



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Identificación de variantes de un solo nucleótido de  
significado incierto en el gen *FOXL2* posiblemente  
asociadas con insuficiencia ovárica prematura idiopática.**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de:**

**Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

**P R E S E N T A :**

**Jorge Alberto Cerón Albarrán**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Irma Eloisa Monroy Muñoz**

**ASESORA INTERNA:**

**M. en C. Maritere Domínguez Rojas**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÉS FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
EXÁMENES PROFESIONALES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Identificación de variantes de un solo nucleótido de significado incierto en el gen FOXL2 posiblemente asociadas con insuficiencia ovárica prematura idiopática.**

Que presenta el pasante: **Jorge Alberto Cerón Albarrán**

Con número de cuenta: **309026808** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**


Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Agosto de 2019.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. María Esther Revuelta Miranda	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
<b>1er. SUPLENTE</b>	LDB. Larisa Andrea González Salcedo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg/cga\*



**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética y Genómica Humana del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes”, bajo la dirección de la Dra. Irma Eloisa Monroy Muñoz.**

“No son problemas, son oportunidades de mejorar y superar adversidades”.

Javier Ibarra

“Se feliz, en esta vida somos efímeros”.

Salvador Mendoza Parra

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, especialmente al Laboratorio de Genómica Molecular del Departamento de Genética y Genómica Humana.

A mi asesora, la Doctora Irma Eloisa Monroy Muñoz por brindarme confianza de participar en este proyecto, por las oportunidades, por su dedicación y por todo el aprendizaje que he adquirido bajo su dirección a lo largo de la elaboración de esta tesis. Gracias por todo el apoyo y sobre todo por creer en mí y en mis capacidades, es usted una excelente profesional pero sobre todo una gran persona a la cual respeto y admiro mucho.

Gracias a mi profesora de secundaria Ofelia Jaimes Hernández por sembrar en mí el gusto por la lectura, a mi profesor de preparatoria Miguel Eligio por inculcarme el gusto por la ciencia y a la M. en C. Maritere Dominguez Rojas porque a cada clase logró transmitirme su gusto por la biología y genética molecular Sin dichas enseñanzas no habría podido llegar al lugar donde me encuentro ahora.

Gracias a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por abrirme las puertas para brindarme un espacio en el cual logré desarrollarme integralmente. Agradezco a cada profesor que con gusto y esmero transmiten conocimientos y motivación a sus alumnos para ser mejores profesionistas pero sobre todo mejores personas.

*“Por mi raza hablará el espíritu”*

## DEDICATORIAS

Dedico el presente trabajo a mi familia, especialmente a mi madre, a mi padre y a mi hermano, a quienes admiro, entre otras cosas he aprendido a siempre superarme, a valorarme y no sentirme menos ante nadie gracias por todo el cariño, el apoyo y por la paciencia que me han tenido.

A mi gran familia por ser un gran ejemplo para mí, espero algún día llegar a ser tan inteligente e inspirar el mismo respeto y admiración que ustedes inspiran en mí.

A mis amigos, quienes se han convertido en mi familia de quienes tengo los recuerdos más felices de mi juventud y han sido parte importante de este camino, espero sigamos recorriendo más y formando nuevos recuerdos.

A la persona quien ha creído en mí, por el cariño, por todo el apoyo y por tener siempre un abrazo para cuando más lo necesito.

A quienes que por algún motivo ya no están, han sido parte importante en mi crecimiento como persona, de ustedes me llevo un gran aprendizaje y un pedazo de cada uno conmigo siempre. “Nadie podrá quitarnos lo que hicimos ya”.

# ÍNDICE

1.	Abreviaturas.....	3
2.	Índice de figuras.....	6
3.	Índice de tablas.....	7
4.	Resumen.....	9
I.	Introducción.....	11
II.	Marco Teórico.....	12
	2.1 Insuficiencia Ovárica prematura.....	12
	2.1.1 Presentación clínica.....	12
	2.1.2 Prevalencia.....	13
	2.1.3 Padecimientos asociados.....	13
	2.1.4 Diagnóstico.....	13
	2.1.5 Tratamiento.....	14
	2.1.6 Etiología.....	16
	2.2 Foliculogénesis.....	18
	2.3 FOXL2.....	21
	2.3.1 <i>FOXL2</i> y su relación en el ciclo celular.....	23
	2.3.2 SIRT1.....	25
	2.3.3 SMAD3.....	26
	2.3.4 StAR.....	27
	2.3.5 DP103.....	27
	2.3.6 DMRT1.....	28
	2.3.7 CYP19A1.....	28
	2.3.8 FST.....	28
	2.3.9 SF-1.....	28
	2.3.10 COL1A2.....	29
	2.3.11 ESR1.....	29
	2.3.12 MiRNAs.....	29
	2.3.13 Multimerización.....	30

III.	Justificación.....	30
IV.	Objetivos.....	31
V.	Hipótesis.....	32
VI.	Metodología.....	32
	6.1 Selección de pacientes.....	32
	6.2 Extracción de DNA.....	33
	6.3 MLPA.....	33
	6.4 PCR.....	36
	6.5 Secuenciación.....	40
	6.6 Análisis bioinformático.....	42
VII.	Resultados .....	43
VIII.	Análisis de resultados y discusión .....	50
IX.	Conclusiones.....	56
X.	Referencias.....	58



## ABREVIATURAS

AMH	Hormona Anti-Mülleriana
AMPC	Adenosin Monofosfato cíclico
ATF3	Factor de Activación Transcripcional 3
BANF1	Barrera del factor de autointegración
BCL2A1	Proteína Célula B Linfoma 2 Asociado a Proteína 2
BLAST	Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local
BPEI	Blefarofimosis Ptois Epicanto Inverso
CG	Células de la Granulosa
CH25H	Colesterol 25-Hidroxilasa
CNV's	Variantes en el Número de Copias
COL1A2	Colágeno tipo 1 Cadena Alfa 2
CYP17	17- Alfa Hidroxilasa
CYP19	Aromatasa
DAX-1	Receptor Nuclear Huérfano
dbSNP	Database of Single Nucleotide Polymorphism
DMRT1	Factor de Transcripción 1 Relacionado a doblesexualidad y Mab-3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP103	Caja de la Muerte RNA Helicasa Gemin3
DUSP6	Fosfatasa Dual Específica 6
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
ERK1/2	Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares

ESEs	Empalme potenciador
ESR1/2	Receptores de Estrógeno 1 y 2
ESSs	Empalme silenciador
FLRE	Elemento de Respuesta <i>FOXL2</i>
FMR1	Proteína de Retraso Mental Frágil
FOX	Caja de Cabeza de Horquilla
FOXL2	Factor de Transcripción Caja de Cabeza de Horquilla L2
FSH	Hormona Folículo Estimulante
FST	Folistatina
GADD45A	Proteína de Arresto de Crecimiento e Inducible por Daños en el ADN alfa
GF	Factor de Crecimiento
GnRh	Hormona Liberadora de Gonadotropina
IGF	Factor de Crecimiento Insulínico
IGFBP	Proteína Transportadora 3 del Factor de Crecimiento Insulínico
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
IOP	Insuficiencia Ovárica Prematura
LH	Hormona Luteinizante
miRNA	Micro Ácido Ribonucleico
MLPA	Amplificación de Sondas Múltiples Dependientes de Ligasa
MnSOD	Antioxidante Mitocondrial Superóxido Dismutasa de Manganeso
NR2C1	Receptor Sensitivo a Ácido Retinoico
NR5A1/2	Receptores Nucleares Subfamilia 5 grupo A miembros 1 y 2
OSR2	Asociado a Saltos Impares

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGR	Receptor de Progesterona
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RPM	Revoluciones Por Minuto
SCC	Enzima de Escisión de la Cadena Lateral del Colesterol
SF-1	Factor Esteroidogénico -1
SIFT	Transformación de Característica invariante de escala
SIRT1	Sirtulina 1
SMAD3	Madres Contra el Homólogo Decantapléjico
SNP	Polimorfismo de un sólo nucleótido.
SOP	Síndrome de Ovario Poliquístico
SNV's	Variantes de un Sólo Nucleótido
SOX9	Caja de SRY -9
StAR	Proteína Reguladora Aguda Esteroidogénica
TNF $\alpha$ IP3	Factor de Necrosis Tumoral proteína alfa inducida 3
TRH	Tratamiento de Reemplazo Hormonal
TSH	Hormona Tiroestimulante
UBC9	Enzima Conjugadora de Ubiquitina
XRCC6	Proteína Reparadora de DNA

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización citogenética de <i>FOXL2</i> .....	18
Figura 2. La foliculogénesis.....	19
Figura 3. <i>FOXL2</i> inferencia en el desarrollo folicular.....	20
Figura 4. Estructura teórica del dominio forkhead de <i>FOXL2</i> .....	22
Figura 5. Representación esquemática de la acción de <i>FOXL2</i> en blancos confirmados y su actividad reportada en el ciclo celular.....	24
Figura 6. Modelo de acción de <i>FOXL2</i> en la homeostasis de las células de la granulosa.....	26
Figura 7. Gráfica representativa del programa en termociclador para la reacción de MLPA.....	35
Figura 8. Diagrama de PCR punto final en gradiente.....	39
Figura 9. Diagrama de una reacción de purificación por exonucleasa.....	41
Figura 10. Diagrama de una reacción de PCR de secuencia.....	43
Figura 11. Electroferograma de la variante heterocigota hallada en una paciente con diagnóstico de BPEI.....	45
Figura 12. Alineamiento en BLASTn de un fragmento de <i>FOXL2</i> .....	45
Figura 13. Alineamiento en BLASTp de la proteína resultante de la variante NG_012454.1:g.5757_5759del contra la proteína silvestre.....	46
Figura 14. HMM (Modelo oculto de Markov) Logo del alineamiento de la secuencia de proteínas y su conservación.....	46
Figura 15. Análisis con Coffalyzer.NET de una muestra con IOP (Ratio Chart)....	47
Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la proteína <i>FOXL2</i> .....	49
Figura 17. Dominio Forkhead de la proteína de <i>FOXL2</i> .....	50

Figura 18. Electroferograma del cambio heterocigoto de una Adenina por una Guanina NG\_012454.1:g.5833G>A.....50

Figura 19. Electroferograma de los cambios de base NG\_012454.1:g.5852G>C; NG\_012454.1:g.5855G>C; NG\_012454.1:g.5858G>C.....51

Figura 20. Electroferograma del SNP rs7432551 NG\_012454.1:g.5954C>G.....52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presentación clínica de la Insuficiencia Ovárica Prematura.....12

Tabla 2. Enfermedades asociadas a Insuficiencia Ovárica Prematura.....13

Tabla 3. Consideraciones diagnósticas en la evaluación de Insuficiencia Ovárica Prematura.....14

Tabla 4. Condiciones médicas de las pacientes en las que no se recomienda el trh.....15

Tabla 5. Causas iatrogénicas de la Insuficiencia Ovárica Prematura. ....16

Tabla 6. Causas genéticas de la Insuficiencia Ovárica Prematura.....17

Tabla 7. Reactivos y volúmenes para la prueba MLPA Día 1.....36

Tabla 8. Reactivos y volúmenes para la prueba MLPA Día 2. Ligación.....36

Tabla 9. Reactivos y volúmenes para la prueba MLPA Día 2. Reacción de PCR.....36

Tabla 10. Cebadores amplificadores específicos de la región exónica de *FOXL2*, fragmentos 1 a 5.....37

Tabla 11. Reactivos y volúmenes correspondientes para cada reacción de PCR punto final de los fragmentos 4 y 5.....38

Tabla 12. Reactivos y volúmenes correspondientes para amplificación por PCR punto final de los fragmentos 1, 2 y 3.....39

Tabla 13. Temperaturas de alineamiento óptimas experimentales para cada fragmento de la región exónica de <i>FOXL2</i> .....	40
Tabla 14. Reactivos y volúmenes correspondiente para cada reacción de purificación.....	41
Tabla 15. Reactivos y volúmenes utilizados para cada reacción de PCR de Secuencia.....	42
Tabla 16. Total de variantes encontradas en la serie de casos, dentro de la región exónica del gen <i>FOXL2</i> .....	48
Tabla 17. Variantes encontradas en las pacientes con IOP que producen un cambio de aminoácido dentro de la región codificante de <i>FOXL2</i> y su posible impacto en la proteína.....	49

## RESUMEN

La Insuficiencia Ovárica Prematura (IOP) es un padecimiento que afecta del 1-3% de las mujeres en el mundo, varía dependiendo de la etnia y el origen, si existen antecedentes familiares el riesgo de padecer esta enfermedad es mayor. Se caracteriza por amenorrea primaria o secundaria, cantidades elevadas de la Hormona Folículo Estimulante (FSH), la Hormona Luteinizante (LH) y disminución de la producción hormonal de la Hormona Anti-Mülleriana (AMH) y estradiol. La principal problemática de esta patología es la infertilidad, además de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, depresión y un posible efecto perjudicial en la cognición, que en conjunto disminuye considerablemente la calidad de vida de las mujeres. Su etiología es muy variable y puede ser iatrogénica o espontánea, el 90% de las causas espontáneas son desconocidas (idiopáticas). El diagnóstico de esta enfermedad se realiza mediante un perfil hormonal realizado por lo menos en dos ocasiones. En cuanto a las posibles causas de IOP, se han descrito principalmente a los defectos del cromosoma X, los cuales se pueden determinar mediante estudios citogenéticos (cariotipo) o mediante el estudio molecular de la premutación del gen *FMR1*. (Qin, Jiao, Simpson y Chen 2015; Coulam, Adamson, y Annegers, 1985; Rossetti, 2017)

La IOP puede ser idiopática o de origen desconocido, pero a partir del estudio de síndromes autosómicos caracterizados por la presencia de otros defectos estructurales e IOP, se ha propuesto a variantes de ciertos genes como posibles causales de la IOP. Entre estos genes se encuentra *FOXL2*, el cual se asoció inicialmente con el Síndrome de Blefarofimosis Ptosis Epicanto Inverso (BPEI) caracterizado en la mayoría de casos por la presencia de IOP, pero que más tarde se demostró que está involucrado en el desarrollo y mantenimiento de la reserva ovárica. A nivel mundial se han descrito casos de pacientes con infertilidad que presentan mutaciones en *FOXL2* sin presencia de BPEI. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se decidió demostrar que las variantes del gen *FOXL2* pueden estar asociadas al desarrollo de IOP mediante un estudio piloto desarrollado en el departamento de Genética y Genómica humana del INPer. (Torrealdy, Kodaman, Pal 2017; Crisponi, et.al. 2001)

El estudio se realizó en mujeres, pacientes del INPer, menores de 40 años con diagnóstico de IOP, con perfil hormonal completo y cariotipo normal. Se extrajo DNA a partir de muestras de sangre periférica y se realizaron las técnicas de MLPA y de secuenciación tipo Sanger para identificar variantes en la región exónica y analizar con herramientas bioinformáticas si éstas se encuentran asociadas a la patología.

Se encontraron variantes de un solo nucleótido (SNV's) dentro de *FOXL2* que pudieran estar asociadas con el desarrollo de IOP tanto como agente causal, como modificador de efecto. Las variantes sinónimas pueden estar involucradas en elementos de regulación en CIS críticos (como potenciadores o silenciadores, sitios de unión de miRNAs u otros factores transcripcionales), afectar la estructura del RNA mensajero o la velocidad de traducción de la proteína. Se necesitan una mayor cantidad de muestras y análisis de las proteínas para determinar su patogenicidad.



# INTRODUCCIÓN

La Insuficiencia Ovárica Prematura idiopática (IOP) es una patología que afecta en aproximadamente 1-3% de las mujeres menores de 40 años y puede variar dependiendo la etnia o del origen, se define como el cese de la menstruación antes de la edad esperada de la menopausia. La presentación clínica principalmente se diagnostica por la presencia de amenorrea primaria o secundaria, infertilidad/subfertilidad, niveles elevados de FSH y bajos niveles de estradiol y de la hormona anti-Mülleriana.

Su etiología es diversa, se dividen en inducidas y espontáneas, dentro de las últimas las causas reconocidas son: genéticas, autoinmunes, infecciosas e idiopáticas, las cuales representan el 90% de los casos.

La finalidad es identificar si en estos casos, de las causas sin discernir, mediante un estudio piloto si las variantes en el gen *FOXL2* pueden estar asociadas con la IOP, ya que este gen está asociado al desarrollo y mantenimiento folicular dentro del ovario, debido a esto las variaciones en la región exónica.

El estudio se realizó a partir de muestras de sangre periférica utilizando técnicas de genética molecular, secuenciación tipo Sanger y MLPA en el gen *FOXL2* para identificar si existen variantes de nucleótidos en la región exónica y variantes en el número de copias de este gen respectivamente y si estas variantes se encuentran relacionadas con la IOP idiopática.

El estudio bioinformático correspondiente se realiza con Blastn, Mutalyzer, BioEdit y Coffalyzer, se realiza la identificación de variantes y su posible impacto sobre la formación y función de la proteína.

En un futuro se busca encontrar nuevos marcadores pronósticos para IOP y así enfrentar el problema de infertilidad desde temprana edad, así como prever las patologías asociadas.

# MARCO TEÓRICO

## 2.1 INSUFICIENCIA OVÁRICA PREMATURA

La **Insuficiencia Ovárica Prematura (IOP)** o Insuficiencia Ovárica Primaria es el término más utilizado para la condición antes referida como menopausia prematura o falla ovárica prematura; otros términos usados para esta condición son: falla ovárica primaria e hipogonadismo hipergonadotrópico, así como el mal llamado disgénesis gonadal (Nelson, 2009). La IOP se define como el cese de la menstruación antes de la edad esperada de la menopausia (Qin, et.al., 2015).

### 2.1.1 PRESENTACIÓN CLÍNICA

En el año 2017, Torrealday propuso una clasificación de las presentaciones clínicas de la falla ovárica prematura dividiéndolas en anomalías en la menstruación, infertilidad/subfertilidad, síntomas de menopausia, cambios en la pigmentación de la piel y en otras manifestaciones clínicas, tal y como se muestra en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Presentación clínica de la Insuficiencia Ovárica Prematura

<b>Anormalidades en la menstruación</b> Ciclos ausentes que conducen a amenorrea Aparición repentina de amenorrea secundaria Amenorrea Primaria
<b>Infertilidad / Subfertilidad</b>
<b>Síntomas de menopausia</b> (sofocos, sequedad vaginal y alteración del sueño)
<b>Cambios en la pigmentación de la piel</b> Vitiligo (autoinmune) Hiperpigmentación asociada a insuficiencia suprarrenal (autoinmune)
<b>Otras manifestaciones clínicas</b> Pérdida de cabello / alopecia (autoinmune) Bocio (autoinmune) Fatiga Ansiedad / Depresión

(Torrealday, et.al., 2017)

### 2.1.2 PREVALENCIA

En mujeres provenientes de naciones industrializadas, la edad media de la menopausia oscila entre los 50-52 años de edad, la menopausia temprana ocurre antes de los 45 años en el 10% de las mujeres (Rossetti, Ferrari, Bonomi y Persani, 2017).

En la IOP presenta una escasa prevalencia, donde el 1% de las mujeres menores de 40 años presentan IOP (Coulam, et.al. 1985). Sin embargo, este porcentaje llega a alcanzar de 13 a 30% si la IOP es de origen familiar. La IOP está presente en un rango de 10-28% de los casos de amenorrea primaria, en el 4-18% de la secundaria y es tres veces más frecuente entre gemelos monocigóticos y dicigóticos.

La etnia también es un factor a considerar en su prevalencia. La IOP presenta una frecuencia del 1% en la etnia caucásica, 1.4% en la afroamericana, 1.4% en la centroamericana, 0.5% en la china y en 0.14% en la japonesa (López, Flores y Romeru, 2015).

### 2.1.3 PADECIMIENTOS ASOCIADOS

La IOP está asociada a otros padecimientos debido a la baja producción hormonal, principalmente de estrógeno, los más relevantes se presentan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Enfermedades asociadas a Insuficiencia Ovárica Prematura

Padecimientos asociados a la IOP
Reducción de la densidad mineral de los huesos, asociado al incremento de riesgo de fracturas.
Incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares
Impacto negativo significativo en la salud psicológica y la calidad de vida.
Impacto negativo en la vida sexual de las mujeres
Posible efecto perjudicial en la cognición cuando se planea histerectomía

(Webber, et.al., 2016)

### 2.1.4 DIAGNÓSTICO

Esta condición se considera presente cuando mujeres menores de 40 años tienen amenorrea primaria o secundaria (Rossetti, 2017) por 4 meses o más y bioquímicamente se manifiesta con niveles elevados de FSH (>40 IU/l) confirmado en al menos dos ocasiones, cuyas determinaciones se obtuvieron con al menos 1 mes de diferencia (Nelson, 2009), además de bajos niveles de estradiol y hormona anti-Mülleriana (Rossetti, et.al., 2017).

Para el diagnóstico Torrealday propone, se deben tener en cuenta diversas pruebas de laboratorio: hormonales, cariotipo, anticuerpos, así como el uso de imágenes como Rayos X, ultrasonido (Ver **Tabla 3**).

**Tabla 3.** Consideraciones diagnósticas en la evaluación de Insuficiencia Ovárica Prematura

Pruebas de laboratorio	Utilidad
Gonadotropina coriónica humana	Excluye embarazo
Hormona folículo estimulante (FSH)	Evalúa el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.
Hormona anti-Mülleriana	Evalúa la reserva ovárica.
Cariotipo, <i>FMR1</i> premutación	Se evalúa para causas genéticas.
Hormona tiroestimulante (TSH)	Evalúa la función de la tiroides
Anticuerpo antiperoxidasa tiroidea	Cuantifica el riesgo de disfunción tiroidea y adrenal.
Anticuerpo 21-hidroxilasa	
Test radiológicos	
Ultrasonido transvaginal	Evalúa el recuento de los folículos antrales para valorar la reserva ovárica.
Absorciometría de rayos x de energía dual	Valora la densidad ósea.

(Torrealday, et.al., 2017)

### 2.1.5 TRATAMIENTO

El tratamiento de reemplazo hormonal (trh) es recomendado en pacientes con hipoestrogenismo, específicamente en IOP, el reemplazo hormonal se realiza a través del implante transdérmico o transvaginal con 17-β-estradiol 100 mg/día. Se sugiere adicionar acetato de medroxiprogesterona a una dosis de 10 mg/día de 12 – 14 días al mes, con la finalidad de proteger el endometrio, pero esto no resuelve

el problema de infertilidad. El trh junto con un estilo de vida saludable podrían ayudar en la prevención primaria en enfermedades del sistema cardiovascular así como en la protección de huesos (Webber, et.al., 2016). Los anticonceptivos orales que contienen drospirenona en dosis ligeramente mayores a las utilizadas en la trh no son recomendados, ya que muestran un alto riesgo de presentar eventos tromboembólicos. En algunos casos la trh está contraindicada debido a problemas de salud que se pueden agravar con el uso de las hormonas (Ver **Tabla 4**).

**Tabla 4.** Condiciones médicas de las pacientes en las que no se recomienda el trh.

**Condiciones en las que no se recomienda el tratamiento hormonal en la IOP**

Cáncer de mama  
Condiciones malignas dependientes de estrógenos  
Sangrado uterino anormal de causa desconocida  
Hiperplasia endometrial no tratada  
Tromboembolismo venoso idiopático o previo  
Enfermedad tromboembólica arterial  
Cardiopatía isquémica  
Enfermedad hepática aguda  
Hipersensibilidad a los fármacos o a los excipientes  
Porfiria cutánea  
Edad mayor a 60 años  
Pacientes con IOP que han logrado el embarazo

(Mejía, Velázquez y Vital, 2013)

En cuanto a las opciones pro-fertilidad en pacientes con IOP se encuentran: el embarazo espontáneo (5-10% de los casos), fertilización asistida con donación de ovocitos y la adopción. La terapia que podría ser adecuada para mujeres con IOP es la fertilización asistida con donación de ovocitos ya que tiene tasas de éxito típicamente mayores a las observadas en fertilización *in vitro*.

En pacientes con Síndrome de Turner debe evitarse la fertilidad debido a la alta tasa de morbilidad materno fetal. En el caso de que las pacientes presenten alteraciones en el gen *FMR1*, se debe realizar el estudio genético para determinar la posibilidad de transmitir la premutación o la mutación completa.

La terapia de apoyo psicológico es importante para todas las mujeres con IOP, ya que éstas pueden experimentar estrés, ansiedad y depresión.

### 2.1.6 ETIOLOGÍA

Las causas de IOP se dividen principalmente en inducidas y espontáneas (Ver **Tabla 5**). Dentro de las espontáneas las causas que son reconocidas hasta ahora incluyen: genéticas (Ver **Tabla 6**), autoinmunes infecciosas e **idiopáticas**. En la mayoría de los casos, cerca del 90% es idiopática (sin una causa discernible) (Torrealday, et.al., 2017).

**Tabla 5.** Causas iatrogénicas de la Insuficiencia Ovárica Prematura

Causas iatrogénicas y espontáneas de la IOP
<p><b>Iatrogénicas</b></p> <p>Ooforectomía bilateral, cistectomía ovárica bilateral.</p> <p>Quimioterapia, agentes alquilantes y antraciclinas</p> <p>Haz de radiación externa intracavitaria</p> <p>Toxinas ambientales</p> <p>Embolización del vaso pélvico</p>
<p><b>Espontáneas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Autoinmune</b></li> <li>● <b>Infecciosas</b></li> </ul> <p>Paperas ooforitis</p> <p>Tuberculosis, malaria, citomegalovirus, varicela y shigella</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Idiopática</b></li> </ul>

(Modificada de: Torrealday, et.al., 2017)

Dentro de las causas espontáneas se engloban las causas genéticas, alteraciones cromosómicas del X y defectos autosómicos presentes en diversos genes. (Ver **Tabla 6**)

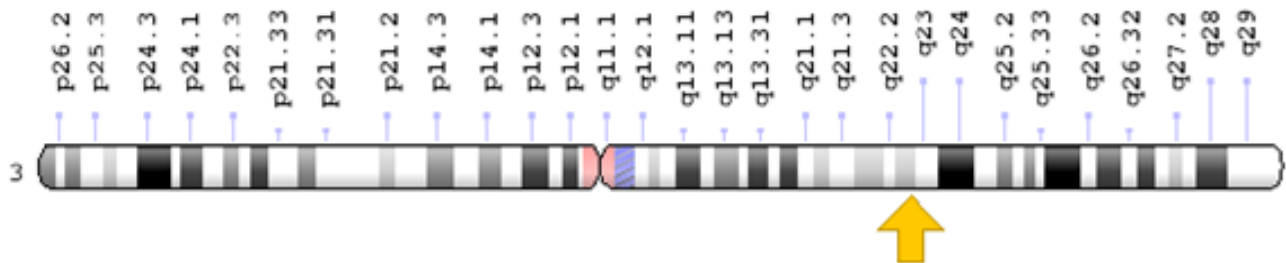
**Tabla 6.** Causas genéticas de la Insuficiencia Ovárica Prematura

<b>Causas Genéticas de la IOP</b>	
<b>Defectos en el cromosoma X</b>	<b>Alteración cromosómica</b>
Síndrome de Turner (45XO) o Turner en mosaico (45X/46XX) Trisomía del X (47XXX o mosaico) X frágil premutación Proteína morfogenética del hueso Receptor de progesterona asociado a la membrana	45XO o 45X/46XX  47XXX <i>FMR1</i> (Xq27) <i>BMP15</i> (Xp11.2) <i>PGRMC1</i> (Xq22 –q24)
<b>Defectos autosómicos</b>	<b>Genes asociados</b>
Receptor androgénico Galactosemia (deficiencia de galactosa-1-fosfato uridiltransferasa) Síndrome poliglandular autoinmune (Tipos 1 y 2) Mutación en el receptor hormonal folículo estimulante Deficiencia de 17- $\alpha$ -hidroxilasa Deficiencia de aromatasa Síndrome de Bloom Ataxia telangiectasia Anemia de Fanconi <b>Síndrome de Blefarofimosis Ptosis Epicanto Inverso</b> Enfermedades mitocondriales Síndrome Demirhan Pseudohipoparatiroidismo (PHP1A) Ovario-leucodistrofia Síndrome de Perrault  Síndrome de Werner Enfermedad de GAPO A-inhibina Variantes Factor de crecimiento/diferenciación Rabdomiosarcoma Forkhead Newborn Ovary Homeobox Foliculogénesis específico de hélice-vuelta-hélice Receptor nuclear LIM Homeobox	<i>AR</i> (Xq12) <i>GALT</i> (9p13.3) ( <i>Ncbi</i> )1  <i>AIRE</i> (21q22.3) <i>Ncbi</i> <i>FSHR</i> (2p16.3) <i>CYP17A1</i> (10q24.32) <i>CYP19</i> (15q21.1) <i>BLM</i> (15q26.1) <i>ATM</i> (11q22.3) <i>FANCC</i> (9q22.32) <b><i>FOXL2</i></b> (3q22.3) <i>POLG</i> (15q.26.1) <i>BMPR1B</i> (44q22.3) <i>GNAS</i> (20q13.32) <i>EIF2B</i> (3q27.1) <i>HSD17B4</i> (5q23.1), <i>HARS2</i> (5q31.3), <i>CLPP</i> (19p13.3), <i>LARS2</i> (3p21.31), <i>ERAL1</i> (17Q11.2), <i>TWNK</i> (10Q24.31). <i>RECQL2</i> (8p129) <i>ANTXR1</i> (2p13.3) <i>INAH</i> (2q35) <i>GDF9</i> (5q31.1) <i>FOXO3</i> (6q21) <i>NOBOX</i> (7q35) <i>FIGLA</i> (2p13.3) <i>NR5A1</i> (9q33.3) <i>LHX8</i> (1p31.1)

(Modificada de: Qin, 2017; Torrealday, 2017; Rossetti, 2017)

### 2.1.6.1 Blefarofimosis Ptosis Epicanto Inverso (BPEI)

En el 2001 se descubrió que el gen *FOXL2* se encuentra mutado en el Síndrome de Blefarofimosis Ptosis Epicanto Inverso (BPES) (OMIM 110100), un desorden genético que está asociado con Insuficiencia Ovárica Prematura (BPES tipo I) o aislado (BPES tipo II). Es de carácter autosómico dominante y las anomalías en los párpados son características de este síndrome. Los hombres afectados son fértiles y pueden transmitir la enfermedad a la siguiente generación. Hombres y mujeres muestran rasgos característicos de esta enfermedad, como fisuras palpebrales (Blefarofimosis), párpados caídos (Ptosis) y un pequeño pliegue de piel que corre hacia adentro y hacia arriba desde el párpado inferior (epicanto inverso). El locus identificado para esta etiología es 3q22-q23 (**Figura 6**) (Crisponi, et.al., 2001).



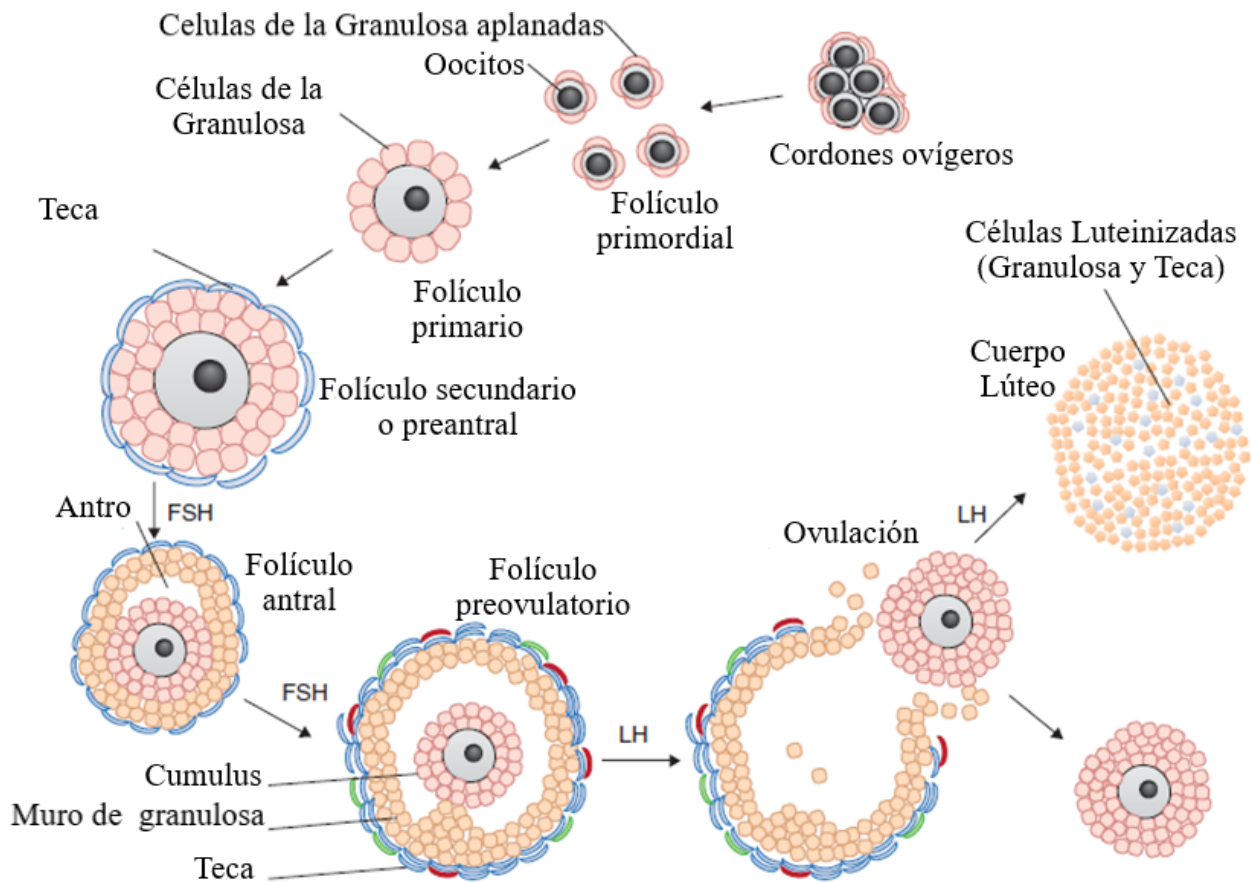
**Figura 1.** Localización citogenética de *FOXL2*. Se encuentra localizado en el brazo largo (q) del cromosoma 3 en la posición 22.3. La localización molecular se encuentra entre los pares de bases 138,994,224 a 138,947,140 en el cromosoma 3 (GNR, 2019)

## 2.2 FOLICULOGÉNESIS

El ovario de los mamíferos es un órgano complejo, el cual tiene varias funciones esenciales para el proceso reproductivo. Está encargado de la producción y liberación de los ovocitos. Además posee una función endocrina, la producción de estrógenos, los cuales son esenciales en el desarrollo de los genitales femeninos y la producción de progesterona, la cual es necesaria para que ocurra el embarazo. Estas funciones están estrechamente relacionadas a través de la foliculogénesis (**Figura 1**), un proceso que involucra la diferenciación en tres tipos celulares: los ovocitos, las células de la granulosa (CG) y las células de la Teca (Georges, et.al., 2014).



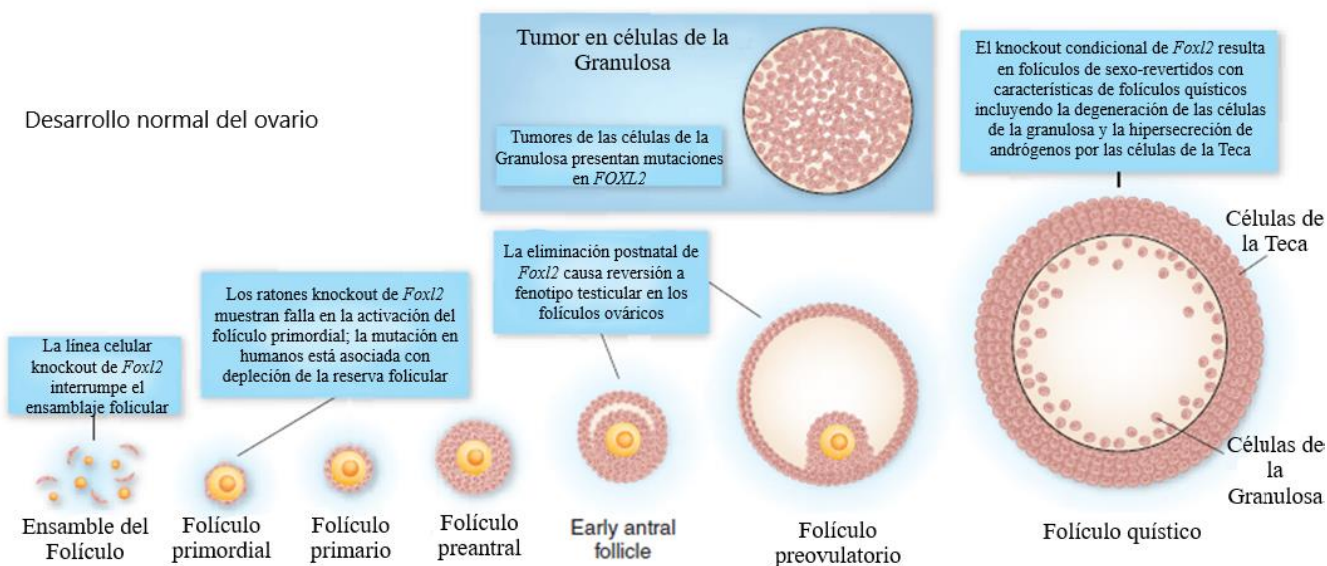
La diferenciación de los ovocitos y las células somáticas están bajo el control de numerosas señales de factores entre los cuales están incluidos las gonadotropinas, FSH y LH, miembros de la familia del factor de crecimiento/diferenciación (TGF $\beta$ , GDF-9, BMP15; BMP4, BMP7; AMH, FST), factores de crecimiento (IGF1, FGF2, KITL) y hormonas sexuales (estradiol, testosterona, progesterona).



**Figura 2.** La foliculogénesis comienza con los folículos primordiales que son reclutados subsecuentemente para convertirse en folículos primarios. Hay proliferación progresiva de células de la Granulosa en varias capas alrededor del ovocito (Secundarios a los folículos tardíos preantrales). En este estado, una capa de células de la Teca rodean el folículo y el cual comienza a producir estrógenos. Las células de la Teca producen andrógenos, que son convertidos en estrógenos en las células de la granulosa debido a la actividad de la enzima aromatasa, la cual cataliza la “aromatización” (es decir, la formación de dobles enlaces del esqueleto esteroide) de la androstenediona a testosterona, que luego se transforma en estradiol, esta actividad es estimulada por la FSH (a través de receptores para FSH y Adenosin monofosfato cíclico (AMPC)) (Genesser, 2000). El crecimiento para la formación del estado secundario/preantral no requiere gonadotropinas, la progresión hacia el estado secundario depende estrictamente de la estimulación con FSH. Las células de la granulosa al continuar con la proliferación, forman la cavidad y esta se separa en dos grupos: cumulus ooforus y la pared de células de la granulosa. En esta etapa, la selección ocurre entre los folículos en crecimiento, donde solo uno o un limitado número de folículos continúan creciendo al estado pre-ovulatorio mientras otros se someten a atresia. Dos capas de la teca (teca interna y teca externa) pueden distinguirse alrededor de los folículos seleccionados. Después de la ovulación, que se desencadena por un pico de FSH y LH, las células de la teca y el muro de las células de la granulosa luteinizan para producir progesterona (Modificado de: Georges, et.al., 2014).

Las células de la Granulosa poseen un papel central en la coordinación de la foliculogénesis (**Figura 2**), a través de su comunicación directa con el ovocito y las células de la Teca, debido a su sensibilidad a las hormonas de la pituitaria y su habilidad para producir estrógenos, hormona anti-Mulleriana, activinas, etc. (Georges, et.al., 2014).

Las células de la granulosa, es un tipo de célula epitelial que crea conexiones con los ovocitos durante el estadio fetal, mantiene el desarrollo de los ovocitos y produce hormonas responsables del desarrollo y mantenimiento del sistema reproductivo femenino. Las células de la granulosa y las células de Sertoli en los testículos, derivan del mismo precursor somático en la cresta genital (Liu, Liu, y Yao 2010). La mala regulación de la diferenciación de las células de la granulosa está involucrada en la mayoría de las patologías del ovario, como Insuficiencia ovárica prematura (IOP), síndrome de ovario poliquístico (SOP) o tumores.



**Figura 3.** *FOXL2* afecta el desarrollo folicular en diferentes estadios. La foliculogénesis inicia con el ensamblaje de los folículos primordiales en el ovario del feto por asociación de las pre-células de la granulosa con el ovocito incipiente. De la población de folículos primordiales, se conforma la reserva de folículos, que son reclutados por la acción de *FOXL2*, el cual controla la diferenciación de las células de la Granulosa en la etapa de folículos primordiales. En el folículo antral *FOXL2* mantiene la identidad de las células de la Granulosa, controla el crecimiento y ensamblaje folicular y la producción de estrógenos. En el folículo quístico previene/promueve los tumores de las células de la granulosa, indirectamente (pituitaria) promueve el crecimiento folicular y controla la diferenciación tardía de las células de la granulosa (Modificada de: Murphy, 2010; Georges, 2014).

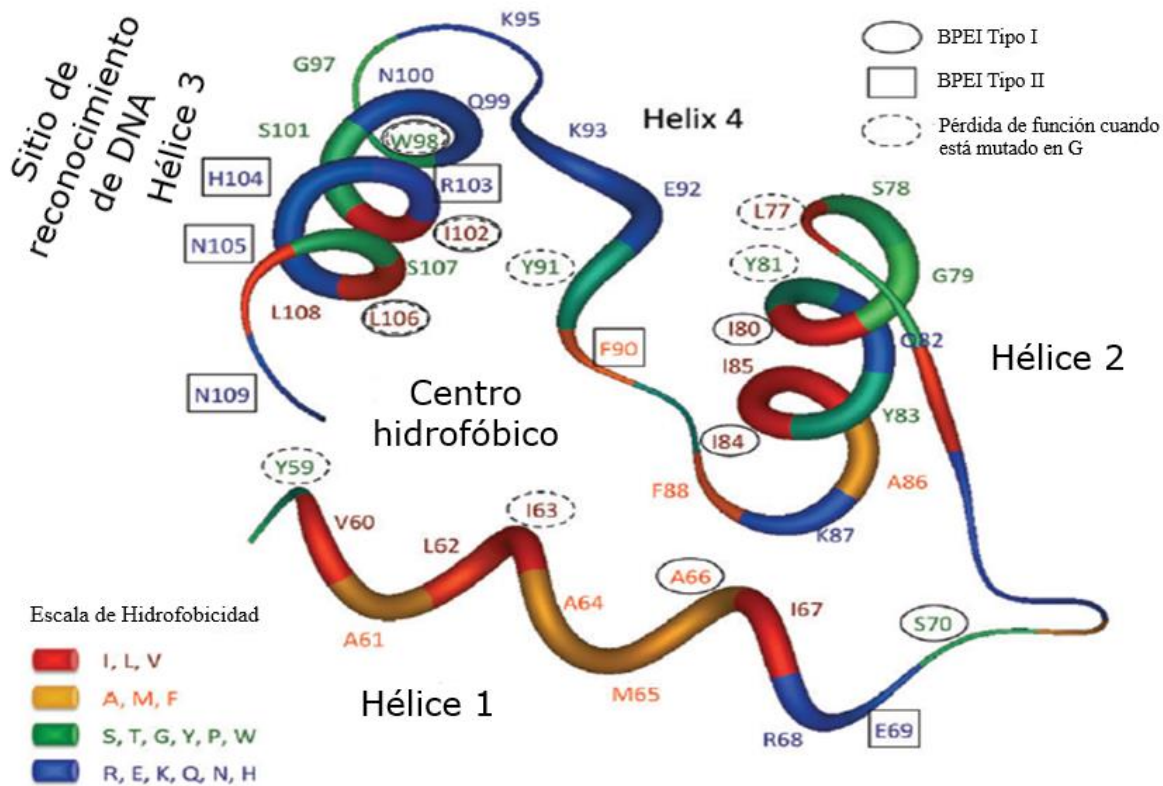
Se han descrito diversos mecanismos que son causantes de la aparición de IOP, entre los que se encuentran: (I) Existencia de un grupo pequeño de folículos primordiales, (II) Aumento de la atresia folicular o (III) Maduración alterada y/o reclutamiento de folículos primordiales (Rossetti, et.al.,2017).

## 2.3 FOXL2

Los factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción “Forkhead Box” (FOX o caja de cabeza de horquilla) (**Figura 3**), se encuentran muy conservados evolutivamente y contiene más de 100 diferentes miembros. Estos contienen un sitio de unión a DNA conocido como caja de cabeza de horquilla o dominio de hélice alada. El dominio de FOX tiene una longitud de aproximadamente 100 aminoácidos y se pliega en una estructura que contiene 3 hélices  $\alpha$ -N-terminales, 3 cadenas  $\beta$  y 2 regiones loop localizadas cerca del dominio C-terminal. En contraste con el dominio altamente conservado de la caja de horquilla, las proteínas FOX son altamente divergentes en otras partes de sus secuencias. Las proteínas FOX varían ampliamente en las otras porciones de la secuencia, de acuerdo a una clasificación filogenética, la familia Forkhead se encuentra dividida en 19 subfamilias, etiquetadas de la A-S. Estos factores de transcripción muestran un amplio rango de patrones de expresión, regulación y funciones fisiológicas, con roles en la organogénesis ocular, adquisición de lenguaje, respuesta al estrés, regulación del envejecimiento y supresión de tumores. Consecuentemente, mutaciones en varias proteínas FOX están asociadas con varias patologías en el humano. Una proteína de esta familia es la codificada por el gen *FOXL2*, la cual desempeña un papel crucial en el desarrollo ovárico y la fertilidad femenina (OMIM 605597); (Benayoun, et.al., 2008).

*FOXL2* está localizado en el cromosoma 3q23 y está compuesto de un solo exón (Crisponi, et.al., 2004) que codifica para una proteína de 376 aminoácidos y una cadena de polialanina de 14 residuos (Ver **Figura 4**) (Beysen, Vandesompele, Messiaen, Paepe y Baere, 2008).

Se conoce que la región codificante de *FOXL2* está altamente conservada en humanos, cabras, ratones y peces globo. El número de residuos de alanina se conservan estrictamente entre los mamíferos estudiados, lo que sugiere la existencia de fuertes limitaciones funcionales o estructurales. *FOXL2* es el marcador más antiguo de diferenciación ovárica en mamíferos y puede desempeñar un papel importante en la diferenciación de células somáticas ováricas y en el desarrollo y/o mantenimiento adicional del folículo. (Cocquet, et.al., 2002). El dominio de polialanina de *FOXL2* está muy conservado en mamíferos. El 30% de las mutaciones intragénicas consisten en la expansión de este dominio. Expansiones de 24-26 Alaninas induce un fenotipo dominante, en cambio la expansión a 19 residuos genera una forma recesiva (Benayoun, et.al.,2008).



Como se ha observado en la foliculogénesis, las gónadas son únicas entre los órganos primordiales debido a su naturaleza bipotencial. Una sola estirpe celular se puede desarrollar en uno de dos órganos, en testículos u ovarios. Aquí es donde FOXL2 tiene un papel muy importante, ya que se espera que FOXL2 regule muy específicamente el desarrollo ovárico. Una de las vías que puede dar este tipo de especificidad, es en la que los demás miembros de la familia Forkhead no se expresen o pudiera ser mediante la regulación de la expresión génica a través de un sitio de unión de alta afinidad. FOXL2 posee un sitio de alta afinidad, este sitio tiene una significativa bifurcación de la secuencia conservada de la superfamilia Forkhead, el llamado Elemento de Respuesta FOXL2 (FLRE) el cual consta de 7 pb 5'-GT(C/G)AAGG-3' o su reverso complementario. En este estudio realizado en células de la granulosa de ratones, utilizando el promotor de luciferasa, se observó la actividad de promotor aumenta proporcionalmente al número de repeticiones del FLRE. El doblete final de GG de la secuencia tiene una importancia particular, ya que al ser cambiadas por T/A su afinidad disminuye (Benayoun, et.al., 2008).

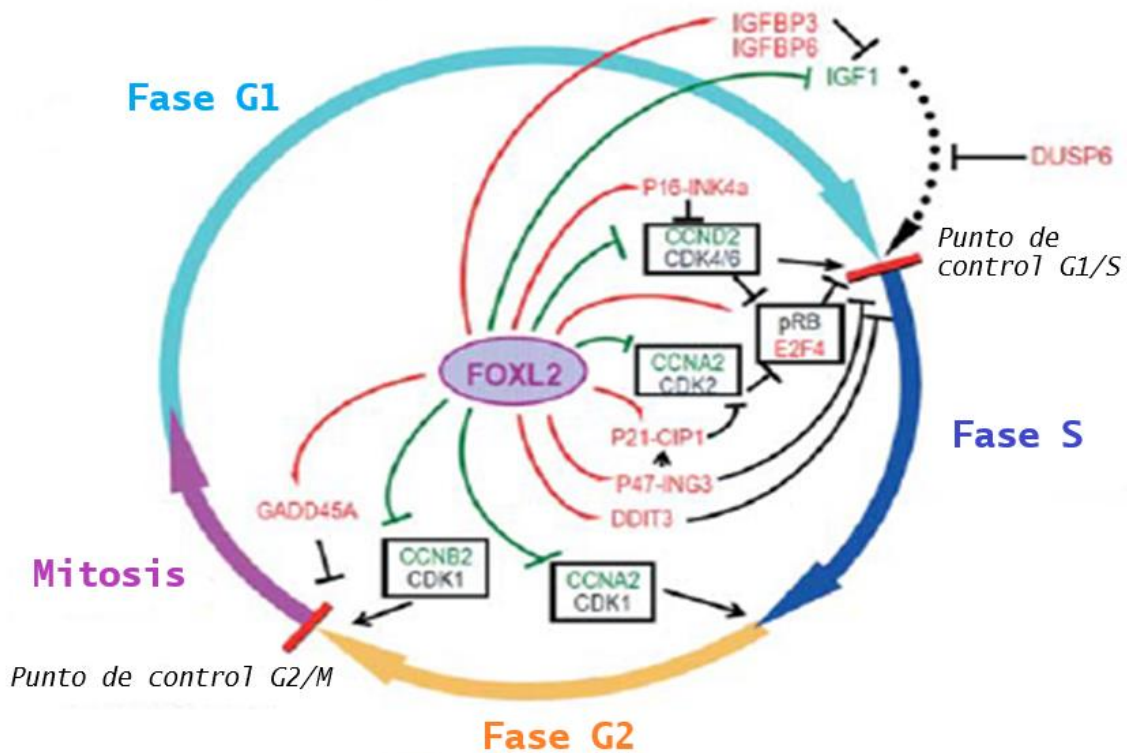
El otro hallazgo en este estudio fue que al aumentar los residuos de Alanina (Ala24) no se produce la correcta activación del gen reportero de la luciferasa, en cambio el fenotipo silvestre Ala14 induce la actividad del reportero cerca de 4 veces más que la variante Ala24 (Benayoun, et.al., 2008).

### 2.3.1 FOXL2 Y SU FUNCIÓN EN EL CICLO CELULAR

El factor de crecimiento Insulínico (*IGF*) (necesario para salir de la fase G1 y entrar a la fase S) podría ser inhibido por FOXL2, por el aumento de la regulación de la Proteína Transportadora 3 del Factor de Crecimiento Insulínico (IGFBP), la cual puede interferir con la señalización de IGF y regulación del gen Fosfatasa Dual Específica 6 (*DUSP6*), el cual codifica una fosfatasa que contrarresta o neutraliza la acción pro-mitogénica de las Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares (ERK1/2). FOXL2 induce la baja actividad de los complejos CDK/ciclinas, promoviendo la salida de G1, y una baja regulación de la expresión de la Ciclina A2. Finalmente, FOXL2 también activa inhibidores de la transición G1/S, como lo son P47/ING3 y DDIT3/GADD153. Además FOXL2 regula positivamente la proteína de

arresto de crecimiento e inducible por daños en el ADN alfa (*GADD45A*) y regula negativamente a Ciclina B2, esto sugiere que FOXL2 puede inhibir la transición G2/M. La acción de FOXL2 en los blancos confirmados sugiere que interfiere con la progresión a través del ciclo celular. Por lo tanto se podría decir que el incremento significativo de la expresión de *FOXL2* inhibe la proliferación celular y el arresto en el punto de control G1/S. Una consecuencia directa de la acción de FOXL2 sobre el ciclo celular, es que la no regulación puede alterar severamente el destino celular y deteriorar la diferenciación de esta manera promueve una transformación maligna (Benayoun, et.al., 2011).

En resumen, la sobreexpresión celular de *FOXL2* genera una baja velocidad de proliferación y arresto en el punto de control G1/S FOXL2 interfiere con la proliferación desacelerando el ciclo celular en la transición G1/S y protege a la célula del daño por estrés oxidativo. (Ver **Figura 5**)



**Figura 5.** Representación esquemática de la acción de FOXL2 en blancos confirmados y su actividad reportada en el ciclo celular. Todos son blancos directos, a excepción de P16/INK4a y CCND2. Flechas/texto color rojo: activación por FOXL2 y líneas romas/texto verde: inhibición por FOXL2. Notar que la activación por FOXL2 tiende a promover el arresto en el punto de control de G1/S (Modificada de: Benayoun, et.al., 2011).

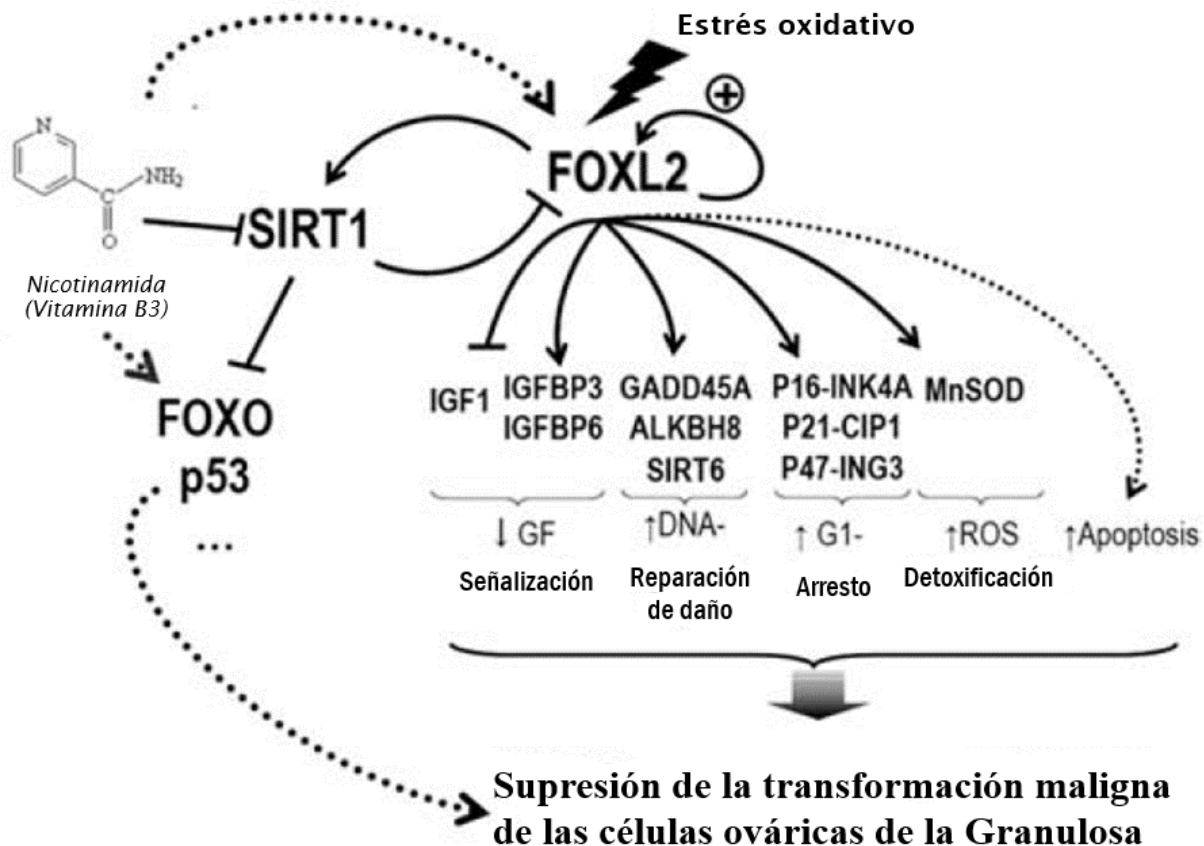
En el ovario adulto, se ha demostrado que FOXL2 es esencial para mantener la identidad y diferenciación del ovario y reprimir la programación de diferenciación a testículo. FOXL2 regula procesos de inflamación, apoptosis, metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) y homeostasis del colesterol (Benayoun, et.al., 2011).

FOXL2 aparentemente tiene la capacidad de regular la apoptosis (positiva o negativamente) a través de la regulación del gen que codifica para la proteína Célula B Linfoma 2 Asociado a Proteína 2 (*BCL2A1*), el factor de activación transcripcional 3 (*ATF3*), el Factor de Necrosis Tumoral proteína alfa inducida 3 (*TNF $\alpha$ IP3*), el colesterol 25-Hidroxilasa (*CH25H*) y la Sirtulina 1 (*SIRT1*) (Benayoun, et.al., 2008).

### 2.3.2 SIRT1

Benayoun propone que FOXL2 actúa como un sensor molecular del estrés celular de las células de la granulosa, influenciado por la acción de **SIRT1 (Figura 5)**. SIRT1 afecta de manera diferente la capacidad de transactivación de FOXL2 en diferentes promotores específicos, su acción puede cambiar el grupo de genes blanco reconocidos y/o regulados en un momento dado. Esto podría potencialmente afectar el destino de las células de la granulosa en respuesta a señales ambientales (Benayoun, et.al., 2008).

La transactivación de *FOXL2* es inhibida por la acción de SIRT1 debido a su unión con promotores específicos, los cuales incluyen el promotor de *FOXL2*, el promotor propio de *SIRT1* y el del gen Antioxidante Mitocondrial Superóxido Dismutasa de Manganeso (*MnSOD*). Además, FOXL2 activa directamente la transcripción de *SIRT1*, dilucidando un bucle de retroalimentación negativa (Ver **Figura 5**). Las formas hipermodificadas/hiperacetiladas de FOXL2 que incrementan durante el estrés celular son las isoformas más activas (Benayoun, et.al., 2008).



**Figura 6.** Modelo de acción de FOXL2 en la homeostasis de las células de la granulosa. La expresión y niveles de actividad de *FOXL2* están regulados por señalizaciones de retroalimentación positiva y negativa. En relación con la respuesta al estrés, la mínima expresión de *FOXL2* podría incrementar la regulación de los blancos conocidos para inhibir la señalización del factor de crecimiento (GF), incrementar la estabilidad genómica, el arresto en G1 y la destoxificación. FOXL2 por sí mismo promueve el arresto del ciclo celular y en algunos casos apoptosis. Estas capacidades están bajo el control del inhibidor de *FOXL2*, SIRT1 y puede ser mejorado por la inhibición por nicotinamida. El tratamiento con nicotinamida está también descrito para aliviar la inhibición de *SIRT1* sobre los factores FOXO y p53. La cooperación de FOXL2 con otros supresores tumorales podrían prevenir transformaciones malignas de las células de la granulosa (Modificada de: Benayoun, et.al., 2011).

### 2.3.3 SMAD3

Se ha descrito que FOXL2 funciona en asociación con la proteína Madres Contra el Homólogo Decantapléjico (**SMAD3**) como facilitador dependiente de activina en la transcripción del gen codificador para folistatina en las células αT3-1 derivadas de Gonadotropinas. La activina B y folistatina son expresadas y secretadas por las gonadotropinas hipofisarias, ejerciendo un control local en las subunidades de



expresión de FSH $\beta$  y LH $\beta$  y trabajando en conjunto con la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRh), inhibina y hormonas esteroideas, promueven variaciones en el ciclo de FSH/LH. La unión de FOXL2 a SMAD3. SMAD3 está mediada por el dominio MH2 de SMAD3 y por el dominio "Forkhead" de FOXL2. FOXL2 se encuentra expresado en la pituitaria en edad madura, ya que la FSH y la LH se unen a las células de la granulosa y la teca para estimular la foliculogénesis y la producción ovárica de diversos esteroides sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos), péptidos gonadales (activina, inhibina y follistatina), los cuales retroalimentan el hipotálamo e hipófisis para inhibir o aumentar la secreción de GnRh y gonadotropinas. Los esteroides son indispensables para la implantación del embrión durante el embarazo (Blount, et.al., 2008).

#### 2.3.4 StAR

FOXL2 actúa como un factor transcripcional represor durante el desarrollo folicular y se sabe que interactúa directamente con el promotor del gen codificante para la Proteína Reguladora Aguda Esteroidogénica (**StAR**), esta interacción requiere modificaciones postraduccionales de FOXL2 vía SUMOilación, las cuales están mediadas por UBC9, estas modificaciones son requeridas para la represión en el promotor del gen *StAR* por FOXL2. Se confirma en este estudio que SUMO-1 se conjuga con la Lisina que se encuentra en la posición 25 de FOXL2, sugiriendo que el sitio de SUMOilación se encuentra entre las posiciones 24VKEP27 de la proteína de FOXL2. *StAR* es un marcador de la diferenciación de las células de la granulosa y del desarrollo folicular, la pérdida de represión podría llevar a falla ovárica prematura (Kuo, Bentsi-Barnes, Barlow, Bae y Pisarska, 2009).

#### 2.3.5 DP103

**DP103** modula la actividad proapoptótica de FOXL2, esta es la primera proteína conocida con función reguladora sobre *FOXL2*, interactuando de manera directa con este en un proceso celular. DP103 también llamado DEAD-box o DDX20 regula ciertos genes, entre ellos *SF-1* que es un receptor esencial para la formación de las gónadas femeninas o masculinas regulando la expresión de diversos genes centrales para la esteroidogénesis (Lee, et.al., 2005).

### 2.3.6 DMRT1

El Factor de Transcripción 1 Relacionado a doblesexualidad y Mab-3 (**DMRT1**) es esencial para el mantenimiento del sexo postnatal, éste es un regulador transcripcional que activa o reprime la transcripción en genes blanco. DMRT1 reprime a *FOXL2*, que a su vez reprime a *DMRT1*. La pérdida de *FOXL2* en el ovario adulto puede dar lugar a la transdiferenciación de las células de la granulosa a células de Sertoli por otro lado la pérdida de *DMRT1* en los testículos adultos activa y causa la transformación recíproca de células de Sertoli a células de la Granulosa (Matson, et.al., 2012).

### 2.3.7 CYP19A1

*FOXL2* ha sido descrito en varias especies como un regulador positivo de **CYP19A1**, que codifica para la aromatasa la cual es responsable del último paso en la producción de estrógenos en las Células de la Granulosa (CG). Esto sugiere que *FOXL2* puede influir directa o indirectamente con la señalización de estrógenos.

### 2.3.8 FST

*FOXL2* es también requerido para la expresión del gen codificante para Folistatina (**FST**), la cual está involucrada en el ensamblaje folicular. Deleciones en *FST*, impactan negativamente en las CG que se encuentran proliferando, provocando depleción prematura de la reserva ovárica y la formación de células similares a las de Sertoli en el ovario, muy parecido al fenotipo observado por la deleción de *FOXL2* (Georges, et.al., 2014).

### 2.3.9 SF-1

El factor esteroideogénico -1 (**SF-1**) también conocido como NR5A1 regula la transcripción positiva o negativa de genes cruciales para la reproducción incluidos los codificantes para: *AMH*, Receptor Nuclear Huérfano (*DAX-1*), *StAR*, Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (*SCC*), Esteroide alfa hidroxilasa (*CYP17*) y aromatasa (*CYP19*). *FOXL2* interactúa con *SF-1* como factor de transcripcional mediante unión a su promotor, esta interacción es necesaria para que *SF-1* regule a su vez la transcripción de *AMH*. *AMH* está altamente expresado

en células de la granulosa de los pequeños folículos en crecimiento del ovario y codifica para una hormona esencial para la diferenciación sexual (Jin, et.al., 2016).

### 2.3.10 COL1A2

Existe evidencia que FOXL2 modula la transcripción de Colágeno tipo 1 cadena alfa 2 (**COL1A2**). Esto posee relevancia a nivel de la Membrana Extracelular, ya que el colágeno tipo 1 es el más abundante, y está involucrado en la formación de órganos, crecimiento y homeostasis. Esta membrana compartimenta al ovario durante la foliculogénesis y va cambiando durante el desarrollo folicular. La lámina basal folicular posee menos colágeno y es más rica en laminina, esto la hace más expandible, propiedad necesaria para la ampliación folicular (Marongiu, et.al., 2016).

### 2.3.11 ESR1

FOXL2 se relaciona con los receptores de estrógeno y en conjunto con Receptor de Estrógeno 1 (**ESR1**), esto reprime la expresión del gen Caja de SRY -9 (*SOX9*) que es un promotor de las células de Sertoli, esta represión mantiene el fenotipo del ovario en mamíferos (Uhlenhaut, et.al., 2009).

FOXL2 interactúa también con *ESR1* y *ESR2* (Receptores de estrógeno 1 y 2), *NR5A1* y su parálogo *NR5A2* (Receptores nucleares subfamilia 5 grupo A miembros 1 y 2), el receptor sensitivo a ácido retinoico (*NR2C1*) y el receptor de progesterona (*PGR*), así mismo con reguladores de la cromatina como barrera del factor de autointegración (*BANF1*) y la proteína reparadora de DNA (*XRCC6*), lo cual sugiere que desarrolla un papel en la organización de la cromatina (Georges, et.al., 2014).

### 2.3.12 miRNAs

La expresión de *FOXL2* también podría estar regulada por la unión de micro RNA (miRNAs) a la región 3'-UTR, los miRNAs propuestos son los de la familia miR17 que, regulan negativamente la expresión de *FOXL2*. La otra familia es la miR133b la cual propicia una menor expresión de *FOXL2* (Georges, et.al., 2014).

### 2.3.13 MULTIMERIZACIÓN

Es propuesto que las interacciones con otras proteínas pueden formar homodímeros o multímeros, pero no se sabe si son transcripcionalmente activos o no, pero se sugiere que la multimerización de FOXL2 produce un efecto dominante negativo (Georges, et.al., 2014).

## JUSTIFICACIÓN

Cuando la expectativa de vida era <65 años y las mujeres usualmente concebían durante la segunda década de vida, la IOP no representaba una enfermedad relevante. Actualmente, debido a los cambios culturales y socioeconómicos de las últimas décadas, un gran número de mujeres programan sus primeros embarazos alrededor de los 30 años de edad, por lo cual la IOP adquiere una particular relevancia ya que es diagnosticada cuando la fertilidad se encuentra irreversiblemente afectada.

Esta patología afecta aproximadamente del 1-3% de mujeres menores de 40 años, sin embargo, este porcentaje aumenta del 13-30% si es de origen familiar. Su distribución varía dependiendo la etnia, presentando una frecuencia del 1% en la etnia caucásica, 1.4% en la afroamericana, 1.4% en la centroamericana, 0.5% en la china y en 0.14% en la japonesa.

Las causas de la IOP se dividen en inducidas y espontáneas, dentro de las últimas las causas reconocidas son: infecciosas, autoinmunes y genéticas, pero cerca del 90% es idiopática (sin causa discernible).

En el 2001 se descubrió la relación de un gen llamado *FOXL2* con el Síndrome de Blefarofimosis Ptosis Epicanto Inverso, al cual generalmente se le asocia con Insuficiencia Ovárica Prematura. *FOXL2* se expresa principalmente en la zona cráneo-facial, específicamente en párpados; así como en ovario, en las células de la granulosa. Es un importante factor de transcripción, cuyas funciones más importantes son la diferenciación de células somáticas ováricas y el desarrollo y/o mantenimiento adicional del folículo. En otros estudios que este gen puede provocar IOP sin presentar fenotipo de BPEI. Por todo lo anterior, en este estudio piloto se buscó identificar las variantes genéticas que pudieran estar relacionadas con IOP sin la presencia de BPEI, con la intención de encontrar una respuesta a la etiología de esta patología.

## OBJETIVOS

### 4.1 GENERAL

Identificar variantes genéticas en *FOXL2* utilizando secuenciación tipo Sanger y MLPA en una serie de pacientes con insuficiencia ovárica primaria idiopática del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” para determinar si las variantes se asocian con dicha enfermedad.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Analizar la región exónica del gen *FOXL2* de pacientes con insuficiencia ovárica primaria, mediante secuenciación Sanger para la búsqueda de mutaciones y polimorfismos, así como la búsqueda de CNVs mediante la técnica de MLPA (Amplificación de Sondas Múltiples Dependientes de Ligasa).
- Determinar el posible impacto de las variantes encontradas sobre la estructura y función de la proteína mediante el análisis bioinformático correspondiente.

## HIPÓTESIS

Si encontramos variantes genéticas en *FOXL2* en pacientes con insuficiencia ovárica prematura idiopática, entonces éstas estarán asociadas con la infertilidad que las pacientes presentan.

# METODOLOGÍA

## 6.1 Selección de pacientes.

Se seleccionaron pacientes de sexo femenino menores de 40 años con diagnóstico multidisciplinario de Insuficiencia ovárica prematura idiopática con estudios hormonales completos y cariotipo normal, del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”. Como control positivo, se empleó una muestra de un paciente con diagnóstico de BPES proveniente de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México.

Previa lectura y firma del consentimiento informado se tomó muestra de sangre periférica en tubos de 4 mL BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA de cada paciente.

## 6.2 EXTRACCIÓN DE DNA

La sangre periférica se centrifugó a 4,000 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos con la finalidad de tener tres capas definidas, en el fondo un paquete celular compuesto principalmente de eritrocitos, seguido de una capa de leucocitos y en la última parte compuesta principalmente de suero. Se separan los leucocitos con una pipeta Pasteur, procurando arrastrar la menor cantidad de eritrocitos posible, esto se transfirió a un tubo Eppendorf® de 1.5 mL.

Para la obtención del DNA se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega.

1.- Se adicionó al tubo Eppendorf® 1 mL de buffer de lisis celular, se incubó y agitó vigorosamente con ayuda del vórtex durante 10 minutos, intermitentemente. Posteriormente se centrifugó a 14,000 RPM durante cuatro minutos.

2.- Se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso del paso 1 cuantas veces fuera necesario hasta lisar y eliminar la mayor cantidad de eritrocitos posible.

3.- Al botón de leucocitos se le agregó 600 µL de buffer de lisis nuclear y se le adicionó 30 µL de proteinasa K de Sigma-Aldrich a una concentración de 20 mg/mL dejando incubar la mezcla durante 24 horas a 55°C.

4.- Posterior a la lisis de núcleos se agregaron 300 µL de solución de precipitación de proteínas, se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó durante 5 minutos a en hielo. Se procedió a centrifugar a 14,000 RPM durante 4 minutos.

5.- Se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf al cual se le agregaron 600 µL de isopropanol a 4 °C y se mezcló suavemente hasta observar la precipitación de los ácidos nucleicos. Se incubó durante 5 minutos en hielo.

6.- Se centrifugó a 14,000 RPM durante 4 minutos para obtener un botón de ácidos nucleicos en el fondo de color blanquecino. Se eliminó el sobrenadante.

7.- Al precipitado de ácidos nucleicos se le adicionó 600 µL de etanol absoluto para eliminar restos de sales y otras impurezas.

8.- Se centrifugó nuevamente a 14,000 RPM durante 4 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente o con la ayuda de un “thermomixer” a 55 °C, una vez seco se resuspendió con 30 a 100 µL de buffer de rehidratación (dependiendo de la cantidad de DNA).

### **6.3 CUANTIFICACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE DNA**

Cada muestra se cuantificó por duplicado con la ayuda del equipo NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer de Thermo Scientific™ y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **6.4 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)**

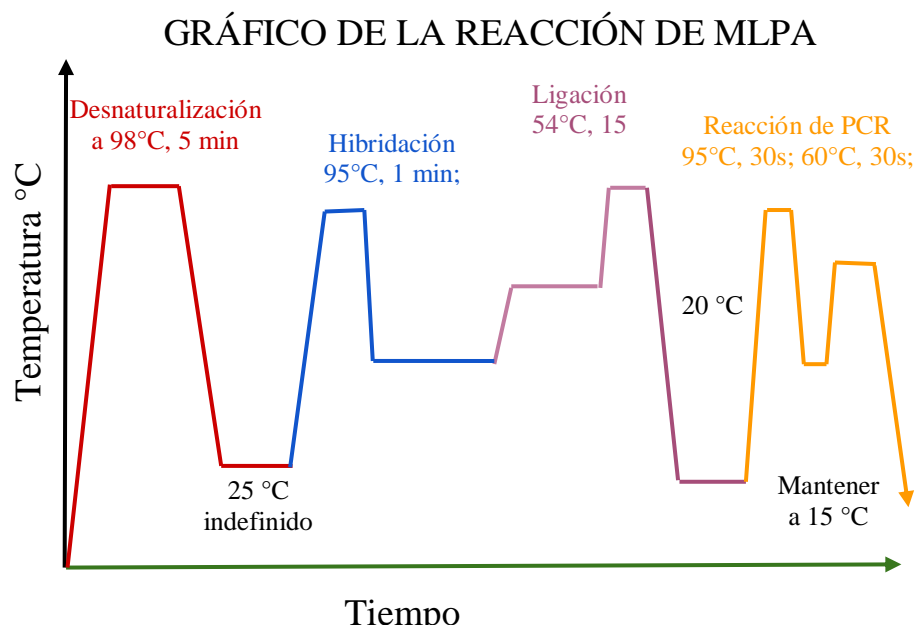
La determinación de variantes en el número de copias de DNA en humanos tiene un papel importante en una cantidad importante de enfermedades. La técnica de MLPA es una prueba semicuantitativa que nos permite tener un aproximado en el número de copias de hasta 60 secuencias de DNA.



Cada kit de MLPA cuenta con hasta 60 sondas que se unen a secuencias específicas y éstas tienen un tamaño de amplicón diferente de entre 150 a 500 nucleótidos. En reacciones subsecuentes todas las sondas son ligadas y amplificadas simultáneamente usando el mismo par de cebadores. Uno de estos cebadores está marcado fluorescentemente lo que permite ser visualizado durante la separación de los fragmentos a través de electroforesis capilar.

La técnica de MLPA realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando la mezcla de sondas SALSA MLPA P054-FOXL2-TWIST1 probemix y el kit EK1 reagent (MCR Holland).

Para esta prueba se necesita una alícuota de DNA de 50 a 100 ng/ $\mu$ L en un volumen de 5  $\mu$ L por reacción.



**Figura 7.** Gráfica representativa del programa en termociclador para la reacción de MLPA.

En el día uno se realizó la desnaturalización del DNA, una vez que la reacción alcanzara una temperatura de 25 °C se adiciona a la reacción de hibridación los reactivos y la cantidad correspondiente, los cuales se observan en la **Tabla 7** y los tiempos empleados se muestran en la **Figura 7**.

**Tabla 7.** Reactivos y volúmenes para la prueba MLPA Día 1

Reactivo	Cantidad en $\mu\text{L}$ por cada reacción
DNA (30 ng/ $\mu\text{L}$ )	5.0
Buffer MLPA (Tapa amarilla)	1.5
Sondas (Tapa negra)	1.5
Volumen total	8.0

En el Día 2 se llevó a cabo la ligación, si la hibridación no se llevaba a cabo correctamente, el proceso de ligación tampoco. Los reactivos de ligación se agregaron al momento que la temperatura de la reacción se mantenía a 54 °C. Los reactivos, volúmenes y tiempos de reacción utilizados se muestran en la **Tabla 8** y **Figura 7** respectivamente.

**Tabla 8.** Reactivos y volúmenes para la prueba MLPA Día 2. Ligación

Reactivo	Cantidad en $\mu\text{L}$ por cada reacción
dH <sub>2</sub> O	25.0
Buffer A	3.0
Buffer B	3.0
Ligasa-65	1.0
Volumen total	32.0

Continuando con la reacción en el Día 2, después de ser inactivada la ligasa se procedió a amplificar los fragmentos que fueron unidos por la ligasa, utilizando un par de cebadores para los fragmentos que serán analizados, por medio de una PCR punto final. Los reactivos para la reacción de PCR se adicionaron a 20 °C. Los reactivos, volúmenes **Tabla 9** y tiempos de reacción empleados se muestran en la **Figura 7**.

**Tabla 9.** Reactivos y volúmenes para la prueba MLPA Día 2. Reacción de PCR

Reactivo	Cantidad en $\mu\text{L}$ por cada reacción
dH <sub>2</sub> O	7.5
SALSA PCR (Primer-Mix)	2.0
SALSA (Polimerasa)	0.5
Volumen total	.10.0

## 6.5 SEPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Los fragmentos amplificados se encontraban marcados con fluorescencia (con el fluoróforo FAM), los cuales fueron separados por medio de una electroforesis capilar, con ayuda del secuenciador 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems, empleando POP7 de Applied Biosystems como polímero para la electroforesis capilar. Este equipo separa los fragmentos por tamaños, de menor a mayor y con ayuda del marcador de peso molecular GeneScan de Applied Biosystems (marcado con el fluoróforo LIZ) se determinan los pesos moleculares de cada fragmento amplificado. El análisis de los fragmentos se realizó con el software Coffalyser de MRC Holland. Este programa asigna un nombre a cada fragmento dependiendo del tamaño y de la sonda utilizada, realiza una comparación con muestras control, el aumento o disminución de la cantidad de número de copias con respecto al control y arroja una predicción de ganancia o pérdida de material genético.

## 6.6 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POR PCR PUNTO FINAL

### 11.6.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Para analizar el único exón del gen *FOXL2*, que posee una longitud de 1092 pares de bases (pb), se diseñaron 5 pares de cebadores que cubrieron toda la región exónica, y una región anterior y una región posterior al exón. El diseño de cada cebador, así como sus temperaturas medias de alineamiento ( $T_m$ ) se obtuvieron utilizando el programa "PrimerSelect" de DNASTAR. Las condiciones que se buscaron fueron que la  $T_m$  entre el cebador "Forward" y el cebador "Reverse" fueran lo más parecidas entre si para cada par de cebador (Ver **Tabla 10**). El programa PrimerSelect del paquete Lasergene® de la marca DNASTAR muestra la secuencia, longitud y temperatura media de alineamiento sugerida para cada cebador, además nos muestra el tamaño del producto esperado para los 5 pares de cebadores.

**Tabla 10.** Cebadores amplificadores específicos de la región exónica de *FOXL2*, fragmentos 1 a 5

Fragmento	Forward	Reverse
1	5'-CTTGGAGATGAACTCGCCCGTG-3'	5'-TGCCAGCCCTTCTTATTCTTCTCG-3'
2	5'-CGGAGAAGAGGCTCACGCTGTC-3'	5'-CGGCCGCGTGCAGATGGTGT-3'
3	5'-CGCATCCGCACGCACACCATCT-3'	5'-CACACGTATTGGTCCGTCCCTTTC-3'
4	5'-GCTAGACGCGCCGGACAGGAC-3'	5'-GGTGAAACTTCCCAATTGGTAGACG-3'
5	5'-AAAAGCTTTAGTATTCCTCATCTT-3'	5'-TAACTCATTCTGAAAAAGATAAAA-3'

Se estandarizó la amplificación de 5 pares de cebadores, utilizando DNA control, extraído con el mismo kit comercial empleado para la extracción del DNA de las muestras.

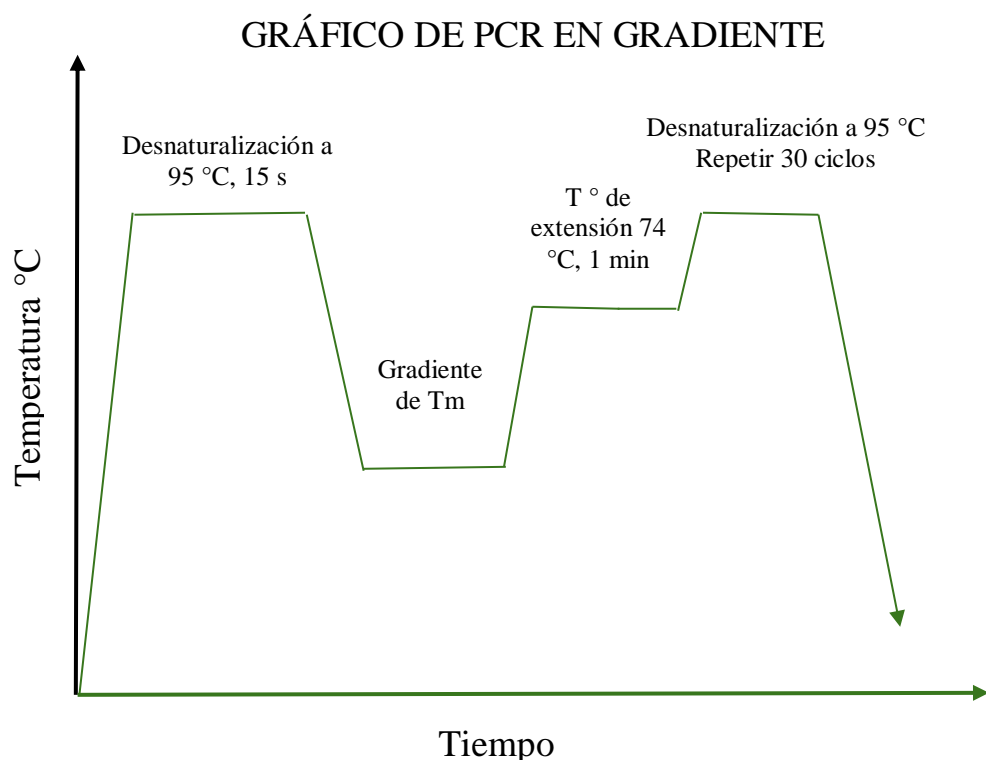
Para la estandarización se utilizó una alícuota de DNA control a 100 ng/μL. la amplificación se realizó empleando el kit HotStarTaq® Master Mix de QIAGEN. La enzima de este kit requiere de una activación con calor, para la cual se necesita mantener una T de 95°C durante 15 minutos según las instrucciones del fabricante. Se empleó el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf®. Cada reacción se preparó como se indica en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Reactivos y volúmenes correspondientes para cada reacción de PCR punto final de los fragmentos 4 y 5

Reactivo	Cantidad en μL por cada reacción
Master Mix	6.25
Primer Forward (10 pM)	1.25
Primer Reverse (10 pM)	1.25
cDNA (100 ng/μL)	3.0
H <sub>2</sub> O	0.75
Volumen total	12.5

Para establecer la T<sub>m</sub> experimental para cada par de cebadores, se realizaron rampas de temperatura, contemplando dentro las temperaturas medias de alineamiento de los cebadores utilizados de cada reacción. Cada rampa de temperaturas incluía seis temperaturas distintas. La amplificación se realizó en el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf® el cual permite controlar la

temperatura por filas, esto hace posible obtener hasta 12 diferentes temperaturas de alineamiento.



**Figura 8.** Diagrama de PCR punto final en gradiente, la Tm abarca desde los 50 °C hasta los 68 °C, la Tm media es de 59 °C y se extiende +/-9 °C hacia cada extremo.

Para los casos de los fragmentos 1, 2 y 3 debido a que la región no amplifica correctamente, se modificaron las condiciones y se adicionó dimeltilsulfóxido (DMSO) al 10% para evitar la formación de estructuras secundarias. La mezcla de reacción empleada se indica en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Reactivos y volúmenes correspondientes para amplificación por PCR punto final de los fragmentos 1, 2 y 3.

Reactivo	Cantidad en $\mu\text{L}$ por cada reacción
Master Mix	6.25
Primer Forward (10 pM)	1.25
Primer Reverse (10 pM)	1.25
cDNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	3.0
H <sub>2</sub> O	0.0
DMSO 10%	1.25
Volumen total	13.0

Después de realizar cada gradiente de PCR punto final, se realizan geles de agarosa al 1.5% para analizar los productos obtenidos del gradiente de los cinco fragmentos y así determinar la temperatura de alineamiento óptima de cada uno de los cinco pares de cebadores. Se seleccionaron aquellas temperaturas en las cuales el fragmento amplificado presentara el peso molecular más aproximado al esperado y que no existiera la presencia de otros fragmentos en el mismo carril del gel (amplificaciones inespecíficas).

De las temperaturas cuyos fragmentos cumplieran con dichas características se seleccionó aquella temperatura donde se observa el fragmento con mayor intensidad, suficiente para concluir que en la reacción se favorecía la formación del producto. Las  $T_m$  determinadas experimentalmente para cada par de cebadores se muestran en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Temperaturas de alineamiento óptimas experimentales para cada fragmento de la región exónica de *FOX2*.

Fragmento	Temperatura óptima
1	62.2 °C
2	62.2 °C
3	53.3 °C
4	65.5 °C
5	55.7 °C

Una vez que se obtuvo la amplificación por PCR punto final se procedió a secuenciar el producto obtenido con la  $T_m$  óptima, con el fin de comprobar que el fragmento correspondiera con la secuencia de nucleótidos esperada.

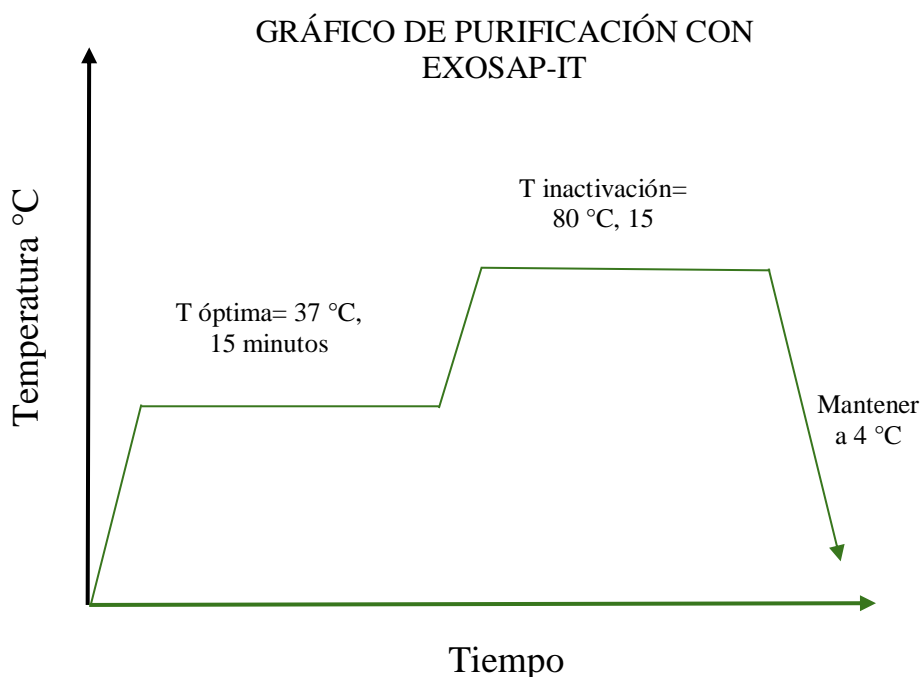
## 6.7 PURIFICACIÓN CON EXONUCLEASA

Para llevar a cabo la reacción de secuenciación, se eliminaron la mayor cantidad de impurezas posibles de nuestro producto de PCR punto final, para ello se utilizó la enzima de purificación ExoSAP-IT® (USB Corporation). Esta exonucleasa elimina cualquier fragmento de DNA de cadena sencilla.

**Tabla 14.** Reactivos y volúmenes correspondiente para cada reacción de purificación.

Reactivo	Cantidad en $\mu\text{L}$ por cada reacción
Producto de PCR punto final	2
ExoSAP-IT	1
H <sub>2</sub> O	4
Volumen total	7

Esta reacción de purificación se llevó a cabo en dos pasos, el primero es mantener durante 15 minutos una temperatura de 37 °C que es la temperatura óptima de trabajo de la enzima, el segundo paso es mantener a una temperatura de 80 °C durante 15 minutos para la inactivación de la enzima y que no interfiera en los pasos posteriores. **Figura 9.**



**Figura 9.** Diagrama de una reacción de purificación por exonucleasa

## 6.8 REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

La reacción de Secuenciación se realizó a partir del producto de PCR punto final purificado, empleando el método de Sanger modificado con el kit BigDye® v3.1 Terminator Sequencing Cycle (Applied Biosystems).

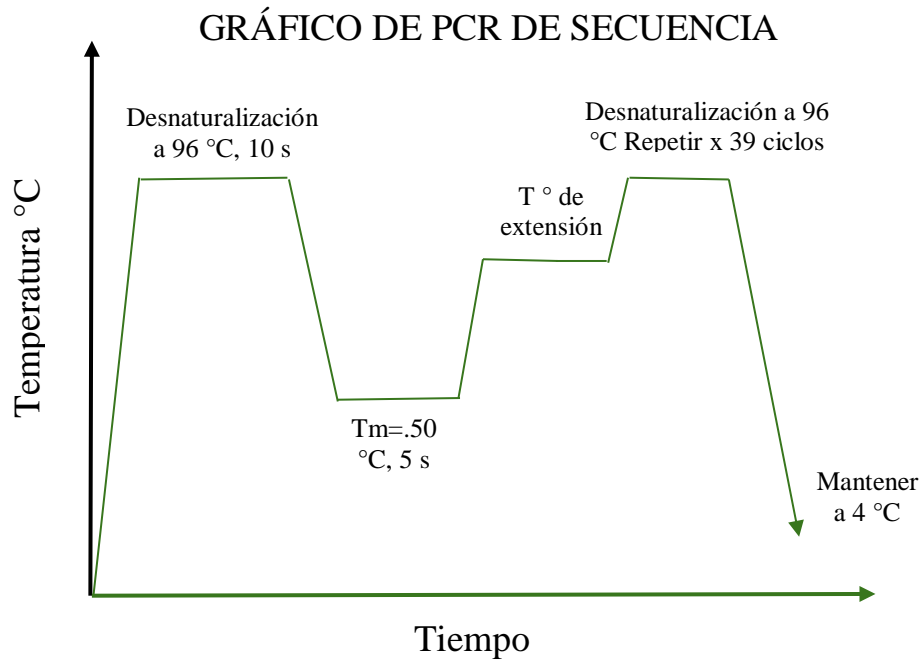
Se secuenciaron los cinco fragmentos, cada uno en ambas direcciones (forward y reverse)

El programa utilizado en el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf® para secuenciación por el método de Sanger modificado es una reacción que se desarrolla con las operaciones básicas de una PCR punto final, pero con distintas temperaturas, tiempos y ciclaje. El programa y los reactivos se muestran en la **Figura 10 y Tabla 15** respectivamente, esto de acuerdo al kit utilizado.

**Tabla 15.** Reactivos y volúmenes utilizados para cada reacción de PCR de Secuencia.

Reactivo	Cantidad en $\mu\text{L}$ por cada reacción
Producto purificado ExoSAP-IT	7.0
Primer Forward o Reverse (3.2 $\mu\text{M}$ )	1.0
Buffer de reacción	3.0
ddH <sub>2</sub> O	7.0
BigDye®	2.0
Volumen total	20.0





**Figura 10.** Diagrama de una reacción de PCR de secuencia.

## 6.9 PURIFICACIÓN EN COLUMNA

Posteriormente se llevó a cabo la purificación del producto de PCR de secuencia, es necesario eliminar los residuos de nucleótidos marcados (nucleótidos terminadores) ya que podrían interferir en la lectura de la fluorescencia de las secuencias.

Los productos de la PCR de secuencia se purificaron con columnas de sefarosa del kit Dye Ex 2.0 spin kit® (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 6.10 SECUENCIACIÓN

Los productos de PCR de secuencia purificados fueron secados por completo y resuspendidos en formamida. Se llevó a cabo una desnaturalización a 96 °C durante siete minutos para facilitar la lectura en el secuenciador. Se procesaron en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems, utilizando POP7 de Applied Biosystems como polímero para la electroforesis capilar.

## 6.11 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Los resultados de la secuenciación se analizaron con el software BioEdit v7.0.5 para verificar la concordancia del electroferograma con la base asignada para cada pico.

Posteriormente se analizaron las secuencias en formato FASTA utilizando Blastn (NCBI), con el fin de encontrar las variantes genéticas presentes en las muestras en comparación con la secuencia de referencia del gen.

Los cambios de nucleótidos encontrados se analizaron con el software Mutalyzer 2.0.29, este software nos indica si una variante cambia drásticamente la conformación de la proteína o si solo es una variante sinónima. Las variantes que generaron un cambio en la secuencia de aminoácidos se analizaron con el software Polyphen-2 para determinar el posible impacto que posee cada variante en la secuencia de la proteína, la probabilidad/posibilidad de patogenicidad o de benignidad en función de la proteína.

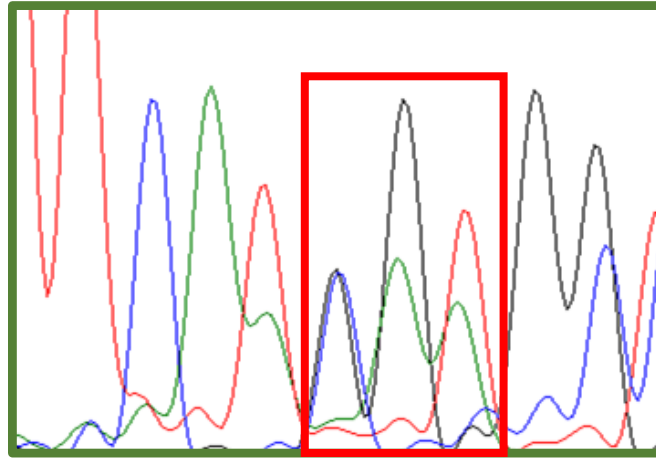
Para la identificación de polimorfismos, se compararon las variantes encontradas en la base de datos Database of Single Nucleotide Polymorphism (dbSNP) de NCBI.

## RESULTADOS

Se estudió un grupo de seis pacientes del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer) con diagnóstico multidisciplinario de Insuficiencia Ovárica Prematura Idiopática, con perfil hormonal completo y cariotipo normal.

El DNA de dos pacientes con diagnóstico confirmado de Blefarofimosis Ptosis Epicanto Inverso, provenientes del INPer y de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México, se utilizó para verificar que la técnica empleada permite la obtención de variantes genéticas de *FOXL2*.

En una de estas pacientes se encontró el cambio NG\_012454.1:g.5757\_5759del. Ver **Figura 11**.



**Figura 11.** Electroferograma de la variante heterocigota hallada en una paciente con diagnóstico de BPEI, el recuadro rojo delimita el sitio donde se presenta una delección de tres pares de bases CAA y se observa la superposición de bases por corrimiento del marco de lectura.

Homo sapiens forkhead box L2 (FOXL2), RefSeqGene on chromosome 3  
 Sequence ID: [NG\\_012454.1](#) Length: 9917 Number of Matches: 1

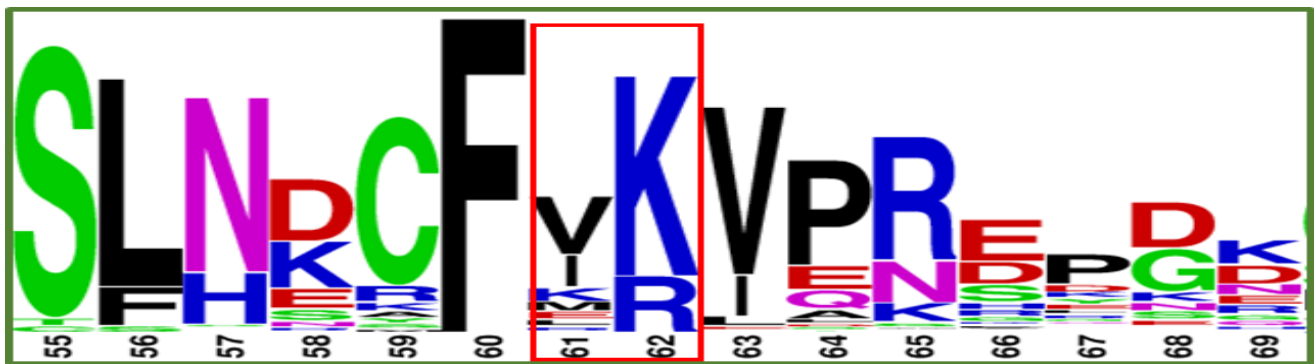
Range 1: 5667 to 6316 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	309 bits(167)	1e-79	514/677(76%)	41/677(6%)	Plus/Plu
Query	12	CATCATCGGCG-AGTTCCCGTTCTACGAGAAGAATAAGAAGGGCTGGCAAATAGCATCC	70		
Sbjct	5667	CATCATC-GCGAAGTTCCCGTTCTACGAGAAGAATAAGAAGGGCTGGCAAATAGCATCC	5725		
Query	71	GCCACAACCTCAGCCTCAACGAGTGCTTCAT ---GGTGGCGCCCGAGGGCGGCGGCGACC	127		
Sbjct	5726	GCCACAACCTCAGCCTCAACGAGTGCTTCATCAAGGTGCCGCGAGGGCGGCGGCGAGC	5785		

**Figura 12.** Alineamiento en BLASTn de un segmento de la secuencia de *FOXL2* en la cual se observa la delección de las bases CAA, como se muestra en el electroferograma de la Figura 11.

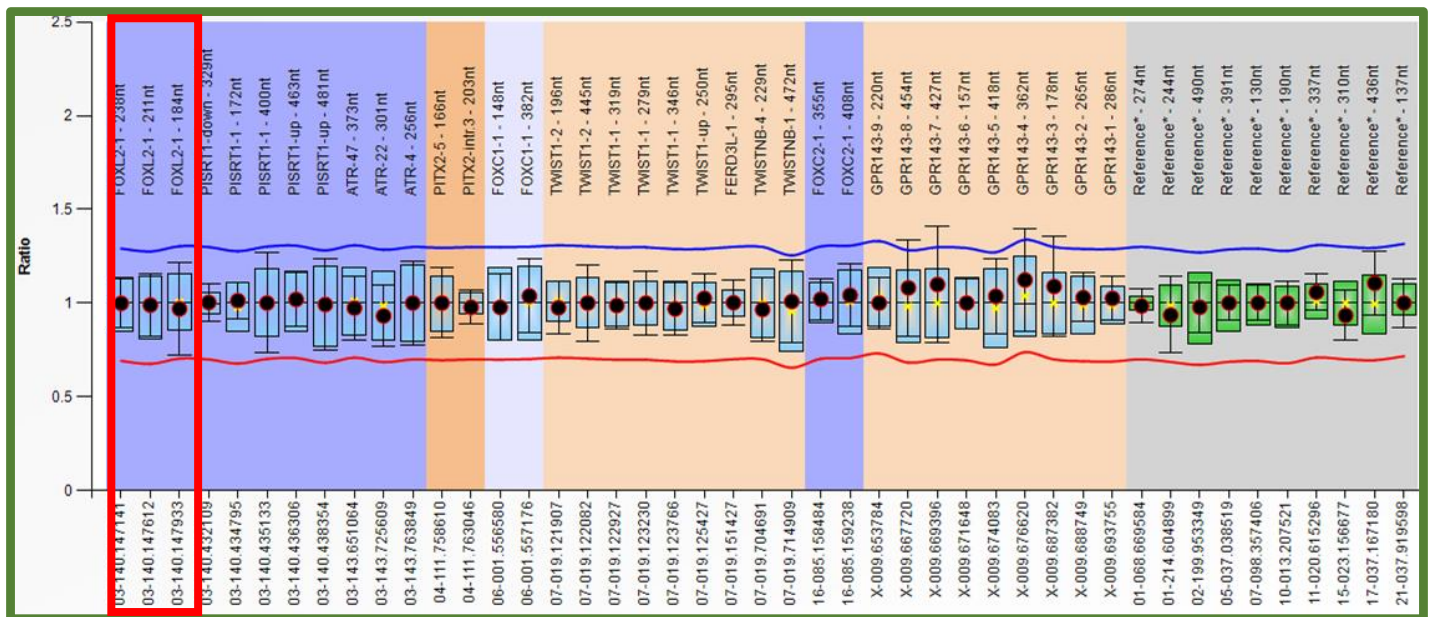
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
731 bits(1886)	0.0	Compositional matrix adjust.	374/376(99%)	375/376(99%)	1/376(0%)
Query 1		MMASYPEPEDAAGALLAPETGRTVKEPEGPPSPGKGGGGGGTAEKPDPAQKPPYSYV			60
Sbjct 1		MMASYPEPEDAAGALLAPETGRTVKEPEGPPSPGKGGGGGGTAEKPDPAQKPPYSYV			60
Query 61		ALIAMAIRESAEKRLTSGIYQYIIAKFPFYENKKGWQNSIRHNLSLNECFIKVPREGG			120
Sbjct 61		ALIAMAIRESAEKRLTSGIYQYIIAKFPFYENKKGWQNSIRHNLSLNECF+VPREGG			119
Query 121		GERKGNWTLDPACEDMFEKGNYSRRRRMKRPFPPPAHFQPGKGLFGAGGAAGGCGVAG			180
Sbjct 120		GERKGNWTLDPACEDMFEKGNYSRRRRMKRPFPPPAHFQPGKGLFGAGGAAGGCGVAG			179

**Figura 13.** Comparación de la proteína resultante de la variante NG\_012454.1:g.5757\_5759del contra la proteína normal o tipo silvestre, mediante la herramienta Blastp. En rojo se enmarca el cambio de aminoácido de una Isoleucina por una Metionina y la delección de una Lisina.NG\_012454.1(FOXL2\_i001):p.(Ile113\_Lys114delinsMet).



**Figura 14.** HMM (Modelo oculto de Markov) Logo del alineamiento de la secuencia de proteínas del dominio Forkhead, donde a mayor tamaño, mayor grado de conservación del aminoácido. En el recuadro rojo se resaltan los aminoácidos deletados (Isoleucina y Lisina). En su lugar se inserta una Metionina.

Se estandarizó la técnica de MLPA para identificar Variaciones en el Número de Copias (CNV's), a la cual se sometieron los casos con IOP. Este estudio no identificó CNV's en nuestro grupo analizado, como se muestra en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Análisis con Coffalyzer.NET de una muestra con IOP (Ratio Chart). En el recuadro rojo se resaltan las sondas para *FOXL2* en las cuales no se observan variantes en cambio en el número de copias para las muestras analizadas por MLPA.

En nuestra población de estudio (IOP) se encontraron un total de 38 variantes dentro del gen *FOXL2*, de ellas, 25 fueron sinónimas y 13 resultan en un cambio de aminoácido (**Tabla 16**)

Todos los casos mostraron variantes con respecto a la secuencia consenso con un mínimo de 9 y un máximo de 15 variantes por caso.

Se delimitaron estas variantes para analizar únicamente las que producen un cambio de aminoácido dentro de la proteína debido a que estos cambios tienen el potencial de provocar un efecto adverso en la proteína. (**Tabla 17**).

**Tabla 16.** Total de variantes encontradas en la serie de casos, dentro de la región exónica del gen *FOXL2*.

Gen	Variante	ID dbSNP	Producto
FOXL2	NG_012454.1:g.5111G>A	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5128A>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5168G>A	<a href="#">rs145924266</a>	Sinónima
	NG_012454.1:g.5187G>A	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5277A>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5279C>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5281A>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5285A>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5293C>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5297A>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5297A>C	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5334C>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.5782G>A NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.5833G>A NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.5852G>C NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.5855G>C NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.5858G>C NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.5864T>G NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.5954C>G	<a href="#">rs7432551</a>	No sinónima
	NG_012454.1:g.6143C>G NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.6160C>G NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.6161T>G NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.6423C>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.6481A>G NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.6497A>G NR	No reportada	No sinónima
	NG_012454.1:g.6810C>T	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.6821C>T	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.6890C>G	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.6891G>C	No reportada	Sinónima
	NG_012454.1:g.7006G>A	No reportada	Sinónima

**Tabla 17.** Variantes encontradas en las pacientes con IOP que producen un cambio de aminoácido dentro de la región codificante de *FOXL2* y su posible impacto en la proteína.

Cambio de Nucleótido	Cambio de Aminoácido	Número de pacientes	Número de controles	PolyPhen 2	SIFT
g.5757_5759del *	Ile113_Lys114delinsMe	-	1	PD 1.000	NT
g.5833 G>A *	Glu139Lys	2	-	PD 1.000	NT
g.5852 G>C *	Arg145Pro	4	1	PD 1.000	nt
g.5855 G>C *	Arg146Pro	4	2	PD 1.000	T
g.5858 G>C *	Arg147Pro	4	1	PD 1.000	NT
g.5864 T>G	Met149Arg	1	-	PD 0.987	T
g.5954 C>G	Ala179Gly	1	-	pd 0.829	nt
g.6143 C>G	Ala242Gly	1	-	pd 0.495	nt
g.6160 C>G	Leu248Arg	4	-	PD 0.999	nt
g.6161 T>G	Leu248Val	2	-	pd 0.921	nt
g.6481 A>G	Met355Val	1	-	B 0.000	nt
g.6497 A>G	Tyr360Cys	1	-	PD 0.999	nt

\*Localizadas dentro del dominio Forkhead

PD = Probablemente dañina; pd = Posiblemente dañina; B = Benigna; T = Tolerada (Aparece en Alineamiento); NT = No tolerada (Aparece en Alineamiento); t = tolerada (predicción); nt No tolerada (predicción)

En la serie de casos encontramos 4 variantes las cuales generan un cambio de aminoácido y que se encuentran dentro del dominio de unión a DNA (Forkhead) de *FOXL2* los cuales se muestran en las **Figuras 17-18-19**.

Además de un SNP reportado, el cual ha sido reportado como no dañino. (Ver **Figura 20**) según la base de datos para SNP's.

```
>sp|P58012|FOXL2_HUMAN Forkhead box protein L2 OS=Homo sapiens
OX=9606 GN=FOXL2 PE=1 SV=1
MMASYPEPEDAAGALLAPETGRTVKEPEGPPPSPGKGGGGGGTAPKPDPAQ
KPPYSYVALIAMAIRESAEKRLTLSGIYQYIIAKFPFYEKNNKKGWQNSIRHNLSLNE
CFIKVPREGGGERKGNWTLDPACEDMFEKGNRRRRRMKRPFRPPPAHFQPG
KGLFGAGGAAGGCGVAGAGADGYGYLAPPKYLQSGFLNNSWPLPQPPSPMPY
ASCQMAAAAAAAAAAAAAAAAAAGPGSPGAAAVKGLAGPAASYGPYTRVQSMALPP
GVVNSYNGLGGPPAAPPPPHPHPHAHHLHAAAAPPPAPPHHGAAAPPPGQ
LSPASPATAAPPAPPTSAPGLQFACARQPELAMMHCSYWDHDSKTGALHSRL
DL
```

**Figura 16.** Secuencia de aminoácidos de la proteína *FOXL2*, en verde se encuentra remarcado el sitio de unión a DNA llamado "Forkhead".

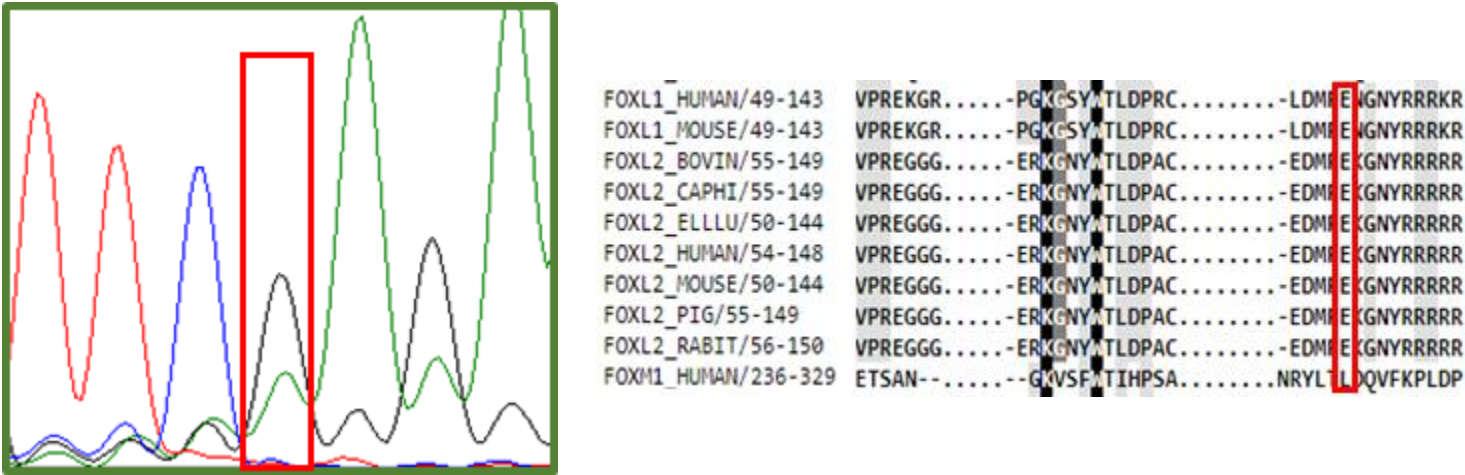
```

54 KPPYSYVALIAMAIRESAEKRLTLSGIYQYIIAKFPFYEKNKKGWQNSIRHN 105
54 KPPYSYVALIAMAIRESAEKRLTLSGIYQYIIAKFPFYEKNKKGWQNSIRHN 105

106 LSLNECFIKVPREGGGERKGNWTLDPACEDMFEKGNYYYYRR 148
106 LSLNECFIKVPREGGGRKGNWTLDPACEDMFKKGNYPYPPR 148

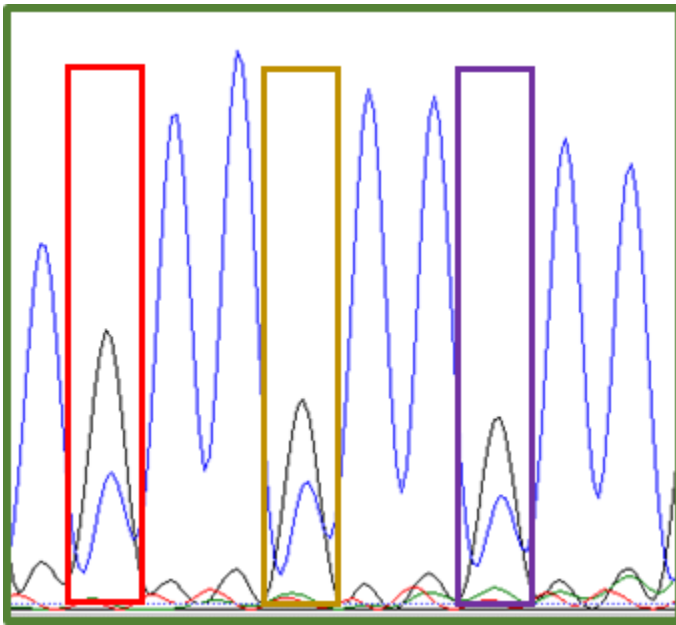
```

**Figura 17.** Dominio Forkhead de la proteína de FOXL2, en rojo se señalan las variaciones encontradas en la serie de casos que recaen dentro del dominio de unión a DNA.



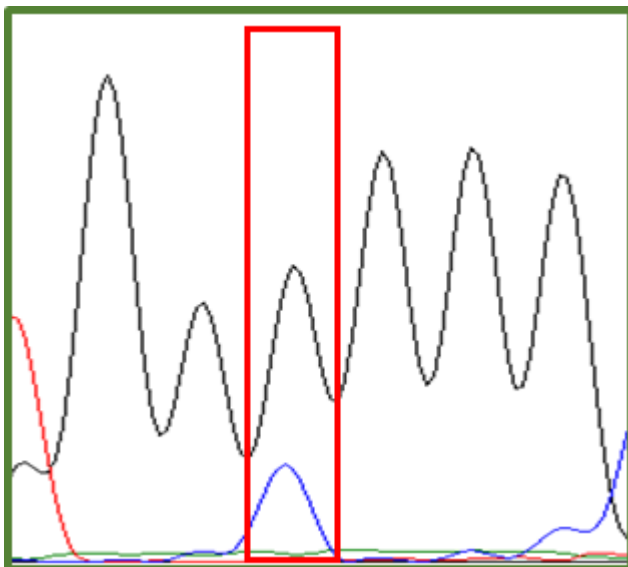
**Figura 18.** Electroferograma, de la variante heterocigota de una Adenina por una Guanina, NG\_012454.1:g.5833G>A Se encuentra marcada con un rectángulo rojo, éste se encuentra dentro del dominio Forkhead de la proteína FOXL2 El aminoácido “E”, marcado en rojo se encuentra poco conservado evolutivamente. Marcado en negro mayor conservación y blanco menor conservación evolutiva.





FOXL1_HUMAN/49-143	VPREKGR....-PGKGSY.TLDPRC.....-LDMFENGNYRRRKR
FOXL1_MOUSE/49-143	VPREKGR....-PGKGSY.TLDPRC.....-LDMFENGNYRRRKR
FOXL2_BOVIN/55-149	VPREGGG....-ERKGNV.TLDPAC.....-EDMFEKGNVRRRRR
FOXL2_CAPHI/55-149	VPREGGG....-ERKGNV.TLDPAC.....-EDMFEKGNVRRRRR
FOXL2_ELLLU/50-144	VPREGGG....-ERKGNV.TLDPAC.....-EDMFEKGNVRRRRR
FOXL2_HUMAN/54-148	VPREGGG....-ERKGNV.TLDPAC.....-EDMFEKGNVRRRRR
FOXL2_MOUSE/50-144	VPREGGG....-ERKGNV.TLDPAC.....-EDMFEKGNVRRRRR
FOXL2_PIG/55-149	VPREGGG....-ERKGNV.TLDPAC.....-EDMFEKGNVRRRRR
FOXL2_RABIT/56-150	VPREGGG....-ERKGNV.TLDPAC.....-EDMFEKGNVRRRRR

**Figura 19.** Electroferograma, de tres variantes heterocigotas, las cuales se marcan en rectángulos rojo, ocre y morado se señalan los cambios de base NG\_012454.1:g.5852G>C; NG\_012454.1:g.5855G>C; NG\_012454.1:g.5858G>C respectivamente. Éste se encuentra dentro del dominio Forkhead. Las segunda y tercera arginina tienen mediano grado de conservación evolutiva.



**Figura 20.** Electroferograma de una variante heterocigota de una Ctosina por una Guanina NG\_012454.1:g.5954C>G la cual se señala en rojo, esta variante está reportada como un polimorfismo con número de identificación [rs7432551](#). Esta variante no se encuentra dentro del dominio Forkhead.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La infertilidad es un desorden común que afecta a 1 de cada 10 parejas. En el 10% de éstas, las mujeres tienen un mal funcionamiento en las interacciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Este padecimiento tiene un impacto en la calidad de vida de las mujeres tanto en el bienestar psicológico como en las relaciones de pareja. También tiene un efecto adverso en la salud cardiovascular y mantenimiento óseo estos dos últimos padecimientos están relacionados con la baja producción de estrógenos. (Torrealday, 2017).

En condiciones normales el número de ovocitos al nacimiento es cerca de 1 millón y poco menos de 300,000 sobreviven en la pre pubertad. La sobrevida o muerte de estos ovocitos depende del balance entre factores pro-apoptóticos o anti-apoptóticos que mantienen la homeostasis tisular de los ovarios. Un desbalance en estos factores puede provocar infertilidad al aumentar la capacidad pro apoptótica o cáncer de ovario al no regular los mecanismos de reproducción celular por medio de la apoptosis. La mayoría de estos factores que influyen en la vida y desarrollo ovárico están mediados por la interacción entre las células de la granulosa y los ovocitos.

Dentro de este grupo de factores, uno de los más importantes debido a las vías de señalización en las que interviene, es el factor de transcripción FOXL2 el cual está relacionado principalmente con el Síndrome de Blefarofimosis Ptosis Epicanto Inverso, síndrome al cual se le asocia infertilidad debido a insuficiencia ovárica prematura.

La proteína FOXL2 sufre diferentes modificaciones postraduccionales, e interactúa con una considerable cantidad de proteínas, debido a estas modificaciones e interacciones, FOXL2 tiene, entre otras, actividad pro apoptótica, promueve el crecimiento de los folículos primordiales y la diferenciación a células de la granulosa, lo cual es necesario para el desarrollo y maduración de los ovocitos además del mantenimiento de los ovocitos maduros.

En el 2008 en un estudio realizado por Benayoun, por primera vez se asoció el gen *FOXL2* con el síndrome de Blefarofimosis Ptosis Epicanto Inverso, en este estudio se observó que en ratones knockout para *Foxl2*, los párpados no se forman correctamente y las células de la granulosa no maduran apropiadamente, conduciendo a la ausencia de folículos primarios, lo que resulta en el agotamiento folicular prematuro. Debido a la importancia que tiene *FOXL2* en el desarrollo ovárico en nuestro estudio analizamos la relación de variantes en el gen *FOXL2*, y su impacto en el desarrollo ovárico, para esto se incluyeron mujeres menores de 40 años con insuficiencia ovárica prematura idiopática, sin presentación clínica de BPEI, buscando variaciones en el gen codificante para *FOXL2*.

En el 2005 Lee y colaboradores descubrieron la actividad pro apoptótica de *FOXL2* sobre Células de la Granulosa, la cual resultó ser dosis-dependiente. Por lo que un aumento en la expresión o en el número de copias del gen *FOXL2* puede resultar en un incremento de la apoptosis inducida sobre las células de la granulosa y consecuentemente el agotamiento folicular. Para evaluar el número de copias en este gen utilizamos la técnica de MLPA (Fig. 15), donde al analizar los patrones, no se observaron variaciones en el número de copias en las regiones analizadas para el gen *FOXL2* de nuestras pacientes. Esto quiere decir que no hay ganancias ni pérdidas de dichas regiones, dicho en otras palabras, el gen no se encuentra ni en mayor ni en menor dosis en las muestras obtenidas de nuestras pacientes.

Por otra parte realizamos la técnica de secuenciación capilar por el método de Sanger modificado para realizar el análisis del gen *FOXL2*, al analizar los electroferogramas en Bioedit® las variantes que con más frecuencia se encontraron fueron sinónimas (**Tabla 16**). Aunque estas variantes no producen un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína se ha propuesto que estas pueden tener impacto en los procesos celulares, como regulación genética, estructura del mRNA y procesamiento de la proteína, conformación y funcionalidad (Hunt, 2014). Algunas de estas variantes pudieran estar localizadas en elementos de regulación en cis, que resultan críticos para la regulación del gen, tales como: 1) Sitios de Splicing, empalme potenciador (ESEs) y empalme silenciador (ESSs), los cuales pueden cambiar la estructura primaria de la proteína ya que son necesarios para definir las

uniones de intrones y exones en grandes eucariontes; 2) miRNA y sitios de unión al factor transcripcional, que pueden alterar los niveles de expresión del gen.

Si las variantes se localizan en la región 3'-UTR podrían afectar la estructura del RNA mensajero, ya sea volviéndolo más inestable (afectando la longitud de la cola de poli-A) y por tanto favoreciendo su degradación, lo que conlleva a una baja expresión de la proteína. Si las variantes se localizan en la región 5'-UTR se puede obstaculizar la iniciación de la traducción y producir una baja expresión de la proteína.

Se propone que las variantes sinónimas pueden afectar la velocidad de traducción mediante tres posibles mecanismos: 1) Elección del codón sinónimo; 2) Los aminoácidos cargados positivamente interactúan con el túnel de salida 50S cargado negativamente; 3) La estructura del RNA mensajero (Hunt, et.al., 2014).

En un estudio se sugiere que las proteínas truncas, las mutaciones con cambio de aminoácido en el dominio Forkhead o la expansión de la cadena de poli Alaninas pueden desencadenar una deslocalización, agregación y/o alterar la transactivación, actividades que pueden ser responsables del síndrome BPES y de la Insuficiencia Ovárica Prematura. (Moumne, et.al., 2008)

Previamente se han encontrado variantes de *FOXL2* en pacientes que no presentaban BPEI pero sí IOP. Un ejemplo es el cambio G187D, el cual *in vitro* no cambia la localización celular pero posee impacto en la transactivación, esto hace que el promotor reportero principal tenga una menor actividad que la forma silvestre, pero está disponible para el promotor de *OSR2* (Asociado a saltos impares) un blanco potencial de *FOXL2* en la región craneofacial. En los ovocitos el resultado del funcionamiento anormal del gen *FOXL2* acelera la maduración de las células de la granulosa, lo que provoca la muerte prematura de los ovocitos ([OMIM 605597](#)) esto concuerda con la ausencia de anomalías craneofaciales. (Elzaiat, et.al., 2017)

Se realizó el análisis a las variantes no sinónimas (**Tabla 17**) con el fin de comparar e intuir el impacto que tiene en la proteína el cambio de un aminoácido por otro de acuerdo a la estructura y propiedades de los aminoácidos, así como su grado de

conservación dentro de la proteína. El análisis *in silico* realizado con Polyphen y con SIFT mostró que la mayoría se encuentran situadas en residuos o regiones altamente conservadas entre secuencias relacionadas. Encontramos que cuatro de estas variantes se encuentran dentro del sitio de unión a DNA, dos de ellas en sitios conservados de la proteína este sitio de unión a DNA varía de entre las proteínas de la familia Forkhead, lo cual confiere especificidad a la proteína y actúe sobre órganos específicos. Otras siete variantes se encuentran fuera del sitio de unión a DNA algunos pueden ser residuos que se encuentran conservados en la proteína, o cumplen una función importante, en la actividad proteica ya sea de reconocimiento, de unión, activación o silenciamiento a otras proteínas, u otra función específica lo cual puede afectar negativamente el funcionamiento de la proteína al evitar la correcta formación de las células de la granulosa y por lo tanto sobre los ovocitos, disminuyendo la reserva ovárica que provoca la IOP.

En la **Tabla 17** se observan los resultados del análisis *in silico* de las variantes con cambio de sentido, se observa que el cambio de Ácido glutámico por Lisina (Glu139Lys) el cual se encuentra dentro del dominio Forkhead, es probablemente dañino con un score de 1.00 con Polyphen y no tolerado por la herramienta SIFT, estas dos herramientas realizan un alineamiento y relacionan el daño a mayor grado de conservación, SIFT además analiza el aminoácido en cuestión y de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas. El Ácido glutámico debido a su segundo grupo carboxílico es de naturaleza polar, cargado negativamente a pH fisiológico mientras que la Lisina es un aminoácido básico (cargado positivamente) la cual contiene un segundo grupo amino en la posición  $\epsilon$  de la cadena alifática, lo que le confiere la carga positiva. Las cadenas R- de estos aminoácidos difieren de manera considerable al ser uno de naturaleza ácida y la segunda de naturaleza básica, al existir un intercambio entre estos dos residuos, dificulta la conservación de la función del residuo nativo. (Voet, 2006)

En los cambios de Arginina por Prolina (Arg145Pro, Arg146Pro, Arg147Pro) que se encuentran dentro del sitio de unión a DNA, Polyphen arroja un score de 1.00 lo cual es considerado probablemente dañino, debido al sitio altamente conservado de la proteína donde ocurre el cambio como puede observarse en la Figura 19. La

herramienta SIFT da como resultado en los cambios 1° y 3° como no tolerados, en cambio el 2° lo arroja como tolerado, debido a que este aminoácido puede estar ligeramente menos conservado, hay que tener en cuenta que el análisis es realizado individualmente. En adición se analizan las propiedades de los aminoácidos donde tenemos a que la Arginina es una entidad de carácter básico, con carga positiva debido a que tiene un grupo guanidino cargado positivamente en R-. En cambio la prolina contiene un grupo R- que es un hidrocarburo alifático, esto le da característica no polar e hidrófobo. En este caso la solubilidad de estos dos residuos hace que reaccionen de manera distinta y en el caso de ocurrir un intercambio, no pueden suplir la función en la proteína que tiene el aminoácido nativo. Habría que considerar que la Prolina cambia el sentido del plegamiento de la proteína debido a que en cambio de todos los aminoácidos, ésta solo tiene el grupo carboxilo. (Voet, 2006)

Se realizó el análisis de las variantes encontradas que presentan un cambio de aminoácido pero el cambio se produce fuera del dominio Forkhead, como ya se ha observado estos cambios pueden producir IOP sin presentar signos de BPEI .

El cambio de una Metionina por una Arginina (Met149Arg) es probablemente dañina con un score de 0.987 por Polyphen y “tolerada” por la herramienta SIFT esto se puede deber a que la metionina es un aminoácido de naturaleza no polar o hidrófobo, con un grupo R- que contiene azufre. La arginina al ser básica y tener carga positiva se le confiere una naturaleza polar o hidrofílica, por lo que el cambio entre estos dos residuos puede ser perjudicial debido a la diferencia notable de sus características. (Voet, 2006)

Analizando los cambios Alanina por Glicina (Ala179Gly, Ala242Gly) se clasifican como posiblemente dañino, debido posiblemente al grado de conservación en la proteína pero al realizar un análisis de las propiedades de estos aminoácidos tenemos que la alanina, tiene un grupo R- pequeño, un hidrocarburo alifático (CH<sub>3</sub>) es el aminoácido menos hidrófobo de los no polares. El grupo R- de la glicina está compuesto únicamente de un Hidrógeno, el cual no interfiere en la polaridad de los grupos amino y carboxilo. Estos dos aminoácidos poseen una estructura molecular

muy parecida, por lo que el intercambio en la proteína de estos aminoácidos no tendría un impacto significativo en la función del otro. (Voet, 2006)

En el cambio de Leucina por Arginina observamos un score por Polyphen de 0.999 asignado por su grado de conservación, en SIFT es no tolerada por predicción. Al observar las propiedades de estos dos aminoácidos observamos que la leucina tiene un grupo R- alifático (CH<sub>2</sub>-CH-(2CH<sub>2</sub>)) es no polar o hidrófobo. La arginina es de carácter básico y tiene una carga +, y es polar lo que afecta de gran manera la sustitución por el aminoácido nativo debido a la diferencia de afinidad por el agua, lo cual puede afectar la conformación terciaria de la proteína.(Voet, 2006)

En los cambios de Leucina por Valina (Leu248Val) y Metionina por Valina (Met355Val) Observamos en sus propiedades que Leucina y Valina se encuentran en el mismo grupo de aminoácidos no polares o hidrófobos alifáticos, solo difieren un poco en el tamaño; por otro lado la metionina y la valina tienen una carga no polar, el primero por la presencia de un grupo -SH y el segundo por ser alifático. La similitud entre los miembros de cada grupo es de gran significancia, por lo tanto la sustitución entre estos residuos resulta en un funcionamiento lo más cercano a lo normal. (Voet, 2006)

Benayoun en el 2008 observó que el aumento de la cadena de alaninas induce a un tipo de BPEI dominante del tipo II. Las causas de la dominancia de este fenotipo se debe principalmente a la agregación de la proteína y la pérdida de función o ganancia de toxicidad que se traduce en la pérdida de la homeostasis en las células de la granulosa y por lo tanto no se pueden mantener las condiciones necesarias para los ovocitos, en consecuencia la pérdida de la función ovárica. Realizamos por medio de Blastp el alineamiento de nuestra secuencia obtenida por secuenciación de cada una de nuestras pacientes, como resultado no hubo aumento o disminución en el número de Alaninas en la cadena de proteínas, siendo 14 Alaninas consecutivas (Ala14) la cantidad normal o nativa.

Otra causa de la IOP está relacionada con la resistencia a insulina y la sobreproducción por compensación. La insulina estimula las células de la Teca interna para producir testosterona, la cual actúa en la hipófisis e hipotálamo, inhibiendo la producción de FSH/LH. FOXL2 junto con SF-1 estimulan a *CYP17* (17

alfa hidroxilasa) para la producción de 17-hidroxilasa, esta enzima es una de los limitantes de la producción de testosterona. Si el gen *FOXL2* presenta mutaciones, se puede generar la disminución de la dosis o la pérdida parcial o total de actividad de la proteína, y por tanto no se estimula de manera correcta la producción de la enzima 17-hidroxilasa, esto a su vez produce un efecto desregulador en la producción de la testosterona, y por lo tanto una menor producción de FSH/LH necesaria para la maduración y mantenimiento de los ovocitos.

Las variantes encontradas podrían estar asociadas con el desarrollo de la insuficiencia ovárica primaria, tanto como posible factor causal, como posible factor modificador de efecto. No podemos dejar atrás la posibilidad de que alguna variante encontrada en la región exónica pero fuera del dominio de unión a DNA tenga un impacto en el desarrollo de la condición de IOP en nuestras pacientes.

Serán necesarios más estudios sobre las variantes identificadas, así como el análisis de una serie más grande de pacientes para encontrar mayor evidencia sobre estas hipótesis.

## CONCLUSIONES

- Se identificaron 18 variantes sinónimas en nuestra serie de casos, las cuales pueden estar en sitios de regulación en cis críticos, las cuales afectan la velocidad de traducción.
- Se identificaron 11 variantes que modifican la secuencia de aminoácidos de la proteínas, estas pueden modificar el funcionamiento de la proteína ya que algunas se encuentran en el sitio Forkhead, varios de estos intercambios de aminoácido modifican la polaridad y/o acidez de la secuencia silvestre, lo que puede dar como resultado un mal funcionamiento de la proteína.



- No se encontraron variantes en el número de copias por medio de MLPA, por lo cual sería necesario aumentar el tamaño muestral para verificar la confiabilidad de la técnica.
- Al encontrar la proteína trunca en la muestra control, se comprobó que este estudio piloto es funcional para encontrar variantes dentro del gen *FOXL2*.
- Una de las causas del mal funcionamiento de *FOXL2* se debe a mutaciones en la región intrónica del gen, no dilucidamos esta región debido a que se encuentra en un muy bajo porcentaje este tipo de afectaciones.
- Es necesario realizar estudios funcionales y estructurales de las variantes encontradas en la serie de casos, para así poder esclarecer si estas variantes son responsables de la disminución en la reserva ovárica.
- La búsqueda de variantes genéticas en el gen *FOXL2* puede ser una herramienta adecuada para el estudio de pacientes con insuficiencia ovárica primaria idiopática y así lograr una mejoría en el asesoramiento y manejo de este tipo de pacientes.

Adicionalmente este estudio puede ser de ayuda para el diagnóstico predictivo a cáncer de ovario, identificando las variantes ya descritas y/o encontrando nuevas variantes que estén relacionadas con esta enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

Benayoun B.A., Batista F., Auer J., Dipietromaria A., L'Hôte D., Baere E. y Veitia R.A. Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. *Human Molecular Genetics*. 18(4): 632-634. doi:10.1093/hmg/ddn389

Benayoun B.A., Caburet S., Dipietromaria, A., Bailly-Bechet M., Batista F., Fellous M., Vaiman D. y Veitia R.A. (2008). The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Human Molecular Genetics*. 17(20) 3118-3127. doi:10.1093/hmg/ddn209

Benayoun B.A., Georges A.B., L'Hôte D., Andersson N., Dipietromaria A., Todeschini A-L., Caburet S., Bazin C., Anttonen M. y Veitia R.A. (2011). Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Human Molecular Genetics*. 20(9): 1673-1686. doi:10.1093/hmg/ddr042

Beysen D., Vandesompele J., Messiaen L., Paepe A.D. y Baere E.D., (2004). The Human FOXL2 Mutation Database. *Human Mutation* (24): 189-193 DOI:10.1002/humu.20079

Blount A.L., Schmidt K., Justice N.J., Vale W.W., Fischer W.H. y Bilezikjian L.M. (2008). FoxL2 and Smad3 Coordinately Regulate Follistatin Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 284(12): 7631-7645. DOI:10.1074/jbc.M806676200.

Cocquet J., Pailhoux E., Jaubert F., Servel N., Xia X., Pannetier M., Baere E. D., Messiaen L., Cotinot C., Fellous M., y Veitia R. A. (2002). Evolution and expression of FOXL2. *J. Med. Genet.* (39): 916-922. Disponible en: Revisado el

Coulam C. B., Adamson S. C., y Annegers J. F. (1985). Incidence of Premature Ovarian Failure. *Obstetrics & Gynecology*. 67 (4): 604-606. Disponible en: Revisado el

Crisponi L., Deiana M., Loi A., Chiappe F., Uda M., Amati P., Bisceglia L., Zelante L., Nagaraja R., Porcu S., Ristaldi S., Marzella R., Pocchi M., Nicolino M., Lienhardt-Roussie A., Nivelon A., Verloes A., Schlessinger D., Gasparini P., Bonneau D., Cao A. y Pilia G. (2001). The putative forkhead transcription factor, FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*. 27: 159-156. Disponible en: Revisado el

Elzaiat M., Todeschini A.-L., Caburet, S., Veitia, R. A. (2017). The genetic make-up of ovarian development and function: the focus on the transcription factor FOXL2. *Clin Genet* (91): 173-182. doi:10.1111/cge.12862

Genesser F. (3ª Ed.). (2002). Bioquímica. Argentina: Médica Panamericana

Genetics Home Reference (GHR). FOXL2 gene. 2019. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FOXL2>. Revisado el 23 de Noviembre de 2018.

Georges A., Auguste A., Bessière L., Vanet A., Todeschini A-L. y Veitia R. A. (2014). FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology* (2): 17-33. DOI:10.1530/JME-13-0159

Hunt R. C., Simhdri V., Iandoli M., Sauna Z. E. y Kimichi-Sarfaty C. (2014). Exposing synonymous mutations. *Trends in Genetics*. 30(7): 308-21. Doi:10.1016/j.tig.2014.04.006.

Jin H., Won M., Park S.E., Lee S., Park M. y Bae J. (2016). FOXL2 is an Essential Activator of SF-1-Induced Transcriptional Regulation of Anti-Müllerian Hormone in Human Granulosa Cells. *PLoS ONE* 11(7): e0159112. Doi:10.1371/journal.pone.0159112

Kuo F-T., Bentsi-Barnes I.K., Barlow G.M., Bae J. y Pisarska M.D. (2009). Sumoylation of Forkhead L2 by Ubc9 is required for its activity as a transcriptional repressor on the Steroidogenic Acute Regulatory gene. *Cellular Signalling* (21): 1935-1944. DOI:10.1016/j.cellsig.2009.09.001

Lee K., Pisarska M.D., Ko J-J., Kang Y., Yoon S., Ryou S-M., Cha K-Y. y Bae J. (2005). Transcriptional factor FOXL2 interacts with DP103 and induces apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (336): 876-881. DOI:10.1016/j.bbrc.2005.08.184

Liu C-F., Liu C., y Yao H. H-C. (2010). Building Pathways for Ovary Organogenesis in the Mouse Embryo. *Curr Top Dev Biol.* (90): 263-290. doi:10.1016/S007-02153(10)90007-0.

López V., Flores A. y Romeru S. (2015). Estudio de la Insuficiencia Ovárica Primaria (IOP) e Insuficiencia Ovárica Oculta. Guía de Prácticas Clínicas. *Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O.)* (9): 1-21. Disponible en: Revisado el

Marongiu M., Diana M., Marcia L., Sbardellati A., Asunis I., Meloni A., Angius A., Cusano R., Loi A., Crobu F., Fotia G., Cucca F., Schlessinger D. y Crisponi L. (2016). Novel action of FOXL2 as mediator of Col1a1 gene autoregulation. *Dev. Biol.* 416(1): 200-211. DOI:10.1016/j.ydbio.2016.05.022.

Matson C.K., Murphy M.W., Sarver A.L., Griswold M.D., Bardwell V.J. y Zarkower D. (2012). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature.* 476(7358): 101-104. DOI:10.1038/nature10239.

Mejía C.; Velázquez G.; Vital V.; (2013). Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y Tratamiento de la Insuficiencia Ovárica Primaria. México. Secretaría de Salud. *CENETEC.* IMSS-686-13. Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/catalogoMaestroCPC.html>. Revisado el 28 de Junio de 2019.

Moumné, L., Batista, F., Benayoun, B.A., Nallathambi, J., Fellous, M., Sundaresan, P. y Veitia, R.A. (2008). The mutations and potential targets of the forkhead transcription factor FOXL2. *Molecular and Cellular Endocrinology*. (282): 2-11 doi:10.1016/j.mce.2007.11.006

Murphy B.D. (2010). What a difference a gene makes. *Nature Medicine*. 16 (5): 527-529. Disponible en: Revisado el 28 de junio de 2019.

Nelson L.M. (2009). Primary Ovarian Insufficiency. *N Engl. J Med*. February 5. 306(6): 606-614. DOI:10.1056/NEJMcp0808697.

Online Mendelian Inheritance on Man (OMIM). Blepharophimosis, Ptosis, and Epicanthus Inversus; BPES. 2019. Disponible en <https://www.omim.org/entry/110100>. Revisado el 23 de Noviembre de 2018.

Online Mendelian Inheritance on Man (OMIM). Forkhead Transcription Factor FOXL2; FOXL2. 2019. Disponible en <https://www.omim.org/entry/605597>. Revisado el 23 de noviembre de 2018.

Qin Y., Jiao X., Simpson J.L. y Chen Z-J. (2015). Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Human Reproduction Update*. 21(6): 787-808. doi:10.1093/humupd/dmv036

Rossetti R., Ferrari I., Bonomi M. y Persani L., (2017). Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clinical Genetics* (91): 183-198. DOI: 10.1111/cge.12921

Torrealday S.; Kodaman P.; Pal L. (2017). Premature Ovarian Insufficiency - an update on recent advances in understanding and management. *F1000Research* 6(*F1000 Faculty Rev*): 2069. DOI:10.12688/f1000research.11948.1

Uhlenhaut N.H., Jakob S., Anlag K., Eisenberger T., Sekido R., Kress J., Treier A-C., Klugmann C., Klasen C., Holter N.I. Riethmacher D., Schütz G., Cooney A.J.,

Lovell-Badge R. y Treier M. (2009). Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* (139): 1130-1142. DOI:10.1016/j.cell.2009.11.021.

Voet, D. (3ª Ed.). (2006). Bioquímica. Argentina: Médica Panamericana

Webber L., Davies M., Anderson R., Bartlett J., Braat D., Cartwright B., Cifkova R. Keizer-Schrama S. de M., Hogervorst E., Janse F., Liao L., Vlaisacljevic V., Zillikens C., y Vermeulen N. (2016). ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction* 31 (5): 926-937. doi:10.1093/humrep/dew027