y KITLG sobre las CG depende del sistema de comunicación bidireccional oocito-GC.

Figura 1. Interacción de BMP15 y KL en la regulación de la mitosis de las células de la granulosa.



BMP15 actúa a través de los receptores localizados en las células de la granulosa para estimular la mitosis y la expresión de KL. KL actúa a través del receptor c-kit localizado en la superficie del oocito para inhibir la expresión de BMP15, formando un sistema de retroalimentación negativa. Modificada de Moore y Shimasaki 2005.

BMP15 también ha demostrado participar en la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo del cumulo (*Mvk*, *Pmvk*, *Fdps*, *Sqle*, *Cyp51*, *Sc4mol* y *Ebp*) (Caixeta, et al., 2013; Su, et al., 2008) y la expansión (*Ptx3*, *Has2*, *Tnfaip6* y *Ptgs2*) (Li, et al., 2009; Peng, et al., 2013). Es importante resaltar la acción sinérgica de BMP15 y GDF9 a través de la existencia de los heterodímeros biológicamente activos GDF9:BMP15 y la cooperación de los homodímeros de GDF9 y BMP15. De hecho, los heterodímeros GDF9:BMP15 se producen cuando éstas moléculas son co-expresadas (Liao, et al., 2003). La evidencia *in vitro* mostró la relevancia fisiológica de los heterodímeros en humanos y en ratones. En efecto, Peng y colaboradores (2013) describieron que los heterodímeros de GDF9:BMP15 en el ratón son 10 a 30 veces más activos que los homodímeros de GDF9. En el humano los heterodímeros GDF9:BMP15 son 1000 a 3000 veces más bioactivos que

los homodímeros de BMP15 (Peng, et al., 2013). Colectivamente, estos datos indican que BMP15 está implicado a lo largo de todo el proceso de la foliculogénesis controlando el crecimiento y el desarrollo folicular en estadios tempranos. En fases más tardías BMP15 modula el efecto de la FSH y controla la maduración folicular (Persani, et al., 2014).

2.7.4 Modelos naturales y experimentales de *BMP15*

La relevancia de la acción de *BMP15* en la foliculogénesis ovárica y la fertilidad fue inicialmente demostrada en los modelos animales naturales y experimentales. En estos modelos, las mutaciones en distintas especies de mamíferos han sido relacionadas con fenotipos reproductivos diferentes que van desde la infertilidad completa hasta la hiperfertilidad (Laissue, et al., 2006; Otsuka, et al., 2011; Pangas and Matzuk, 2004).

Oveja

Una raza altamente prolífica de ovejas Romney fue sujeto de investigación a principios de la década de los 90s (Davis, et al., 1992). La mayoría de éstos estudios, realizados con una progenie de 359 hembras llevaron a la conclusión de que el incremento en la prolificidad era debida a un único gen localizado en el cromosoma X (Davis, et al., 1992). El gen que causaba este fenotipo fue denominado “Inverdale” y su locus recibió el nombre *FecX* (*Fecundity X Inverdale*) por el Comité Genético de Nomenclatura de Ovinos y caprinos en 1990. Estos estudios demostraron que la oveja Inverdale portadora de una mutación natural ligada al X desarrollaba un incremento en la tasa de ovulación con embarazos gemelares o triples en las heterocigotas ($FecX^I/FecX^+$). Por el contrario, las ovejas homocigotas ($FecX^I/FecX^I$) eran completamente infértiles con ovarios atróficos y bloqueo de la foliculogénesis (Braw-Tal, et al., 1993; Davis, et al., 1992). En 1993 se encontró el mismo

fenotipo ligado al X (alta prolificidad en heterocigotos e infertilidad en homocigotos) en otra raza de ovejas no-relacionada con la familia Inverdale (Galloway, et al., 2000). Esta oveja fue llamada Hanna y el locus del gen se designó como $FecX^H$ (*Fecundity X Hanna*). En el año 2000 se mapeó el locus $FecX^I$ en una región de 10-cM (en el centro del cromosoma X de la oveja) ortóloga de la región humana Xp11.2–11.4 que contenía el gen *Bmp15* (Galloway, et al., 2000). Los estudios de secuenciación posteriores de *Bmp15* revelaron dos mutaciones naturales: una transversión de T por A en el nucleótido de la posición 92 (p.Val299Asp en el dominio maduro de BMP15) en la oveja Inverdale y una transición de C por T en el nucleótido de la posición 67 (p.Glu291Ter) de la región de *Bmp15* que codifica el péptido maduro en las ovejas Hanna (Galloway, et al., 2000). La caracterización molecular y funcional de las mutaciones naturales de *Bmp15* en las ovejas demostró un efecto deletéreo (deterioro del procesamiento y la secreción de las proteínas) solo cuando se co-expresan tanto la proteína BMP15 mutante como la proteína GDF9 wild type. Estos estudios demostraron la función crítica de la interacción entre GDF9 y BMP15 para la fisiología reproductiva femenina (Liao, et al., 2003; Liao, et al., 2004). La identificación del gen *Bmp15* como causa del fenotipo ovárico en las ovejas Inverdale, Hanna y otras razas ovinas estableció la importancia de *BMP15* en la fertilidad femenina (Bodin, et al., 2007; Davis, 2004; Galloway, et al., 2000; Hanrahan, et al., 2004; McNatty, et al., 2005).

Ratón

A través de la tecnología *Knock-out* (KO) por recombinación homóloga se han creado diferentes modelos murinos para estudiar la función de múltiples miembros de la familia

TGF- β incluyendo *Gdf9* y *Bmp15* (Yan, et al., 2001). Diferentes combinaciones alélicas en los ratones KO demuestran fenotipos reproductivos disímiles: mientras que la inactivación homocigota de *Gdf9* demostró un bloqueo del desarrollo folicular en el estadio primario que condujo a la infertilidad completa (Dong, et al., 1996), los ratones hembra *Bmp15*^{-/-} fueron subfértiles con defectos histopatológicos mínimos en el ovario y tasas de fecundidad y ovulación reducidas (Yan, et al., 2001). El efecto observado en los ratones doble KO (*Bmp15*^{-/-}*Gdf9*^{+/+}) sobre el ovario es más severo que el fenotipo ovárico producido por el KO simple (*Bmp15*^{-/-} o *Gdf9*^{+/+}). En efecto, el ratón doble KO no mostró diferencias significativas en términos de fertilidad comparado con el ratón KO *Gdf9*^{-/-} (Yan, et al., 2001). Lo anterior, contrasta con los efectos drásticos que tienen las mutaciones del gen *Bmp15* en las ovejas Hanna e Inverdale en el desarrollo folicular. Se han propuesto distintas hipótesis para aclarar las diferencias del comportamiento biológico de estas proteínas entre las especies mono (oveja y humano) y poliovulatorias (ratón). Por ejemplo Liao y colaboradores propusieron que las mutaciones *FecX*^I y *FecX*^H producen una proteína BMP15 mutante que puede afectar la biosíntesis de GDF9 a través de un efecto dominante negativo manifestado a través de la formación de heterodímeros GDF9:BMP15. Por el contrario, la delección completa del segundo exón del gen *Bmp15* en el ratón KO no tiene efecto en la regulación de la biosíntesis de GDF9 (Liao, et al., 2003; Liao, et al., 2004). Otras hipótesis se basan en las diferencias especie-específicas que presenta la proteína BMP15 (Hashimoto, et al., 2005). A diferencia de los otros miembros de la superfamilia TGF- β cuyas secuencias nucleotídicas y de aa tienden a ser altamente conservadas entre especies, *BMP15* no presenta un grado similar de homología entre especies (Dube, et al.,

1998). El dominio maduro del humano y el ratón sólo comparten un 70% de identidad en su secuencia aminoacídica lo cual puede representar diferencias en el procesamiento y la secreción de la misma (Dube, et al., 1998). Por consiguiente los defectos en la ovulación y la subsecuente fertilización observados en el ratón KO de *Bmp15* pueden ser atribuidos a las diferencias en el nivel de proteína madura activa que se produce durante, y no antes, del proceso de ovulación en el ratón y que resulta de la resistencia al clivaje de la pro-proteína en esta especie (Al-Musawi, et al., 2013; Hashimoto, et al., 2005; Yoshino, et al., 2006). En conclusión, el fenotipo *Bmp15* mutante del ratón versus la oveja y el humano (como se expondrá en la siguiente sección) demuestra un incremento en la bioactividad de BMP15 sobre GDF9 en las ovejas y el humano (Dixit, et al., 2006b).

2.7.5 Estudios en humanos

La relevancia funcional de *BMP15* en la fertilidad femenina también ha sido demostrada en la especie humana. Las mutaciones en este gen han sido asociadas con AP y AS en varias cohortes de FOP en todo el mundo (Persani, et al., 2010). La primera mutación heterocigota de *BMP15* fue reportada en dos hermanas italianas con falla ovárica hipergonadotrópica caracterizada por disgenesia ovárica y AP (Di Pasquale, et al., 2004). Las pacientes eran portadoras de la mutación puntual heterocigota c.704A>G (p.Tyr235Cys) heredada de su padre hemicigoto. Esta variante está localizada en un residuo de la pro-región, altamente conservado entre especies de vertebrados. En este estudio los análisis funcionales demostraron un descenso en la proliferación de las CG por un efecto dominante negativo de la proteína mutante sobre el procesamiento de la proteína *BMP15 wild type* (Di Pasquale, et al., 2004). Estos hallazgos sugirieron la potencial implicación de *BMP15* como un gen

mayor en la etiología de la FOP. Posteriormente, con el objetivo de evaluar su implicación en la patogénesis de la FOP, fueron analizados grandes paneles de pacientes de diferentes poblaciones (Chand, et al., 2006; Dixit, et al., 2006b; Ferrarini, et al., 2013; Laissue, et al., 2006; Ledig, et al., 2008; Pasquale, et al., 2006; Rossetti, et al., 2009; Takebayashi, et al., 2000; Tiotiu, et al., 2010; Wang, et al., 2010). Se identificaron variantes con una frecuencia variable en pacientes de Europa, Estados Unidos, Africa, India y Asia y casi todas fueron variantes *missense* en estado heterocigoto, localizadas en la región del gen que codifica la pro-región de la proteína (excepto la variante p.S5R localizada en el péptido de señalización) Figura 2.

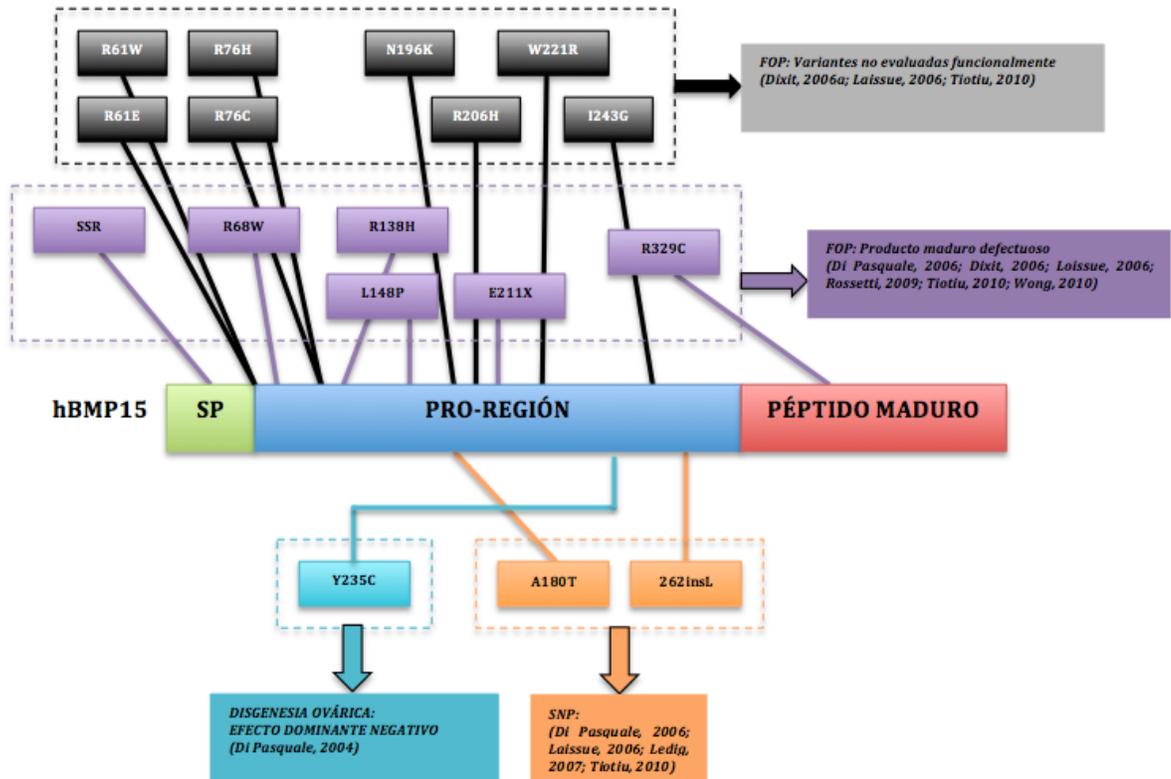
Solo una mutación ha sido identificada en estado homocigoto c.631C>T (p.Glu211X, localizada en la pro-región) en una mujer de la India (Dixit, et al., 2006b). Esta mutación conduce a un codón de parada prematuro que traduce una proteína con ausencia de la región C-terminal que contiene el péptido maduro. El efecto drástico de ésta variante explicaría la severidad del fenotipo en la paciente, caracterizado principalmente por atrofia ovárica severa e infertilidad completa con AP (Dixit, et al., 2006b). Estudios posteriores en mujeres de la misma cohorte revelaron dos de ellas con mutaciones concomitantes en los genes *BMP15* e *INHA*. De esta manera, la paciente con la mutación p.Glu211X en *BMP15* también fue portadora de la mutación c.275G>A (p.Ala257Thr) en *INHA* (Dixit, et al., 2006a). Un grupo chino reportó en el año 2010 la única mutación *missense* c.985C>T (p.Arg329Cys) localizada en el dominio maduro (Wang, et al., 2010). Esta variante condujo al cambio de un aa polar y positivo por otro neutro y no polar que forma puentes disulfuro. El cambio de una cisteína por una arginina podría alterar la estructura de la proteína

BMP15 impidiendo el correcto plegamiento y la subsecuente formación de homo- o heterodímeros con GDF9.

A pesar del amplio número de pacientes en quienes se secuenció la región codificante de *BMP15* ($n=1144$) hasta el año 2013, solo cuatro mutaciones (p.Arg68Trp, p.Arg138His, p.Leu148Pro, p.Tyr235Cys) han sido formalmente validadas como causales del fenotipo a través de estudios funcionales (Di Pasquale, et al., 2004; Rossetti, et al., 2009). Para este fin, Rossetti y colaboradores transfectaron células HEK293T (*Human embryonic Kidney 293T*) con vectores de expresión que contenían la secuencia *wild type* o las formas mutantes de *BMP15* humano (p.L262-L263insL, p.Arg68Trp, p.Arg138His, p.Leu148Pro, p.Ala180Thr) (Rossetti et al. 2009). Se documentó una reducción marcada en la producción de la proteína madura rhBMP15 secretada por las formas variantes p.Arg68Trp, p.Arg138His y p.Leu148Pro. En este estudio se investigó además la actividad biológica de la proteína *BMP15 wild type* en comparación con sus formas mutantes a través de un ensayo reportero con luciferasa en una línea humana de CG evidenciando una reducción significativa del efecto biológico de las mismas formas mutantes (Rossetti, et al., 2009). Cuando los plásmidos mutantes fueron cotransfectados con cantidades iguales de cDNA *wild type* (con el fin de reproducir el estado heterocigoto visto en las pacientes FOP) no se logró el restablecimiento de la actividad *wild type* por las formas mutantes p.Arg68Trp, p.Arg138His y p.Leu148Pro (Rossetti, et al., 2009). El mecanismo funcional por el cual las variantes de *BMP15* con un impacto biológico probado alteran la foliculogénesis ovárica es actualmente desconocido. Se ha hipotetizado que la disminución de la señal paracrina de

BMP15 sobre el folículo conduce al deterioro del efecto antiapoptótico en las CG favoreciendo la atresia folicular (Persani, et al., 2011).

Figura 2 Esquema de las variantes identificadas en el gen BMP15 asociadas con FOP no-sindrómica.



El péptido de señalización (SP), la pro-región y el dominio maduro se muestran en los colores verde, azul y rojo respectivamente. Los recuadros representan las mutaciones a nivel de la proteína descritas por los diferentes investigadores así como aquellas variantes cuyo impacto funcional ha sido predicho por el tipo de variante o por los estudios *in vitro*. Modificada de (Persani, et al., 2014).

Alternativamente, las variantes de BMP15 pueden alterar el reclutamiento de los folículos pre-antrales por las gonadotropinas. Por esta razón, el gen *BMP15* también ha sido investigado en mujeres con diferentes alteraciones de la ovulación sin encontrarse asociación en pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) o con las madres de gemelos dicigotos (Zhao, et al., 2008b).

2.8 La variante -9C>G en el promotor de *BMP15* y la proteína PITX1

Por ser parte del desarrollo conceptual y de la principal pregunta científica de la presente tesis, a continuación se presentaran brevemente hallazgos previos y conocimiento sobre la variante -9C>G en el promotor de *BMP15* así como sobre el factor de transcripción PITX1.

Estudios anteriores de tamizaje de mutaciones del gen *BMP15* en 166 pacientes caucásicas no relacionadas con FOP idiopática confirmaron la presencia de una sustitución localizada en la región 5'UTR (Elisa Di, et al., 2006). En este estudio la secuenciación de la región codificante completa y de las uniones intrón-exón de *BMP15* demostró el cambio c.-9C>G. Posteriormente, Dixit y colaboradores secuenciaron el ORF de *BMP15* incluyendo las uniones intrón-exón y un fragmento corto de la región 5'UTR en 202 mujeres FOP provenientes de la India (Dixit, et al., 2006b). El estudio reveló 18 variantes dentro de las cuales, tres (c.-9C>G, c.308A>G y c.852C>T) tenían una alta frecuencia (más del 5% entre las mutantes homocigotas y heterocigotas). Las tres combinaciones alélicas que incluían además el cambio c.-9C>G fueron escogidas para la realización de un análisis de haplotipos que reveló una asociación significativa del haplotipo GGC con los casos de FOP (P=0.0075) (Dixit, et al., 2006b). Así mismo, Morón y colaboradores analizaron cuatro SNPs (c.-673C>T, c.-9C>G, IVS1+905A>G y c.308A>G) localizados en *BMP15* con el objetivo de investigar la función de este gen en la respuesta a la estimulación ovárica controlada (COS: *controlled ovarian stimulation*) en las mujeres sometidas a las técnicas de reproducción asistida con FSH recombinante (rFSH) (Moron, et al., 2006). El haplotipo TGGA que incluía el alelo G en el locus c.-9C>G estuvo sobre representado en las mujeres altas respondedoras (Moron, et al., 2006). Estos hallazgos fueron confirmados por un

estudio realizado en 191 mujeres sometidas a estimulación ovárica controlada en el cual se encontró una asociación entre el alelo *BMP15* -9G y la alta respuesta a la estimulación ovárica (Hanevik et al. 2013). En otro estudio llevado a cabo con 398 mujeres españolas con síndrome de ovario poliquístico, se analizaron 2 polimorfismos (-9C>G, IVS1+905A>G) en *BMP15* y aunque no se logró demostrar asociación de este gen con la enfermedad, se encontró una asociación de ambos marcadores con la infertilidad (Gonzales et al. 2008). El genotipo heterocigoto c.-9 CG tuvo un efecto protector ($P=0.005$) mientras que el genotipo homocigoto *wild type* c.-9 CC confirió un efecto de riesgo ($P=0.012$) para la infertilidad (González, et al., 2008).

2.8.1 *PITX1*

El gen *PITX1* (*pituitary homeo box transcription factor 1*) se encuentra localizado en el cromosoma 5q31 humano y está formado por tres exones con una longitud de 945pb (Shang, et al., 1997; Szeto, et al., 1996). Inicialmente se describió que la actividad reguladora de la proteína PITX1 activa la transcripción del gen de la proopiomelanocortina (POMC) en las células corticotropas de la hipófisis anterior donde actúa de manera sinérgica con el factor hélice-vuelta-hélice neuro D1 (Lamonerie, et al., 1996). Se expresa en los cinco linajes celulares de la hipófisis anterior donde activa la expresión de los genes que codifican las cinco hormonas secretadas en esta glándula (Lancôt, et al., 1999). En el linaje somato-lactotrofo actúa en sinergismo con *Pit-1* en el promotor PRL y con SF-1 en las células gonadotropas (Jacques, et al., 1998; Szeto, et al., 1996). *Pitx1* también está involucrado en el desarrollo de las estructuras derivadas del estomodeo y el primer arco branquial (Bolsa de Rathke y el epitelio oral, nasal y dental), así como también de las

extremidades inferiores (Crawford, et al., 1997). Es un gen homeótico que participa en el desarrollo embrionario confiriendo a la célula identidad espacial o temporal a lo largo del eje anteroposterior del cuerpo (Crawford, et al., 1997). Codifica para un factor de transcripción miembro de la familia RIEG/PITX de homeocajas que pertenece a la clase bicoide de proteínas de homeodominios (Lamonerie, et al., 1996). Estos factores son reguladores relacionados entre sí por tener un homeodominio de unión al ADN altamente conservado de 60 aa. El segmento de ADN correspondiente se llama homeocaja (*homeobox* o *Complejo Hox*) (Tremblay, et al., 2000). Las proteínas *PITX1* de ratón y humano tienen un 100% de homología en el homeodominio y entre un 88% a 97% en las regiones N- y C-terminal, respectivamente (Crawford, et al., 1997). Promotores de distintos genes o *enhancers* hipófisis-específicos contienen al menos un sitio de unión putativo para *Pitx1* (Jacques, et al., 1998; Lamonerie, et al., 1996; Ma, et al., 1996; Wilson, et al., 1996)

Tabla 1.

Tabla 1 Sitios putativos de unión a *Pitx1* presentes en los promotores hipófisis-específicos.

Promotor hipófisis-específico		TAATCC	
Rata POMC	-302	TAAGCC	m,r,h
Ratón α GSU	-1620	TAAGCT	m
	-1485	TAATCC	m
	-605	TAATCC	m
	-389	TAATCC	m
	-368	TTATCC	m
	-220	TAAGCT	m,r
	-70	TAAGCT	m,r, h
Bovino βLH	-628	TAAGCT	b,s,p
	-233	CAATCC	b,s,p
	-92	TAATCT	b,s,p
Bovino βFSH	-1534	TTATCC	b
	-1513	TTATCC	b,s
	-1437	CAATCC	b,s
	-1426	TAATCT	b,s
	-1409	TAAGCC	b,s
	-1233	TTATCC	b,s

Promotor hipófisis-específico		TAATCC	
	-1209	TAATCC	b,s
	-1197	TCATCC	b,s
	-1165	TCATCC	b,s
	-710	TAATCC	b,s
	-216	TAATCT	b,s
	-52	TAAACC	b,s
Ratón βTSH	-42	TTATCC	m,r, h
Rata GH	-217	TAAACC	m,r
	-124	TTATCC	m,r
Rata PRL	-27	TAAACC	r,h
Ratón Pit Enhancer	94	TAATCT	m
	99	TAATCC	m,r
	616	TAATCT	m,r
Ratón GnRH-R	-1425	CAATCC	m
	-939	TAAACC	m
	-846	TAATCT	m
	-702	TAATCC	m
	-253	TCATCC	m
	-105	TAATCT	m

Los sitios conservados entre especies se indican en la columna de la izquierda (r, rat, m, mouse, h, human, b, bovine, s, sheep, p, pig). Modificado de Tremblay et al, 1998.

Hasta antes del inicio de este estudio no se habían encontrado funciones ováricas de este factor ni una relación regulatoria con el gen *BMP15*.

3. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿La variante de secuencia *BMP15* c.-9C>G podría modificar el sitio de fijación de algún factor de transcripción específico alterando la trans-activación del promotor?.

4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Objetivo general

Este estudio busca proponer nuevos elementos que permitan una mejor comprensión de las bases genéticas de la FOP no-sindrómica a partir del estudio específico de una variante de

secuencia en el promotor del gen *BMP15* y de su potencial efecto funcional durante su trans-activación

4.2 Objetivos específicos

1. Predecir por aproximaciones *in-silico* potenciales sitios de unión a factores de transcripción (TFBS: *Transcription Factor Binding Sites*) en la región 5' de *BMP15*.
2. Determinar la modificación de la transactivación del promotor de *BMP15* causada por la variante de c-9C>G.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Análisis *in-silico* del promotor de *BMP15*

5.1.1 Identificación de potenciales sitios de unión a factores de transcripción en las secuencias nucleotídicas de la región 5' del gen *BMP15*

La función MatInspector del software Genomatix (www.genomatix.de) emplea una gran librería de matrices, la similitud central y la similitud de matriz para calcular el índice de similitud (Cartharius, et al., 2005; Quandt, et al., 1995). La secuencia central o *core* de una matriz se define como la secuencia consecutiva (generalmente 4 nucleótidos) más altamente conservada. La unión perfecta a la matriz se obtiene con una puntuación de 1. El análisis de la secuencia promotora de *BMP15* con este programa se localizó en 2Kb *upstream* del codón de iniciación ATG (intervalo genómico -2001pb hasta +100pb). Los potenciales sitios de unión a factores de transcripción fueron seleccionados con un índice de similitud de 0.75.

5.1.2 Alineamiento múltiple de la región promotora de *BMP15*

Se efectuó un alineamiento múltiple de la secuencia de la región promotora del gen *BMP15* en diferentes especies de mamíferos utilizando el programa informático ClustalW que permite el alineamiento simultáneo de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas (www.ebi.ac.uk). Las secuencias que se analizaron fueron los promotores de *BMP15* de *H. sapiens*- NG_012894.1, *P. troglodytes*- NC_006491.3, *P. abelii*- NC_012614.1, *M. mulatta*- NC_007878.1, *O. aries*- NC_019484.1, *B. taurus*- AC_000187.1, *C. lupus familiaris*- NC_006621.3, *T. truncatus*- NW_004205773.1, *O. cuniculus*- NC_013685.1, *R. norvegicus*- NC_005120.3, *M. musculus*- NC_000086.7.

5.2 Construcciones plasmídicas

5.2.1 Promotor de *BMP15* en pGL4.22[luc2CP/Puro]

Amplificación por PCR y preparación del fragmento del promotor del gen *BMP15*.

Se realizó la extracción de ADN genómico de sangre periférica de mujeres donantes mediante la purificación por precipitación salina, previo consentimiento informado y aprobación del Comité de Ética en Investigación Escuela de Medicina y Ciencias de la salud de la Universidad del Rosario. Para amplificar una región del promotor de *BMP15* de 554pb comprendida entre -555pb hasta -1pb (ENST00000252677) se diseñaron secuencias de oligonucleótidos con el programa Primer 3 que incluían en sus extremos secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción KpnI y XhoI presentes en el sitio de clonaje múltiple (*polylinker*) del vector pGL4.22[luc2CP/Puro] para realizar posteriormente la

inserción del fragmento Tabla 2. Los fragmentos con la letra C o G en la posición -9 se obtuvieron utilizando el primer reverse que contenía la letra C o G en dicha posición.

Tabla 2 Primers de amplificación del promotor de *BMP15*.

GEN	SECUENCIA DEL PRIMER	
Promotor de <i>BMP15</i> (554pb)	Forward- HuBMP15PrF-KpnI	5'CGCGGGGTACCTGGTTCAGACCCAGGAGTCTACATT3'
	Reverse- HuBMP15 PrR-XhoI	5'CGCGGCTCGAGCTTGAAAGCCTTAGTGTTCACAACAGG3' 5'CGCGGCTCGAGCTTGAAAGCCTTAGTGTTCACAACAGG3'

El fragmento del promotor objeto fue amplificado mediante la reacción de PCR con un volumen final de mezcla de 25µl, 100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer. Las siguientes especificaciones fueron usadas para la reacción de PCR. Tabla 3.

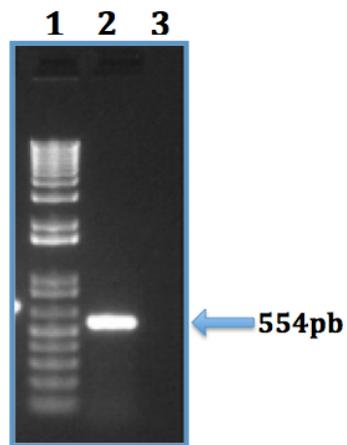
Tabla 3 Programa de PCR para el fragmento del promotor de *BMP15*.

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	63°C	40 segundos
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

La amplificación se comprobó en un gel de electroforesis con agarosa al 1% en un buffer TBE 1X. Se comparó el tamaño del fragmento amplificado con el de un patrón de peso molecular (1kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen). Figura 3.

Para la purificación del ADN amplificado por PCR se realizó un gel preparativo de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio seguido de electroforesis de 100µL del producto amplificado (4 tubos de reacción de PCR de 25µL cada uno) a 120V por una hora y veinte minutos. La banda fue posteriormente extraída y purificada usando el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

Figura 3 Amplificación del promotor de *BMP15*



La flecha señala el fragmento amplificado de 554pb. (1) Marcador de peso molecular. (2) Fragmento de 554pb. (3) Blanco.

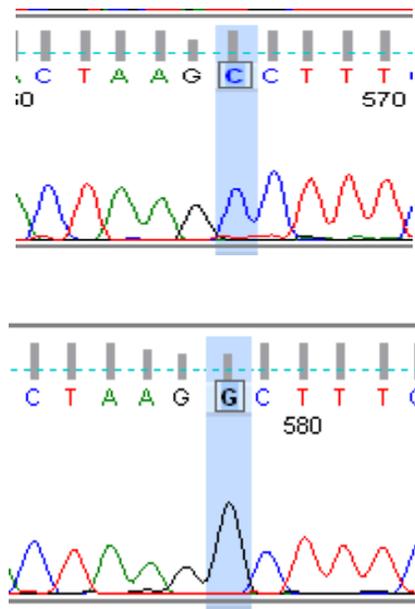


Figura 4. Electroforetograma que corresponde a la secuenciación del fragmento del promotr de BMP15 con la letra C o G en la posición -9.

Digestión

El producto de extracción de banda obtenido con los sitios de restricción tanto en 5' como en 3' se sometieron a un proceso de digestión con las enzimas de restricción elegidas según la región de clonaje múltiple de pGL4: En el Buffer 1.1 (*CutSmart BioLabs*) la enzima KpnI funciona al 100% mientras que en el mismo Buffer la enzima XhoI funciona al 75% (*Biolabs*: www.neb.com). Por esta razón, para efectuar una digestión doble (digestión simultanea con dos enzimas) se agregó el doble de XhoI (1 μ L=20U) en relación con KpnI (1 μ L=10U), dado que sus concentraciones son de 20U/ μ L y 10U/ μ L respectivamente.

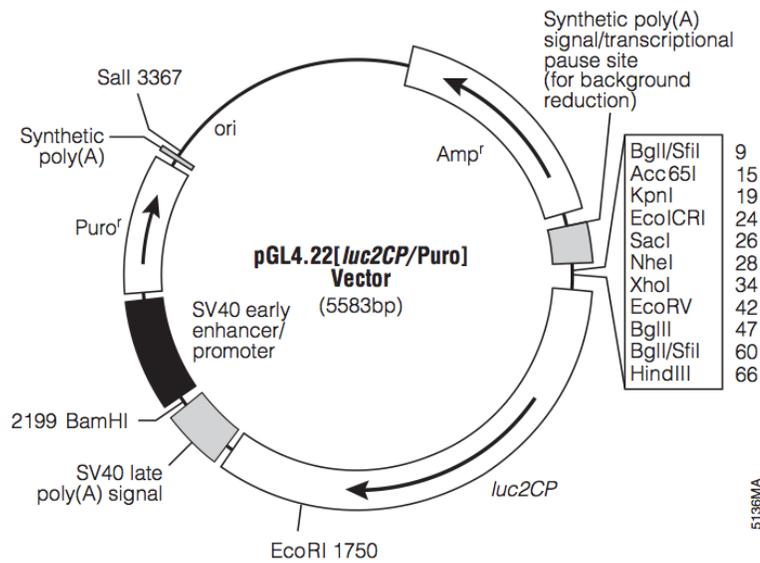
En la reacción de digestión del fragmento del promotor de *BMP15* se adicionaron 100ng del producto de extracción de banda, 0.2 μ L de BSA (100X) como coadyuvante de la reacción, 2 μ L de Buffer 1.1 (10X), 1 μ L de KpnI (10U), 1 μ L de XhoI (20U) y agua para completar un volumen final de reacción de 20 μ L. Esta reacción se realizó con las mismas

cantidades en dos tubos por separado para completar 40µL de producto de digestión. Los dos tubos se incubaron a 37°C por 4 horas. El producto final de digestión (40µL) se pasó por un gel preparativo de agarosa (1%) y posteriormente se realizó la extracción de las bandas con el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

Vector pGL4.22[luc2CP/Puro]

pGL4.22[luc2CP/Puro], 5583pb (Promega): Vector de expresión optimizado para la expresión en células de mamífero (www.promega.com/protocols). Contiene el gen reportero de la lucifereasa de luciérnaga Luc2CP (*Photinus pyralis*) que permite la monitorización de la actividad transcripcional en las células eucariotas transfectadas. Posee el origen de replicación del virus SV40 (Simian Vacuolating virus 40) para la replicación del ADN en células COS y un gen de resistencia a la Puromicina (Puro) y a la Ampicilina (Ampr) para la selección de bacterias transformadas. Figura 5. Carece de secuencias promotoras inmediatamente antes del gen de la luciferasa permitiendo el clonaje del promotor de interés en la región de clonaje múltiple. Fue diseñado con un menor número de secuencias de unión a factores de transcripción que el pGL3 de anterior generación para disminuir el riesgo de transcripción anómala. Así mismo, contiene dos secuencias de señalización (hCL1-hPEST) específicas para ubiquitinación y degradación de la proteína lucifereasa haciendo que la vida media de esta proteína sea menor evitando actividades transcripcionales falsas (www.promega.com/protocols). En este vector se clonó el fragmento de 554pb del promotor de *BMP15* obtenido en el punto 5.2.1.

Figura 5. Mapa del vector pGL4.22[luc2CP/Puro] (Promega).



El vector pGL4.22[luc2CP/Puro] donado por la Dra. Margarita Arango de Laboratory of Molecular Neurosurgery, Department of Neurological Surgery, Weill Cornell Medical College, New York fue eluido en 30µL de buffer TE 1X.

Transformación y digestión

La transformación bacteriana es el proceso mediante el cual se introduce ADN exógeno en estos organismos (Chen and Dubnau, 2004). La transformación de las bacterias con los plásmidos se utiliza para la obtención, luego de purificación, de mayor cantidad de ADN circular. Debido a esto, el plásmido debe contener un origen de replicación que permite su multiplicación en la célula huésped independientemente del cromosoma de la bacteria. Para la transformación del vector eluido, un vial de células de *Escherichia coli* quimio competentes (células capaces de adquirir una molécula de ADN) *One Shot® TOP10 Competent Cells* (Invitrogen) fue sumergido en hielo por 5 minutos. Se añadieron 2µL del vector en 25µL de baterias y se incubó 30 minutos en hielo. Posteriormente se aplicó un

choque térmico a 42°C en un baño serológico por 30 segundos y luego se conservó en hielo por 2 minutos. Se adicionó S.O.C. 125µL (medio revitalizante) y se incubó a 37°C en agitación horizontal (a 300 r.p.m) durante una hora. Se sembraron 50µL y 100µL en placas de LB agar con Ampicilina (previamente incubadas a 37°C) y se incubaron a 37°C toda la noche. Teóricamente, las colonias que crecieron en el medio sólido con Ampicilina corresponden a las células transformadas por el vector. Estas colonias fueron extraídas y añadidas en 5 ml LB Broth con Ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C a 245 rpm. Se extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* y se procedió a la realización de una PCR de verificación con los primers RV (forward) y GL2 (reverse) para comprobación de la identidad del vector y que se encontrara vacío Tabla 4 y Tabla 5.

Tabla 4. Primers de amplificación del vector PGL4.22[luc2CP/Puro]

SECUENCIA DEL PRIMER	
Primer RV(Forward)	5´ CTAGCAAATAGGCTGTCCC 3´
Primer GL (Reverse)	5´ CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA 3´

Tabla 5 Programa de PCR para amplificación del vector PGL4.22[luc2CP/Puro]

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	25 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

El vector PGL4.22[luc2CP/Puro] obtenido en las midipreps se sometió a la reacción de digestión con las mismas condiciones especificadas en el punto 5.2.1 para el fragmento del promotor de *BMP15*. 40µL del producto de digestión se llevaron a un gel preparativo para su posterior extracción de banda con el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

Ligación

Para la ligación del inserto (fragmento de 554pb del promotor de *BMP15*) en el vector pGL4.22[luc2CP/Puro] linearizado previamente, se usó una T4 ligasa de ADN (Invitrogen) siguiendo las condiciones especificadas en la Tabla 6. Mediante la siguiente fórmula se calculó la cantidad de inserto necesario para la reacción de ligación:

$$\text{ng de inserto} = (\text{ng del vector} \times \text{Kb del inserto}) / \text{Kb del vector} \times 3$$

Para la transformación se añadieron 3µL del producto de ligación en 25µL de células de *Escherichia coli* quimio competentes *One Shot® TOP10 Competent Cells* (Invitrogen) según las condiciones descritas en el punto 5.2.1. Las colonias que crecieron en el medio sólido con Ampicilina fueron extraídas y añadidas en 5 ml LB Base con Ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C

Tabla 6 Condiciones de la reacción de ligación del fragmento del promotor de *BMP15* con la letra C o G en la posición -9 en el vector pGL4.

Condiciones de la reacción de ligación	
Buffer T4 ligasa (1X)	2µL
Relación molar Vector: Inserto	1:3
Inserto (40ng/µL)	0.6µL
Vector (65ng/µL)	1.5µL
T4 DNA ligasa (1U/µL)	2µL
Agua	13.9µL
Incubación toda la noche	16°C

Comprobación de la ligación

Se extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* y se procedió a la realización de una PCR de verificación con un primer forward flanqueante a la región insertada del vector pGL4 (RV) y un primer reverse del fragmento de *BMP15* con un volumen final de mezcla de 25µl, 100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer. Tabla 7.

Tabla 7 Programa de PCR para la verificación de los clones positivos

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	25 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	30 segundos
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

Las construcciones plasmídicas denominadas BMP15-prom-C y BMP15-prom-G fueron enviadas a secuenciación con primers internos y sobre el vector con el objetivo de verificar que no existiera ninguna mutación inducida por la polimerasa en la reacción de PCR y además para comprobar la existencia del nucleótido C o G en la posición -9. Se realizó un alineamiento comparando las secuencias nucleotídicas de las construcciones plasmídicas con la secuencia *wild type* del promotor de *BMP15* empleando el programa informático Clustal W. A continuación y una vez comprobado que el inserto se clonó adecuadamente en el vector se realizaron midipreps empleando el kit *PureLink® HiPure Plasmid Filter* y se conservaron a -20°C.

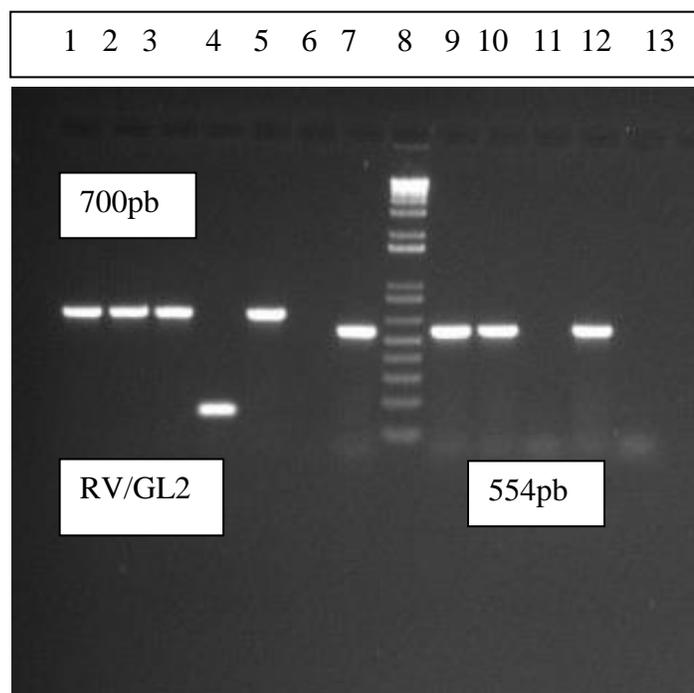


Figura 6. PCR de verificación de los clones positivos. Carril 1,2,3 y 5: fragmentos que corresponden a la amplificación de BMP15 con primers sobre vector. Carril 6: blanco. Carril 7, 9, 10 y 12: fragmentos que corresponden a la amplificación de BMP15 con primers sobre el fragmento. Carril 8: marcador de peso molecular. Carril 13 : blanco.

5.2.2 Construcción pcDNA3.1- *PITX1*

La región codificante completa del gen *PITX1* humano clonado en el vector pCMV6-XL5 (Origene) fue amablemente cedido por la Doctora Christina Gurnett (*Washington University*) (Gurnett, et al., 2008). El vector pCMV6-XL5 (Origene) fue usado como matriz de subclonaje de la región codificante de *PITX1* en el vector pcDNATM3.1(+) (Invitrogen). Se realizó un proceso de elusión del vector (del papel de filtro *FTA de Whatman*) sumergiéndolo en 30 μ L de buffer TE 1X por 3 horas a temperatura ambiente. 2 μ L de la elusión fueron transformados (según el protocolo nombrado en el punto 5.2.1) en 12.5 μ L de bacterias y los clones positivos fueron cultivados en 5ml de LB Broth con Ampicilina toda la noche a 37°C en agitación a 245rpm. Se efectuó miniprep con el protocolo *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* y con el producto se procedió a la realización de una PCR con *primers* específicos del vector (v1.5 y XL39) Tabla 8, un volumen final de mezcla de 25 μ L,

100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer Tabla 9. Se procedió a la secuenciación con los mismos primers de amplificación en la que se encontró la variante c.896G>C (p.Gly299Ala) (rs479632) que ha demostrado una frecuencia alélica del alelo C del 68% y del alelo G de 32% en la población mundial (<http://www.ensembl.org/>).

Tabla 8 Primers de amplificación de *PITXI*

SECUENCIA DEL PRIMER	
pCMV6-XL5-V1.5F	5' GGACTTTCCAAAATGTCG 3'
pCMV6-XL5-XL39R	5' GGGTGGTCGGAACAGGATTA 3'

Tabla 9 Programa de PCR para la amplificación de *PITXI*

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	25 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	30 segundos
Elongación	72°C	1 minuto
Elongación final	72°C	10 minutos

Posterior a esto, se realizó una PCR de la región codificante de *PITXI* sobre el vector con dos primers diseñados por Primer3 que incluían en sus extremos secuencias de reconocimiento para dos enzimas de restricción (KpnI y EcoRI) presentes en el sitio de clonaje múltiple del vector pcDNA™3.1(+) Tabla 10. Un volumen final de mezcla de 25µl, 100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer con las condiciones especificadas en la Tabla 11. 100µl del producto de esta PCR (4 tubos de reacción cada uno de 25µl) son llevados a electroforesis en un gel preparativo de agarosa al

1% y posteriormente extraídos con el kit *The PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

Tabla 10 Primers para la amplificación de *PITX1* con sitios de restricción

SECUENCIA DEL PRIMER	
hPTX1alpha1KpnI (Forward)	5'cgcggGGTACCGCCGCCACCATGGACGCCTTCAAGGGGGGCATG3'
hPTX1-OM1EcoRI (Reverse)	5'cgccgGAATTCTCAGCTGTTGTACTGGCACGCGTTGA 3'

Tabla 11 Programa de PCR para la amplificación de *PITX1* con sitios de restricción

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos		35 ciclos
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos
Elongación	72°C	1 minuto
Elongación final	72°C	10 minutos

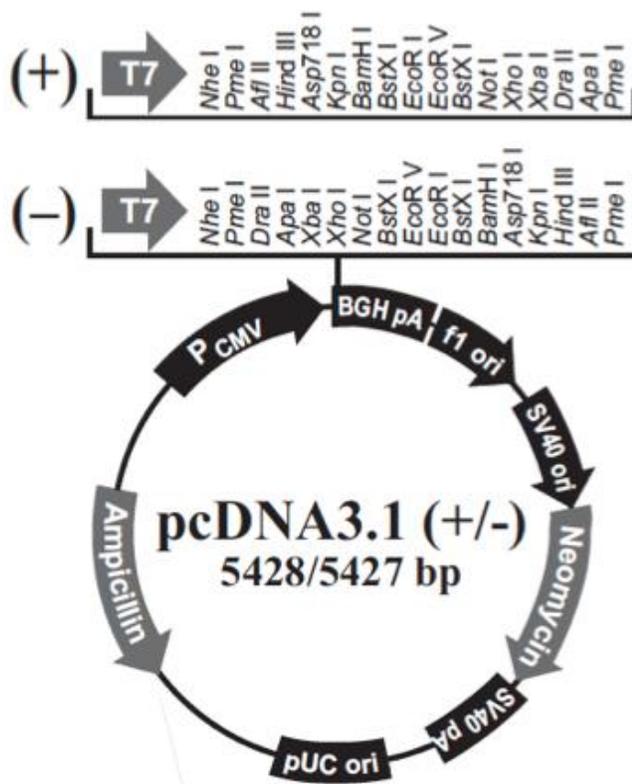
A continuación se efectuó la digestión simultánea con las enzimas KpnI y EcoRI del fragmento de *PITX1* extraído de banda. Estas enzimas actúan al 75% y 100% respectivamente en el buffer 2.1. Para efectuar una digestión doble se agregó el doble de KpnI (1µL=10U) en relación con EcoRI (1µL=20U). Para la digestión se adicionaron 100ng del producto de extracción de banda, 0.2µL de BSA (100X) como coadyuvante de la reacción, 2µL de Buffer 2.1 (10X), 2µL de KpnI, 0.5µL de EcoRI y agua para completar un volumen final de reacción de 20µL. Esta reacción se realizó con las mismas cantidades en dos tubos por separado para completar 40µL de producto de digestión. Los dos tubos se

incubaron a 37°C por 4 horas. El producto final de digestión (40µL) se pasó por un gel preparativo de agarosa (1%) y posteriormente se realizó la extracción de las bandas con el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

Vector pcDNATM3.1(+)

pcDNATM3.1(+), 5428 bp. (Invitrogen): Vector de expresión que contiene el *Enhancer-promotor* CMV y un sitio de clonaje múltiple en orientación *forward* (Figura 7). Usa el gen de resistencia a la Neomicina y a la Ampicilina como marcadores de selección. Este vector fue usado para clonar el marco abierto de lectura del gen *PITXI*.

Figura 7. Mapa del vector pcDNATM3.1(+)



El vector pcDNATM3.1(+), fue eluido en 30µL de buffer TE 1X para su posterior transformación en células de *Escherichia coli* quimio competentes *One Shot® TOP10*

Competent Cells (Invitrogen) siguiendo el protocolo empleado en el punto 5.2.1. Las colonias que crecieron fueron extraídas y añadidas en 5 ml LB Broth con Ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C a 245 rpm. Se extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* y se procedió a la realización de una PCR de verificación con los primers T7 (forward) y BGH (reverse) Tabla 12, para la comprobación de la identidad del vector y que se encontrara vacío. La reacción de PCR se realizó con un volumen final de mezcla de 25µl, 100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer con las condiciones especificadas en la Tabla 13.

Tabla 12 Primers para la amplificación del vector pcDNA3.1(+)

SECUENCIA DEL PRIMER	
T7 (Forward)	5´ GACTCACTATAGGG 3´
BGH (Reverse)	5´ CCTCGACTGTGCCTTCTA 3´

Tabla 13 Programa de PCR para la amplificación de pcDNA3.1(+)

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	25 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

Se realizaron midipreps del vector vacío pcDNA3.1(+) y se procedió a la digestión de la misma forma en que se realizó la del inserto de *PITX1*.

Luego de pasar 40µL del producto de digestión a un gel preparativo y hacer la extracción de banda con las condiciones descritas anteriormente se realizó la ligación de éste con el producto extraído de banda que se obtuvo de la digestión del fragmento de cDNA de *PITX1*. Para este propósito se empleó una T4 ligasa de ADN (Invitrogen) 2U, Buffer de T4 ligasa 1X, relación molar vector:inserto 1:3 y agua para completar un volumen total de 20µL. Mediante la fórmula especificada en el punto 5.2.1 se calculó la cantidad de inserto necesario para la reacción de ligación, la cual se incubó a 16°C durante toda la noche.

3µL del producto de ligación fueron transformados en células de *Escherichia coli* quimio competentes *One Shot® TOP10 Competent Cells* (Invitrogen) con las condiciones descritas anteriormente. Los clones positivos fueron cultivados en 5ml de LB Broth con Ampicilina en agitación a 245rpm durante toda la noche. Posteriormente se realizó la extracción del ADN plasmídico con el kit *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* y con el producto se procedió a la realización de una PCR de verificación del cDNA de *PITX1* en el vector pcDNA3.1. Los primers empleados para esta PCR fueron el T7 (forward) y BGH (reverse) con las condiciones especificadas en la Tabla 14, un volumen final de mezcla de 25µl, 100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer.

Tabla 14 PCR de amplificación del plásmido PITX1 en pcDNA3.1

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	25 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	1 minuto
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

La secuenciación fue hecha con los mismos primers de amplificación y se procedió a un alineamiento comparando las secuencias nucleotídicas de las construcciones plasmídicas con la secuencia *wild type* del cDNA de *PITXI* empleando el programa informático Clustal W. A continuación y una vez comprobado que el inserto se clonó adecuadamente en el vector se realizaron midipreps empleando el kit *PureLink® HiPure Plasmid Filter* que se conservaron a -20°C.

pRL Reporter Vector (*Renilla luciferasa plasmid*) (Promega)

Contiene el gen de la luciferasa de *Renilla* clonado originalmente de la especie marina *Renilla reniformis* (Lorenz, et al., 1991). La luciferasa de *Renilla* es una proteína monomérica que no requiere modificaciones post-traduccionales para su actividad (Matthews, et al., 1977), por lo tanto así como la luciferasa de luciérnaga, puede funcionar como reportero inmediatamente después de su traducción (www.lifetechnologies.com). Este vector se usó como control interno para la normalización de la eficiencia de la transfección.

5.3 Cultivos celulares, transfección y ensayo reportero de luciferasa

5.3.1 Línea celular COS-7

Las células COS (COS-1 y COS-7) derivan de una línea del mono verde africano *Cercopithecus aethiops* (CV1) transformada con un virus SV40 defectuoso que expresa el antígeno T, una proteína responsable de la producción del cáncer mediante la inducción de procesos neoplásicos (Gluzman, 1981; White, et al., 2014). Las células COS-7 semejan a los fibroblastos humanos y por esta razón son a menudo llamadas *COS-7 fibroblast-like*

cells. Este sistema celular no expresa endógenamente *PITX1* y proporciona todos los componentes necesarios para una rápida replicación de plásmidos que contienen el origen de replicación del virus SV40 (Van Doren and Gluzman, 1984).

Medio de cultivo

Las células COS-7 fueron cultivadas en frascos para cultivo celular de 75cm³ en el medio completo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 5000U/ml de penicilina, 5mg/ml estreptomina y 5% de CO₂ a 37°C. Cuando la confluencia fue del 100% se realizó la tripsinización: se retiró el medio DMEM y se lavó con 10 ml de PBS (buffer fosfato salino) 1X. Posteriormente se adicionaron 2ml de tripsina (Invitrogen) y se incubó por 10 minutos a 37°C. Una vez se logró la tripsinización se agregaron 5ml de medio completo.

Siembra celular

Para realizar el recuento celular necesario para la transfección se empleó la cámara de Neubauer. Se sembraron 120.000 células por pozo en cajas de 24 pozos, 24 horas antes de la transfección para conseguir un 70% de confluencia.

5.4 Transfección

La transfección se define como la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas para la transferencia, con el fin de producir modificaciones en la expresión génica (Felgner, et al., 1987; Kim and Eberwine, 2010). Un método de transfección ideal debe cumplir con cuatro propiedades básicas: alta eficiencia de transfección, baja toxicidad celular, fácil estandarización y

reproducibilidad (Kim and Eberwine, 2010). Entre las técnicas usadas actualmente existen varios métodos: biológicos como los virus, químicos como el fosfato de calcio y los lípidos catiónicos y físicos como la electroporación y la inyección directa (Kim and Eberwine, 2010). En la metodología de la presente tesis se transfectaron las células COS-7 con el lípido catiónico FuGENE6 *Transfection reagent* (Promega) como se describirá a continuación.

5.4.1 Eficiencia de la transfección

Con el fin de identificar las cantidades optimas del promotor de *BMP15 C* o *G* y de *PITX1* se realizó un experimento con escaleras de diferentes concentraciones de cada uno de estos: se co-transfectaron 250, 500 y 700 ng del promotor de *BMP15 G* y *C* con 50, 100 y 200ng de *PITX1* identificando que el valor mas adecuado para visualizar los efectos de la transactivación de *PITX1* sobre la variante del promotor de *BMP15* era con 500ng de éste y 50ng de *PITX1*.

Se ha sugerido que para una transfeccion exitosa de DNA la relación Fugene: DNA debe ser primero optimizada. Se realizaron transfecciones con cantidades de Fugene en μl y de ADN en ng en las siguientes realaciones: 4:1,6:1 y 3:1.

Para cada réplica del experimento (N=6) se calcula la cantidad de ADN, FuGENE y medio Optimem requerido para mantener la proporción elegida (3:1) y un volumen de siembra de 125 μl por pozo. El volumen de ADN por pozo es variable y depende de las concentraciones que se hayan obtenido de las Midipreps.

5.4.2 Co-transfección de los constructos BMP15-prom-C o BMP15-prom-G con pcDNA-PITX1.

Las células COS-7 fueron co-transfectadas con 500ng de los constructos BMP15-prom-C o BMP15-prom-G, 50 ng del constructo pcDNA-PITX1-WT y 30 ng por pozo del plásmido con la luciferasa de Renilla. Simultáneamente se co-transfectaron diferentes controles: pGL4-vacío/pcDNA3.1-PITX1, pGL4-BMP15-prom-C/pcDNA-vacío, pGL4-BMP15-prom-G/pcDNA-vacío y células no transfectadas.

Protocolo de transfección

1. Se sembraron 120.000 células por pozo en cajas de 24 pozos, 24 horas antes de la transfección para conseguir un 70% de confluencia. Cada pozo tiene en total 1000µl de medio más células por pozo.
2. En el momento de la transfección se adicionó el medio OptiMEM y el FuGENE a cada tubo eppendorf (según su volumen calculado para el numero de experimentos) y esta mezcla se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos.
3. Posteriormente se añadió el volumen de ADN calculado para la co-transfección y el plásmido de Renilla. Esta mezcla se deja en incubación a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir la formación del complejo entre el lípido catiónico y el ADN.
4. De manera simultanea con el paso anterior se retira el medio DMEM de cada pozo de células y se reemplaza por 600µl OptiMEM libre de SFB y antibiótico.

5. Por ultimo, se siembran 125µl de la mezcla de transfección en cada pozo, se agita de manera suave y se incuba a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 horas para permitir la expresión de las proteínas.

48 horas después de la transfección se extrajo el medio OptiMEM y se realizó el lavado de cada uno de los pozos con PBS 1X. Se añadieron 100µl del buffer de lisis 1X a cada pozo y a continuación se llevó a agitación a 200 rpm a temperatura ambiente por una hora. Los lisados celulares fueron recuperados por medio de desprendimiento manual y se depositaron en tubos eppendorf de 1.5ml. La actividad transcripcional del promotor con la letra C o G en la posición -9 fue evaluada con el protocolo *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (DLR) (Promega, *Madison, WI, USA*). 100µl del reactivo de ensayo de luciferasa II (LAR II) fueron añadidos a 20µl de lisado celular y se realizó la lectura en un luminómetro GloMax® 20/20. Se adicionaron 100µl del reactivo de Renilla *Stop & Glo® Reagent* y se realizó la lectura en el luminómetro. Los resultados fueron reportados en unidades relativas de luciferasa (Jones, et al.) y la significancia estadística fue estimada con la prueba t-Student.

5.5 Co-expresión de *BMP15* y *PITX1* en oocitos humanos y ovario de ratón

5.5.1 Extracción de mRNA de oocitos humanos

Mujeres sanas con ciclos menstruales regulares, atendidas en el Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES Bogotá, Colombia) realizaron la donación de cuatro oocitos humanos previo consentimiento informado. Luego de una leve estimulación ovárica, los oocitos en metafase II extraídos de los folículos por aspiración, aparecen como un complejo oocito-cúmulo que tiene sus células débilmente unidas entre sí y radialmente

expandidas formando una zona más densa denominada corona alrededor de la zona pelúcida. Para separar el oocito del cúmulo y de la corona radiada se usó la enzima hialuronidasa (*Hyase-10X, Vitrolife, Inc, San Diego, CA, USA*). Cada oocito fue recolectado y almacenado en 150µl del reactivo Trizol a -80°C (*Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA*). Para la extracción del mRNA de los oocitos humanos se usó el mini kit de *Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY, USA)*.

1. Los oocitos inmersos en Trizol se homogenizan mediante el uso de vortex.
2. Incubar la muestra homogenizada por 5 mins a 30°C.
3. Adicionar 0.2ml de cloroformo por cada ml de trizol y mezclar por inversión durante 15 seg. Se incuba a 15 °C por 2-3 mins.
4. Centrifugar a 12000g por 5 min a 4°C.
5. Pasar la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 1.5 ml y añadir alcohol isopropílico 0.5 ml /ml de trizol en que estaba conservada la muestra.
6. Incubar por 10 mins a 15-30°C y centrifugar a 12000g por 10mins a 4°C.
7. Remover el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 75% (1ml de etanol por c/ml de trizol inicial).
8. Centrifugar a no mas de 7500g por 5 mins a 4°C. Dscartar el sobrenadante y dejar secar al aire 5- 10 mins (no completamente).
9. Resuspender en agua esteril e incubar por 10 mins a 55-60°C.
10. Cuantificar mediante espectrofotometría en nanodrop 2000.
11. El mARN extraido se conservó a -80°C.

5.5.2 Síntesis de cDNA mediante RT-PCR

El cDNA se sintetizó a partir del mRNA extraído en el punto anterior, empleando la transcriptasa reversa del kit *SuperScript*® *III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*. Mezclar 1000 ng del RNA total con 1µl de primer OligoDT (50 µM), 1µl de Mix de dNTP (10mM) y agua para completar un volumen final de 10µl.

1. Incubar a 65°C durante 5 minutos y colocar en hielo durante 1 minuto.
2. Preparar la mezcla de síntesis de cDNA adicionando 2µl de Buffer 10X, 4µl de MgCl₂ 25 mM, 2µl de DTT 0.1 M, 1µl de RNasa Out, 1µl de SuperSript II RT (200 U/µl).
3. Mezclar 10µl de la mezcla del paso 1, más 10µl de la mezcla de síntesis de cDNA e incubar 50 minutos a 50°C.
4. Incubar a 85°C durante 5 minutos e incubar en hielo.
5. Añadir 1µl de RNasa H e incubar a 37°C durante 20 minutos.
6. Conservar a -30°C.

5.5.3 Amplificación por RT-PCR de *PITX1* en oocitos humanos

Para amplificar el cDNA de *PITX1* humano se diseñaron secuencias de oligonucleótidos por el programa Primer3 localizados en exones contiguos con condiciones específicas de PCR (Tabla 15 y Tabla 16). La PCR se realizó con un volumen final de mezcla de 25µl, 100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer.

Tabla 15 Primers de amplificación de cDNA de PITX1

GEN	SECUENCIA DEL PRIMER	
PITX1	hPITX1-seq1F	5'-GAGGGAGGAGATCGCCGTGTGGACC-3'
	hPITX1-seq1R	5- GCCGGCGGGGTACACGTCCTCGTAG-3'

Tabla 16 Programa de PCR para la amplificación de cDNA de PITX1

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	63°C	1.20 minutos
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

El amplicon fue secuenciado con los mismos primers de amplificación y comparados con las secuencias *wild type* mediante el programa Clustal W (*PITX1*: ENSG00000069011).

5.5.4 Extracción de mRNA y obtención de cDNA de ovarios de ratón adulto

Nueve ratones hembra BALB/c de 8 semanas, obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud fueron sometidas a la disección completa de sus ovarios. Los ovarios extraídos se almacenaron en 1ml de Trizol y conservados a -80°C. Para la extracción del mRNA de los ovarios de ratón se empleó el mini kit de *Invitrogen Life Technologies (Grand Island, NY, USA)* de la misma forma descrita en el punto 13.1. La síntesis de cDNA se realizó a partir del mRNA empleando la transcriptasa reversa del kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* con las mismas condiciones descritas en el punto 13.2.

5.5.5 Amplificación por RT-PCR de *Pitx1* de ovarios de ratón adulto

El cDNA de *Pitx1* de ovario de ratón fue amplificado usando primers diseñados por primer3 (Tabla 17). Las condiciones de PCR se especifican en la Tabla 18 con un volumen

final de mezcla de 25µl, 100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer.

Tabla 17 Primers de amplificación de cDNA de *Pitx1*

GEN	SECUENCIA DEL PRIMER	
PITX1	mPTX1alpha1	5'- ATGGACGCCTTCAAGGGGGGCATG -3'
	mPTX1-OM1	5- TCAGCTGTTGTACTGGCACGCGTTGA -3'

Tabla 18 Programa de PCR para la amplificación de cDNA de *Pitx1*

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	63°C	1.20 minutos
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

El amplicon fue secuenciado con los mismos primers de amplificación y comparados con las secuencias *wild type* mediante el programa Clustal W (*Pitx1*: ENSMUSG00000021506).

5.5.6 Amplificación por RT-PCR de *BMP15* en oocitos humanos y ovarios de ratón

La amplificación *BMP15* en oocito de humano y ovario de ratón se realizó con primers localizados en los exones 2 y 3, diseñados por el programa Primer3 (Tabla 19) con las condiciones de PCR especificadas en la Tabla 20. La PCR se realizó con un volumen final de mezcla de 25µl, 100ng de ADN, 12.5µl de Master Mix (Promega) y 0.8µM de cada primer.

Tabla 19 Primers de amplificación de cDNA de *BMP15*

GEN	SECUENCIA DEL PRIMER	
BMP15	HuBMP15-S5RFHind	5´AAGCTTGCCCGCCACCATGGTCCTCCTCCG3´
	HuBMP15-S5RFNhe	5´GCTAGCGCCCGCCACCATGGTCCTCCTCCG3´

Tabla 20 Programa de PCR para la amplificación de cDNA de *BMP15*

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100@		TIEMPO
Desnaturalización Inicial	95°C	10 minutos
Numero de ciclos	35 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	61°C	1 minuto
Elongación	72°C	40 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

El producto de PCR fue secuenciado con los mismos primers de amplificación y comparados con las secuencias *wild type* mediante el programa Clustal W (*BMP15*: ENSG00000130385. *Bmp15*: ENSMUSG00000023279).

6. RESULTADOS

6.1 Análisis *in-silico* del promotor de *BMP15*

El análisis de la secuencia promotora de *BMP15* con el software MatInspector predijo 493 TFBS localizados 2Kb *upstream* del codón de iniciación ATG con una similitud de matriz >0.80 (la unión perfecta a la matriz se obtiene con una puntuación de 1) **Anexo 1**. Entre los factores de transcripción predichos, PITX1 potencialmente se une de manera exclusiva a la región 5'aacaCTAAgccttcaa-3' que incluye la posición -9 de interés (la secuencia central o *core* se muestra en letras mayúsculas y la letra subrayada corresponde a la posición -9). Para comprobar la conservación de la citosina en la posición -9 del promotor de *BMP15* se realizó un alineamiento múltiple de secuencia entre especies de mamíferos lo cual demostró una conservación estricta de ésta base en la posición -9. Figura 8.

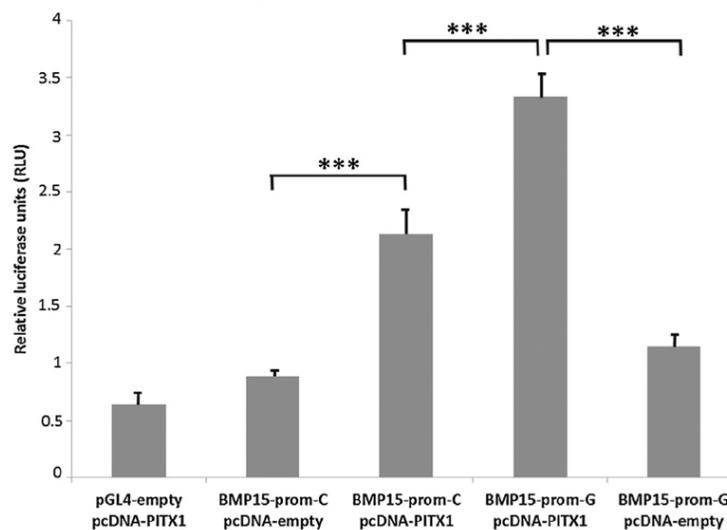
El ensayo reportero de luciferasa en células COS-7 en donde se usó el vector pGL4 con el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de BMP15 en dos versiones (BMP15-prom-C o BMP15-prom-G) y el factor de transcripción PITX1 demostró que este último es capaz de trans-activar tanto el alelo C como el alelo G. La actividad transcripcional de PITX1 cuando en la posición -9 del promotor está la letra G fue 1.6 veces más alta que la observada cuando se encuentra la letra C ($P = 1.4 \times 10^{-4}$). Figura 9.

Figura 8 Alineamiento múltiple de las secuencias del promotor de *BMP15* de especies de mamíferos vertebrados.

	-9	+1
<i>H. sapiens</i>	ACACTAAG C CCTTTCAAG ATG GGTCCTCCTCAGTA	
<i>P. troglodytes</i>	ACACTAAG C CCTTTCAAG ATG GGCCTCCTCAGTA	
<i>P. abelii</i>	ACACTAAG C CCTTTCAAG ATG GGTCCTCCTCAGTA	
<i>M. mulata</i>	ACACTAAG C CCTTTCAAG ATG GGTCCTCCGCAGTA	
<i>O. aries</i>	ACACCAAG C TTTTCAAG ATG GGTCCTCCTGAGCA	
<i>B. taurus</i>	ACACCAAG C TTTTCAAG ATG GGTCCTTCTGAGCA	
<i>C. lupus familiaris</i>	ACACCAC C TTTTGAG ATG GGTCCTCCTCAGCA	
<i>T. truncatus</i>	ACACCAAG C CCTTTCAAG ATG GGTCCTCCTGAGCA	
<i>O. cuniculus</i>	ATACCCG A CCTTGCAAG ATG GGCCCTCCTCAGCA	
<i>R. norvegicus</i>	GCACCAAG C TTTGCAAG ATG GGCCCTTCTCACAA	
<i>M. musculus</i>	GCACCAAG C TTTGCAAG ATG GGCCCTTCTCACAA	

La adenina del primer codon ATG (metionina) fue considerado como +1. La posición -9C se encuentra resaltada en gris.

Figura 9. Activación del promotor de *BMP15*-9C/G por PITX1

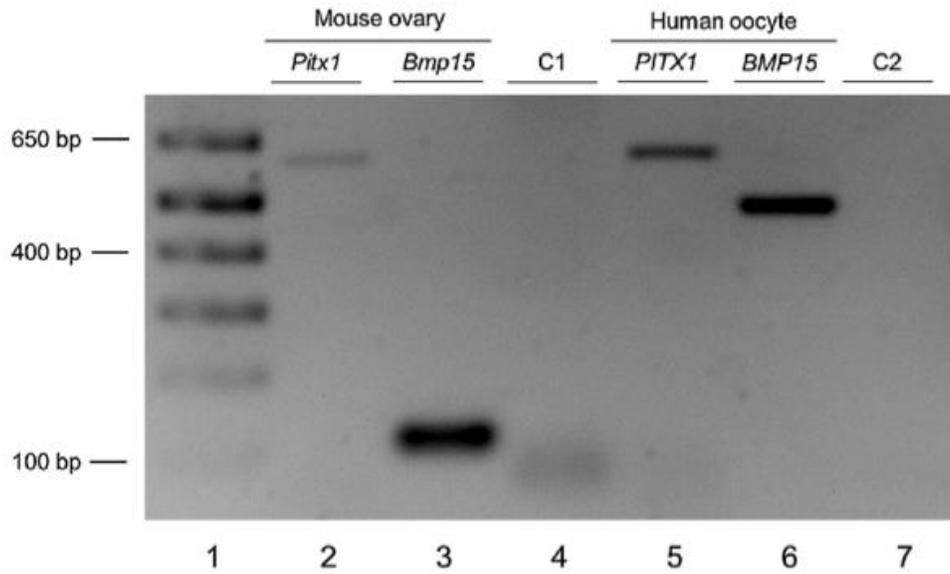


El ensayo reportero de luciferasa mostró la capacidad de transactivación de PITX1 sobre el promotor de *BMP15* con los alelos C o G. Se observa una significancia estadística en el aumento de la actividad transcripcional de PITX1 con el constructo BMP15-prom-G con respecto a la observada con el constructo BMP15-prom-C (valor de $p < 0.01$).

6.2 Co-expresión de *BMP15* y *PITX1* en oocitos y en ovarios de ratón

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa demostró que *BMP15* y *PITX1* son co-expresados en oocitos de humanos adultos así como en ovarios de ratón adulto. Figura 10. Se realizó la secuenciación directa de los amplicones de *BMP15* y *PITX1* confirmando que estos correspondían a las secuencias de cDNA *wild type* de estos genes.

Figura 10. Co-expresión de *BMP15* y *PITX1* en oocito de humano y ovario de ratón



Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: expresión de *Pitx1* en ovario de ratón. Carril 3: Expresión de *Bmp15* en ovario de ratón. Carril 4: control negativo de *Pitx1* (C1). Carril 5: expresión de *PITX1* en oocito de humano. Carril 6: expresión de *BMP15* en oocito de humano. Carril 7: control negativo de *PITX1*.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue la búsqueda de un factor de transcripción específico que se uniera a la región promotora de *BMP15* a través de una secuencia que incluyera la posición -9G. Para lograr este propósito existen técnicas tanto experimentales como bioinformáticas que caracterizan y predicen las uniones ADN-proteína. Se han desarrollado tecnologías *in vitro* e *in vivo* que permiten este análisis a mayor escala y que están enfocadas en la identificación de la proteína y/o de la secuencia de unión al ADN (Helwa and Hoheisel, 2010). El ensayo de EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) es un ejemplo clásico que se fundamenta en la premisa que la velocidad de movilidad electroforética de un complejo de ácido nucleico y de proteína es menor que el de el ADN libre (Hellman and Fried, 2007). A pesar de que la técnica es ampliamente usada para detectar interacciones ADN-proteína presenta diferentes limitaciones entre las que se incluyen la poca información que aporta acerca de las secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la unión (Hellman and Fried, 2007; Helwa and Hoheisel, 2010). La inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en combinación con técnicas de secuenciación de siguiente generación (ChIP on ChIP) ha permitido la identificación de sitios de unión a factores de transcripción (TFBS) en un contexto controlado por el empaquetamiento del ADN en la cromatina del núcleo celular (Hoffman and Jones, 2009; Massie and Mills, 2008). La ChIP involucra el entrecruzamiento del ADN a las proteínas con formaldehído para fijar los factores de transcripción a sus sitios de unión en el genoma. La cromatina es luego fragmentada y anticuerpos específicos son empleados para inmunoprecipitar los factores de transcripción unidos a los fragmentos de ADN. Las secuencias específicas de ADN, también inmunoprecipitadas, son posteriormente amplificadas por PCR y

secuenciadas (Hoffman and Jones, 2009). Otras técnicas emplean oligonucleótidos de cadena sencilla de ADN o ARN con una estructura tridimensional específica que les permite unirse con alta afinidad a una molécula diana (Oliphant, et al., 1989). Las metodologías *in vivo* incluyen el sistema de mono-híbrido en la levadura (Y1H) la cual provee un alto rendimiento para la identificación de interacciones entre un “DNA bait” (p.ej. elementos regulatorios en *cis* o promotores génicos) y una “proteína pray” (p.ej. factores de transcripción) (Deplancke (Deplancke, et al., 2006).

En contraste con estas técnicas, las herramientas *in silico* predicen TFBS (sitios de unión a factores de transcripción) teniendo en cuenta grandes regiones genómicas y numerosos factores de transcripción simultáneamente (Segal, et al., 2008). Diferentes herramientas computacionales emplean programación que se basa en matrices de peso posicional (PMWs: *Positional Weight Matrices*) permitiendo el análisis rápido de la regiones promotoras con resultados concisos y con el menor número de falsos positivos (Stormo, 2000). El concepto de PMWs se desarrolló en la década de 1980 y MatInspector fue uno de los primeros programas en ofrecer una extensa librería de 214 matrices de peso posicional (Quandt, et al., 1995). La construcción de una PMWs usa las secuencias de sitios de unión conocidas para un factor de transcripción en grandes bases de datos (TRANSFAC 4.0 y JASPAR) y calcula las frecuencias de nucleótidos en cada posición (Cartharius, et al., 2005). La probabilidad calculada a partir de las frecuencias permite la creación de la matriz para más adelante ser comparada con la región promotora de interés. Se reportan los sitios de unión con un puntaje mayor al mínimo puntaje posible para cada PMW (Quandt, et al., 1995). Las matrices en la biblioteca MatInspector se derivan de publicaciones individuales

con una lista de sitios de unión a factores de transcripción o varios artículos en los que se publican sitios de unión individuales (Cartharius, et al., 2005). Escogimos la librería de matrices de MatInspector del programa Genomatix debido a que esta diseñada para representar el mejor conocimiento actual en términos de sensibilidad y de especificidad. A través de la actividad del gen reportero de la lucifereasa-Luc logramos comprobar que el TFBS para PITX1 predicho por MatInspector es funcional. El *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (DLR) de Promega combina las actividades de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) y de la renilla (*Renilla reniformis*) midiéndolas secuencialmente a partir de una sola muestra (Sherf, et al., 1996). La actividad del reportero “experimental” se correlaciona con el efecto de las condiciones experimentales específicas (la respuesta de un promotor como resultado de la unión a un factor de transcripción) mientras que la actividad del reportero “control” provee un control interno que permite la normalización de la eficacia de la transfección (Sherf, et al., 1996) (*Technical Manual Dual-Luciferase®Reporter Assay System Promega DLR*). Los ensayos de gen reportero bioluminiscente como el DLR tienen una clara ventaja sobre los ensayos reporteros fluorescentes como la proteína verde fluorescente (GFP) puesto que ofrecen 10 a 1000 veces mayor sensibilidad mejorando sustancialmente el rendimiento del ensayo (*Technical Manual Dual-Luciferase®Reporter Assay System Promega*). En consecuencia, la bioluminiscencia emitida por estas proteínas se puede medir en niveles cercanos a 10^{-20} moles (menos de 10.000 moléculas por muestra) y por esta razón resultados con diferencias sutiles pero significativos en la actividad de la luciferasa son susceptibles de medición mediante esta metodología. El DLR realizado en el presente estudio evidenció una

diferencia en la actividad de la luciferasa de 1,6 veces entre las construcciones del promotor BMP15-G y BMP15-C la cual logró ser determinada con el luminómetro GloMax® 20/20 ultrasensible. Este modelo empleado para la medición de la intensidad de luz emitida por las luciferasas de luciérnaga y de renilla (representada en unidades relativas de luciferasa, RLU) tiene una capacidad de detección de 5-6 órdenes de magnitud o 1×10^{-21} moles de luciferasa de luciérnaga. El aumento de la trans-activación del promotor con la construcción BMP15-G fue estadísticamente significativo y la metodología nombrada anteriormente ofreció una alta reproducibilidad de los resultados.

Hasta antes del inicio de este estudio *PITX1* era conocido por su expresión y amplia función regulatoria a nivel de la glándula hipófisis y no había sido implicado en la regulación de la transcripción en el ovario. La importancia de la co-expresión de *PITX1* y *BMP15* en el ovario se fundamentó en sustentar biológicamente el hallazgo de la transactivación del promotor de *BMP15* por *PITX1*. Para regular la expresión de *BMP15*, *PITX1* debía expresarse en el mismo tejido de su gen blanco y para esto se debía evidenciar la presencia de su mRNA en el tejido ovárico. Existen diversos métodos para realizar un análisis de expresión génica: Northern Blot, slot/dot blot, ensayos de protección de RNasa, la hibridación *in situ*, la RT-PCR y la PCR cuantitativa. La técnica Northern blot (Alwine et al. 1977; Thomas, 1980) es poco sensible dado que requiere cantidades de 5 a 10 μg de ARN para producir una señal. Además precisa del uso de sondas con marcaje radioactivo (que es detectado por autoradiografía) o con haptenos (detectado directa o indirectamente por inmunocitoquímica). Otro método utilizado para el análisis de ARN es el slot/dot blot descrito por Kafasos et al. en 1979. Esta técnica al igual que la anterior, utiliza una

estimación semi-cuantitativa de las cantidades de mARN presentes en la muestra pero su baja sensibilidad (1-10µg de ARN para producir señal) limita los resultados. El ensayo de protección de RNasa es más sensible que el Northern blot (100ng - 1 µg son requeridos para cada ensayo respectivamente). Sin embargo su principal desventaja es la digestión parcial con RNasas lo que resulta en productos inespecíficos, con señales incluso en el control de tARN. Una técnica más sensible para el análisis de mARN es la hibridación *in situ* (Dirks, et al., 1991) que aunque técnicamente laboriosa, es capaz de determinar perfiles de expresión temporal y espacial de mRNA dentro de una población celular o de un tejido específico. Mediante este método se pueden detectar 10 a 100 moléculas de mARN además de obtener su localización celular. La RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) es 1000 a 10000 veces más sensible que las técnicas de ARN blot. Como resultado de esta sensibilidad, esta metodología puede ser utilizada para analizar ARN en muy baja abundancia o en escasa cantidad celular (1 a 1000 células) y no requiere un alto grado de pureza del ARN (O'Driscoll et al. 1993; Gomella LG et al. 1997; Billinis et al 2001). La posibilidad de detectar con gran sensibilidad un mARN incluso aunque se trate de mensajeros con bajos niveles de transcripción representa una de las principales ventajas de esta técnica (Bustin, 2000). Además, la RT-PCR es superior en términos de facilidad, velocidad, sensibilidad y especificidad para el análisis de mRNA en comparación con las metodologías de hibridación *in situ*, ARN blot y ensayos de protección de RNasa (O'Driscoll, et al., 1993). Mediante RT-PCR logramos demostrar por primera vez la expresión de *PITXI* en el ovario de humano y de ratón.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Durante el presente trabajo de tesis evaluamos si el polimorfismo -9C>G podría modificar las propiedades de trans-activación de un factor de transcripción contribuyendo a la etiología molecular de la FOP. Para este fin empleamos herramientas bioinformáticas, moleculares e *in vitro* que demostraron que aunque los dos constructos del promotor de *BMP15* (BMP15- prom-G and BMP15-prom-C) eran activados por PITX1, el constructo BMP15- prom-G aumentó 1.6 veces la actividad transcripcional del factor de transcripción de una manera estadísticamente significativa. Una mayor cantidad de BMP15 producida por alelo G en el ovario, podría llevar a alteraciones en la tasa de proliferación las células de la granulosa además de una mayor reducción de la expresión del receptor de la FSH. Este efecto fue el observado en un ratón transgénico en el que se sobre-expresó la proteína BMP15 madura exclusivamente en los oocitos (McMahon et al., 2008). El ratón transgénico inmaduro (25 días de edad) exhibió una disminución significativa de los folículos primarios con un aumento concomitante en los folículos secundarios comparado con el ratón *wild type* (sin alteraciones en la reserva de los folículos primordiales o en la transición de folículo primordial a primario). Se demostró además que el índice mitótico de las células de la granulosa en el ratón transgénico era dos veces mayor que en el ratón *wild type*, indicando un desarrollo folicular acelerado que probablemente condujo a la atraesia folicular y al desarrollo de la menopausia prematura (McMahon et al., 2008). De la misma forma que en este modelo animal, el aumento de BMP15 en la especie humana podría acelerar el desarrollo folicular además de conducir a la disminución en la cantidad crítica de

receptores necesaria para que la FSH ejerza su función sobre las CG. La disminución en la sensibilidad a la FSH impediría el progreso del crecimiento del pequeño grupo de folículos reclutados en la fase folicular de cada ciclo menstrual conduciéndolos a su muerte por atresia antes de alcanzar el estadio pre-ovulatorio. Aun si se alcanzara la maduración de algunos folículos antes de su atresia, la selección del folículo dominante y su ovulación mediada por el segundo pico plasmático de la FSH probablemente no sería posible sin la cantidad suficiente de receptores disponibles.

Por otro lado, dado que en el presente estudio demostramos por primera vez que BMP15 y PITX1 son co-expresados en oocitos humanos adultos y en ovario de ratón adulto, otra hipótesis para explicar cómo la variante c.-9C>G podría contribuir a la patogénesis de la FOP se basa en los hallazgos recientes en los que los heterodímeros de GDF9:BMP15 son los ligandos más biopotentes en el ratón y en el humano comparados con los homodímeros (Peng et al 2013). Si asumimos que el alelo G conduce a un aumento en la producción de BMP15, habría una mayor biodisponibilidad de esta proteína para la formación de homodímeros BMP15:BMP15 los cuales en mayor concentración desplazarían de manera competitiva la actividad de los heterodímeros GDF9:BMP15. A diferencia del modelo anterior, en esta situación hipotética la función biológica de la proteína BMP15 no sería completa dada la ausencia de su acción sinérgica con GDF9. Como consecuencia, se observaría una probable detención en los estadios primarios de la foliculogénesis debida al descenso de la actividad de la proteína sobre las CG, las cuales tampoco disminuirían la expresión del receptor de la FSH. A nivel de la hipófisis la presencia de niveles elevados de BMP15 desencadenarían un incremento en la biosíntesis y la secreción de la FSH, cuyo

pico mensual ejercería su efecto sobre folículos detenidos en sus primeros estadios del desarrollo y serían incapaces de continuar su proceso de maduración.

Determinar las causas genéticas de las enfermedades complejas como la FOP implica la dificultad inherente a la naturaleza poligénica de estas patologías y a las tecnologías empleadas para su estudio. La fertilidad y la función reproductiva dependen de redes bioquímicas y fisiológicas bajo un control poligénico de múltiples cascadas moleculares en interacción que responden a través de mecanismos de retroalimentación para mantener la homeostasis (Matzuk and Burns, 2012; Matzuk, et al., 2002; Matzuk and Lamb, 2008). Como resultado, en el proceso de identificación de las bases genéticas de la FOP se han empleado las estrategias de análisis de gen candidato, los estudios de ligamiento en familias afectadas y los estudios de asociación del genoma completo (GWAS). Los GWAS se han empleado con el objetivo de encontrar *loci* susceptibles o genes candidatos de esta patología con resultados que frecuentemente carecen de significancia estadística ($p < 5 \times 10^{-8}$) (Kang, et al., 2008; Knauff, et al., 2009; Pyun, et al., 2012; Qin, et al., 2015). La falta de asociación en muchos de estos estudios es secundaria probablemente al tamaño pequeño de la muestra y a que los GWAS están basados en la hipótesis de que las enfermedades comunes están explicadas por variantes frecuentes (Qin, et al., 2015).

Puede considerarse que la heredabilidad perdida en las enfermedades complejas como la FOP y que los rasgos cuantitativos podrían estar determinados por una de tres causas: un gran número de variantes comunes con poco efecto (modelo infinitesimal), una gran cantidad de variantes raras con un gran efecto (modelo del alelo raro) o una combinación de interacciones genotípicas, ambientales y genéticas (modelo de heredabilidad en sentido

amplio) (Cirulli and Goldstein, 2010; Gibson, 2011; Laissue, 2015; Visscher, et al., 2012; Wray, et al., 2008). Aunque probablemente en la FOP como en otras enfermedades complejas las variantes raras podrían tener un efecto genético más contundente, las tres arquitecturas genéticas podrían contribuir en diferente grado al fenotipo.

Las técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS) ofrecen una oportunidad para el estudio de los modelos propuestos así como para el creciente abordaje investigativo de las regiones reguladoras del genoma. Gracias al amplio uso de estas tecnologías a gran escala, se ha generado un crecimiento exponencial de las bases de datos de SNP (dbSNP) después del año 2007 (Ma, et al., 2015). Gran cantidad de las variantes patogénicas recolectadas por bases de datos como *Human Gene Mutation Database, HGMD* corresponden a SNPs codificantes (cSNPs: ~86%) y de splicing (sSNPs: ~10%) y solo un ~3% corresponden a variantes localizadas en regiones reguladoras (rSNPs) (Stenson, et al., 2009). En nuestro estudio determinamos por primera vez que una variante reguladora puede contribuir a la etiología de la FOP mediante la interrupción de la unión de factores de transcripción al promotor de un gen implicado en uno de los procesos críticos de la fertilidad (foliculogénesis).

9. PERSPECTIVAS

Con el objetivo de corroborar nuestros resultados en términos de expresión sería de utilidad analizar de manera cuantitativa la expresión de *BMP15* posterior al ensayo de transfección de las diferentes construcciones plasmídicas. Para conseguir estos objetivos se podrían emplear metodologías como la PCR en tiempo real o la PCR cuantitativa (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) combinada con RT-PCR. La q-PCR es un método

muy sensible para la detección de mRNA de baja cantidad y permite el análisis de diferentes muestras obtenidas hasta de una única célula en el mismo experimento con un amplio rango de cuantificación (hasta siete órdenes de magnitud) (Bustin, 2000). En la actualidad otras técnicas como la PCR digital (dPCR) posibilitan la cuantificación de una molécula única o de cantidades muy bajas de material genético con un rendimiento superior a otros métodos cuantitativos (Hudecova). Esta nueva herramienta experimental se fundamenta en la dilución, amplificación y detección de las moléculas de ADN mediante el uso de fluoróforos. Una de sus múltiples aplicaciones es el análisis de expresión génica (Pohl G et al. 2004). Las tecnologías de la dPCR basadas en microfluidos (chip) o emulsiones (*droplet*) ofrecen la posibilidad de realizar el análisis cuantitativo de ARN mediante la combinación RT-dPCR con escalas de partición de cientos de millones de nanolitros o incluso picolitros (*Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR*) (Huggett and Whale, 2013) lo que podría contribuir en la determinación de las diferencias mínimas de expresión en genes reguladores como *BMP15* en el tejido ovárico de pacientes con la variante en su promotor. En términos poblacionales estudios futuros de tamizaje de variantes de la región promotora de *BMP15* permitirían la identificación de nuevas variantes potencialmente patogénicas que podrían, al igual que c.-9C>G integrarse a una actitud diagnóstica para mujeres POF. Esta aproximación podría igualmente extenderse a otros fenotipos ováricos. Debe igualmente señalarse que el descubrimiento de la participación de *PITX1* en la función ovárica permite proponer la búsqueda de nuevos genes blancos directos de esta proteína que participen de la regulación de la fisiología gonadal femenina.

Por último, debe considerarse la secuenciación de regiones promotoras de genes implicados en la regulación de la biología ovárica como una herramienta para la identificación de nuevos factores moleculares etiológicos de la POF y de otras patologías.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R and others. 1999. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 84(8):2744-50.
- Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. 1999. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22(2):125-126.
- Aittomaki K. 1994. The genetics of XX gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet* 54(5):844-51.
- Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehvaslaiho H, Engel AR and others. 1995. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82(6):959-68.
- Al-Musawi SL, Walton KL, Heath D, Simpson CM, Harrison CA. 2013. Species Differences in the Expression and Activity of Bone Morphogenetic Protein 15. *Endocrinology* 154(2):888-899.
- Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, Charen K, He W, Taylor KC, Sherman SL. 2007. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod* 22(8):2142-52.
- Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P, Kotlar TJ, Huhtaniemi IT, Jameson JL, Cheetham TD, Ball SG. 2003. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotropic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum Reprod* 18(2):251-6.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A and others. 1999. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet* 83(4):322-5.
- Amato P, Roberts AC. 2001. Transient ovarian failure: a complication of uterine artery embolization. *Fertility and Sterility* 75(2):438-439.
- Anasti JN. 1998. Premature ovarian failure: an update. *Fertility and Sterility* 70(1):1-15.
- Anderson E, Albertini DF. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 71(2):680-6.
- Athanikar JN, Osborne TF. 1998. Specificity in cholesterol regulation of gene expression by coevolution of sterol regulatory DNA element and its binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9):4935-40.
- Bakalov VK, Anasti JN, Calis KA, Vanderhoof VH, Premkumar A, Chen S, Furmaniak J, Smith BR, Merino MJ, Nelson LM. 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.
- Bakker CE, de Diego Otero Y, Bontekoe C, Ragho P, Luteijn T, Hoogeveen AT, Oostra BA, Willemsen R. 2000. Immunocytochemical and Biochemical Characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the Mouse. *Experimental Cell Research* 258(1):162-170.

- Bashamboo A, McElreavey K. 2010. NR5A1/SF-1 and development and function of the ovary. *Ann Endocrinol (Paris)* 71(3):177-82.
- Bayne RA, Martins da Silva SJ, Anderson RA. 2004. Increased expression of the FIGLA transcription factor is associated with primordial follicle formation in the human fetal ovary. *Mol Hum Reprod* 10(6):373-81.
- Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, Milgrom E, Kuttenn F, Misrahi M. 1998. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 102(7):1352-9.
- Beerendonk CC, Braat DD. 2005. Present and future options for the preservation of fertility in female adolescents with cancer. *Endocr Dev* 8:166-75.
- Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Froster-Iskenius U and others. 1991. Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* 64(4):861-6.
- Beysen D, Raes J, Leroy BP, Lucassen A, Yates JR, Clayton-Smith J, Ilyina H, Brooks SS, Christin-Maitre S, Fellous M and others. 2005. Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. *Am J Hum Genet* 77(2):205-18.
- Bharath R, Unnikrishnan AG, Thampy MV, Anilkumar A, Nisha B, Praveen VP, Nair V, Jayakumar RV, Kumar H. 2010. Turner syndrome and its variants. *The Indian Journal of Pediatrics* 77(2):193-195.
- Bione S, Rizzolio F, Sala C, Ricotti R, Goegan M, Manzini MC, Battaglia R, Marozzi A, Vegetti W, Dalpra L and others. 2004. Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, DACH2 and POF1B. *Hum Reprod* 19(12):2759-66.
- Bodega B, Porta C, Crosignani PG, Ginelli E, Marozzi A. 2004. Mutations in the coding region of the FOXL2 gene are not a major cause of idiopathic premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 10(8):555-7.
- Bodin L, Pasquale ED, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P. 2007. A Novel Mutation in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Causing Defective Protein Secretion Is Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Lacaune Sheep. *Endocrinology* 148(1):393-400.
- Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, De Rooij DG, Cooke HJ. 2007. SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol* 176(6):741-7.
- Bolcun-Filas E, Hall E, Speed R, Taggart M, Grey C, de Massy B, Benavente R, Cooke HJ. 2009. Mutation of the mouse *Sycel* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet* 5(2):e1000393.
- Bosch AM, Ijlst L, Oostheim W, Mulders J, Bakker HD, Wijburg FA, Wanders RJA, Waterham HR. 2005. Identification of novel mutations in classical galactosemia. *Human Mutation* 25(5):502-502.
- 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.

- Bouilly J, Roucher-Boulez F, Gompel A, Bry-Gaillard H, Azibi K, Beldjord C, Dodé C, Bouligand J, Mantel AG, Hécart A-C and others. 2015. New NOBOX Mutations Identified in a Large Cohort of Women With Primary Ovarian Insufficiency Decrease KIT-L Expression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100(3):994-1001.
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J and others. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312(5773):596-600.
- Braw-Tal R, McNatty KP, Smith P, Heath DA, Hudson NL, Phillips DJ, McLeod BJ, Davis GH. 1993. Ovaries of ewes homozygous for the X-linked Inverdale gene (FecXI) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. *Biology of reproduction* 49(5):895-907.
- Bustin S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25(2):169-193.
- Byskov AG. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews* 66(1):71-117.
- Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, Garcia-Tunon I and others. 2014. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med* 370(10):943-9.
- Caburet S, Zavadakova P, Ben-Neriah Z, Bouhali K, Dipietromaria A, Charon C, Besse C, Laissue P, Chalifa-Caspi V, Christin-Maitre S and others. 2012. Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial Premature Ovarian Failure. *PLoS One* 7(3):e33412.
- Caixeta ES, Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG, Price CA, Machado MF, Lima PF, Buratini J. 2013. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 146(1):27-35.
- Calderon FRO, Phansalkar AR, Crockett DK, Miller M, Mao R. 2007. Mutation database for the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Human Mutation* 28(10):939-943.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21(13):2933-2942.
- Cerutti L, Simanis V. 2000. Controlling the end of the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 10(1):65-9.
- Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN. 2006. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 86(4):1009-1012.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23(6):787-823.
- Chen I, Dubnau D. 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Micro* 2(3):241-249.

- Christin-Maitre S, Vasseur C, Portnoi M-F, Bouchard P. 1998. Genes and premature ovarian failure. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145(1–2):75-80.
- Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. 1996. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137(4):1447-1456.
- Cirulli ET, Goldstein DB. 2010. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet* 11(6):415-25.
- Conway GS. 2000. Premature ovarian failure. *British Medical Bulletin* 56(3):643-649.
- Conway GS, Kaltsas G, Patel A, Davies MC, Jacobs HS. 1996. Characterization of idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril* 65(2):337-41.
- Costa Y, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Hoog C, Benavente R and others. 2005. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* 118(Pt 12):2755-62.
- Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. 1986. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 67(4):604-6.
- Crawford MJ, Lanctôt C, Tremblay JJ, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, Beatty B, Drouin J. 1997. Human and murine PTX1/Ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins syndrome. *Mammalian genome* 8(11):841-845.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S and others. 2001. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27(2):159-66.
- Crisponi L, Uda M, Deiana M, Loi A, Nagaraja R, Chiappe F, Schlessinger D, Cao A, Pilia G. 2004. FOXL2 inactivation by a translocation 171 kb away: analysis of 500 kb of chromosome 3 for candidate long-range regulatory sequences. *Genomics* 83(5):757-64.
- Crow JF. 1994. Advantages of sexual reproduction. *Dev Genet* 15(3):205-13.
- Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR. 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257(5068):369-73.
- Davis GH. 2004. Fecundity genes in sheep. *Animal Reproduction Science* 82–83(0):247-253.
- Davis GH, McEwan JC, Fennessy PF, Dodds KG, McNatty KP. 1992. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biology of reproduction* 46(4):636-640.
- De Baere E, Beysen D, Oley C, Lorenz B, Cocquet J, De Sutter P, Devriendt K, Dixon M, Fellous M, Fryns J-P and others. 2003. FOXL2 and BPES: Mutational Hotspots, Phenotypic Variability, and Revision of the Genotype-Phenotype Correlation. *American Journal of Human Genetics* 72(2):478-487.
- De Baere E, Dixon MJ, Small KW, Jabs EW, Leroy BP, Devriendt K, Gillerot Y, Mortier G, Meire F, Van Maldergem L and others. 2001. Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype--phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 10(15):1591-600.

- De Baere E, Lemerrier B, Christin-Maitre S, Durval D, Messiaen L, Fellous M, Veitia R. 2002. FOXL2 mutation screening in a large panel of POF patients and XX males. *J Med Genet* 39(8):e43.
- de Caestecker M. 2004. The transforming growth factor- β superfamily of receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15(1):1-11.
- de Moraes-Ruehsen M, Jones GS. 1967. Premature ovarian failure. *Fertil Steril* 18(4):440-61.
- de Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. 2014. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 99(10):E2129-32.
- Deplancke B, Vermeirssen V, Arda HE, Martinez NJ, Walhout AJM. 2006. Gateway-Compatible Yeast One-Hybrid Screens. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006(5):pdb.prot4590.
- 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.
- Dirks RW, Van Gijlswijk RPM, Vooijs MA, Smit AB, Bogerd J, van Minnen J, Raap AK, Van der Ploeg M. 1991. 3'-End fluorochromized and haptenized oligonucleotides as in situ hybridization probes for multiple, simultaneous RNA detection. *Experimental Cell Research* 194(2):310-315.
- Dixit H, Rao KL, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty BN, Singh L. 2006a. Expansion of the germline analysis for the INHA gene in Indian women with ovarian failure. *Human Reproduction* 21(6):1643-1644.
- Dixit H, Rao L, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. 2006b. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Human Genetics* 119(4):408-415.
- Do KA, Treloar SA, Pandeya N, Purdie D, Green AC, Heath AC, Martin NG. 1998. Predictive factors of age at menopause in a large Australian twin study. *Hum Biol* 70(6):1073-91.
- Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, Aittomaki K. 2002. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3):1151-5.
- Donderwinkel PF, van der Vaart H, Wolters VM, Simons AH, Kroon G, Heineman M-J. 2000. Treatment of patients with long-standing unexplained subfertility with in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 73(2):334-337.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383(6600):531-535.
- Dragojević-Dikić S, Marisavljević D, Mitrović A, Dikić S, Jovanović T, Janković-Ražnatović S. 2010. An immunological insight into premature ovarian failure (POF). *Autoimmunity Reviews* 9(11):771-774.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. 1998. The Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes. *Molecular Endocrinology* 12(12):1809-1817.

- Elisa Di P, Raffaella R, Anna M, Beatrice B, Stefano B, Luciano C, Silvia E, Giorgio R, Gianni R, Michele S and others. 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.
- Ellsworth BS, Burns AT, Escudero KW, Duval DL, Nelson SE, Clay CM. 2003. The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 206(1-2):93-111.
- Ellsworth BS, Egashira N, Haller JL, Butts DL, Cocquet J, Clay CM, Osamura RY, Camper SA. 2006. FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis. *Mol Endocrinol* 20(11):2796-805.
- Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass JA. 2002. Turner's syndrome in adulthood. *Endocr Rev* 23(1):120-40.
- Erickson GF, Shimasaki S. 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1:9.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-6.
- Fechner PY, Davenport ML, Qualy RL, Ross JL, Gunther DF, Eugster EA, Huseman C, Zagar AJ, Quigley CA. 2006. Differences in Follicle-Stimulating Hormone Secretion between 45,X Monosomy Turner Syndrome and 45,X/46,XX Mosaicism Are Evident at an Early Age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(12):4896-4902.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(21):7413-7417.
- Ferrarini E, Russo L, Fruzzetti F, Agretti P, De Marco G, Dimida A, Gianetti E, Simoncini T, Simi P, Baldinotti F and others. 2013. Clinical characteristics and genetic analysis in women with premature ovarian insufficiency. *Maturitas* 74(1):61-67.
- Fonseca DJ, Patiño LC, Suárez YC, de Jesús Rodríguez A, Mateus HE, Jiménez KM, Ortega-Recalde O, Díaz-Yamal I, Laissue P. 2015. Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertility and Sterility* 104(1):154-162.e2.
- Forges T, Monnier-Barbarino P, Leheup B, Jouvet P. 2006. Pathophysiology of impaired ovarian function in galactosaemia. *Hum Reprod Update* 12(5):573-84.
- Forti G, Krausz C. 1998. Evaluation and Treatment of the Infertile Couple. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83(12):4177-4188.
- Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M. 1977. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *The Anatomical Record* 188(3):315-329.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW and others. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25(3):279-83.

- Garcia-Cruz R, Brieno MA, Roig I, Grossmann M, Velilla E, Pujol A, Cabero L, Pessarrodona A, Barbero JL, Garcia Caldes M. 2010. Dynamics of cohesin proteins REC8, STAG3, SMC1 beta and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes. *Hum Reprod* 25(9):2316-27.
- Gehring WJ. 1993. Exploring the homeobox. *Gene* 135(1-2):215-221.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wuthrich K. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78(2):211-23.
- Gersak K, Harris SE, Smale WJ, Shelling AN. 2004. A novel 30 bp deletion in the FOXL2 gene in a phenotypically normal woman with primary amenorrhoea: case report. *Hum Reprod* 19(12):2767-70.
- Gerton JL, Hawley RS. 2005. Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* 6(6):477-487.
- Gibson G. 2011. Rare and Common Variants: Twenty arguments. *Nature reviews. Genetics* 13(2):135-145.
- Gluzman Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23(1):175-182.
- González A, Ramírez-Lorca R, Calatayud C, Mendoza N, Ruiz A, Sáez ME, Morón FJ. 2008. Association of genetic markers within the BMP15 gene with anovulation and infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 90(2):447-449.
- Gosden RG. 2002. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 186(2):149-153.
- Goswami D, Conway GS. 2005. Premature ovarian failure. *Human Reproduction Update* 11(4):391-410.
- Gougeon A, Testart J. 1990. Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 54(5):848-52.
- Group ECW. 2004. Diagnosis and management of the infertile couple: missing information. *Human Reproduction Update* 10(4):295-307.
- Guillemin Y, Lalle P, Gillet G, Guerin J-F, Hamamah S, Aouacheria A. 2009. Oocytes and early embryos selectively express the survival factor BCL2L10. *Journal of Molecular Medicine* 87(9):923-940.
- Gurnett CA, Alae F, Kruse LM, Desruisseau DM, Hecht JT, Wise CA, Bowcock AM, Dobbs MB. 2008. Asymmetric Lower-Limb Malformations in Individuals with Homeobox PITX1 Gene Mutation. *American Journal of Human Genetics* 83(5):616-622.
- Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. 2011. Defining infertility—a systematic review of prevalence studies. *Human Reproduction Update* 17(5):575-588.
- Habbema JDF, Collins J, Leridon H, Evers JLH, Lunenfeld B, te Velde ER. 2004. Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Fertility and Sterility* 82(1):36-40.
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15

- are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction* 70(4):900-909.
- Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomaki K, Shelling AN. 2002. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 8(8):729-33.
- Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S. 2005. Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: Potential implication in the determination of ovulation quota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(15):5426-5431.
- Hellman LM, Fried MG. 2007. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nature protocols* 2(8):1849-1861.
- Helwa R, Hoheisel J. 2010. Analysis of DNA-protein interactions: from nitrocellulose filter binding assays to microarray studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(6):2551-2561.
- Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101.
- Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. 1997. Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity. *Endocrine Reviews* 18(1):107-134.
- Hoffman BG, Jones SJM. 2009. Genome-wide identification of DNA-protein interactions using chromatin immunoprecipitation coupled with flow cell sequencing. *Journal of Endocrinology* 201(1):1-13.
- Houmard B, Small C, Yang L, Naluai-Cecchini T, Cheng E, Hassold T, Griswold M. 2009. Global gene expression in the human fetal testis and ovary. *Biol Reprod* 81(2):438-43.
- Howell S, Shalet S. 1998. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27(4):927-43.
- Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clinical Biochemistry*.
- Huggett JF, Whale A. 2013. Digital PCR as a Novel Technology and Its Potential Implications for Molecular Diagnostics. *Clinical Chemistry* 59(12):1691-1693.
- Hughes EG, Fedorkow DM, Collins JA. 1993. A quantitative overview of controlled trials in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 59(5):963-70.
- Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. 1985. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 291(6510):1693-1697.
- Huntriss J, Gosden R, Hinkins M, Oliver B, Miller D, Rutherford AJ, Picton HM. 2002. Isolation, characterization and expression of the human Factor In the Germline alpha (FIGLA) gene in ovarian follicles and oocytes. *Mol Hum Reprod* 8(12):1087-95.
- Huntriss J, Hinkins M, Picton HM. 2006. cDNA cloning and expression of the human NOBOX gene in oocytes and ovarian follicles. *Mol Hum Reprod* 12(5):283-9.
- Imani B, Eijkemans MJC, te Velde ER, Habbema JDF, Fauser BCJM. 2002. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *Fertility and Sterility* 77(1):91-97.

- Ismail RS, Okawara Y, Fryer JN, Vanderhyden BC. 1996. Hormonal regulation of the ligand for c-kit in the rat ovary and its effects on spontaneous oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 43(4):458-69.
- Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O. 1999. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol* 156(1-2):189-93.
- Jacques JT, Christian L, Jacques D. 1998. The pan-Pituitary Activator of Transcription, Ptx1 (Pituitary Homeobox 1), Acts in Synergy with SF-1 and Pit1 and Is an Upstream Regulator of the Lim-Homeodomain Gene Lim3/Lhx3. *Molecular Endocrinology* 12(3):428-441.
- Jenkins J, Daya S, Kremer J, Balasch J, Barratt C, Cooke I, Lawford-Davies J, De Sutter P, Suikari AM, Neulen J and others. 2004. European Classification of Infertility Taskforce (ECIT) response to Habbema et al., 'Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal'. *Human Reproduction* 19(12):2687-2688.
- Jennifer LD, Pei W, Julia E, Karen ML, Anthony JC, Martin MM. 1998. The Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes. *Molecular Endocrinology* 12(12):1809-1817.
- Jin P, Warren ST. 2000. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics* 9(6):901-908.
- Jones MH, Furlong RA, Burkin H, Chalmers IJ, Brown GM, Khwaja O, Affara NA. 1996. The *Drosophila* developmental gene *fat facets* has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2. *Hum Mol Genet* 5(11):1695-701.
- Julaton VT, Reijo Pera RA. 2011. NANOS3 function in human germ cell development. *Hum Mol Genet* 20(11):2238-50.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14(2):142-6.
- Kalantaridou SN, Davis SR, Nelson LM. 1998. Premature ovarian failure. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27(4):989-1006.
- Kang H, Lee SK, Kim M-H, Song J, Bae SJ, Kim NK, Lee S-H, Kwack K. 2008. Parathyroid hormone-responsive B1 gene is associated with premature ovarian failure. *Human Reproduction* 23(6):1457-1465.
- Kaufman FR, Xu YK, Ng WG, Silva PD, Lobo RA, Donnell GN. 1989. Gonadal function and ovarian galactose metabolism in classic galactosemia. *Acta Endocrinol (Copenh)* 120(2):129-33.
- Kaufmann E, Knochel W. 1996. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* 57(1):3-20.
- Kim TK, Eberwine JH. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(8):3173-3178.
- Kingsley DM. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & development* 8(2):133-146.
- Knauff EAH, Franke L, van Es MA, van den Berg LH, van der Schouw YT, Laven JSE, Lambalk CB, Hoek A, Goverde AJ, Christin-Maitre S and others. 2009. Genome-

- wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Human Reproduction* 24(9):2372-2378.
- Kosova G, Urbanek M. 2013. Genetics of the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 373(1-2):29-38.
- Koyama H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T, Aoki Y, Terasawa T, Kosaki G, Yamamoto T, Wada A. 1977. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer* 39(4):1403-1409.
- Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, Muller JM, Nelson SF, Salameh W, Vilain E. 2006. Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 79(1):113-9.
- Lai P. 2015. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology* 411:243-257.
- Lai P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R and others. 2006. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology* 154(5):739-744.
- Lai P, Vinci G, Veitia RA, Fellous M. 2008. Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 282(1-2):101-11.
- Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O. 1998. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 78(1-2):135-40.
- Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J. 1996. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes & Development* 10(10):1284-1295.
- Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J. 1999. Pituitary Homeobox 1 (Ptx1) Is Differentially Expressed during Pituitary Development. *Endocrinology* 140(3):1416-1422.
- Larsen U. 2005. Research on infertility: Which definition should we use? *Fertility and Sterility* 83(4):846-852.
- Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, Castro M, Tsigos C, Chrousos GP. 1996. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 334(8):507-12.
- Ledig S, Röpke A, Haeusler G, Hinney B, Wieacker P. 2008. BMP15 mutations in XX gonadal dysgenesis and premature ovarian failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 198(1):84.e1-84.e5.
- Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. 2003. Fox's in development and disease. *Trends Genet* 19(6):339-44.
- Leslie ND. 2003. Insights into the pathogenesis of galactosemia. *Annu Rev Nutr* 23:59-80.
- Leslie ND, Immerman EB, Flach JE, Florez M, Fridovich-Keil JL, Elsas LJ. 1992. The human galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *Genomics* 14(2):474-480.

- Li Q, Rajanahally S, Edson MA, Matzuk MM. 2009. Stable expression and characterization of N-terminal tagged recombinant human bone morphogenetic protein 15. *Molecular Human Reproduction* 15(12):779-788.
- Liang L, Soyal SM, Dean J. 1997. FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 124(24):4939-47.
- Liao WX, Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. 2003. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *The Journal of biological chemistry* 278(6):3713.
- Liao WX, Moore RK, Shimasaki S. 2004. Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *Journal of Biological Chemistry* 279(17):17391-17396.
- Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, Homfray T, Albanese A, Molini V, Sebire NJ, Einaudi S, Conway GS and others. 2007. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3):991-9.
- Lin SY, Morrison, Phillips DJ, de Kretser DM. 2003. Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. *Reproduction* 126(2):133-148.
- Littlewood TD, Evan GI. 1995. Transcription factors 2: helix-loop-helix. *Protein Profile* 2(6):621-702.
- Liu G, Hale GE, Hughes CL. 2000. Galactose metabolism and ovarian toxicity. *Reproductive Toxicology* 14(5):377-384.
- Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ. 1991. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(10):4438-4442.
- Lourenco D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, Weryha G, Muresan M, Boudjenah R, Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT, Achermann JC and others. 2009. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 360(12):1200-10.
- Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. 2003. Premature menopause in a multi- ethnic population study of the menopause transition*. *Human Reproduction* 18(1):199-206.
- Lunenfeld B, Van Steirteghem A, participants oboa. 2004. Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: Condensed Meeting Report from the Bertarelli Foundation's Second Global Conference. *Human Reproduction Update* 10(4):317-326.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77(4):481-90.
- Ma M, Ru Y, Chuang L-S, Hsu N-Y, Shi L-S, Hakenberg J, Cheng W-Y, Uzilov A, Ding W, Glicksberg BS and others. 2015. Disease-associated variants in different categories of disease located in distinct regulatory elements. *BMC Genomics* 16(Suppl 8):S3-S3.

- Ma X, Yuan D, Diepold K, Scarborough T, Ma J. 1996. The Drosophila morphogenetic protein Bicoid binds DNA cooperatively. *Development* 122(4):1195-1206.
- Macaluso M, Wright-Schnapp TJ, Chandra A, Johnson R, Satterwhite CL, Pulver A, Berman SM, Wang RY, Farr SL, Pollack LA. 2010. A public health focus on infertility prevention, detection, and management. *Fertility and Sterility* 93(1):16.e1-16.e10.
- Magoffin DA, Gelety TJ, Magarelli PC. 1994. Follicular development: the role of LH. *Ovulation Induction*. Amsterdam: Elsevier:25-36.
- Massagué J. 1998. TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry* 67(1):753-791.
- Massagué J, Attisano L, Wrana JL. 1994. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends in Cell Biology* 4(5):172-178.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes & development* 19(23):2783-2810.
- Massie CE, Mills IG. 2008. ChIPping away at gene regulation. *EMBO Reports* 9(4):337-343.
- Matthews JC, Hori K, Cormier MJ. 1977. Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry* 16(1):85-91.
- Matzuk MM, Burns KH. 2012. Genetics of Mammalian Reproduction: Modeling the End of the Germline. *Annual Review of Physiology* 74(1):503-528.
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296(5576):2178-80.
- Matzuk MM, Lamb DJ. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14(11):1197-1213.
- Mazia D. 1961. How cells divide. *Sci Am* 205:100-20.
- McLaren A. 1999. Signaling for germ cells. *Genes & Development* 13(4):373-376.
- McLaren A. 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology* 262(1):1-15.
- McNatty KP, Galloway SM, Wilson T, Smith P, Hudson NL, O'Connell A, Bibby AH, Heath DA, Davis GH, Hanrahan JP and others. 2005. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics, Selection, Evolution : GSE* 37(Suppl 1):S25-S38.
- McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Quirke LD, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan JP, Smith P, Groome NP, Laitinen M and others. 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128(4):379-386.
- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of Biochemistry* 147(1):35-51.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16(3):251-263.
- Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. 2003. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *Journal of Biological Chemistry* 278(1):304-310.
- Moore RK, Shimasaki S. 2005. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Molecular and Cellular Endocrinology* 234(1-2):67-73.

- Morabia A, Costanza MC. 1998. International Variability in Ages at Menarche, First Livebirth, and Menopause. *American Journal of Epidemiology* 148(12):1195-1205.
- Moron FJ, de Castro F, Royo JL, Montoro L, Mira E, Saez ME, Real LM, Gonzalez A, Manes S, Ruiz A. 2006. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) alleles predict over-response to recombinant follicle stimulation hormone and iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Pharmacogenet Genomics* 16(7):485-95.
- Morrish BC, Sinclair AH. 2002. Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124(4):447-57.
- Mosquera L, Forristall C, Zhou Y, King ML. 1993. A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. *Development* 117(1):377-86.
- Motta P, Makabe S, Nottola S. 1997. The ultrastructure of human reproduction. 1. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update* 3(3):281-297.
- Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N. 1999. Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *J Med Genet* 36(10):767-70.
- Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P. 1998. Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet* 35(8):637-40.
- Nakamura Y, Maekawa R, Yamagata Y, Tamura I, Sugino N. 2008. A novel mutation in exon8 of the follicle-stimulating hormone receptor in a woman with primary amenorrhea. *Gynecol Endocrinol* 24(12):708-12.
- Nasmyth K. 2001. Disseminating the Genome: Joining, Resolving, and Separating Sister Chromatids During Mitosis and Meiosis. *Annual Review of Genetics* 35(1):673-745.
- Nasmyth K. 2011. Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nat Cell Biol* 13(10):1170-7.
- Nelson LM, Covington SN, Rebar RW. 2005. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. *Fertility and Sterility* 83(5):1327-1332.
- Nielsen J, Wohler M. 1991. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet* 87(1):81-3.
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cellular Signalling* 16(3):291-299.
- O'Driscoll L, Daly C, Saleh M, Clynes M. 1993. The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology* 12(1-3):289-314.
- Oktay K, Briggs D, Gosden RG. 1997. Ontogeny of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Expression in Isolated Human Ovarian Follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82(11):3748-3751.
- Oliphant AR, Brandl CJ, Struhl K. 1989. Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 protein. *Molecular and Cellular Biology* 9(7):2944-2949.
- Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. 2011. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development* 78(1):9-21.

- Otsuka F, Shimasaki S. 2002. A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology* 143(12):4938-41.
- Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. 2001. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *Journal of Biological Chemistry* 276(14):11387-11392.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275(50):39523-8.
- Pangas SA, Matzuk MM. 2004. Genetic models for transforming growth factor β superfamily signaling in ovarian follicle development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 225(1-2):83-91.
- Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E. 2006. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol* 36(3):399-413.
- Pasquale ED, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M and others. 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.
- Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM. 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-E785.
- Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. 2010. Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of Molecular Endocrinology* 45(5):257-279.
- Persani L, Rossetti R, Cacciatore C, Fabre S. 2011. Genetic defects of ovarian TGF- β -like factors and premature ovarian failure. *Journal of Endocrinological Investigation* 34(3):244-251.
- Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore 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.
- Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. 2003. Un Ménage à Quatre: The Molecular Biology of Chromosome Segregation in Meiosis. *Cell* 112(4):423-440.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145(1-2):27-37.
- Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. 1991. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66(4):817-22.
- Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJ. 2004. Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* 145(7):3424-33.

- Practice Committee of the American Society for Reproductive M. 2013. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and Sterility* 99(1):63.
- Prueitt RL, Ross JL, Zinn AR. 2000. Physical mapping of nine Xq translocation breakpoints and identification of XPNPEP2 as a premature ovarian failure candidate gene. *Cytogenet Cell Genet* 89(1-2):44-50.
- Pulkki MM, Myllymaa S, Pasternack A, Lun S, Ludlow H, Al-Qahtani A, Korchynskyi O, Groome N, Juengel JL, Kalkkinen N and others. 2011. The bioactivity of human bone morphogenetic protein-15 is sensitive to C-terminal modification: Characterization of the purified untagged processed mature region. *Molecular and Cellular Endocrinology* 332(1-2):106-115.
- Pyun J-A, Cha DH, Kwack K. 2012. LAMC1 gene is associated with premature ovarian failure. *Maturitas* 71(4):402-406.
- Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson Joe L, Chen Z-J, Rajkovic A. 2007. NOBOX Homeobox Mutation Causes Premature Ovarian Failure. *American Journal of Human Genetics* 81(3):576-581.
- Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen Z-J. 2015. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Human Reproduction Update*.
- Qin Y, Shi Y, Zhao Y, Carson SA, Simpson JL, Chen Z-J. 2009. Mutation analysis of NOBOX homeodomain in chinese women with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 91(4, Supplement):1507-1509.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic acids research* 23(23):4878-4884.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. 2004. NOBOX Deficiency Disrupts Early Folliculogenesis and Oocyte-Specific Gene Expression. *Science* 305(5687):1157-1159.
- Rannikko A, Pakarinen P, Manna PR, Beau I, Misrahi M, Aittomäki K, Huhtaniemi I. 2002. Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Molecular Human Reproduction* 8(4):311-317.
- Rebar RW, Cedars MI. 1992. Hypergonadotropic forms of amenorrhea in young women. *Endocrinol Metab Clin North Am* 21(1):173-91.
- Rebar RW, Connolly HV. 1990. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* 53(5):804-10.
- Reynaud K, Cortvrindt R, Verlinde F, De Schepper J, Bourgain C, Smits J. 2004. Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45,x karyotype. *Fertility and Sterility* 81(4):1112-1119.
- Rombauts Ph.D L, Suikkari Ph.D A-M, MacLachlan B.Sc V, Trounson Ph.D AO, Healy Ph.D DL. 1998. Recruitment of Follicles by Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone Commencing in the Luteal Phase of the Ovarian Cycle 1. *Fertility and Sterility* 69(4):665-669.
- Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, Nelson LM, Beck-Peccoz P, Persani L. 2009. BMP15 mutations associated with Primary Ovarian Insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Human mutation* 30(5):804-810.

- Rubio-Gozalbo ME, Gubbels CS, Bakker JA, Menheere PPCA, Wodzig WKWH, Land JA. 2010. Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia. *Human Reproduction Update* 16(2):177-188.
- Sanders RD, Spencer JB, Epstein MP, Pollak SV, Vardhana PA, Lustbader JW, Fridovich-Keil JL. 2009. Biomarkers of ovarian function in girls and women with classic galactosemia. *Fertility and Sterility* 92(1):344-351.
- Santos MG, Machado AZ, Martins CN, Domenice S, Costa EM, Nishi MY, Ferraz-de-Souza B, Jorge SA, Pereira CA, Soardi FC and others. 2014. Homozygous inactivating mutation in NANOS3 in two sisters with primary ovarian insufficiency. *Biomed Res Int* 2014:787465.
- Sara LA-M, Kelly LW, Derek H, Courtney MS, Craig AH. 2013. Species Differences in the Expression and Activity of Bone Morphogenetic Protein 15. *Endocrinology* 154(2):888-899.
- Sathananthan AH, Selvaraj K, Trounson A. 2000. Fine structure of human oögonia in the foetal ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 161(1-2):3-8.
- Scheele F, Schoemaker J. 1996. The role of follicle-stimulating hormone in the selection of follicles in human ovaries: a survey of the literature and a proposed model. *Gynecol Endocrinol* 10(1):55-66.
- Schlunegger MP, Grutter MG. 1992. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 [angst] resolution of human transforming growth factor β 2. *Nature* 358(6385):430-434.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. 2004. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131(4):933-42.
- Schwarz HP, Moser H, Schild J, Zuppinger K. 1984. Hypergonadotropic hypogonadism in two sisters with galactosaemia. *Archives of Disease in Childhood* 59(8):781-783.
- Segal E, Raveh-Sadka T, Schroeder M, Unnerstall U, Gaul U. 2008. Predicting expression patterns from regulatory sequence in *Drosophila* segmentation. *Nature* 451(7178):535-540.
- Shang J, Li X, Ring HZ, Clayton DA, Francke U. 1997. Backfoot, a Novel Homeobox Gene, Maps to Human Chromosome 5 (BFT) and Mouse Chromosome 13 (Bft). *Genomics* 40(1):108-113.
- Shaw JLV, Dey SK, Critchley HOD, Horne AW. 2010. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Human Reproduction Update* 16(4):432-444.
- Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, Wood KV. 1996. Dual-Luciferase® reporter assay: An advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays. *Promega Notes* 57(2).
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25(1):72-101.
- Smith JM, Maynard-Smith J. 1978. *The evolution of sex*: Cambridge Univ Press.
- Snowdon DA, Kane RL, Beeson WL, Burke GL, Sprafka JM, Potter J, Iso H, Jacobs DR, Phillips RL. 1989. Is early natural menopause a biologic marker of health and aging? *American Journal of Public Health* 79(6):709-714.
- Soyal SM, Amleh A, Dean J. 2000. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127(21):4645-54.

- Stein KK, Primakoff P, Myles D. 2004. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *Journal of Cell Science* 117(26):6269-6274.
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NST, Cooper DN. 2009. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Medicine* 1(1):13-13.
- Stormo GD. 2000. DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics* 16(1):16-23.
- Su Y-Q, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135(1):111-121.
- Suzuki H, Tsuda M, Kiso M, Saga Y. 2008. Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. *Dev Biol* 318(1):133-42.
- Suzumori N, Yan C, Matzuk MM, Rajkovic A. 2002. Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mech Dev* 111(1-2):137-41.
- Sybert VP, McCauley E. 2004. Turner's Syndrome. *New England Journal of Medicine* 351(12):1227-1238.
- Szeto DP, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG. 1996. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(15):7706-7710.
- Takebayashi K, Takakura K, Wang H-Q, Kimura F, Kasahara K, Noda Y. 2000. Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 74(5):976-979.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 61(3):414-424.
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. 2000. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 66(1):6-15.
- Taylor AE. 2001. Systemic adversities of ovarian failure. *J Soc Gynecol Investig* 8(1 Suppl Proceedings):S7-9.
- Taylor NA, Van De Ven WJ, Creemers JW. 2003. Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *The FASEB journal* 17(10):1215-1227.
- Tedesco TA, Miller KL. 1979. Galactosemia: alterations in sulfate metabolism secondary to galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Science* 205(4413):1395-1397.
- Tharapel AT, Anderson KP, Simpson JL, Martens PR, Wilroy RS, Jr., Llerena JC, Jr., Schwartz CE. 1993. Deletion (X)(q26.1-->q28) in a proband and her mother: molecular characterization and phenotypic-karyotypic deductions. *Am J Hum Genet* 52(3):463-71.
- Themmen APN, Huhtaniemi IT. 2000. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21(5):551-83.

- Therman E, Laxova R, Susman B. 1990. The critical region on the human Xq. *Human Genetics* 85(5):455-461.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial M-L, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste J-M, Spira A. 1991. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)*. *Human Reproduction* 6(6):811-816.
- Tibiletti MG, Testa G, Vegetti W, Alagna F, Taborelli M, Dalpra L, Bolis PF, Crosignani PG. 1999. The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. *Hum Reprod* 14(11):2731-4.
- Timmreck LS, Reindollar RH. 2003. Contemporary issues in primary amenorrhea. *Obstet Gynecol Clin North Am* 30(2):287-302.
- Tiotiu D, Mercadal BA, Imbert R, Verbist J, Demeestere I, De Leener A, Englert Y, Vassart G, Costagliola S, Delbaere A. 2010. Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Human reproduction:deq073*.
- Tjio JH, Levan A. 1956. THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN. *Hereditas* 42(1-2):1-6.
- Toniolo D. 2006. X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Curr Opin Genet Dev* 16(3):293-300.
- Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, Detoef M, Paniel B, Prieur M, Zorn JR and others. 1999. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol* 13(11):1844-54.
- Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG. 1998. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 12(11):1691-704.
- Tremblay JJ, Goodyer CG, Drouin J. 2000. Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinology* 71(5):277-286.
- Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. 2003. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301(5637):1239-41.
- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. 2004. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13(11):1171-81.
- Van Doren K, Gluzman Y. 1984. Efficient transformation of human fibroblasts by adenovirus-simian virus 40 recombinants. *Molecular and cellular biology* 4(8):1653-1656.
- van Noord PAH, Dubas JS, Dorland M, Boersma H, Velde Et. 1997. Age at natural menopause in a population-based screening cohort: the role of menarche, fecundity, and lifestyle factors. *Fertility and Sterility* 68(1):95-102.
- Vegetti W, Grazia Tibiletti M, Testa G, de Lauretis Y, Alagna F, Castoldi E, Taborelli M, Motta T, Bolis PF, Dalpra L and others. 1998. Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases. *Hum Reprod* 13(7):1796-800.
- Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. 2001. Theories of endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 96(1):21-34.
- Visscher Peter M, Brown Matthew A, McCarthy Mark I, Yang J. 2012. Five Years of GWAS Discovery. *American Journal of Human Genetics* 90(1):7-24.

- Waggoner DD, Buist NR, Donnell GN. 1990. Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. *J Inher Metab Dis* 13(6):802-18.
- Wang B, Wen Q, Ni F, Zhou S, Wang J, Cao Y, Ma X. 2010. Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clinical endocrinology* 72(1):135-136.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2004. Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenetic and Genome Research* 105(2-4):228-234.
- White EA, Kramer RE, Hwang JH, Fernando ATP, Nana N, Hahn WC, Roberts TM, Schaffhausen BS, Livingston DM, Howley PM. 2014. Papillomavirus E7 Oncoproteins Share Functions with Polyomavirus Small T Antigens. *Journal of virology:JVI*. 03282-14.
- Wilson DS, Sheng G, Jun S, Desplan C. 1996. Conservation and diversification in homeodomain-DNA interactions: a comparative genetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(14):6886-6891.
- Wray NR, Goddard ME, Visscher PM. 2008. Prediction of individual genetic risk of complex disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 18(3):257-263.
- Wu X, Wang B, Dong Z, Zhou S, Liu Z, Shi G, Cao Y, Xu Y. 2013. A NANOS3 mutation linked to protein degradation causes premature ovarian insufficiency. *Cell Death Dis* 4:e825.
- Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL and others. 2001. Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *Molecular Endocrinology* 15(6):854-866.
- Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. 2006. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(28):10678-10683.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. 2009. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertility and Sterility* 92(5):1520-1524.
- Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, Simpson JL, Rajkovic A. 2008a. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 82(6):1342-8.
- Zhao XX, Suzumori N, Yamaguchi M, Suzumori K. 2005. Mutational analysis of the homeobox region of the human NOBOX gene in Japanese women who exhibit premature ovarian failure. *Fertil Steril* 83(6):1843-4.
- Zhao ZZ, Painter JN, Palmer JS, Webb PM, Hayward NK, Whiteman DC, Boomsma DI, Martin NG, Duffy DL, Montgomery GW. 2008b. Variation in bone morphogenetic protein 15 is not associated with spontaneous human dizygotic twinning. *Human Reproduction* 23(10):2372-2379.
- Zinn AR. 2001. The X chromosome and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 8(1 Suppl Proceedings):S34-6.

- Zinn AR, Page DC, Fisher EM. 1993. Turner syndrome: the case of the missing sex chromosome. *Trends Genet* 9(3):90-3.
- Zinn AR, Ross JL. 1998. Turner syndrome and haploinsufficiency. *Current Opinion in Genetics & Development* 8(3):322-327.
- Zinn AR, Ross JL. 2001. Molecular analysis of genes on Xp controlling Turner syndrome and premature ovarian failure (POF). *Semin Reprod Med* 19(2):141-6.
- Zinn AR, Tonk VS, Chen Z, Flejter WL, Gardner HA, Guerra R, Kushner H, Schwartz S, Sybert VP, Van Dyke DL and others. 1998. Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1. *Am J Hum Genet* 63(6):1757-66.
- Zlotogora J, Sagi M, Cohen T. 1983. The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *Am J Hum Genet* 35(5):1020-7.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1 Análisis *In-silico* del promotor del *BMP15*. Tabla de TFBS.

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$ZFHX	V\$AREB6.04	0.98	1826	1838	+	1	1	cttctGTTTctgt
V\$MZF1	V\$MZF1.02	0.99	1127	1137	-	1	1	aaGGGgaagag
V\$EVI1	V\$MEL1.02	0.99	929	945	-	1	1	aggagatGATGagtcag
V\$AP1F	V\$AP1.01	0.94	927	939	-	1	1	tgatgAGTCaggc
V\$FKHD	V\$FOXP1.02	0.96	669	685	+	1	1	tcctcacAACAcctgt
V\$FKHD	V\$FOXP1_ES.01	1	569	585	+	1	1	aaaaaaaaAACAgaggaa
V\$FKHD	V\$FOXP1_ES.01	1	525	541	-	1	1	agtgtaaAACAAaaggc
V\$IKRS	V\$LYF1.01	0.98	437	449	+	1	1	gtcTGGGgaaaat
V\$FKHD	V\$FOXP1_ES.01	1	264	280	-	1	1	aactgaaACAacatta
V\$ZFHX	V\$DELTAEF1.01	0.99	177	189	+	1	1	tcctcACCTgaac
V\$ZFHX	V\$AREB6.04	0.98	1832	1844	+	0.997	1	tttctGTTTcttt
V\$HAND	V\$TAL1_E2A.02	0.98	1071	1091	-	0.997	1	tgtagagCAGCaggctcggc
V\$CART	V\$S8.01	0.97	623	643	+	0.997	1	gtgtcTAATtaggctttgtgc
V\$CART	V\$S8.01	0.97	618	638	-	0.997	1	aagccTAATtagacacaagac
V\$CART	V\$S8.01	0.97	633	653	-	0.995	1	tatgtTAATtgacaaaagcct
V\$ZF02	V\$ZNF300.01	0.99	1525	1547	+	0.994	1	ataatcaCCCagatagttcac
V\$HBOX	V\$GSH2.01	0.95	622	640	+	0.993	1	tggtgcTAATtaggctttg
V\$HBOX	V\$GSH2.01	0.95	621	639	-	0.993	1	aaagccTAATtagacacaa
V\$SF1F	V\$SF1.01	0.95	551	565	+	0.993	1	ggccCAAGgtcatgt
V\$EVI1	V\$MEL1.02	0.99	708	724	+	0.992	1	ttctacaGATGagaaaa
V\$DLXF	V\$DLX3.01	0.91	639	657	-	0.992	1	aatctatgtTAATgcaca
V\$RU49	V\$RU49.01	0.98	1770	1776	-	0.991	1	tAGTAcc
V\$NKXH	V\$NKX25.03	0.99	1232	1250	-	0.991	1	gttcacaAGTGattttaat
V\$EREF	V\$ESRRA.01	0.87	552	574	+	0.99	1	gccAAGGtcatgttagaaaaa
V\$NEUR	V\$NGN_NEUROD.01	0.98	343	355	+	0.989	1	gaatCATCgtttt
V\$HOMF	V\$MSX.01	0.97	621	639	+	0.988	1	ttgtgtcTAATtaggcttt
V\$CEBP	V\$CEBPD.01	0.92	634	648	+	0.987	1	ggcttTGTGcaatta
V\$RUSH	V\$SMARCA3.02	0.98	361	371	+	0.986	1	ccttACTTgta
V\$RUSH	V\$SMARCA3.01	0.96	987	997	+	0.985	1	ccCCATatgtt
V\$NEUR	V\$NGN_NEUROD.01	0.98	710	722	-	0.985	1	ttctCATCgttag
V\$ZFHX	V\$AREB6.04	0.98	990	1002	+	0.984	1	catatGTTTctac
V\$IRFF	V\$IRF4.01	0.94	266	286	-	0.984	1	aaacgcaactGAAAacaacat
V\$HOMF	V\$NOBOX.02	0.89	622	640	-	0.983	1	caaagcctAATtagacaca
V\$BCDF	V\$PTX1.01	0.94	2032	2048	+	0.982	1	aacaCTAAgcctttcaa
V\$SORY	V\$SOX6.01	0.97	622	646	-	0.982	1	attgcACAagcctaattagacaca
V\$ZFX	V\$ZFX.01	0.97	1279	1289	-	0.981	1	tgGGCctgggt
V\$MYOD	V\$TCFE2A.02	0.94	1092	1108	-	0.981	1	ctagccaGATGgttaa
V\$OCT1	V\$OCT1.06	0.81	641	655	-	0.981	1	tctatgttAATTgca
V\$FKHD	V\$FREAC7.01	0.96	346	362	-	0.981	1	gggataTAAAcagatga
V\$GATA	V\$GATA1.06	0.96	99	111	-	0.981	1	gagaGATAtggaa

<i>Family</i>	<i>Matrix</i>	<i>Opt. Th.</i>	<i>Start</i>	<i>End</i>	<i>St</i>	<i>Mt sim.</i>	<i>Core sim.</i>	<i>Sequence</i>
V\$GATA	V\$GATA3.01	0.91	695	707	-	0.98	1	tggaGATAacacg
V\$HAND	V\$MESP1_2.01	0.91	982	1002	-	0.979	1	gtagaaaCATAtggggatctg
V\$SORY	V\$SOX3.01	0.94	514	538	-	0.979	1	gtaaaaCAAaggcataggtttacg
V\$AP1R	V\$BACH2.01	0.89	922	942	-	0.977	1	agatgaTGAGtcaggcttgat
V\$STAT	V\$STAT5.01	0.89	2060	2078	-	0.976	1	agaaTTCTaagaataactga
V\$AARF	V\$AARE.01	0.95	1845	1853	-	0.976	0.981	tTTGCatca
V\$KLFS	V\$GKLF.02	0.96	1623	1639	-	0.976	1	catccttAAAGggccag
V\$SMAD	V\$SMAD.01	0.96	874	884	+	0.976	1	aatGTCTgtcc
V\$DLXF	V\$DLX1.01	0.91	619	637	+	0.976	1	tcttgtgtctAATtaggct
V\$AARF	V\$AARE.01	0.95	1289	1297	+	0.975	0.885	aTTACatca
V\$SORY	V\$SOX6.01	0.97	2069	2093	-	0.974	1	agttcACAagaaaaagaattctaa
V\$ETSF	V\$PDEF.01	0.93	1952	1972	+	0.974	1	tggagccaGGATgcagttatc
V\$YY1F	V\$YY2.01	0.96	2037	2059	-	0.973	1	ggaggaCCATcttgaaggctta
V\$GATA	V\$GATA1.03	0.95	1964	1976	-	0.973	1	tgcaGATAactgc
V\$STAT	V\$STAT5.01	0.89	2062	2080	+	0.972	1	agtaTTCTtagaattcttt
V\$NEUR	V\$NEUROG.01	0.92	986	998	+	0.972	1	tccCCATatgttt
V\$AP1F	V\$AP1.03	0.94	927	939	+	0.972	0.971	gccTGACTcatca
V\$ZF08	V\$ZNF354C.01	0.97	1949	1959	-	0.971	1	tggctCCACaa
V\$SF1F	V\$FTF.01	0.94	1179	1193	+	0.971	1	cttcCAAGgtaaac
V\$CIZF	V\$NMP4.01	0.97	2074	2084	-	0.97	1	agAAAAagaat
V\$CIZF	V\$NMP4.01	0.97	1924	1934	-	0.97	1	agAAAAagaaa
V\$BCDF	V\$OTX2.01	0.96	1633	1649	-	0.97	1	tccttTAATccatcctt
V\$ETSF	V\$ERG.02	0.93	651	671	-	0.97	1	ggaagcaaGGAaataatctat
V\$IRXF	V\$IRX5.01	0.86	600	612	-	0.969	1	gttaCATGttcaa
V\$HBOX	V\$GSH2.01	0.95	464	482	+	0.969	1	cccagcTAATgagtttttg
V\$RUSH	V\$SMARCA3.01	0.96	99	109	+	0.969	1	ttCCATatctc
V\$CREB	V\$CREB1.01	0.86	1990	2010	+	0.968	1	tcagagTGACgtcccttgggc
V\$ETSF	V\$ERG.02	0.93	1974	1994	+	0.968	1	gcatgaaaGGAAtggtcaga
V\$HOMF	V\$NOBOX.01	0.92	637	655	-	0.967	1	tctatgtTAATtgacaaaa
V\$NKX6	V\$NKX61.01	0.91	639	653	-	0.967	1	tatgTTAAttgcaca
V\$GATA	V\$GATA4.01	0.92	30	42	+	0.967	1	cagaGATAatgcc
V\$SREB	V\$SREBP.01	0.9	1526	1540	+	0.966	1	taaTCACcccagata
V\$ZF35	V\$ZNF35.01	0.96	1125	1137	-	0.966	1	aaggggAAGAgta
V\$NEUR	V\$ATOH1.01	0.95	1093	1105	+	0.966	1	taacCATCtgggc
V\$ETSF	V\$SPI1.02	0.96	957	977	-	0.966	1	gaaactggGAAgaggtca
V\$NFAT	V\$NFAT.01	0.95	650	668	-	0.966	1	agcaaGGAaataatctatg
V\$RUSH	V\$SMARCA3.01	0.96	221	231	+	0.966	1	atCCATttaat
V\$RUSH	V\$SMARCA3.01	0.96	170	180	+	0.966	1	ttCCATatcct
V\$KLFS	V\$GKLF.02	0.96	1737	1753	-	0.965	1	taacttaAAAGgagagg
V\$ETSF	V\$PEA3.01	0.94	1708	1728	+	0.965	1	taagttaAGGAagtgggtcct
V\$BPTF	V\$FAC1.01	0.96	671	681	+	0.965	1	ctcacAACAac
V\$DLXF	V\$DLX1.01	0.91	624	642	-	0.965	1	cacaaagcctAATtagaca
V\$IRXF	V\$IRX5.01	0.86	601	613	+	0.965	1	tgaaCATGtaacc
V\$CLOX	V\$CDPCR3HD.01	0.94	213	231	+	0.965	1	tgctatcGATccatthaat

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$IRFF	V\$IRF4.01	0.94	1889	1909	+	0.964	1	tcctcttagaGAAAgcaacat
V\$CEBP	V\$CEBPB.01	0.94	1568	1582	+	0.964	1	tattttgaGAAAtgc
V\$WHNF	V\$WHN.01	0.95	1474	1484	+	0.964	1	tggACGCcatc
V\$ETSF	V\$SPI1.02	0.96	1121	1141	-	0.964	1	gaggaaggGGAAGagtaatct
V\$ETSF	V\$ETV1.02	0.96	659	679	-	0.964	1	tgttgtgaGGAAGcaaggaaa
V\$HOMF	V\$BSX.01	0.95	636	654	+	0.964	1	cttgtgcAATTaacaatag
V\$ETSF	V\$ETV1.02	0.96	574	594	+	0.964	1	aaaacagaGGAAGagcaca
V\$HOMF	V\$HHEX.01	0.95	641	659	-	0.963	1	ataatctatgtTAATgtca
V\$YY1F	V\$YY1.02	0.94	1719	1741	-	0.962	1	agaggtCCATtccaggaccact
V\$HOXF	V\$HOXB8.01	0.83	638	656	+	0.962	1	ttgtgcaATTAacaatagat
V\$HOXF	V\$HOXA3.02	0.84	623	641	+	0.962	1	gtgtctaATTAggctttgt
V\$BPTF	V\$FAC1.01	0.96	265	275	-	0.962	1	aaaacAACAtt
V\$STEM	V\$OCT3_4.02	0.88	1839	1857	-	0.961	1	cctctttGCATcaaaagaa
V\$IRFF	V\$IRF3.01	0.85	1825	1845	-	0.961	1	aaaagaacaGAAAcagaagg
V\$EVI1	V\$EVI1.06	0.83	1769	1785	-	0.961	1	agaacaAGATagtagct
V\$HOMF	V\$HHEX.01	0.95	1228	1246	-	0.961	1	acaagtgattTAATgtgc
V\$ETSF	V\$ETV1.02	0.96	1127	1147	-	0.961	1	aagcctgaGGAAGgggaagag
V\$RBP2	V\$PLU1_JARID1B.01	0.96	635	643	-	0.961	1	GCACaaagc
V\$SATB	V\$SATB1.01	0.94	364	378	-	0.961	1	tataATAtacaagta
V\$HOMF	V\$BARX2.01	0.95	184	202	+	0.961	1	ctgaactTAATagtgccag
V\$EGRF	V\$CKROX.01	0.88	1794	1810	+	0.96	1	gagagcGGGAggggcat
V\$PAXH	V\$PAX4.02	0.84	623	637	-	0.96	1	agcctAATTagacac
V\$HBOX	V\$GSH1.01	0.85	53	71	-	0.96	1	tttgtataaTAATtttgg
V\$BRN5	V\$BRN5.04	0.83	462	484	-	0.959	1	ctcaaaaactcATTAgctgggtt
V\$AP1F	V\$AP1.01	0.94	339	351	+	0.959	0.881	ttgtgAATCatct
V\$HOMF	V\$HHEX.01	0.95	180	198	+	0.959	1	tcacctgaactTAATagtg
V\$XBBF	V\$RFX4.02	0.88	877	895	+	0.958	0.924	gtctgtccataGATActcc
V\$SF1F	V\$SF1.01	0.95	780	794	-	0.958	1	tttcCAAGgcaaatt
V\$HOXF	V\$HOXA3.02	0.84	620	638	-	0.958	1	aagcctaATTAgacacaag
V\$PAXH	V\$PAX4.02	0.84	624	638	+	0.958	1	tgtctAATTaggctt
V\$HAND	V\$LXL1_E12.01	0.81	339	359	-	0.958	1	atataaacaGATGattcacia
V\$NFAT	V\$NFAT.01	0.95	1406	1424	-	0.956	1	aatgtGGAActactgagt
V\$CEBP	V\$CEBP.02	0.92	1931	1945	-	0.955	1	aggatgggGCAAgaa
V\$ARID	V\$ARID5A.01	0.87	1555	1575	-	0.955	1	tcaaaATATgtctgctaata
V\$MEF3	V\$SIX.01	0.89	1749	1761	-	0.954	1	ggcTCAGgtaact
V\$SATB	V\$SATB1.01	0.94	52	66	-	0.954	1	tataATAattttgga
V\$SORY	V\$HMGY.01	0.92	774	798	+	0.953	1	gctagaAATTgccttgaaaggtt
V\$HBOX	V\$GSH2.01	0.95	636	654	-	0.953	1	ctatgtTAATgcacaaag
V\$CLOX	V\$CDPCR3HD.01	0.94	208	226	-	0.953	0.842	atggatcGATAgcacatta
V\$HOMF	V\$HHEX.01	0.95	217	235	+	0.952	1	atcgatccattTAATgtgc
V\$HOMF	V\$HHEX.01	0.95	197	215	+	0.952	1	tgccagactttTAATgtgc
V\$OCT1	V\$OCT1.02	0.85	1844	1858	+	0.951	1	ttgATGCaagaggc
V\$CLOX	V\$CDPCR3HD.01	0.94	212	230	-	0.951	1	ttaaatgGATCgatagcac
V\$ARID	V\$ARID5A.01	0.87	1562	1582	+	0.95	1	agacaATATtttgagaaatgc

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$HOMF	V\$HHEX.01	0.95	1512	1530	+	0.95	1	gtctacattctTAATaatc
V\$HAND	V\$TH1E47.01	0.93	190	210	+	0.95	1	ttaatagtgCCA Gacttttaa
V\$HOXF	V\$NANOG.01	0.94	1304	1322	-	0.949	1	tattatgAATGcctgggta
V\$AP1F	V\$AP1.01	0.94	339	351	-	0.949	0.833	agatgATTCacaa
V\$PARF	V\$TEF.01	0.85	1286	1302	-	0.948	1	cattctgatGTAAtggg
V\$HOXF	V\$NANOG.01	0.94	1280	1298	-	0.948	1	ctgatgtAATGggcctggg
V\$MYOD	V\$TCFE2A.02	0.94	1329	1345	+	0.947	1	gcttccaGATGattcc
V\$FKHD	V\$HFH2.01	0.91	262	278	-	0.947	1	ctgaaacAACAttaag
V\$HAND	V\$TH1E47.01	0.93	32	52	+	0.947	1	gagataatgCCA Gattgctct
V\$CEBP	V\$CEBPB.01	0.94	737	751	+	0.946	1	gaagtgaGAAAttt
V\$MYT1	V\$MYT1L.01	0.92	1536	1548	+	0.945	1	agatAGTTtact
V\$PAX5	V\$PAX2.02	0.92	918	946	+	0.945	1	acaaatcaagccTGACtcatctctccta
V\$ZFHX	V\$AREB6.01	0.93	1748	1760	+	0.944	1	aagttACCTgagc
V\$BRAC	V\$EOMES.02	0.88	1167	1189	-	0.944	1	tacctggaaGGTgttgatcc
V\$CART	V\$PHOX2.01	0.87	1146	1166	+	0.944	1	ttctTAATgaagccaataa
V\$SATB	V\$SATB1.01	0.94	149	163	-	0.944	1	tatAATAtatagaat
V\$MYBL	V\$CMYB.01	0.9	2017	2031	-	0.943	1	caaCAACagggccca
V\$SORY	V\$SOX3.01	0.94	1909	1933	-	0.943	0.834	gaaaaGAAAggcaggcggccta
V\$HOXF	V\$NANOG.01	0.94	222	240	+	0.943	1	tccattAATGtctatca
V\$HOXF	V\$NANOG.01	0.94	1223	1241	-	0.942	1	tgattttAATGtgcagcca
V\$RORA	V\$RORA1.01	0.93	949	971	-	0.942	1	ggggaagcaGGTcaagacctggc
V\$CREB	V\$CREB.02	0.89	1987	2007	+	0.941	1	tggtcagagTGACgtcccttg
V\$STAT	V\$STAT6.01	0.84	1427	1445	-	0.941	1	gaagTTCctatgaaacct
V\$HAND	V\$TAL1BETAE47.01	0.87	1089	1109	-	0.941	1	cctagccCAGAtggttaatgt
V\$SMAD	V\$SMAD4.01	0.94	951	961	+	0.941	1	cagGTCTtgac
V\$MYOD	V\$TCFE2A.02	0.94	342	358	-	0.941	1	tataacaGATGattca
V\$HNF1	V\$HMBOX.01	0.83	1265	1281	+	0.94	1	atgactaGTTAcaacc
V\$PAX5	V\$PAX2.02	0.92	909	937	-	0.94	0.962	atgagtcaggctGATttgtggaggcct
V\$LHXF	V\$LHX4.01	0.83	619	641	+	0.94	1	tcttgtgtctAATtaggcttgt
V\$MYOD	V\$TCFE2A.02	0.94	493	509	+	0.94	1	tgagtccaGATGtagag
V\$HOXF	V\$NANOG.01	0.94	202	220	+	0.94	1	gacttttAATGtctatcg
V\$IRFF	V\$IRF3.01	0.85	1917	1937	-	0.939	1	gcaagaaaaGAAAggcaggc
V\$STAT	V\$STAT6.01	0.84	1428	1446	+	0.939	0.862	ggttTTCataggaacttct
V\$ZF02	V\$ZBTB7.03	0.88	1790	1812	-	0.935	1	gcatgCCCCtcccgtctcccgg
V\$RP58	V\$RP58.01	0.84	496	508	-	0.935	1	tctaCATCtggac
V\$CART	V\$PHOX2.01	0.87	1574	1594	-	0.934	1	gcctcTAATgcagcatttctc
V\$BCDF	V\$PCE1.01	0.89	637	653	-	0.933	1	tatgtTAATgcacaaa
V\$CAAT	V\$NFY.04	0.92	1156	1170	+	0.932	1	aagCCAAtaaggat
V\$CHRF	V\$CHR.01	0.92	596	608	+	0.932	1	aaatTTGAacatg
V\$XBBF	V\$RFX4.02	0.88	1300	1318	-	0.931	0.821	atgaatgcctgGTAacat
V\$HOMF	V\$HMX3.02	0.92	185	203	-	0.931	1	tctggcactTAAgttca
V\$NOLF	V\$EBF1.01	0.88	1995	2017	+	0.93	1	gtgacgTCCctggcctgtgtt
V\$CEBP	V\$CEBPB.02	0.91	862	876	-	0.93	1	attacTGTGgaacag
V\$PAX5	V\$PAX2.02	0.92	1126	1154	-	0.929	0.923	attagagaagccTGAGgaagggaagagt

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$HOMF	V\$HMX3.02	0.92	1736	1754	+	0.928	1	acctctcctTTAAgttac
V\$HAND	V\$MESP1_2.01	0.91	983	1003	+	0.928	1	agatcccCATAtgttctact
V\$OCT1	V\$OCT1.03	0.85	625	639	-	0.928	1	aaagcctaATTAgac
V\$NKXH	V\$NKX25.02	0.88	635	653	-	0.927	1	tatgtTAATgcacaaagc
V\$NKXH	V\$NKX25.02	0.88	186	204	+	0.927	1	gaactTAATagtgccagac
V\$HOMF	V\$HMX3.02	0.92	1741	1759	-	0.926	1	ctcaggtaacTTAAaagga
V\$ZF05	V\$ZFP410.01	0.84	1477	1491	-	0.926	1	tctctgGGATggcgt
V\$PDX1	V\$IPF1.01	0.84	624	642	-	0.926	1	cacaaagccTAATtagaca
V\$NEUR	V\$NEUROG.01	0.92	1094	1106	-	0.925	0.875	agcCCAGatggtt
V\$CEBP	V\$CEBPB.02	0.91	1413	1427	-	0.924	1	taaaaTGTGgaaact
V\$PDX1	V\$IPF1.01	0.84	619	637	+	0.924	1	tcttgtgtcTAATtaggct
V\$OCT1	V\$OCT1.03	0.85	622	636	+	0.924	1	tgtgtctaATTAggc
V\$GATA	V\$GATA2.01	0.92	1702	1714	+	0.923	1	agtGATAagtta
V\$GFI1	V\$GFI1.02	0.9	67	81	+	0.923	1	ccaAATCacactctc
V\$FAST	V\$FAST1.01	0.81	1342	1358	-	0.922	0.983	ttggctgtaGATTggaa
V\$GATA	V\$GATA2.02	0.9	1024	1036	-	0.922	1	gaaaGATAgtagg
V\$EREF	V\$ER.04	0.87	1982	2004	+	0.921	1	ggaaatgGTCagagtgcgtccc
V\$MAZF	V\$MAZR.01	0.88	1798	1810	+	0.921	1	gcgggaGGGGcat
V\$ZF03	V\$ZNF217.01	0.9	1490	1502	+	0.921	1	GAATcctggttca
V\$STEM	V\$OCT3_4.02	0.88	1967	1985	+	0.92	1	gttatctGCATgaaaggaa
V\$ABDB	V\$HOXC13.01	0.91	1225	1241	+	0.92	1	gctgcacatTAAAtca
V\$MEF3	V\$MEF3.01	0.89	1137	1149	+	0.92	1	tccTCAGgcttct
V\$NBRE	V\$NBRE.01	0.86	552	566	+	0.92	1	gccAAGGtcatggt
V\$ABDB	V\$HOXC13.01	0.91	202	218	-	0.92	1	atagcacatTAAAgctc
V\$P53F	V\$P53.02	0.91	1802	1826	-	0.919	1	ggtaggacaaggcagCATGcccctc
V\$FKHD	V\$FHXB.01	0.83	1311	1327	+	0.919	1	gcattcATAAtagttaa
V\$LHXF	V\$LHX6.01	0.84	620	642	-	0.918	1	cacaaagccTAATtagacacaag
V\$XBBF	V\$RFX1.02	0.9	1747	1765	-	0.917	0.945	gagaggctcagGTAActta
V\$BCDF	V\$PCE1.01	0.89	622	638	-	0.917	1	aagccTAATtagacaca
V\$ZF03	V\$ZNF217.01	0.9	1041	1053	+	0.915	1	GAATaatggtctg
V\$MEF3	V\$MEF3.01	0.89	1677	1689	+	0.914	1	ggaTCAGgctgct
V\$ARID	V\$JARID2.01	0.89	220	240	+	0.914	1	gatccaTTAatgtgctatca
V\$SP1F	V\$GC.01	0.88	1795	1811	+	0.913	0.877	agagcgGGAGgggcatg
V\$SRFF	V\$SRF.04	0.86	1155	1173	+	0.913	0.901	gaagcccaaTAAGgatctc
V\$CLOX	V\$CLOX.01	0.81	642	660	-	0.913	0.807	aataATCTatgtaattgc
V\$THAP	V\$THAP1.01	0.9	1663	1673	+	0.912	1	tgtaggGGCAa
V\$NKX6	V\$NKX61.01	0.91	1518	1532	+	0.912	1	attcTTAAtaatcac
V\$GATA	V\$GATA3.02	0.91	1232	1244	-	0.912	0.875	aagTGATttaa
V\$BRAC	V\$EOMES.02	0.88	719	741	+	0.912	1	agaaaactaaGGTGtagggaagt
V\$HIFF	V\$ARNT.01	0.89	687	703	+	0.912	1	aggtaaaaCGTgttatc
V\$AP2F	V\$TCFAP2E.01	0.91	1616	1630	-	0.911	1	agggccagAGGCctc
V\$CREB	V\$ATF2.01	0.87	1283	1303	-	0.911	0.815	ccattcTGATgtaatgggctc
V\$GATA	V\$GATA2.02	0.9	1770	1782	-	0.91	1	acaaGATAgtagc
V\$HOMF	V\$HMX3.01	0.89	1710	1728	+	0.91	1	agttaaggAAGTgggtcct

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$OCT1	V\$OCT1.05	0.89	1229	1243	+	0.91	0.9	caCATTaaatcact
V\$NGRE	V\$IR1_NGRE.01	0.81	938	952	-	0.91	1	tggtctaGGAGatg
V\$ETSF	V\$SPI1.03	0.88	728	748	+	0.91	1	aggtgtagGGAAGtgaagaaa
V\$HASF	V\$HAS.01	0.91	691	701	-	0.91	1	taaCACGtttt
V\$NKXH	V\$NKX25.02	0.88	620	638	-	0.91	1	aagccTAATtagacacaag
V\$HOXF	V\$HOXB3.01	0.84	462	480	-	0.91	0.868	aaaacTCATtagctgggtt
V\$ABDB	V\$HOXC13.01	0.91	222	238	-	0.91	1	atagcacatTAAAtgga
V\$BCDF	V\$PCE1.01	0.89	623	639	+	0.908	1	gtgtcTAATtagctttt
V\$ZF03	V\$ZNF217.01	0.9	343	355	+	0.908	1	GAATcatctgttt
V\$ZF03	V\$ZNF217.01	0.9	253	265	+	0.908	1	GAATtagtatctta
V\$ARID	V\$JARID2.01	0.89	200	220	+	0.908	1	cagactTTTAatgtgctatcg
V\$BARB	V\$BARBIE.01	0.88	1681	1695	-	0.907	1	aaaaAAAGcagcctg
V\$GLIF	V\$ZIC2.01	0.89	1525	1539	+	0.907	1	ataatcaCCCagat
V\$NKXH	V\$NKX25.02	0.88	1313	1331	+	0.907	1	attcaTAATagttaaagct
V\$XBBF	V\$RFX1.01	0.89	1859	1877	+	0.906	1	caagttatgagGCAActtt
V\$MYBL	V\$CMYB.01	0.9	390	404	+	0.906	1	tcaCAACagctctct
V\$PARF	V\$VBP.01	0.86	1370	1386	-	0.905	1	gaagatgccGTAACagt
V\$GFI1	V\$GFI1B.01	0.86	1234	1248	+	0.905	1	taaAATCacttgtga
V\$ZF03	V\$ZNF217.01	0.9	7	19	+	0.905	1	GAATtgtatatct
V\$BCL6	V\$BCL6.04	0.88	747	763	-	0.904	1	cccTTCCaagacaatt
V\$SORY	V\$SOX9.01	0.9	323	347	-	0.904	1	gattcaCAATaggcaaaatttagat
V\$GFI1	V\$GFI1.02	0.9	918	932	+	0.903	1	acaAATCaagcctga
V\$PARF	V\$VBP.01	0.86	599	615	+	0.901	1	tttgaacatGTAACcct
V\$LHXF	V\$ISL2.01	0.87	462	484	-	0.901	1	ctcaaaaactcATTAgctgggtt
V\$ZF04	V\$ZID.01	0.85	1947	1959	-	0.9	1	tgGCTCcacaacc
V\$PCBE	V\$PREB.01	0.86	1675	1689	+	0.9	1	taggaTCAGgctgct
V\$MYBL	V\$VMYB.01	0.88	1959	1973	-	0.899	0.866	agatAACTgcatcct
V\$LEFF	V\$TCF7.01	0.85	1837	1853	-	0.899	1	tttgcataAAAagaaac
V\$NKXH	V\$NKX25.02	0.88	1518	1536	+	0.899	1	attctTAATaatcacccca
V\$OCT1	V\$OCT1.05	0.89	320	334	+	0.899	0.95	acCATCtaaattttg
V\$PLZF	V\$PLZF.01	0.86	1012	1026	-	0.897	0.833	aggTATAgctctggc
V\$RXRF	V\$RAR_RXR.01	0.78	542	566	+	0.897	1	acatgccaggcccaAGGTcatgtt
V\$NGRE	V\$IR1_NGRE.01	0.81	1876	1890	+	0.896	1	ttgtccaGGAGatc
V\$IRFF	V\$IRF7.01	0.86	1819	1839	-	0.896	1	aacaGAAAcagaaggtgggac
V\$HAND	V\$TAL1BETA47.01	0.87	1328	1348	+	0.896	1	agctcccCAGAtgattccaat
V\$BCL6	V\$BCL6.04	0.88	2063	2079	+	0.895	0.798	gtaTTCTtagaattctt
V\$XBBF	V\$RFX1.01	0.89	1598	1616	+	0.894	0.882	gaagtaggatgGAAAcagg
V\$E4FF	V\$E4F.01	0.82	1992	2004	-	0.893	1	gggACGTcactct
V\$HNF1	V\$HNF1.04	0.84	1703	1719	+	0.893	1	gtggataaGTTAaggaa
V\$GREF	V\$ARE.02	0.89	1607	1625	-	0.893	1	cagaggcctctGTTCCca
V\$NKX1	V\$NKX12.01	0.87	623	639	+	0.892	1	gtgtctAATTagctttt
V\$BCL6	V\$BCL6.04	0.88	1328	1344	+	0.891	1	agcTTCCcagatgattc
V\$BRN5	V\$BRN5.04	0.83	620	642	-	0.891	1	cacaaagcctaATTAgacacaag
V\$HOXC	V\$MEIS1.03	0.85	336	352	-	0.891	1	cagatGATTcacaatag

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$PARF	V\$VBP.01	0.86	1747	1763	-	0.89	1	gaggctcagGTAActta
V\$BRNF	V\$BRN2.04	0.82	621	639	+	0.89	1	ttgtgtcTAATtaggcttt
V\$XBBF	V\$RFX4.02	0.88	457	475	-	0.889	1	tcattagctggGTTActtt
V\$HOXF	V\$HOX1-3.01	0.82	48	66	-	0.889	1	tataaTAATtttgagagc
V\$SORY	V\$SRY.02	0.88	53	77	+	0.888	1	ccaaaATTAttataccaatcacac
V\$E4FF	V\$E4F.01	0.82	1995	2007	+	0.887	1	gtgACGTcccttg
V\$CART	V\$PHOX2.01	0.87	1629	1649	-	0.887	1	tccctTAATccatccttaag
V\$ETSF	V\$SPIB.01	0.88	1407	1427	-	0.887	1	taaaatgtGGAAactactgag
V\$CLOX	V\$CLOX.01	0.81	1110	1128	-	0.887	0.807	agtaATCTatgggagctaa
V\$PARF	V\$TEF.01	0.85	680	696	+	0.887	1	acctgtgagGTAAaacg
V\$HBOX	V\$EVX1.01	0.84	463	481	-	0.887	1	aaaaactcATTAgctgggt
V\$DLXF	V\$DLX1.02	0.88	634	652	+	0.886	1	ggctttgtgcAATTaocat
V\$PARF	V\$VBP.01	0.86	451	467	+	0.886	1	ttgcttaaaGTAAacca
V\$PAX3	V\$PAX3.02	0.85	1984	2002	-	0.885	1	gacgTCACtctgaccattt
V\$HNF1	V\$HNF1.04	0.84	1742	1758	+	0.885	1	ccttttaaGTTAcctga
V\$NFAT	V\$NFAT5.02	0.87	787	805	+	0.885	1	cttGGAAagggttaattac
V\$SORY	V\$SOX15.01	0.88	373	397	+	0.885	1	attatACAAtacaaccctcacaaca
V\$BARB	V\$BARBIE.01	0.88	520	534	-	0.884	1	aacaAAAGgcatagg
V\$STAT	V\$STAT6.01	0.84	1175	1193	-	0.883	0.793	ggtTACCTtgaagggtgt
V\$ABDB	V\$HOXB9.01	0.88	1055	1071	+	0.883	1	ggcagcctTAAAactgg
V\$DLXF	V\$DLX4.01	0.88	1193	1211	-	0.882	1	tctgacttatAATTtctg
V\$XBBF	V\$RFX4.02	0.88	995	1013	+	0.882	0.821	gtttctacttcGGTAcggc
V\$GCMF	V\$GCM1.03	0.83	983	997	+	0.882	0.815	agatcCCCAtatgtt
V\$FKHD	V\$FHXB.01	0.83	55	71	-	0.882	1	tttggTATAaatttt
V\$SORY	V\$SRY.02	0.88	46	70	-	0.882	0.775	ttggtATAAaattttgagagcaa
V\$OCT1	V\$OCT1.06	0.81	54	68	-	0.882	1	ggtataatAATTtg
V\$NR2F	V\$HNF4.02	0.76	544	568	+	0.881	0.75	atgccagggccCAAGtcatgttag
V\$LEFF	V\$TCF7.01	0.85	1971	1987	+	0.88	0.805	tctgcatGAAAggaaat
V\$MYT1	V\$MYT1.02	0.88	1867	1879	-	0.88	1	ccaAAGTtgcctc
V\$CLOX	V\$CLOX.01	0.81	1628	1646	-	0.88	0.804	cttaATCCatccttaaagg
V\$PERO	V\$PPARG.02	0.88	1614	1636	-	0.88	0.892	ccttaaaggccAGAGcctcct
V\$PLZF	V\$PLZF.01	0.86	903	917	+	0.88	0.958	aggTAAAgcctccc
V\$SORY	V\$HBP1.02	0.83	210	234	-	0.88	1	cacattaAATGgatcgatagacat
V\$MEF2	V\$SL1.01	0.84	228	250	+	0.879	1	taatgtCTATcaatactgggtg
V\$AP1R	V\$NFE2.01	0.85	924	944	+	0.878	1	caagcCTGActcatcatctcc
V\$BRN5	V\$BRN5.04	0.83	619	641	+	0.878	1	tcttgtgtctaATTAgccttgt
V\$BRNF	V\$BRN2.04	0.82	622	640	-	0.878	1	caaagccTAATtagacaca
V\$HNF1	V\$HNF1.04	0.84	1315	1331	+	0.877	1	tcataataGTTAagct
V\$PAX6	V\$PAX6.04	0.83	984	1002	+	0.877	0.944	gatCCCAcatgtttctac
V\$CREB	V\$ATF2.01	0.87	679	699	+	0.877	0.778	aacctGTAGgtaaacgtgt
V\$FAST	V\$FAST1.01	0.81	363	379	+	0.877	1	ttactgtatATTatatac
V\$ZF10	V\$PRDM14.01	0.85	1142	1156	-	0.876	1	tcaTTAGagaagcct
V\$SORY	V\$SOX5.01	0.87	1559	1583	+	0.875	1	agcagaCAATattttgagaatgct
V\$NF1F	V\$NF1.04	0.87	1451	1471	+	0.875	1	gcactggtaaagaGCCAgatt

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$CAAT	V\$ACAAT.01	0.83	915	929	+	0.875	0.75	cccaCAAAatcaagcc
V\$STAT	V\$STAT5A.01	0.84	746	764	-	0.875	1	accctTTCaagacaaattt
V\$BNCF	V\$BNC.01	0.85	808	826	-	0.874	1	gttgcaattcTGTCcctag
V\$HOMF	V\$HMX2.02	0.82	684	702	+	0.874	1	gtgaggtAAACgtgttat
V\$GRHL	V\$GRHL1.01	0.86	676	688	-	0.874	1	ctcacaGGTTggt
V\$HOXF	V\$HOXB3.01	0.84	465	483	+	0.874	1	ccagcTAATgagttttga
V\$BNCF	V\$BNC.01	0.85	1808	1826	+	0.873	1	catgctgcctTGTCccacc
V\$HBOX	V\$GSH1.01	0.85	1034	1052	+	0.873	1	ttctgcagaaTAATggtct
V\$BRN5	V\$BRN5.04	0.83	835	857	+	0.873	1	agatctgcctgATTAcgaagtc
V\$HBOX	V\$GSH1.01	0.85	254	272	+	0.873	1	aatagtatctTAATggtgt
V\$SRFF	V\$SRF.04	0.86	1623	1641	+	0.872	0.901	ctggccctTAAAGgatgga
V\$YY1F	V\$YY2.02	0.82	1281	1303	+	0.871	1	ccaggcCCATtacatcagaatgg
V\$EREF	V\$ESRRA.01	0.87	1180	1202	+	0.871	1	ttccAAGGtaaaccagaaaatta
V\$FAST	V\$FAST1.01	0.81	640	656	-	0.871	0.85	atctatgtTAATTgcac
V\$IRFF	V\$IRF7.01	0.86	2067	2087	-	0.87	1	caaaGAAAaagaattctaaga
V\$BRNF	V\$BRN2.01	0.86	1291	1309	+	0.87	0.9	taCATCagaatggtaccca
V\$IRXF	V\$IRX3.01	0.86	361	373	-	0.87	0.772	tataCAAGtaagg
V\$PAX3	V\$PAX3.02	0.85	80	98	-	0.87	1	catcTCACactgctgttga
V\$LHXF	V\$ISL1.01	0.82	1035	1057	+	0.869	1	tctgcagaaTAATggtctgaggc
V\$HOXF	V\$HOXD3.01	0.85	635	653	-	0.869	1	tatgttAATTgcacaaagc
V\$RP58	V\$RP58.01	0.84	1332	1344	-	0.867	1	gaatCATCtggga
V\$LHXF	V\$LHX2.01	0.85	461	483	+	0.867	0.77	taaccagctAATGagtttttga
V\$RP58	V\$RP58.01	0.84	1093	1105	+	0.866	1	taacCATCtgggc
V\$NBRE	V\$NBRE.01	0.86	789	803	+	0.866	1	tggaAAGGttaaatt
V\$XBBF	V\$RFXDC2.01	0.83	1427	1445	+	0.865	0.774	aggtttcatagGAActtc
V\$BRNF	V\$BRN2.01	0.86	704	722	+	0.865	1	tcCATTctacagatgagaa
V\$IRFF	V\$ISGF3G.01	0.82	272	292	-	0.865	0.753	tcagaaaaacGCAActgaaaa
V\$GATA	V\$GATA3.03	0.82	711	723	+	0.864	0.758	tacaGATGagaaa
V\$PARF	V\$DBP.01	0.84	31	47	+	0.864	0.885	agagaTAATgccagatt
V\$EREF	V\$ER.02	0.81	1984	2006	-	0.863	1	aaggacGTCActctgaccattt
V\$BRNF	V\$BRN2.01	0.86	637	655	-	0.863	0.8	tcTATGttaaattgcacaaa
V\$OCT1	V\$OCT1.03	0.85	467	481	-	0.863	1	aaaaactcATTAgct
V\$ETSF	V\$ERG.01	0.84	285	305	-	0.863	0.769	gatgtacTGGAAatcagaaaa
V\$IRXF	V\$IRX3.01	0.86	362	374	+	0.862	0.772	cttaCTTGtatat
V\$CDXF	V\$CDX2.02	0.85	346	364	+	0.862	1	tcatctgtTTATatccctt
V\$GFI1	V\$GFI1B.01	0.86	283	297	-	0.862	1	ggaAATCagaaaaac
V\$MEF2	V\$SL1.01	0.84	118	140	-	0.862	1	agatattCTATatagagagattc
V\$MEF2	V\$SL1.01	0.84	103	125	-	0.862	1	agagattCTATatagagagatat
V\$ZF10	V\$PRDM14.01	0.85	1891	1905	+	0.861	1	ctcTTAGagaaagca
V\$STAT	V\$STAT6.01	0.84	780	798	+	0.861	0.759	aattTGCcttggaaaggtt
V\$BRN5	V\$BRN5.03	0.76	469	491	+	0.861	1	cTAATgagttttgagctgaaat
V\$EVI1	V\$EVI1.02	0.83	1704	1720	+	0.86	0.75	tggatAAGTtaaggaag
V\$HOXF	V\$HOXB5.01	0.84	1549	1567	+	0.86	0.763	gcagaTTATtagcagacaa
V\$PDX1	V\$IPF1.01	0.84	466	484	-	0.86	0.789	ctcaaaaacTCATtagctg

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$SIXF	V\$SIX1.01	0.84	229	243	+	0.859	1	aatgtgcTATCaata
V\$HBOX	V\$VAX1.01	0.84	637	655	+	0.858	1	ttgtgcAATTaacataga
V\$AP1R	V\$NFE2.01	0.85	334	354	-	0.858	0.806	aacagATGAttcacaataggc
V\$HOXC	V\$HOX_PBX.01	0.81	212	228	-	0.858	0.944	aaatGGATcgatagcac
V\$HBOX	V\$GSH1.01	0.85	1581	1599	-	0.857	1	tcctgcctcTAATgcagc
V\$ZF10	V\$PRDM14.01	0.85	1584	1598	+	0.857	1	gcaTTAGagcatgg
V\$FKHD	V\$FHXB.01	0.83	1558	1574	+	0.857	0.909	tagcagACAAtattttg
V\$HAML	V\$AML3.01	0.84	1361	1375	-	0.857	1	aacaGTGGttctcaa
V\$PDX1	V\$IPF1.01	0.84	461	479	+	0.857	1	taaccagcTAATgagttt
V\$HOXF	V\$HOXD3.01	0.85	1521	1539	+	0.856	0.767	cttaatAATCaccagat
V\$STAT	V\$STAT5A.01	0.84	1327	1345	+	0.856	1	aagTTCcagatgattcc
V\$RP58	V\$RP58.01	0.84	987	999	-	0.856	0.753	gaaaCATAtgggg
V\$IRFF	V\$ISGF3G.01	0.82	1831	1851	-	0.854	1	tgcatcaaaaGAAAcagaaac
V\$ETSF	V\$SPDEF.01	0.85	1250	1270	-	0.854	0.803	gtgcatcAGGAttttttaag
V\$NR2F	V\$COUP.02	0.84	896	920	+	0.854	0.75	tggtgtaaggTAAAgcctcccaca
V\$HAND	V\$TAL1BETAITF2.01	0.85	1818	1838	-	0.853	1	acagaaaCAGAaggtgggaca
V\$MEF2	V\$SL1.01	0.84	1643	1665	+	0.853	0.773	taagggaCTActtttaaggctgt
V\$AP1R	V\$MARE.03	0.82	1077	1097	+	0.853	1	ccctGCTGcttcacattaacc
V\$PARF	V\$TEF.01	0.85	896	912	+	0.853	1	tggtgtaagGTAAaggc
V\$ABDB	V\$HOXC9.01	0.83	638	654	+	0.853	1	ttgtgcaaTTAAcatag
V\$PRDF	V\$PRDM1.01	0.81	1533	1551	-	0.852	1	tcagtgGAAActatctggg
V\$FKHD	V\$FKHRL1.01	0.83	1182	1198	+	0.852	0.75	ccaaggtaAACcagaaa
V\$CDXF	V\$CDX2.01	0.84	1055	1073	-	0.852	1	ggccagtTTTAaggctgcc
V\$HOXC	V\$MEIS1.03	0.85	913	929	-	0.852	1	ggcttGATTtggtggag
V\$HNF1	V\$HNF1.04	0.84	642	658	-	0.851	1	taatctatGTTAattgc
V\$NFAT	V\$NFAT5.01	0.83	1979	1997	+	0.85	1	aaaGGAAtggtcagagtg
V\$GREF	V\$PRE.01	0.84	1769	1787	+	0.85	1	aggactatctTGTTctca
V\$OCT1	V\$OCT1.03	0.85	1517	1531	+	0.85	0.767	cattcttaATAAtca
V\$NR2F	V\$COUP.02	0.84	946	970	-	0.85	1	gggaagcaggTCAAgacctggctct
V\$ETSF	V\$ETS2.01	0.84	1607	1627	+	0.849	1	tggaacAGGAggcctctggc
V\$HOXF	V\$HOXB5.01	0.84	1546	1564	-	0.849	1	tctgcTAATaatctgcagt
V\$HNF1	V\$HNF1.02	0.77	1546	1562	-	0.849	1	tcTAATaatctgcagt
V\$ATBF	V\$ATBF1.01	0.79	619	635	+	0.849	1	tcttgtgtctAATtagg
V\$OCT1	V\$POU2F3.01	0.8	1966	1980	-	0.848	1	ttcATGCagataact
V\$CART	V\$PRRX1.01	0.83	460	480	-	0.848	0.753	aaaactCATTagctgggttac
V\$HNF1	V\$HNF1.04	0.84	1959	1975	+	0.847	1	aggatgcaGTTAtctgc
V\$ABDB	V\$HOXC10.01	0.83	1208	1224	+	0.847	0.813	cagagtccTTAAacgtg
V\$CLOX	V\$CLOX.01	0.81	411	429	-	0.847	0.807	cttcATCTatactgctggc
V\$NR2F	V\$COUP.01	0.82	1611	1635	-	0.846	0.779	cttaaaggccagAGGCctctgtt
V\$MEF2	V\$SL1.01	0.84	1012	1034	+	0.846	1	gccaggaCTATacctactatctt
V\$CDXF	V\$CDX2.01	0.84	1648	1666	+	0.845	1	gactactTTTAaggctgta
V\$HOXF	V\$HOX1-3.01	0.82	1576	1594	-	0.845	1	gcctcTAATgcagcatttc
V\$PAX6	V\$PAX6.04	0.83	1329	1347	+	0.845	0.778	gctTCCcagatgattccaa
V\$BRN5	V\$BRN5.01	0.74	644	666	+	0.845	1	aattaaCATAgattttccttg

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$PAX6	V\$PAX6.04	0.83	568	586	-	0.845	0.889	cttCCTCgttttttttc
V\$NR2F	V\$PNR.01	0.79	480	504	-	0.845	1	catctggacTCAAatttcagctcaa
V\$PARF	V\$HLF.01	0.84	370	386	-	0.845	0.8	ttgtattgtATAAtata
V\$HNF1	V\$HNF1.04	0.84	22	38	-	0.845	1	ttatctctGTTAaggtt
V\$NFAT	V\$NFAT5.01	0.83	1681	1699	-	0.844	0.75	aatGAAAAaaagcagcctg
V\$NF1F	V\$NF1.01	0.82	1451	1471	-	0.843	0.763	aatCTGGctctttaccagtgc
V\$FKHD	V\$FREAC2.01	0.84	1452	1468	+	0.843	1	cactggTAAAgagccag
V\$NKXH	V\$NKX31.01	0.84	1240	1258	-	0.843	1	tttttAAGTcacaagtg
V\$PERO	V\$PPARG.03	0.83	780	802	+	0.843	1	aattgccttgAAAAGgttaaat
V\$NFAT	V\$NFAT5.01	0.83	648	666	-	0.843	1	caaGGAATAaatctatggtt
V\$PAXH	V\$PAX4.02	0.84	465	479	-	0.843	0.751	aaactCATTagctgg
V\$FKHD	V\$FHXB.01	0.83	386	402	+	0.843	0.909	accctACAACagctct
V\$HOXF	V\$HOXA5.01	0.84	836	854	-	0.842	0.762	cttgtAATCaggcagatc
V\$HEAT	V\$HSF1.01	0.84	765	789	+	0.842	1	taaattacagctAGAAatttgcctt
V\$ZF57	V\$ZFP57.01	0.84	1863	1875	-	0.841	1	agtTGCctcataa
V\$GCMF	V\$GCM1.03	0.83	1661	1675	-	0.841	1	acttgCCCCtacagc
V\$PDX1	V\$IPF1.01	0.84	1545	1563	+	0.841	0.763	cactgcagaTTATtagcag
V\$HOXF	V\$HOX1-3.01	0.82	1146	1164	+	0.841	1	ttctTAATgaagccaat
V\$HOXF	V\$HOXA3.02	0.84	1515	1533	-	0.84	1	ggtgattATTAagaatgta
V\$ABDB	V\$HOXA13.01	0.81	1450	1466	+	0.84	1	agcactggTAAAgagcc
V\$DMRT	V\$DMRT3.01	0.79	303	323	+	0.838	1	atctttcaTACAttgacca
V\$CREB	V\$ATF.02	0.83	1989	2009	-	0.837	0.75	cccaagGGACgtcactctgac
V\$BRNF	V\$BRN3.03	0.83	1516	1534	+	0.837	1	acattctTAATaatcaccc
V\$LHXF	V\$ISL1.01	0.82	182	204	+	0.837	1	acctgaactTAATagtgccagac
V\$STEM	V\$OSNT.01	0.78	1031	1049	+	0.836	0.76	tctttctGCAGaataatgg
V\$PRDF	V\$BLIMP1.01	0.81	965	983	-	0.836	1	tggagaGAAAActggggaag
V\$P53F	V\$P53.07	0.79	946	970	+	0.836	0.803	agagcCAGGtcttgacctgctccc
V\$E4FF	V\$E4F.01	0.82	684	696	+	0.836	0.789	gtgAGGTaaaacg
V\$HNF1	V\$HMBOX.01	0.83	1449	1465	+	0.835	0.797	gagcactgGTAAAgagc
V\$NR2F	V\$TR2_TR4.01	0.77	1974	1998	+	0.834	1	gcatgaaaggaatGGTCagagtga
V\$HNF1	V\$HMBOX.01	0.83	1088	1104	-	0.834	1	cccagatgTTAatgtg
V\$P53F	V\$P53.07	0.79	945	969	-	0.834	0.803	ggaagCAGGtcaagacctgctcta
V\$BRN5	V\$BRN5.04	0.83	220	242	-	0.834	1	attgatagcacATTAaatggatc
V\$SORY	V\$HBP1.02	0.83	1298	1322	-	0.833	1	tattatgAATGcctgggtaccattc
V\$GRHL	V\$GRHL3.01	0.82	690	702	-	0.833	0.761	ataacaCGTTtta
V\$OVOL	V\$OVOL1.01	0.8	1961	1975	+	0.832	1	gatgcaGTTAtctgc
V\$SP1F	V\$SP2.01	0.8	1816	1832	-	0.832	1	acagaaggtgGGACaag
V\$SRFF	V\$SRF.03	0.79	1622	1640	-	0.832	0.787	ccatcttaaAGGGccaga
V\$ABDB	V\$HOXC9.01	0.83	1517	1533	-	0.832	1	ggtgattaTTAAaatg
V\$ABDB	V\$HOXA13.01	0.81	508	524	+	0.832	1	aggaccccTAAAcctat
V\$CART	V\$PRRX2.01	0.83	465	485	+	0.832	0.751	ccagctAATGagttttgagc
V\$PBXC	V\$PBX1_MEIS1.02	0.77	336	352	-	0.832	1	cagaTGATcacaatag
V\$BRN5	V\$BRN5.04	0.83	200	222	-	0.832	1	atcgatagcacATTAaaagtctg
V\$NKXH	V\$NKX29.01	0.81	1204	1222	+	0.831	0.778	aagtcagaGTCcttaaagc

Family	Matrix	Opt. Th.	Start	End	St	Mt sim.	Core sim.	Sequence
V\$DMTF	V\$DMP1.01	0.82	1955	1967	+	0.83	1	agccaGGATgcag
V\$PERO	V\$PPAR_RXR.01	0.76	543	565	+	0.83	1	catgccagggcccaAGGTcatgt
V\$RORA	V\$REV-ERBA.02	0.79	1196	1218	+	0.829	1	aaaattataaGTCAgagtcctta
V\$PAX6	V\$PAX6.01	0.75	917	935	-	0.829	0.755	gagtcAGGCTtgattgtg
V\$HNF6	V\$OC2.01	0.82	647	663	-	0.829	1	ggaaatAATCtatgta
V\$DMRT	V\$DMRT5.01	0.8	1824	1844	+	0.828	0.753	acctctGTTTctgttcttt
V\$HOXC	V\$HOX_PBX.01	0.81	1631	1647	+	0.828	0.944	ttaaGGATggattaagg
V\$LHXF	V\$ISL1.01	0.82	1222	1244	-	0.828	1	aagtgattTAATgtcagccac
V\$OVOL	V\$OVOL1.01	0.8	356	370	+	0.828	0.75	atatccCTTActgt
V\$HNF1	V\$HNF1.01	0.8	1081	1097	-	0.827	1	gGTTAatgtgaagcagc
V\$E4FF	V\$E4F.01	0.82	1286	1298	-	0.825	0.842	ctgATGTaatggg
V\$RREB	V\$RREB1.01	0.8	2007	2021	-	0.824	1	cCCCAacacaagccc
V\$AP1R	V\$MARE.03	0.82	1044	1064	-	0.822	1	taagGCTGcctcagaccatta
V\$CAAT	V\$NFY.03	0.81	465	479	+	0.822	0.75	ccagCTAAtgagttt
V\$OVOL	V\$OVOL1.01	0.8	22	36	-	0.822	1	atctctGTTAaggtt
V\$OCT1	V\$OCT.01	0.78	1687	1701	-	0.821	0.857	agaATGAaaaaaagc
V\$NKXH	V\$NKX31.02	0.81	1205	1223	-	0.821	0.764	acgtttaaGGACtctgact
V\$OCT1	V\$OCT.01	0.78	301	315	-	0.821	0.857	tgtATGAaaagatgt
V\$PAX2	V\$PAX2.01	0.78	1539	1561	-	0.82	1	gctaataatctgcagtgAAACta
V\$HNF1	V\$HNF1.03	0.8	1520	1536	+	0.82	0.77	tCTTAataatcacccca
V\$GRHL	V\$GRHL3.01	0.82	691	703	+	0.82	0.761	aaaacgTGTTatc
V\$HBOX	V\$EN1.01	0.77	588	606	-	0.82	1	tgttcaaaTTTAttgtgc
V\$ABDB	V\$HOXD11.01	0.81	1720	1736	+	0.819	0.779	gtgggtccTGAAtgga
V\$AP1R	V\$TCF11MAFG.01	0.81	1075	1095	-	0.818	0.778	ttaatGTAAgcagcagggtct
V\$BRNF	V\$BRN3.01	0.78	646	664	+	0.818	1	ttaacatagATTAttctt
V\$BRN5	V\$BRN5.01	0.74	318	340	-	0.818	0.75	aataggCAAAatttagatgggtca
V\$OVOL	V\$OVOL1.01	0.8	1367	1381	+	0.817	1	accactGTTAcggca
V\$CREB	V\$E4BP4.01	0.8	895	915	+	0.817	1	ctggtgtaagGTAAaggcctc
V\$BRN5	V\$BRN5.03	0.76	227	249	+	0.817	1	tTAATgtgtatcaatactgggt
V\$CREB	V\$E4BP4.01	0.8	1744	1764	-	0.816	1	agaggctcagGTAActtaaaa
V\$CREB	V\$E4BP4.01	0.8	450	470	+	0.816	1	gttgcttaaaGTAAccagct
V\$NGRE	V\$IR1_NGRE.01	0.81	434	448	+	0.816	1	taagtctgGGAGaaa
V\$HESF	V\$BHLHB2.02	0.8	1215	1229	+	0.815	1	cttaaaCGTGgctgc
V\$OCT1	V\$POU3F3.01	0.81	1310	1324	+	0.814	0.758	ggcatTCATaatagt
V\$HNF6	V\$HNF6.01	0.81	1633	1649	-	0.813	0.806	tcctctaaTCCAtcctt
V\$OCT1	V\$POU3F3.01	0.81	1969	1983	+	0.812	1	tatctGCATgaaagg
V\$DMRT	V\$DMRT3.01	0.79	1266	1286	+	0.812	1	tgactagtTACAaccaggc
V\$AP1R	V\$TCF11MAFG.01	0.81	660	680	-	0.812	0.815	ttgttgTGAGgaagcaaggaa
V\$CLOX	V\$CLOX.01	0.81	134	152	-	0.812	0.807	gaatATCTatatagatatt
V\$CLOX	V\$CLOX.01	0.81	133	151	+	0.812	0.807	gaatATCTatatagatatt
V\$GLIF	V\$GLI1.02	0.81	908	922	+	0.811	0.793	aaggCCTCccacaaa
V\$NR2F	V\$PNR.01	0.79	1233	1257	-	0.81	0.782	ttttaagtTCACaagtgatttaa
V\$HOMF	V\$HMX2.03	0.81	218	236	-	0.81	1	agcacaTTAAatggatcga
V\$P53F	V\$P53.07	0.79	845	869	-	0.809	0.803	tggaaCAGGcgtggacttggaatc

<i>Family</i>	<i>Matrix</i>	<i>Opt. Th.</i>	<i>Start</i>	<i>End</i>	<i>St</i>	<i>Mt sim.</i>	<i>Core sim.</i>	<i>Sequence</i>
V\$RXRF	V\$CAR_RXR.01	0.75	552	576	+	0.808	1	gccccaaGGTCatgttagaaaaaaaa
V\$HNF1	V\$HNF1.01	0.8	1322	1338	+	0.807	1	aGTTAaagcttcccaga
V\$HNF1	V\$HNF1.02	0.77	1518	1534	-	0.805	0.762	gggTGATtattaagaat
V\$RXRF	V\$RAR_RXR.01	0.78	954	978	-	0.804	1	agaaactggggaagcAGGTcaagac
V\$PTF1	V\$PTF1.01	0.76	1453	1473	-	0.803	0.857	gaaaCTGgctctttaccagt
V\$HBOX	V\$EN1.01	0.77	319	337	-	0.803	1	aggcaaaaTTTAgatggtc
V\$BRNF	V\$BRN3.01	0.78	149	167	+	0.803	1	attctatatATTAtaccta
V\$MEF2	V\$MEF2.01	0.77	1515	1537	+	0.802	0.75	tacattctTAATaatcaccccag
V\$P53F	V\$P53.05	0.78	1993	2017	-	0.801	1	aacaCAAGcccaaggacgtcactc
V\$GABF	V\$GAGA.01	0.78	1790	1814	+	0.801	1	ccgggAGAGcgggaggggcatgctg
V\$GREF	V\$ARE.01	0.8	686	704	+	0.801	1	gaggtaaacgTGTTatct
V\$DICE	V\$DICE.01	0.8	1167	1181	+	0.8	0.811	ggatCTCAacacctt
V\$P53F	V\$P53.06	0.77	846	870	+	0.8	0.938	attacCAAGtccacgcctgtccac

Opt. Th: optimum threshold; **Start:** TFBS start position; **End:** transcription factor binding sites end position; **St:** strand; **Mt sim:** matrix similarity; **Core sim:** core similarity. La casilla de color gris señala las características de union de PITX1. Para PITX las letras rojas corresponden al índice consenso (CI) de union al vector > 60%. El intervalo de confianza para la matriz representa el grado de conservación de cada posición dentro de la matriz (maxima de 100). Letras mayúsculas: secuencia central o *core* de una matriz definida como la secuencia consecutiva (generalmente 4 nucleótidos) más altamente conservada.

11.2 Anexo 2 Articulo

***BMP15* c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure**

Dora Janeth Fonseca a,b, Oscar Ortega-Recalde a, Clara Esteban-Perez c, Harold Moreno-Ortiz c, Liliana Catherine Patiño a, Olga María Bermúdez a, Angela María Ortiz a, Carlos M Restrepo a,b, Elkin Lucena a, Paul Laissue a,b,*

Reprod Biomed Online. 2014 Nov;29(5):627-33.