



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

“IDENTIFICACIÓN DE microRNAs QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE  
*FOXL2* Y ANÁLISIS DE SU INFLUENCIA DURANTE LA ACTIVACIÓN  
FOLICULAR EN OVARIOS FETALES DE RATÓN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

P R E S E N T A:

BIÓL. ELIZABETH BONILLA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

ASESOR INTERNO  
DR. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ

ASESOR EXTERNO  
DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

Ciudad de México

12 de septiembre de 2018

El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I) está valuada en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 003797.

La alumna Elizabeth Bonilla Ramírez contó con el apoyo de la beca que otorga el CONACyT con el número de CVU: 593043

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio S-248 de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Además, con el mismo propósito, se realizó una estancia de investigación en el laboratorio de la Doctora Elizabeth Langley McCarron del departamento de investigación básica del Instituto Nacional de Cancerología.

## MIEMBROS DE LA COMISIÓN TUTORAL

### DIRECTOR

Dr. Edmundo Bonilla González.

Profesor titular

Laboratorio de Expresión Génica.

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

e-mail: [mundo@xanum.uam.mx](mailto:mundo@xanum.uam.mx)

### ASESOR INTERNO

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor titular

Laboratorio de Biología Celular.

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

e-mail: [dino@xanum.uam.mx](mailto:dino@xanum.uam.mx)

### ASESOR EXTERNO

Dr. Mario Altamirano Lozano

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental

UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

e-mail: [maal@unam.mx](mailto:maal@unam.mx)

## MIEMBROS DEL JURADO

✓ **Dr. José Miguel Betancourt Rule**

Profesor Titular

Laboratorio de Biología Celular.

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

Correo: [bet@xanum.uam.mx](mailto:bet@xanum.uam.mx)



✓ **Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo**

Profesor asociado

Laboratorio de Expresión Génica.

Departamento Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: [ivan.bahena@xanum.uam.mx](mailto:ivan.bahena@xanum.uam.mx)



## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Edmundo Bonilla González por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su confianza y guía.

Al doctor Iván Bahena Ocampo por ser mi mentor, por su gran compromiso y apoyo para llevar a cabo la parte experimental de esta investigación.

Al doctor Humberto González Márquez por sus consejos, palabras de aliento y grata convivencia.

A los asesores y miembros del jurado por dedicar tiempo a la revisión de este trabajo y compartir sus conocimientos para enriquecerlo.

A la doctora Elizabeth Langley McCarron del Instituto Nacional de Cancerología por recibirme en las instalaciones de su laboratorio durante la estancia de dos meses que me permitió culminar la fase experimental de esta investigación. Agradezco también al doctor Miguel Ángel Rivas Torres por las asesorías brindadas durante mi estancia en este laboratorio.

Al M. en C. José Luis Cruz Colín del Instituto Nacional de Medicina Genómica por capacitarme en el manejo de la línea celular utilizada, 3T6-Swiss albino ATCC® CCL-96.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Jessica, Ximena, Jonathan, Carlos, Luisa, Ingrid, Alejandro y Mario por los buenos ratos de convivencia, por su solidaridad y siempre buena disposición.

## ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN .....	i
2. ABSTRACT .....	ii
3. INTRODUCCIÓN .....	1
• Desarrollo temprano del ovario e inicio de la foliculogénesis .....	2
• Activación folicular .....	6
• <i>Foxl2</i> en el desarrollo folicular .....	12
• Regulación post-transcripcional de la expresión génica .....	14
• Naturaleza de los microRNAs .....	15
• Los microRNAs y su participación en la regulación de <i>Foxl2</i> .....	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
5. JUSTIFICACIÓN .....	21
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	21
7. HIPÓTESIS .....	22
8. OBJETIVOS .....	22
9. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	23

<b>10. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
• Identificación <i>in silico</i> de microRNAs con probable función reguladora de <i>Foxl2</i> .....	24
• Análisis de la expresión de <i>Foxl2</i> durante la ovogénesis o foliculogénesis fetal .....	24
○ Extracción de RNA y RT-PCR .....	24
○ PCR punto final .....	26
• Análisis del silenciamiento de <i>Foxl2</i> por el microRNA 295 .....	26
○ Generación del inserto .....	26
○ Digestión enzimática del vector .....	28
○ Fosforilación del inserto y desfosforilación del vector .....	29
○ Ligación del inserto con el vector .....	29
○ Transformación bacteriana .....	30
○ Extracción de plásmidos por preparación media (MIDI-prep) .....	30
○ Secuenciación .....	32
○ Transfección transitoria de la línea celular 3T6-Swiss albino ATCC®CCL-96 .....	32
○ Ensayo dual de genes reportero para la evaluación de la interacción microRNA-RNAm .....	33
<b>11. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
• Identificación <i>in silico</i> de microRNAs con probable función reguladora de <i>Foxl2</i> .....	34

- Perfil de expresión de *Foxl2* y de los microRNAs con probable función reguladora durante el desarrollo embrionario ..... 35
- Ubicación del MRE en la 3'UTR del RNAm de *Foxl2* ..... 38
- Validación de la expresión de *Foxl2* mediante RT-PCR ..... 40
- **Análisis del silenciamiento de *Foxl2* por el microRNA 295 ..... 41**
  - Clonación en el sistema vector reportero ..... 41
  - Secuenciación ..... 43
  - Transfección transitoria de la línea celular 3T6-Swiss albino ATCC® CCL-96™ y ensayo dual de genes reportero para la evaluación de la interacción microRNA-RNAm ..... 45
  
- 12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS ..... 47
  
- 13. CONCLUSIONES ..... 51
  
- 14. PERSPECTIVAS ..... 52
  
- 15. BIBLIOGRAFIA ..... 53

## RESUMEN

Durante la activación folicular existen múltiples elementos que actúan en conjunto para regular la activación de los folículos primordiales, entre ellos los genes. *Foxl2* es un gen que se expresa en células de la granulosa para cumplir funciones como promover la determinación ovárica y la diferenciación de las células de la granulosa.

Investigaciones previas han mostrado que los microRNAs 202, 133b, 30a y el grupo de microRNAs 290-295 regulan la expresión de *Foxl2* en diferentes periodos de vida causando alteraciones a varios procesos reproductivos. Sin embargo, hasta el momento no se han identificado los microRNAs que regulan la expresión de *Foxl2* durante la activación folicular por lo que el objetivo de este estudio fue determinar cuáles microRNAs regulan la expresión de *Foxl2* durante la activación folicular y analizar su efecto silenciador en un modelo de gen reportero.

En este trabajo, se encontró que *Foxl2* es blanco probable de 148 microRNAs; no obstante, únicamente tres de ellos se expresan durante la activación folicular. De ellos, dos (microRNA 17 y microRNA 20a) pertenecen a la misma familia génica y cuentan con el mismo elemento de respuesta a microRNA (MRE por sus siglas en inglés), mientras que uno (microRNA 295) corresponde a una diferente familia y tiene un MRE que varía en un nucleótido con respecto al de los otros dos. Se eligió al microRNA 295 para evaluar su posible interacción con *Foxl2* mediante un ensayo de gen reportero y se halló que éste no es capaz de silenciar la expresión génica.

Los datos obtenidos indican que la secuencia que conforma el MRE de los tres microRNAs es una región de principal importancia para la regulación postranscripcional de *Foxl2* por microRNAs. Además, los resultados del experimento de gen reportero llevan a sospechar que el microRNA 295 tiene como blanco a otros genes y que durante la activación folicular, *Foxl2* podría estar regulado por otros microRNAs. Por lo anterior, es necesario realizar más experimentos que permitan validar las nuevas hipótesis generadas a partir de las observaciones conseguidas.

**ABSTRACT**

Throughout the follicular activation there are elements that act together to regulate the primordial follicles activation, between them the genes. *Foxl2* is a gene that is expressed in granulosa cells to fulfill functions such as promoting ovarian determination and granulosa cells differentiation.

Previous investigations have shown that microRNAs 202, 133b, 30a and the microRNAs 290-295 cluster regulate *Foxl2* expression in different life periods causing alterations to several reproductive processes. However, until now, the microRNAs that regulate *Foxl2* expression during follicular activation have not been identified; therefore, the objective of this study was to determine which microRNAs regulate *Foxl2* expression during follicular activation and to analyze their silencing effect in a reporter gene model.

In this work, we found that *Foxl2* is likely target of 148 microRNAs, however, only three are expressed during follicular activation. Of these, two (microRNA 17 and microRNA 20a) belong to the same gene family and have the same microRNA response element (MRE for its acronym in english), while one (microRNA 295), correspond to a different family and has a MRE that varies in one nucleotide with respect to the other two. microRNA 295 was selected to evaluate its possible interaction with *Foxl2* throughout a gene reporter assay and it was found that this was not capable of silencing *Foxl2* expression.

The data obtained indicate that the sequence conforming the MRE of the three microRNA is a region of major importance for *Foxl2* postranscriptional regulation by microRNAs. In addition, the results of the reporter gene experiment indicate that microRNA 295 has other gene targets and that during follicular activation, *Foxl2* could be regulated by other microRNAs. Therefore, it is necessary carry out experiments to validate the new hypotheses generated from the observations obtained.

## INTRODUCCIÓN

La foliculogénesis es un proceso cíclico y dinámico a través del cual se desarrollan los folículos ováricos desde que se encuentran en la reserva de folículos primordiales quiescentes hasta que son ovulados o destinados a la muerte por atresia (Pangas y Rajkovic, 2015; Monniaux *et al.*, 2018). Involucra cambios dramáticos en el tamaño y número de varios tipos celulares con la finalidad de promover que el ovocito alcance la madurez y funcionalidad indispensables para ser fertilizado y permitir la propagación de las especies (Hannon y Curry, 2018).

Para que su progreso ocurra con normalidad es necesaria la participación de factores intrínsecos y extrínsecos como gonadotropinas, miembros de la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factores de crecimiento, factores de transcripción y hormonas sexuales que actúan de manera espacial y temporal para controlar y coordinar el crecimiento y desarrollo de ovocitos, células de la granulosa y células de la teca (Edson *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2015).

Uno de los factores de transcripción que participa en la regulación de la foliculogénesis es *Foxl2*. Se expresa principalmente en ovario durante el periodo de activación folicular y tiene como función central promover la diferenciación de las células de la granulosa de una forma aplanada a cuboide (Schmidt *et al.*, 2004).

Al igual que el resto de los genes, la expresión de *Foxl2* es coordinada en diferentes niveles y por diversos mecanismos. Por ejemplo, a nivel post-transcripcional un mecanismo importante es a través de los microRNAs.

Hasta el momento no se han identificado los microRNAs que regulan la expresión de *Foxl2* durante la activación folicular y tampoco se han descrito sus efectos en la diferenciación de los folículos primordiales a primarios. Por ello, el análisis experimental de la presente investigación se realizó mediante el estudio de la expresión de *Foxl2* modulada por microRNAs presentes en este periodo e identificados previamente *in silico*.

## **Desarrollo temprano del ovario e inicio de la foliculogénesis**

En el ratón, el desarrollo temprano del ovario es un proceso que ocurre en la vida embrionaria y postnatal y, que tiene una duración aproximada de 17 días desde que las células germinales primordiales proliferan (CGP) (día post coito 5) hasta que se forman los folículos primordiales (día postnatal 2) (Wear *et. al.*, 2016).

El origen de las CGP se encuentra fuera del tejido embrionario: el endodermo extraembrionario que regula la formación de los precursores de las CGP y el ectodermo extraembrionario que restringe su localización a la parte posterior del embrión (de Sousa Lopes, Hayashi, y Surani, 2007). A pesar de su origen, las CGP son el único tipo celular que permanece en el organismo aún después del nacimiento debido probablemente a la intención de evitar señales que promueven su diferenciación y mantener así la pluripotencia (Lanner, 2014). No obstante, también es posible que el mantenimiento de esta característica sea fruto de su capacidad para suprimir la expresión de genes homeobox, cuya principal función es inducir la diferenciación celular (Nikolic *et. al.*, 2016).

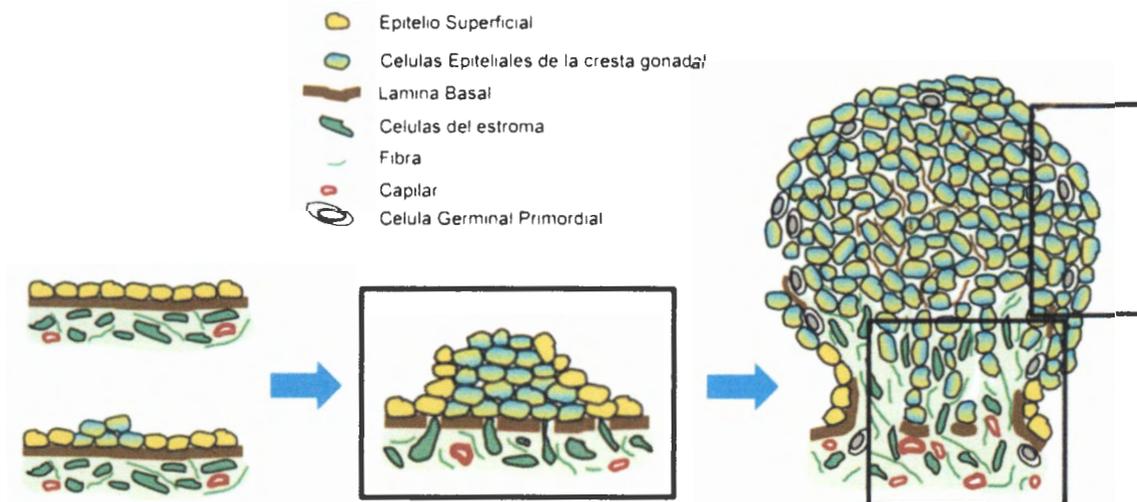
En el día 5 de desarrollo embrionario, la pequeña población de CGP comienza la mitosis e incrementa su número drásticamente; luego, en el día 6 comienzan la migración por el mesodermo extraembrionario hasta que en el día 7 se sitúan en la línea primitiva a la altura de la hendidura entre el saco vitelino y el alantoides en desarrollo (Wear *et. al.*, 2016).

En el lapso de los días 6 y 7 un factor de transcripción activa proteínas que promueven la expresión de factores de pluripotencialidad y metilación de histonas que permitirá mayor acceso de múltiples factores de transcripción hacia diversas regiones del DNA. Después, en el día 8, se desencadenan señales de migración que disminuyen la adhesión celular existente entre cada una de las CGPs; aumentando así su motilidad y capacidad de migración hacia la cresta gonadal (Wear *et. al.*, 2016).

El cese de la migración comienza alrededor de los días de desarrollo embrionario 9 y 10 una vez que las CGPs interactúan con células somáticas



presentes en la cresta gonadal que ya han colonizado. La gónada ahora formada por efecto de esa interacción se mantiene indiferenciada hasta el día 11 de gestación y es rodeada por el mesonefro que posteriormente dará origen al conducto de Müller a partir del cual se desarrollarán estructuras como oviducto, útero, cérvix y la parte alta de la vagina (Figura 1) (Sarraj y Drummond, 2012).

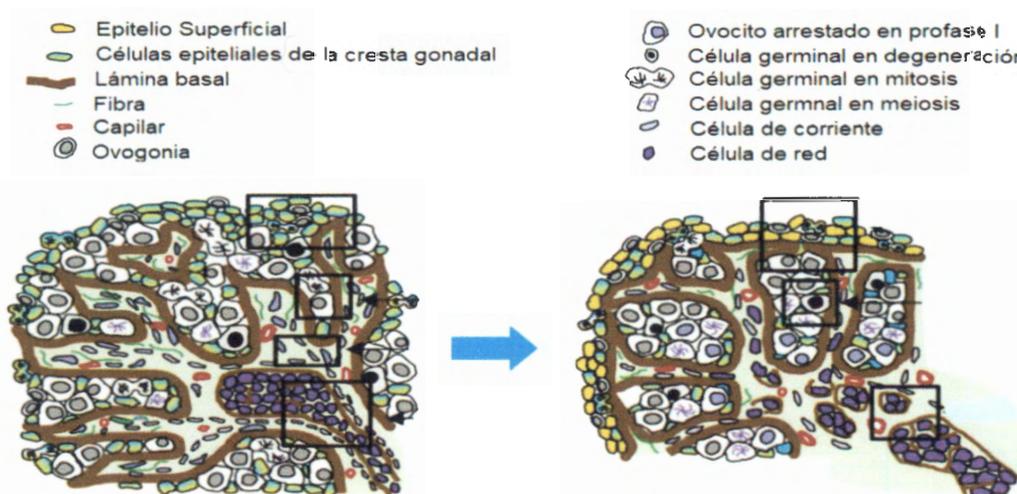


**Figura 1: Desarrollo embrionario del ovario de ratón de los días 5-11 de gestación. Comienza con la diferenciación de las células epiteliales de la cresta gonadal, a partir de células epiteliales del mesonefro, y su proliferación. El rompimiento de la lámina basal que se encuentra bajo la superficie del mesonefro permite la migración de células del estroma, vascularización y la entrada de las ovogonias al ovario. Tanto las células de la cresta gonadal como las ovogonias continúan proliferando y crean asociaciones mediante desmosomas. (Modificada de Smith *et. al.*, 2014).**

El desarrollo sexo-específico del ovario ocurre a partir del día 12 de gestación y depende tanto de la activación de vías ovario-específicas como de la inhibición de las vías opuestas. En ausencia de la región determinante del sexo del cromosoma Y (el gen SRY) o de su blanco (Sox9), diversos factores de transcripción como *Foxl2*, *Rspo1*, *Cttnb1*, *Mmtv* y *Wnt4* participan en la regulación de dichas vías trabajando de manera conjunta y paralela para asegurar el adecuado desarrollo del ovario (Eggers *et. al.*, 2014).

Una vez que las CGPs han colonizado la cresta gonadal, se mantienen en proliferación por mitosis desde el día 10 hasta el 13 y forman una estrecha asociación en forma de racimos llamados quistes de ovogonias. El inicio de la meiosis tiene lugar en el día 13 de desarrollo; este proceso permite a las ovogonias convertirse en ovocitos (Sarraj y Drummond, 2012).

Alrededor del día 14, una nueva estructura llamada cordón ovígero aparece como resultado de la asociación entre las ovogonias y las células de la pregranulosa. Este cordón, que más tarde formará la corteza del ovario, alberga un proceso de desarrollo celular que consta de tres fases: el inicio de la meiosis de las células germinales, muerte de los ovocitos y la formación de los folículos. Así, en este día comienza la muerte de algunos ovocitos por apoptosis y seguirá hasta el final del desarrollo temprano del ovario (Figura 2) (Smith *et. al.*, 2014).

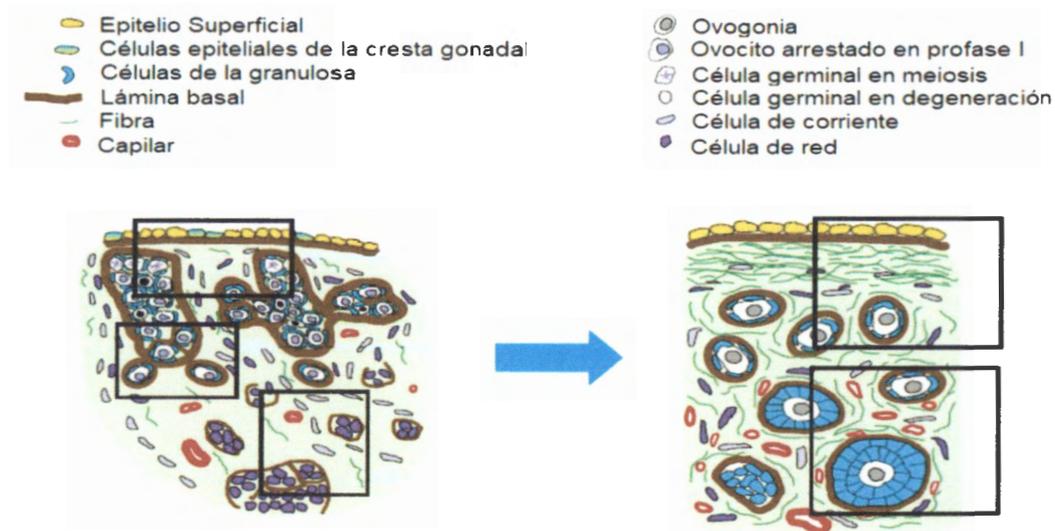


**Figura 2: Desarrollo embrionario del ovario de ratón de los días 12-14 de gestación.** La lámina basal aísla los complejos celulares (células epiteliales de la cresta gonadal-CGPs) del estroma ovárico, pero deja una apertura hacia la periferia del ovario. La apertura permite la proliferación de las células epiteliales de la cresta gonadal hacia la superficie ovárica para que éstas continúen en contacto con las CGPs que también están en proliferación y que al incrementar en número son confinadas hacia las regiones más externas de la corteza. Las CGPs entran en meiosis y posteriormente algunas comienzan la apoptosis, lo que hace evidente que dentro de los cordones las células de la cresta gonadal comienzan a diferenciarse en células de la granulosa. Algunas células derivadas del mesonefro (llamadas de "corriente") y subsecuentemente redes de túbulos (células "de red") entran en la médula del ovario penetrando la corteza y aislando los cordones ovígeros uno de otro. La lámina basal debajo de la superficie ovárica se desarrolla progresivamente aislando los cordones ovígeros de la superficie ovárica (Modificada de Smith *et. al.*, 2014).

Previo a que los quistes de ovogonias sufran su ruptura, en el día 16 comienza la expresión de factores de señalización como NOTCH2, HES1 y HEY2 que promueven la ruptura de los quistes y la formación de los folículos primordiales (Wear *et. al.*, 2016).

En los días inmediatos al nacimiento toma lugar el rompimiento de los quistes de ovogonias para formar los folículos primordiales. Durante este proceso, mientras algunas ovogonias mueren, las células de la pre-granulosa que las rodean permanecen viables y son liberadas para ser reasignadas a un ovocito adyacente. Luego, la cantidad de material de la membrana basal incrementa y se intercala entre los ovocitos que se encuentran dentro de los cordones ovíferos. Finalmente, cada complejo ovocito-células de la pre-granulosa se torna encerrado por membrana basal que provoca su separación del cordón y la conformación de un nuevo folículo primordial que detendrá su desarrollo en la etapa de diploteno de la meiosis I (denominado estado de dictioteno) hasta poco antes de la ovulación, cuando será elegido para completar su desarrollo (Figura 3) (Ginsburg *et. al.*, 1990; Pepling, 2006; Hunt y Hassold, 2008; Smith *et. al.*, 2014).

En este periodo de quiescencia el folículo parece estar inactivo, sin embargo, existen altos niveles en la actividad sintética de proteínas como se demuestra por la presencia de uno o más nucléolos, la actividad de la RNA polimerasa y la captación continua de aminoácidos y ribonucleósidos (Schultz y Wassarman, 1977; 1978). En este transcurso la síntesis y acumulación de RNA y proteínas son esenciales para el crecimiento y maduración de los ovocitos, así como para el desarrollo de un embrión viable después de la fecundación (Eichenlaub-Ritter y Peschke, 2002).



**Figura 3: Desarrollo del ovario de ratón del día 16 de gestación - día 2 post natal.** La superficie del ovario queda completamente aislada de los cordones ovígeros y de las células del estroma debido al aumento continuo de la lámina basal sub-epitelial. Las células de la cresta gonadal que se encuentran en la superficie del ovario se diferencian en células epiteliales maduras de la superficie y las células ubicadas en el interior de los cordones completan su diferenciación hacia células de la granulosa. En los cordones ovígeros, las células germinales son arrestadas en profase I y la continua producción de lámina basal entre las células germinales individuales y las células de la granulosa resulta en la formación de folículos individuales. En este proceso también influye la penetración de las células de corriente y las células de red hacia la corteza ovárica (Modificada de Smith et. al., 2014).

### Activación folicular

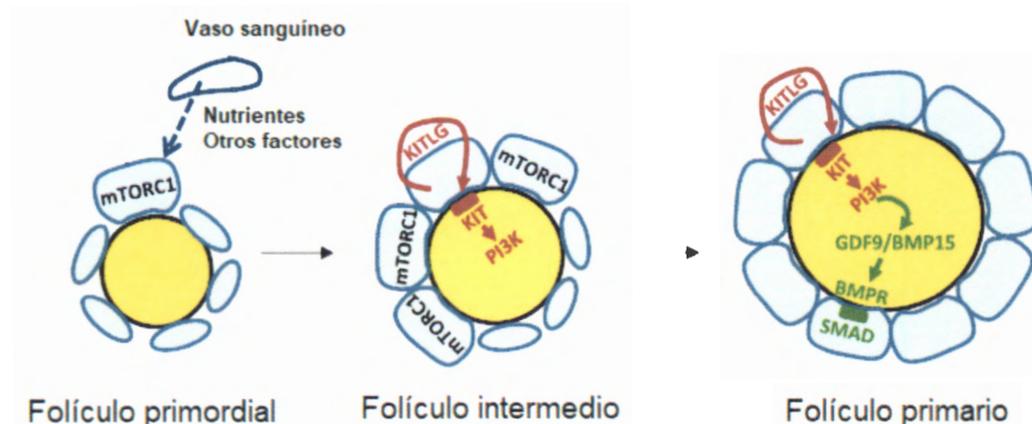
La activación folicular puede ser definida como el momento en el que el folículo primordial deja el estado quiescente y entra en un periodo de crecimiento, es decir, es elegido para continuar con su desarrollo y diferenciación.

La comunicación entre las células somáticas y el ovocito coordina las diferentes fases del desarrollo folicular porque a través de ella se promueve el crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa que, a su vez, proporcionarán los nutrientes y señales reguladoras necesarias para que el ovocito alcance su madurez. El diálogo opera mediante dos mecanismos: 1) las uniones comunicantes que permiten el intercambio de pequeñas moléculas (iones, AMPc, GMPc, aminoácidos y metabolitos) entre el ovocito y las células de la granulosa y,



2) citocinas y factores de crecimiento producidas por un tipo celular que pueden unirse a receptores específicos presentes en el otro tipo celular y activar vías de señalización (Monniaux, 2016).

Las cascadas de señalización de mTORC1-KITL y de KIT-PI3K constituyen la base de la comunicación entre los tipos celulares que de manera conjunta mantienen la supervivencia de los ovocitos y regulan la activación de los folículos primordiales (Zhang *et. al.*, 2014). De forma general, ésta regulación ocurre en tres etapas: 1) activación de mTORC1 en las células de la granulosa aplanadas por efecto de los nutrientes presentes en el microambiente que rodea al folículo, 2) activación de la expresión de KITL en las células de la granulosa cuboides, unión de KITL a su receptor de membrana en el ovocito y subsecuente activación de la vía de señalización PI3K y 3) despertar del ovocito de su estado quiescente y activación de la expresión de GDF9/BMP15 en el ovocito (Figura 4) (Monniaux, 2016).



**Figura 4:** Etapas que componen el proceso de activación folicular (Modificada de Monniaux, 2016).

El desarrollo de los folículos primordiales se encuentra bajo control inhibitorio lo que les permite mantener el estado quiescente, esto es, cuando los factores inhibitorios disminuyen o los factores estimulantes aumentan, los folículos son activados. Los principales factores inhibitorios que regulan el mantenimiento de la

quiescencia de los folículos primordiales son la fosfatasa y homólogo tensina (PTEN), el complejo tubérculo/esclerosis tuberosa (TSC) y el gen *Foxo3a* (Kim, 2012).

Ante la ausencia de PTEN, principal regulador negativo de fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), el incremento de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) promueve la cascada de señalización de la proteína cinasa B (AKT) con lo que los folículos primordiales resultan activados y se desarrollan; esto genera el agotamiento de la reserva de folículos primordiales (Reddy *et. al.*, 2008).

El TSC ha mostrado modular negativamente el complejo 1 blanco de rapamicina en mamíferos (mTORC1) a través de un complejo heterodimérico de dos moléculas: hamartina (Tsc1) y tuberina (Tsc2). En ratones nulos para Tsc1 o Tsc2 en ovocitos, la reserva completa de folículos primordiales se activa prematuramente debido a la elevada expresión de mTORC1 lo que resulta en el agotamiento de la reserva y la posterior falla ovárica prematura. Se expone, además, que el mantenimiento de la quiescencia requiere del trabajo conjunto de Tsc y PTEN debido a que su mecanismo de activación es muy similar (Adhikari *et. al.* 2009, 2010).

El gen *Foxo3a*, normalmente expresado en el núcleo de los ovocitos de folículos primordiales, ha manifestado ser importante en el mantenimiento de la quiescencia folicular debido a que incrementa la expresión de CDKN1B - inhibidor del ciclo celular- y disminuye la expresión de ciclina D1 y D2 -promotores del ciclo celular- (Brenkman y Burgering, 2003). En concordancia, se ha demostrado que en ratones nulos para este gen el patrón de activación se altera y genera muerte de los ovocitos, agotamiento temprano de la reserva de folículos e infertilidad secundaria (Castrillon *et. al.*, 2003). A pesar de su habitual expresión dentro del núcleo de los ovocitos, estudios han demostrado que es susceptible de ser traslocado del núcleo hacia el citoplasma a través de la activación de la vía de señalización de PI3K-AKT, lo que resulta en la activación folicular (Jonh *et. al.*, 2008).

La vía PI3K es la vía activada más importante en el ovocito primario; cuando se activa, fosforila al fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) y lo convierte en PIP3 que actúa como segundo mensajero y facilita los de sitios acoplamiento para la fosfoinositidina dependiente de cinasa 1 (PDK1). A su vez, PDK1 actúa como mediador de la vía al fosforilar y activar la señalización de AKT cuya función es trasladarse al núcleo para estimular la supervivencia celular, el crecimiento y la activación del ovocito. En etapas tempranas donde los receptores a FSH aún no son expresados, el crecimiento folicular depende de esta vía (Kim, 2012).

El gen KIT es el activador de PI3K y el principal regulador del despertar de los folículos en quiescencia al actuar como un receptor de superficie que se expresa en ovocitos de los folículos primordiales y en desarrollo; su ligando (KITL) es sintetizado por las células de la granulosa. Cuando KIT es activado se produce autofosforilación, fosforilación de varios sustratos y asociación de KIT con moléculas que activan diferentes cascadas de señalización, una de ellas PI3K-AKT (Saatcioglu *et.al.*, 2016).

El canal de comunicación entre células somáticas y células germinales vía KITL-KIT es regulado positiva o negativamente por mTORC1, una cinasa de proteínas específica de serina-treonina que regula el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a factores de crecimiento, nutrientes, oxígeno y energía. El complejo mTORC1 funciona a través de la modulación de procesos como síntesis de proteínas, síntesis de lípidos, producción de ATP, biogénesis de ribosomas, biogénesis de RNAm y autofagia (Laplante y Sabatini, 2012). En el ovario, los elementos que activan a mTOR llegan a los folículos primordiales a través de la micro vascularización de la corteza ovárica para que, en las células de la pregranulosa, su efecto regulador actúe como el proceso clave en la toma de decisión acerca de si un folículo primordial será o no activado (Zhang *et. al.*, 2014). Para que mTORC1 pueda ejercer su efecto activador sobre KITL es indispensable la participación de la MAP cinasa 3 (MAPK3/1), cuyo papel es incrementar la señalización de esta vía (Figura 5) (Zhao *et. al.*, 2018).

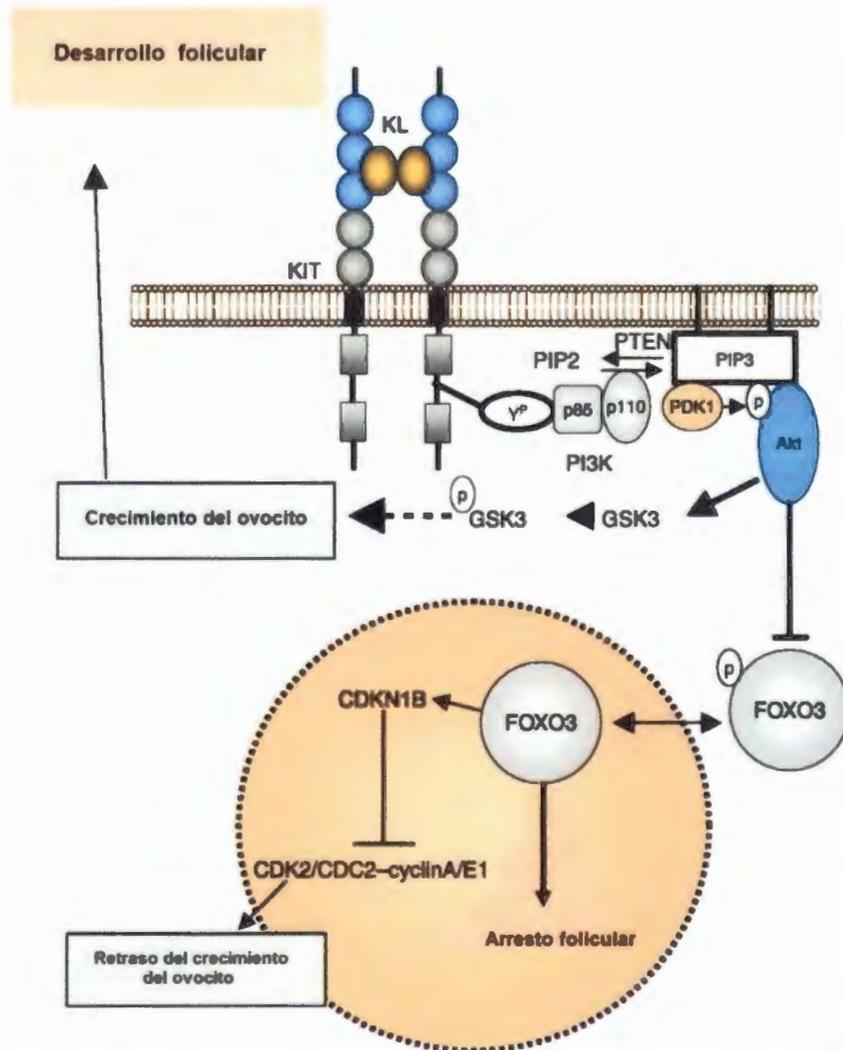


Figura 5: Principales vías de señalización que regulan la activación folicular (Modificada de McLaughlin y McIver, 2009).

El GDF9 (Factor de crecimiento y diferenciación 9) y la BMP15 (proteína morfogénica 15) son ligandos de la familia TGF $\beta$  derivados del ovocito, conocidos por favorecer la activación de los folículos primordiales y por desempeñar un rol de proteínas reguladoras durante el desarrollo de los folículos pre-antrales (McLaughlin y McIver, 2009). Aunque su función en el folículo primordial no ha sido esclarecida, se ha propuesto que en la pubertad, cuando el folículo ya cuenta con receptores a gonadotropinas, la producción de estos ligandos conduce a la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células del *cumulus* que al

unirse con anfiregulina (AREG) y epiregulina (EREG) activan la vía de señalización MAPK quien finalmente modulará las uniones comunicantes y por lo tanto la comunicación entre las células foliculares y el ovocito (Nunes *et. al.*, 2015). La MAPK, además, es capaz de regular la actividad de TSC2 a través de la fosforilación y con ello activar la cascada de señalización de mTORC1 (Zhao *et. al.*, 2018).

Una vez que los folículos primordiales son activados, inicia el crecimiento folicular, momento que se caracteriza por el aumento de tamaño del ovocito y por la activación y aumento del número de células de la granulosa. Consecuentemente, los folículos activados podrán continuar con su desarrollo hasta formar folículos maduros o ser destinados a la atresia si se activan antes de la pubertad (Wear *et. al.*, 2016).

Las células de la granulosa son el tipo celular que inicia la diferenciación de los folículos primordiales a través de la cascada de señalización iniciada por mTORC1 (Zhang *et. al.*, 2014). Si bien la dinámica de todos los complejos celulares que forman al folículo está regulada por las mismas vías de señalización, existe diferencia entre el momento en que cada folículo inicia su transformación, es decir, el patrón de activación que siguen los folículos además de estar relacionado con los elementos que los llevan a iniciar la meiosis también se encuentra bajo influencia de la posición dentro del ovario que tienen las células que los conforman (Cordeiro *et. al.*, 2015).

Al respecto, se ha propuesto que existen dos clases de folículos primordiales que, dependiendo de la población celular de la cual se componen, inician su diferenciación al momento del nacimiento o hasta que el organismo alcanza la pubertad. Los folículos que forman parte de la primera oleada están constituidos por células de la pregranulosa que migran desde la corteza hacia la médula del ovario y tienen como función facilitar la integración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, así como generar una cohorte de folículos que regulen el desarrollo de los demás folículos. La reserva de éstos es reemplazada gradualmente por los folículos primordiales de la etapa adulta y se agota aproximadamente a los tres meses de vida. Los folículos primordiales de la etapa adulta, por su parte, se componen de

células de la pregranulosa que proliferan y se mantienen en la región periférica del ovario y, actúan como la fuente de hormonas esteroides necesaria para el mantenimiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante la etapa adulta (Zheng *et al.*, 2014).

Como ya se mencionó, los mecanismos moleculares que regulan la activación folicular son variados y aunque no han terminado de ser descifrados, se sabe que alteraciones en ellos conducen al desencadenamiento de múltiples patologías, porque el número de folículos activados en cada ciclo está estrechamente relacionado con la reserva de ovocitos que serán viables a lo largo de la vida reproductiva y que además, son resultado del mantenimiento de la quiescencia y de la sobrevivencia de los folículos primordiales (Kim 2012; Adhikari y Liu, 2009).

Como ejemplo, estudios han demostrado que *Foxl2* (gen involucrado en el control de la activación folicular) se encuentra expresado en células de la granulosa de folículos ubicados en la región dorsal del ovario donde, a su vez, se sustenta que ocurre la primera oleada de activación (en la etapa neonatal). Los folículos activados durante la primera oleada, posteriormente, adquieren la capacidad de controlar las siguientes rondas de activación y de establecer una jerarquía donde aquellos folículos activados serán seleccionados o no por estímulos hormonales para culminar su desarrollo creando, de esta forma, una conexión entre el desarrollo independiente del estímulo hormonal y el dependiente de hormonas (Cordeiro *et al.*, 2015).

## **ANTECEDENTES**

### ***Foxl2* en el desarrollo folicular**

*Foxl2* es un gen de un solo exón que mide 2.7 kb y que en humanos se localiza en el brazo largo del cromosoma 3, en la posición 23 (Crisponi *et al.*, 2001). Codifica una proteína de 376 aminoácidos perteneciente a la familia de factores de

transcripción “forkhead” que contiene un dominio de unión al DNA de 100 aminoácidos, así como un tracto de polialanina cuya función no ha sido descrita. Se expresa en etapas tempranas (etapa fetal) y a lo largo del desarrollo folicular (etapa adulta) en células de la granulosa del ovario (Cocquet *et. al.*, 2002; Loffler *et. al.*, 2003). Aunque la dinámica de su función no ha sido descrita en su totalidad, diversos estudios han revelado que *Foxl2* tiene un papel muy importante en la determinación sexual, el desarrollo y el correcto funcionamiento del ovario.

Las primeras observaciones acerca de su función en el ovario revelaron que ratones *Foxl2* knockout son estériles debido a la incapacidad de las células de la granulosa para pasar de una forma aplanada a cúbica y por lo tanto para diferenciar el folículo primordial a primario, así mismo observaron que ante su ausencia y durante las primeras etapas de desarrollo del ovario, las células germinales parecen no verse afectadas (Schmidt *et. al.*, 2004; Uda *et. al.*, 2004).

Se ha observado también que la exclusión de *Foxl2* en las células de la granulosa conduce a la diferenciación de éstas y de las células de la teca en células de Sertoli y de Leydig, así como a la expresión de genes determinantes de testículo por lo que se propone que *Foxl2* tiene un papel importante dentro de la determinación ovárica debido a que suprime genes específicos de testículo (Ottolenghi *et. al.*, 2005; Unhelhaunt *et. al.*, 2009).

Luego del inicio de la pubertad, se ha encontrado que *Foxl2* también es un actor importante en el desarrollo folicular pues se sabe que su expresión es necesaria para la correcta función de las células de la granulosa debido a que regula genes específicos de la esteroidogénesis como StAR, que facilita el transporte de colesterol (precursor de los sustratos para la biosíntesis de hormonas), y CYP19A1, que es una enzima limitante de la velocidad en la producción de estrógenos, lo que sugiere que *Foxl2* podría tener un papel regulador en la secreción de estrógenos (Schmidt *et. al.*, 2004; Caburet *et. al.*, 2012).

Se ha señalado que *Foxl2* reprime la transcripción de la aromatasa P450scc y de la ciclina D2 que son elementos clave en la proliferación y diferenciación de

células de la granulosa, así como en la esteroidogénesis (Bentsi-Barnes *et. al.*, 2010). Además, recientemente se propuso que la forma en que *Foxl2* podría estar regulando la actividad de la aromatasa es a través del receptor a estrógenos  $\beta$  pues las observaciones indican que *Foxl2* también tiene la capacidad de interactuar con él, lo que resulta en la represión de la activación transcripcional dependiente de ligando que ejerce el receptor (Hirano *et. al.*, 2017).

Uno de los últimos hallazgos ha demostrado que *Foxl2* además, es capaz de actuar conjuntamente con el gen *AMH* (que codifica la hormona anti Mülleriana) para formar un sistema de retroalimentación positiva, conocimiento que es de importancia porque *Foxl2* y *AMH* se expresan en células de la granulosa con la finalidad de ejercer un papel inhibitorio en la activación y crecimiento folicular para promover que la reserva de folículos se mantenga estable (Sacchi *et al.*, 2017).

Además de su expresión y funciones en el ovario, se ha encontrado que *Foxl2* también está activo en la glándula pituitaria donde igualmente actúa moderando la síntesis hormonal y por lo tanto el desarrollo folicular. En 2009, por ejemplo, se encontró que *Foxl2* trabaja en asociación con SMAD3 para facilitar la transcripción dependiente de activina que regula la síntesis de folistatina y por ende la secreción de FSH (Blount *et. al.*, 2009). A esta premisa se añadió más tarde, que *Foxl2* también puede actuar en sociedad con SMAD4 para lograr el mismo fin y aunque cada uno tiene la capacidad de regular a FSH de manera independiente, la presencia de al menos uno de estos dos elementos es indispensable (Fortin *et. al.*, 2014).

### **Regulación post-transcripcional de la expresión génica**

La regulación de la expresión génica en la ovogénesis ocurre predominantemente durante la transición de folículos primordiales a primarios, donde la mayoría de los genes relacionados con la proliferación celular, el ciclo celular y la transcripción están altamente regulados (Pan *et. al.*, 2005). Evidencia de lo anterior es que la síntesis de RNA, proteínas y factores de transcripción es alta en las fases tempranas

del desarrollo debido a la activa proliferación de células foliculares, sin embargo, hacia el final del crecimiento y maduración del ovocito, el silenciamiento de la actividad transcripcional y degradación de algunos RNAm son los procesos predominantes (Bachvarova *et. al.*, 1985; De la Fuente *et. al.*, 2004; Su *et. al.*, 2007).

A nivel post-transcripcional, la regulación génica está dada por la interacción de los RNAm con pequeños RNAs de cadena corta de los cuales se han identificado tres clases principales: pequeño ARN de interferencia (siRNAs), microRNAs (miRNAs) y RNAs asociados a Piwi (piRNAs) (Chu y Rana, 2007; Suh y Blelloch, 2011).

Como se ha planteado, el desarrollo folicular es un proceso fisiológico complejo que se encuentra modulado por múltiples factores como los microRNAs. Al respecto, se ha comprobado que el microRNA 145 tiene la capacidad de regular la expresión de algunos genes importantes en la vía de señalización TGF- $\beta$  (como *Tgfr2* y *Smad3*) y con ello el inicio del desarrollo de los folículos primordiales (Yang *et. al.*, 2013).

Recientemente y en ratificación a lo señalado previamente, Zhang y colaboradores probaron que a lo largo del crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos, muchos microRNAs expresados en las células de la granulosa son parte de la regulación de cada evento que ocurre durante el proceso debido a que estos forman redes con diversos factores de crecimiento y vías de señalización. En específico, sugieren que el microRNA 26a/b al asociarse con el factor de crecimiento SMAD2 y con la vía de señalización TGF- $\beta$  forman un eje que podría tener un rol principal en el desarrollo folicular (Zhang *et al.*, 2017).

### **Naturaleza de los microRNAs**

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante de aproximadamente 21-24 nucleótidos de longitud que desempeñan una función muy importante en la regulación de la expresión génica (Bartel, 2004). Tienen diferentes

orígenes, por ejemplo, de genes codificantes, porciones de intrones o incluso de regiones promotoras de genes, tienen una vida media corta y regulan la expresión génica mediante su unión a secuencias complementarias (por lo general en la región 3'UTR) de sus RNAm blanco, lo que resulta en la detención de la traducción y por lo tanto el silenciamiento génico (Kim *et. al.*, 2009; Bartel, 2009).

El transcrito primario de estos microRNAs forma una estructura de bucle, con algunos bultos debido al imperfecto apareamiento de bases, que cuenta con una cola de poli A y un capuchón en el extremo 5'. Esta estructura conocida como microRNA primario (pri-miRNA) es procesada para generar el precursor de microRNA (pre-miRNA). Este proceso incluye dos pasos que son catalizados por endonucleasas que forman parte de la familia de enzimas RNasa III (Drosha y Dicer) y que actúan en conjunto con proteínas que contienen dominios de unión a la doble cadena de RNA (dsRBDs). Drosha trabaja con el gen 8 de la región crítica del síndrome DiGeorge (DGCR8) y Dicer con la proteína de unión TAR RNA (TRBP) (Bartel, 2004; Kotipalli *et. al.*, 2016).

En el primer paso, el complejo Drosha-DGCR8 actúa dentro del núcleo removiendo la cola de poli A y el capuchón del extremo 5' para dar como resultado un precursor (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nucleótidos que una vez que ha sido formado, es transportado hacia el citoplasma con la ayuda de la proteína exportina-5 para que al llegar ahí Dicer forme una doble cadena de microRNA de aproximadamente 20 nucleótidos. Una de las cadenas es seleccionada para ser degradada (conocida como cadena pasajera) y la otra (conocida como cadena madura o guía) es incorporada al complejo RISC para llevar a cabo su función reguladora en el citoplasma. Dentro del complejo RISC, las proteínas argonautas (AGO 1-4) son los componentes principales y trabajan identificando secuencias blanco que presentan perfecta o casi perfecta complementariedad de bases entre el RNAm y el microRNA (Figura 6) (Bartel, 2004; Kotipalli *et. al.*, 2016).

Se conoce que los mecanismos por los cuales los microRNAs reprimen la traducción de RNAm pueden tener lugar al comienzo de la misma o una vez que se ha iniciado (Pillai, 2005). Por ejemplo, algunos microRNAs pueden actuar incluso



dentro del núcleo al ser llevados de vuelta a él utilizando un mecanismo similar con el cual salieron. Ahí, los microRNAs actúan con ayuda de las proteínas argonautas reclutando proteínas modificadoras epigenéticas en la región promotora del gen lo que conduce al silenciamiento o a la activación de la transcripción (Kotipalli *et. al.*, 2016).

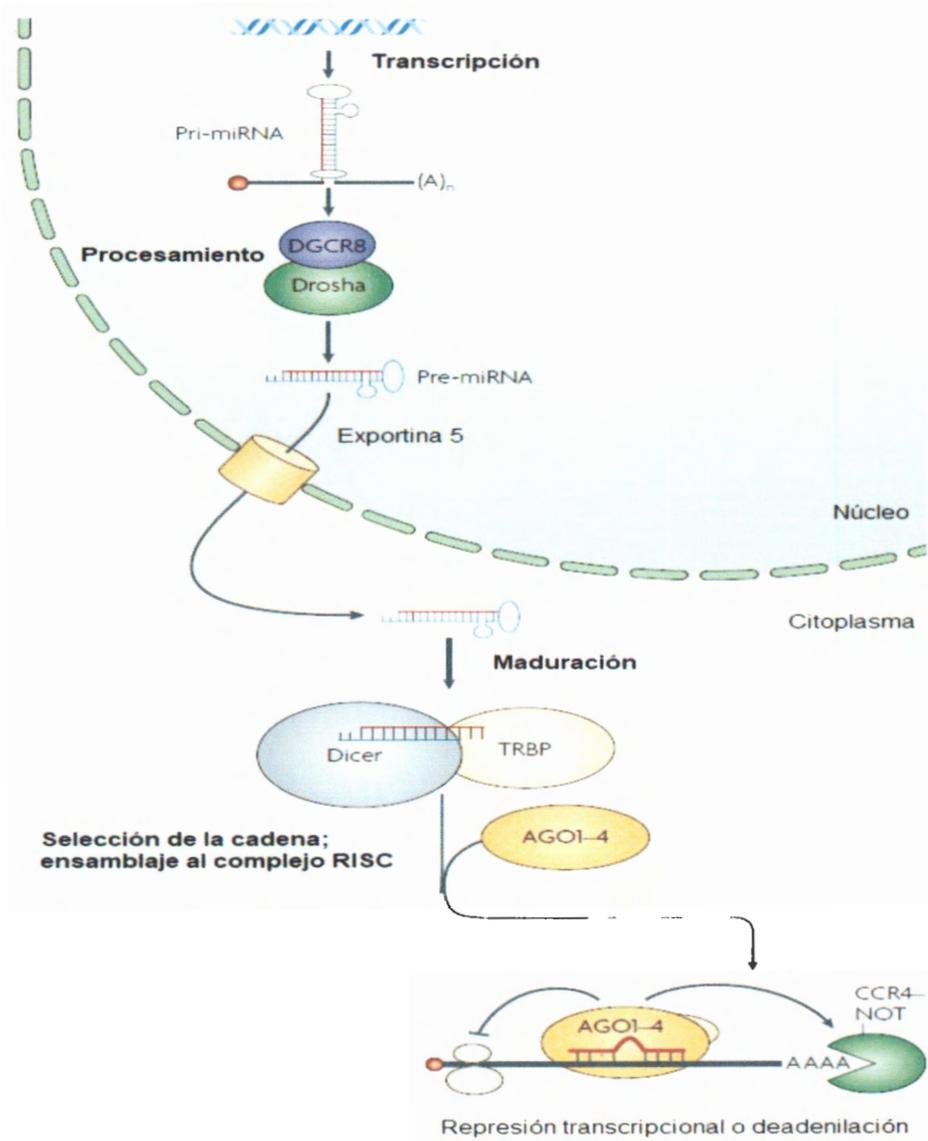


Figura 6: Biogénesis de los microRNAs y su ensamblaje al complejo RISC (Modificada de Filipowicz, 2008).

Post-transcripcionalmente, los microRNAs aceleran la degradación de RNAm, por ejemplo, desencadenando la desestabilización de RNAm por adenilación o retienen al RNAm transportándolo a un compartimiento de almacenamiento donde se degrada (Wu *et. al.*, 2006; Chu y Rana, 2007).

### **Los microRNAs y su participación en la regulación de *Foxl2***

A través de un análisis comparativo entre la expresión de microRNAs en líneas celulares de la granulosa juveniles y adultas, se encontró que los microRNAs que tienen como blanco el RNAm de *Foxl2* muestran distintos perfiles de expresión dependiendo de la “edad” de las células de la granulosa donde estén ejerciendo la regulación (Rosario *et. al.*, 2013).

En 2011, con base en experimentos realizados en pollos, se sugirió que el microRNA 202 regula el desarrollo gonadal. Las observaciones revelaron que existe una relación directa entre la baja expresión del microRNA 202 y la consecuente diferenciación ovárica debido a la alta expresión de genes como *Foxl2* y *CYP19A1*; el efecto contrario, en contraste, se encuentra relacionado con la diferenciación testicular por lo que se consideró al microRNA 202 como un importante marcador de diferenciación gonadal masculina (Bannister *et. al.*, 2011).

También se ha propuesto que el grupo de microRNAs 290-295 tiene un papel fundamental en el desarrollo embrionario y la fertilidad murina. En un experimento a través del cual se inhibió la expresión del microRNA 295, se logró observar que los embriones de ratón que presentan esta condición tienen altas tasas de mortalidad, pero aquellos que logran sobrevivir y que son del sexo femenino ven comprometida su fertilidad debido a un defecto en la migración de las células germinales primordiales hacia la cresta gonadal (Medeiros *et. al.*, 2011).

Dai *et. al.* (2013) han mostrado que el microRNA 133b inhibe la expresión de *Foxl2* en células de la granulosa de ratón, debilitando la regulación transcripcional negativa que el gen ejerce sobre *StAR* y *CYP19A1* estimulando así, la producción de estrógenos.

El equipo de Wang (2015) a través de una serie de análisis sugirió que, en humanos, el microRNA 30a actúa como oncogén debido a su capacidad de reprimir la expresión de *Foxl2* en células de la granulosa donde este gen actúa por su parte, inhibiendo la expresión de ciclina D2 (una proteína que promueve la proliferación de las células de la granulosa).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La regulación de *Foxl2* por microRNAs aún no ha sido descrita. El desarrollo de este proyecto generará conocimiento científico básico original y de frontera acerca de la participación de microRNAs en la regulación de un gen fundamental para la foliculogénesis temprana en mamíferos. Este conocimiento será de utilidad en el mediano plazo para resolver problemas de infertilidad humana y animal, que hasta ahora son clasificados como idiopáticos, debido en parte al pobre entendimiento de los mecanismos que regulan la fertilidad.

## **JUSTIFICACIÓN**

Diversos estudios han mostrado que *Foxl2* es un gen fundamental para que la foliculogénesis temprana se efectúe con éxito y se obtengan ovocitos saludables capaces de ser fertilizados, sin embargo, su regulación por microRNAs durante la activación folicular no ha sido estudiada.

Debido a que existe poco conocimiento acerca de los mecanismos moleculares básicos que sustentan la foliculogénesis, la investigación de los perfiles de microRNAs durante este proceso resulta de especial interés ya que estos moduladores podrían ayudar a dilucidar cómo alteraciones epigenéticas participan en el inicio y desarrollo de la gametogénesis.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue identificar los microRNAs que regulan la expresión de *Foxl2* en el ratón durante la activación folicular y analizar su efecto sobre la expresión génica en un modelo de vector reportero.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué microRNAs regulan la expresión de *Foxl2* en el ratón durante la activación folicular?

## HIPÓTESIS

Dado que *Foxl2* es un gen fundamental para la foliculogénesis y su regulación por microRNAs ha sido demostrada en otros procesos biológicos, se plantea que *Foxl2* estará regulado por microRNAs durante la foliculogénesis, y que éstos podrán ser identificados mediante análisis *in silico* y ensayos de expresión de luciferasa regulada por la adición de la región 3'UTR de *Foxl2*.

## OBJETIVOS

### General

Determinar qué microRNAs regulan la expresión *Foxl2* en el ratón.

### Particulares

- Identificar *in silico* microRNAs con probable función reguladora de *Foxl2* durante la activación folicular.
- Validar el perfil de expresión de *Foxl2* reportado *in silico*
- Analizar el silenciamiento de *Foxl2* inducido por los microRNAs en un modelo de gen reportero.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Identificación *in silico*

microRNAs con probable función reguladora. Perfil de expresión microRNAs y *Foxl2*

2. Análisis de la expresión de *Foxl2*

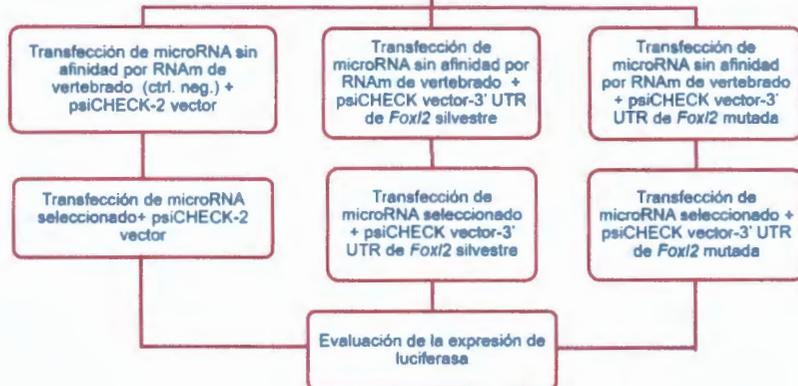
Extracción de RNA de ovarios fetales de ratón (16.5 dpc)

RT-PCR y PCR punto final

Validación del perfil de expresión de *Foxl2*

Creación de construcciones psiCHECK vector-3'UTR de *Foxl2*

3. Análisis del silenciamiento de *Foxl2* por los microRNA seleccionados



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. Identificación *in silico* de microRNAs con probable función reguladora de *Foxl2***

Se llevó a cabo utilizando diferentes bases de datos (Vlachos y Hatzigeorgiou, 2013) para predecir los microRNAs que tienen como blanco a *Foxl2* tomando como base la 3'UTR de su RNAm.

Consultando la base de datos MGI (<http://www.informatics.jax.org>), se seleccionaron los microRNAs que tuvieron los mayores niveles de probabilidad de apareamiento con la 3'UTR, expresión en ovario en el momento de la activación folicular y correlación negativa con la expresión de *Foxl2*. Para ratificar este último criterio de inclusión, se consultaron simultáneamente los perfiles de expresión de *Foxl2* y de los microRNAs en el sitio web de GEO Profiles (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>). Finalmente, en la base de datos Target Scan Mouse (<http://www.targetscan.org>) se examinó el grado de conservación en la escala evolutiva de cada candidato seleccionado y se localizó su elemento de respuesta al microRNA (MRE por sus siglas en inglés) dentro de la 3'UTR.

El perfil de expresión de *Foxl2*, además de obtenerse bioinformáticamente fue validado mediante RT-PCR punto final utilizando un termociclador de alta velocidad (Eppendorf MasterCycler 5333).

### **B. Análisis de la expresión de *Foxl2* durante la ovogénesis o foliculogénesis fetal**

#### **Extracción de RNA y RT-PCR**

El cDNA a partir de la cual se validó el perfil de expresión de *Foxl2*, se obtuvo a partir de ovarios de ratonas CD1 (cepa que se mantiene en el bioterio de la UAM-Iztapalapa) de diferentes edades (12.5 días post-coito (dpc), 13.5 dpc, 16.5 dpc, 17.5 dpc, Neonato, 5 días post-nacimiento (dpi), 10 dpn y 40 dpn) que corresponden a etapas representativas en el desarrollo de la foliculogénesis. Las reacciones de retrotranscripción se realizaron a partir del RNAm aislado de los

ovarios fetales y neonatales que fueron lisados utilizando una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes que facilitan el aislamiento de varias especies de RNA (TRIzol Reagent -Invitrogen Cat. no. 10296-010-).

Para la extracción de RNA, al lisado celular se agregaron 55  $\mu\text{L}$  de cloroformo, así como 70  $\mu\text{L}$  de solución de Hanks y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, la muestra se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Eppendorf Microcentrifuge 5418 R), se inclinó el tubo a un ángulo de 45° y con ayuda de una micropipeta se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo estéril. Se añadieron 65  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  [3M] y 1 000  $\mu\text{L}$  de etanol al 100%, se homogeneizó, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó 10 minutos más bajo las condiciones antes mencionadas.

A continuación, se retiró el sobrenadante con una micropipeta y se conservó el botón formado en el fondo del tubo para resuspenderlo en 333  $\mu\text{L}$  de etanol al 75%. La preparación se mezcló en vortex y se centrifugó a 10 000 rpm y 4°C durante cinco minutos. Se desechó el sobrenadante y el RNA se dejó secar por centrifugación para finalmente resuspender el botón formado en 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas.

Los reactivos de RT (5X First-Strand Buffer, 0.1 M DTT, 40 U/ $\mu\text{L}$  de RNAsa OUT, 10 mM de dNTP's mix y 50-250 ng de random primers) fueron mezclados con 1 ng-5  $\mu\text{g}$  de RNA total. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 65°C. Posteriormente, fueron enfriadas en hielo durante 1 minuto para permitir el reconocimiento del "cebador o primer". La transcriptasa reversa, Superscript Reverse Transcriptase II (Invitrogen Cat. no. 18064-022), se añadió a la reacción de RT y la retrotranscripción se llevó a cabo incubando a 42°C durante 50 minutos. La transcriptasa reversa se inactivó incubando a 70°C durante 15 minutos.



- **PCR punto final**

Las reacciones de PCR de los cDNA que sirvieron para validar el perfil de expresión de *Foxl2* se llevaron a cabo en 35 ciclos de reacción constituidos de la siguiente forma: 1) desnaturalización a 95°C por 2 minutos, 2) segunda desnaturalización a 95°C por 30 segundos, 3) alineamiento de los cebadores a 56°C por 1 minuto y 4) elongación a 72°C durante 30 segundos. Los cebadores utilizados (Invitrogen Cat. No. 10336022) y sus características se presentan en la siguiente tabla.

Gen	Sentido	Secuencias cebadores	Tamaño del cebador (nt)	Tm (°C)	% GC	Tamaño del amplicón (pb)
<i>Foxl2</i>	FW	TTTTCTTCATCGACCCTGCT	20	57.14	45	168
	RW	GATCCGGGGAAATTTGTTTT	20	54.41	40	
<i>β-actina</i>	FW	ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	20	58.02	50	435
	RW	CGGAGCTCGTTGTAGAAGGT	20	59.47	55	

**Tabla 1: Secuencias y características de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR (nt= nucleótidos, pb=pares de bases).**

### C. Análisis del silenciamiento de *Foxl2* por el microRNA 295.

El primer paso para determinar si el microRNA 295 regula la expresión de *Foxl2* es analizar, a través de un modelo de gen reportero, si éste puede unirse al MRE de *Foxl2* (ubicado dentro de la 3' UTR) e interferir la traducción de su RNAm.

- **Generación del inserto**

Tomando como base la secuencia del MRE silvestre reportada en [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org), se diseñaron dos cebadores oligonucleótidos complementarios (Integrated DNA Technologies) de 39 bases que al hibridarse y ser ligados al vector codifican el MRE silvestre (MRE) ubicado en la 3'UTR del RNAm de *Foxl2*. A cada uno de ellos se les anexó, respectivamente, la secuencia

de corte de las endonucleasas de restricción *XhoI* y *NotI* con la finalidad de generar los extremos cohesivos que permitieran su ligación al vector.

Para generar el grupo control, donde la secuencia del MRE tiene una mutación (MUT) y el microRNA no puede reconocerla, igualmente se diseñaron dos cebadores de 39 nucleótidos que contienen los fragmentos de secuencia de corte de *XhoI* y *NotI* pero en esta ocasión, se cambiaron los nucleótidos que conforman la secuencia del MRE con el objetivo de simular una mutación en el ADN. Así, los cebadores resultantes fueron los siguientes (Tabla 2):

Tipo	Sentido	Endonucleasa	Secuencia	Tamaño (nt)
Silvestre (MRE)	5'-3'	<i>XhoI</i>	<b>TCG AGT</b> TTT CTA GAG GGA ACT AGA <b>GCA CTT</b> TTG TTG TGC	39
	5'-3'	<i>NotI</i>	<b>GGC CGC</b> ACA ACA <b>AAA GTG CTC</b> TAG TTC CCT CTA GAA AAC	39
Mutante (MUT)	5'-3'	<i>XhoI</i>	<b>TCG AGT</b> TTT CTA GAG GGA <b>TGA TGA CGT GAA</b> AAG TTG TGC	39
	5'-3'	<i>NotI</i>	<b>GGC CGC</b> ACA ACT <b>TTT CAC GTC ATC ATC</b> CCT CTA GAA AAC	39

**Tabla 2: Secuencias de cebadores que fueron hibridados y ligados a la zona de multiclonaje del vector. En rojo se muestra el MRE silvestre (MRE) del microRNA 295; en negritas se observan las secuencias de corte de las endonucleasas y en verde se indican los nucleótidos alterados para generar el MRE mutado (MUT).**

La ligación de estos insertos en la zona de multiclonaje del vector requirió que previamente fueran hibridados para generar la doble cadena de DNA que codifica el MRE silvestre o mutado. Así, 1  $\mu$ L de cada oligonucleótido (en concentración 1 mM) fue disuelto en 18  $\mu$ L de solución buffer de alineamiento (10 mM Tris pH 7.5-8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) para luego en el termociclador, someter los 20  $\mu$ L de reacción total a un ciclo compuesto de la siguiente forma: 95°C durante 2 minutos y 25°C durante 45 minutos.

Para constatar el alineamiento de los cebadores, se realizó electroforesis en gel de acrilamida al 15% en solución buffer TBE 1X a la que se aplicó un potencial eléctrico de 30 voltios durante 4 horas. Al término, el gel fue revelado en un equipo transiluminador UV (UVP M-20).



- **Digestión enzimática del vector**

El vector utilizado para analizar el silenciamiento de *Foxl2* fue psiCHECK-2 vector que tiene un tamaño de 6 273 pb y que utiliza a *Renilla* luciferasa (hRluc) como gen reportero primario para monitorear cambios en la expresión génica como resultado de la interacción con algún RNAi o microRNA. En este sistema, el MRE del gen de interés (*Foxl2*) se clonó en una región de multiclonaje localizada río abajo del codón de término de traducción del gen *Renilla* luciferasa. El promotor utilizado para la expresión de *Renilla* luciferasa es SV40.

psiCHECK-2 posee además un segundo cassette de expresión que consiste en un promotor HSV-TK, el gen sintético *Firefly* luciferasa (hluc) y una señal tardía de poliA SV40. Este “cassette” sirve como un reportero de normalización intraplasmídico de la transfección de manera que, la señal de *Renilla* luciferasa puede ser normalizada con la señal de *Firefly* luciferasa.

Para ligar los insertos MRE o MUT en la zona de multiclonaje del vector, se generaron cortes con extremos cohesivos a través de dos reacciones de digestión utilizando las endonucleasas de restricción *XhoI* y *NotI* (Thermo Scientific Cat. no. ER0691 y ER0591). Para corroborar la eficiencia de ambas endonucleasas se estableció, además, un grupo control negativo. Cada reacción estuvo conformada de la siguiente manera (Tabla 3):

	Control (-)	Digestión con <i>XhoI</i>	Digestión con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i>
Agua de calidad	12.9 µL	12.4 µL	11.9 µL
PCR			
DNA plasmídico	1 µg	1 µg	1 µg
Buffer O 10X	2.0 µL	----	2.0 µL
Buffer R 10X	----	2.0 µL	----
<i>NotI</i> (10U/µL)	----	----	0.5 µL
<i>XhoI</i> (10U/µL)	----	0.5 µL	1.0 µL

**Tabla 3: Composición de las reacciones de digestión con endonucleasas de restricción *XhoI* y *NotI*.**

Los productos de digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución buffer TAE 1X a la que se aplicó un potencial eléctrico



de 80 voltios durante 40 minutos. Pasado este lapso, para visualizar las bandas de diferentes tamaños correspondientes a los fragmentos de ADN generados por la digestión, el gel se reveló en un sistema de imagen de cámara oscura (KODAK GEL Logic 1 500 Imaging System) bajo una exposición de tipo transiluminación UV durante 25 segundos.

- **Fosforilación del inserto y desfosforilación del vector**

Tanto los insertos formados por los cebadores hibridados como el vector digerido con endonucleasas fueron sometidos a reacciones de fosforilación-desfosforilación (respectivamente) con la finalidad de evitar que los extremos cohesivos del vector se religaran y promover que los extremos de los insertos contaran con el grupo fosfato necesario para ligarse al vector.

Las reacciones de fosforilación-desfosforilación se prepararon utilizando las enzimas T4 polinucleótido cinasa (Thermo Scientific Cat. no. SM0371) y fosfatasa alcalina termosensitiva FastAP (Thermo Scientific Cat. no. EF0654). Las reacciones se elaboraron como sigue (Tabla 4):

Tipo	Fosforilación inserto MRE	Fosforilación inserto MUT	Desfosforilación vector
DNA	20 pmol	20 pmol	1 µg
Buffer 10X	2 µL	2 µL	2 µL
ATP 10 mM	2 µL	2 µL	----
Cinasa 10U/µL	1 µL	1 µL	----
Fosfatasa 1U/µL	----	----	1 µL
Agua	10.8 µL	11.2 µL	0.31 µL

Tabla 4: Composición de las reacciones de fosforilación-desfosforilación de los insertos y el vector.

- **Ligación del inserto con el vector**

Para ligar el inserto fosforilado (MRE o MUT) al vector desfosforilado se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa (Promega Cat. no. M1801). Se preparó una reacción para ligar el fragmento MRE agregando: 100 ng de vector, 2.056 ng de inserto de DNA, 1 µL de T4 DNA ligasa, 1 µL de Ligasa 10X Buffer y agua para llevar a 10 µL. De

igual forma, se preparó la reacción de ligación del fragmento MUT. Cada reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 3 horas y a 4°C durante toda la noche.

Al término de las reacciones de ligación, cada una de las construcciones obtenidas (*psiCHECK-FoxI2-MRE* y *psiCHECK-FoxI2-MUT*) fueron utilizadas para transformar bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  y así amplificar la mayor cantidad posible de dichas construcciones.

- **Transformación bacteriana**

Se utilizaron bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  (donadas por la Doctora Elizabeth Langley Maccarron del Instituto Nacional de Cancerología, México) para ser transformadas con las construcciones *psiCHECK-FoxI2-MRE* y *psiCHECK-FoxI2-MUT*. Se agregaron los 10  $\mu$ L de la reacción de ligación a una alícuota de 20  $\mu$ L de bacterias (previamente descongelada en baño de hielo durante 15 minutos) y se incubó en hielo por 30 minutos. En seguida, se generó un choque térmico incubando a 42°C durante 30 segundos después de los cuales se colocó a las bacterias nuevamente en hielo. Pronto, a esta muestra se añadieron 250  $\mu$ L de medio SOC y se incubó a 37°C en una incubadora de agitación a 100 rpm (SAMYON SPH-100 Program Incubator Shaker) durante una hora. Finalmente, la reacción de transformación se dispersó en placas de cultivo agar-LB-ampicilina [100 $\mu$ g/mL] que quedaron en incubación de 37°C durante la noche.

A la mañana siguiente, las placas de cultivo fueron retiradas de la incubadora y se inocularon 100 mL de medio líquido LB-ampicilina [100 $\mu$ g/mL] con algunas de las colonias crecidas. Se incubaron por 24 horas a 37°C en agitación de 100 rpm.

El proceso descrito se realizó por separado para cada una de las construcciones.

- **Extracción de plásmidos por preparación media (MIDI-prep)**

Para obtener una muestra con alto grado de pureza, las construcciones *psiCHECK-FoxI2-MRE* y *psiCHECK-FoxI2-MUT* fueron extraídas de las bacterias en cultivo mediante lisis alcalina en midiprep haciendo uso del kit comercial QIAGEN®

Plasmid Purification (QIAGEN Cat. no. 12145). Para ello, se tomaron los cultivos líquidos LB-ampicilina de 100 mL y se centrifugaron a 4 000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf Microcentrifuge 5418 R). De cada uno, se decantó el sobrenadante y las bacterias fueron resuspendidas por pipeteo en 4 mL de Buffer P1 (Tris-Cl 50 Mm, pH 8.0; EDTA 10Mm; RNasa A 100 µg/mL).

Posteriormente, 4 mL de Buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) fueron añadidos y mezclados en la solución por inversión de 4 a 6 repeticiones; se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Al paso de este periodo, se añadieron 4 mL de Buffer P3 (3.0 M acetato de potasio, pH 5.5) frío y se mezcló inmediatamente de manera delicada invirtiendo el tubo de 4-6 veces. La muestra se incubó en hielo durante 15 minutos luego de los cuales se centrifugó a 13 500 rpm durante 30 minutos a 4°C (Eppendorf Microcentrifuge 5418 R). Este paso fue repetido una ocasión con tiempo de centrifugación de 15 minutos para obtener un sobrenadante absolutamente claro.

La columna QIAGEN-tip 100 fue equilibrada sobre un matraz Erlenmeyer, luego, se colocaron en ella 4 mL de Buffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol v/v; 0.15% Triton® X-100 v/v) y se permitió que la columna se vaciara por efecto de gravedad. Consecutivamente, el sobrenadante de cada cultivo obtenido después de la centrifugación de 15 minutos a 4°C, fue añadido a esta columna para ser filtrado.

En dos ocasiones la columna fue lavada con 10 mL de Buffer QC (1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol v/v). Inmediatamente, el DNA se eluyó con 5 mL de Buffer QF (1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol v/v) para luego precipitarlo con 3.5 mL de isopropanol, mezclarlo y centrifugarlo a 13 500 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Al concluir la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón de DNA con 2 mL de etanol 70%. Finalmente, se centrifugó nuevamente la muestra a 13 500 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante, se dejó secar el

botón de DNA y se disolvió en 40  $\mu$ L de Buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA).

- **Secuenciación**

Tanto las construcciones obtenidas (*psiCHECK-Foxl2-MRE*, *psiCHECK-Foxl2-MUT*) como el vector *psiCHECK-2* fueron secuenciados por el método de Sanger en el departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para confirmar que los fragmentos MRE y MUT fueron insertados correctamente. Las secuencias resultantes fueron analizadas con el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Luego, para evaluar si las secuencias de interés fueron ligadas al vector, con ayuda de la herramienta en línea BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se hizo un alineamiento para encontrar regiones de similitud entre las secuencias de los insertos y las de las construcciones.

Las muestras se enviaron a una concentración de 359.1 ng/ $\mu$ L (*psiCHECK-Foxl2-MRE*) y 914.1 ng/ $\mu$ L (*psiCHECK-Foxl2-MUT*) contenidas en un volumen de 20  $\mu$ L cada una.

- **Transfección transitoria de la línea celular 3T6-Swiss albino ATCC® CCL-96**

La línea celular de ratón 3T6-Swiss albino ATCC® CCL-96, fue mantenida en medio DMEM suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino y mezcla de antibióticos. Posteriormente, 100 000 células por pozo fueron sembradas en cajas de 24 pozos para ser transfectadas. Se utilizó como agente de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen Cat. no. 11668-027) utilizando el protocolo recomendado por la casa fabricante. Brevemente, 400 ng de vector (*psiCHECK-2* vector, *psiCHECK-Foxl2-MRE* o *psiCHECK-Foxl2-MUT*) y 3 fentomoles de imitador de microRNA (control negativo o microRNA 295) fueron disueltos en 100  $\mu$ L de Medio Opti-MEM™ (ThermoFisher Scientific Cat. no. 31985070); por separado, 100  $\mu$ L del mismo medio fueron mezclados con 1  $\mu$ L de Lipofectamina 2000 y después de 5 minutos ambas soluciones se mezclaron. Finalmente, después de 20 minutos, se agregó el

medio de transfección a cada pozo. Los niveles de luciferasa *Renilla* y *Firefly* fueron determinados 24 horas después de la transfección.

- **Ensayo dual de genes reportero para la evaluación de la interacción microRNA-RNA**

Las células previamente transfectadas fueron lisadas utilizando buffer pasivo de fosfatos (Promega Cat. no. E2661) y los lisados obtenidos fueron preservados en congelación a -20°C hasta su análisis. Para determinar los niveles de luciferasa *Renilla* y *Firefly* se utilizó el kit Dual Luciferase Assay Kit (Promega Cat. no. E1910), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Las señales de cada luciferasa fueron cuantificadas en el equipo GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega Cat. no. E4871). Los niveles de oxoluciferina de cada muestra, fueron cuantificados por la detección de emisión de luz a 560 nm posteriormente, se realizó un paro de la reacción para generar una segunda reacción en la que colenterazina se oxida a coelenteramida y la emisión de luz resultante se cuantificó a 480 nm.

## RESULTADOS

### Identificación *in silico* de microRNAs con probable función reguladora de *Foxl2*

La búsqueda en la base de datos de MGI (Mouse Genome Informatics) mostró la existencia de 148 microRNAs que podrían tener como blanco a *Foxl2* y que se expresan en diferentes órganos durante el desarrollo embrionario y hasta la adultez. Estos resultados se acompañan de puntuaciones (del inglés *score*) que indican la probabilidad de apareamiento con el RNAm de *Foxl2* como blanco (Tabla 5).

Showing interaction(s) 1 - 25 of 148

Feature 1	Interaction	Feature 2	Validation	Data Source	Score
<a href="#">Mir133a-1</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.978
<a href="#">Mir133a-2</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.978
<a href="#">Mir133b</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.978
<a href="#">Mir20b</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.952
<a href="#">Mir20a</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.943
<a href="#">Mir93</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.943
<a href="#">Mir294</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.942
<a href="#">Mir106a</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.937
<a href="#">Mir1951</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.937
<a href="#">Mir17</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.935
<a href="#">Mir673</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.934
<a href="#">Mir106b</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.933
<a href="#">Mir291a</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.93
<a href="#">Mir295</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.921
<a href="#">Mir1192</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.91
<a href="#">Mir1892</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.883
<a href="#">Mir495</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.872
<a href="#">Mir23a</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.837
<a href="#">Mir23b</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.837
<a href="#">Mir3089</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.827
<a href="#">Mir3100</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.813
<a href="#">Mir7-1</a>	targets	<a href="#">Foxl2</a>	predicted	microT_CDS	0.803

Tabla 5: microRNAs candidatos para regular a *Foxl2* identificados por MGI.

De la lista obtenida, se realizó una selección para examinar informáticamente los perfiles de expresión, así como la ubicación del elemento de respuesta al microRNA (MRE por sus siglas en inglés) en la 3'UTR del RNAm de *Foxl2*. Los criterios de inclusión bajo los cuales los microRNAs fueron elegidos para el análisis son los siguientes: 1) mostrar los mayores niveles de probabilidad de apareamiento, 2) tener expresión en ovario y 3) con base en que los microRNAs regulan de manera inhibitoria la expresión génica (Bartel, 2009), mostrar correlación negativa con respecto al perfil de expresión de *Foxl2*. Así, los microRNAs 20a, 17 y 295 fueron escogidos.

a) Perfil de expresión de *Foxl2* y de los microRNAs con probable función reguladora durante el desarrollo embrionario.

El portal de internet GEO Profiles, señala que durante del desarrollo del ovario en la etapa embrionaria del ratón, la expresión de *Foxl2* se encuentra casi ausente al inicio, pero a partir del día 16.5 pc presenta un aumento aproximado del 300% con relación al día 12.5 pc donde su nivel de expresión es el más bajo (Figura 7).

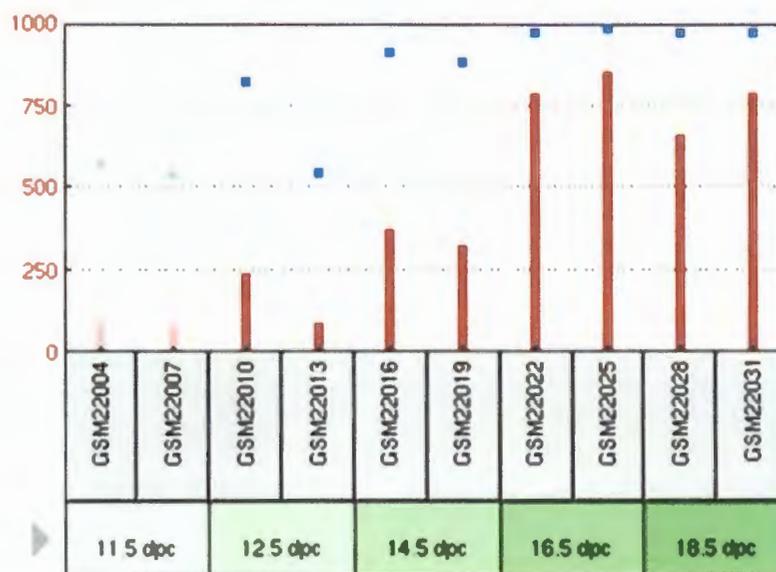


Figura 7: Perfil de expresión de *Foxl2* en el ovario durante el desarrollo embrionario del ratón (Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/5293951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/5293951)).

La expresión de los microRNAs elegidos (20a, 17 y 295), de acuerdo con lo indicado por la misma página web, manifiesta su máximo nivel en los días 11.5-12.5 de desarrollo embrionario, no obstante, disminuye gradualmente conforme avanzan los días de gestación. En el caso específico del microRNA 295, donde el perfil se reporta hasta dos días posteriores al nacimiento, la expresión es completamente nula alrededor de ese momento (Figuras 8, 9 y 10).

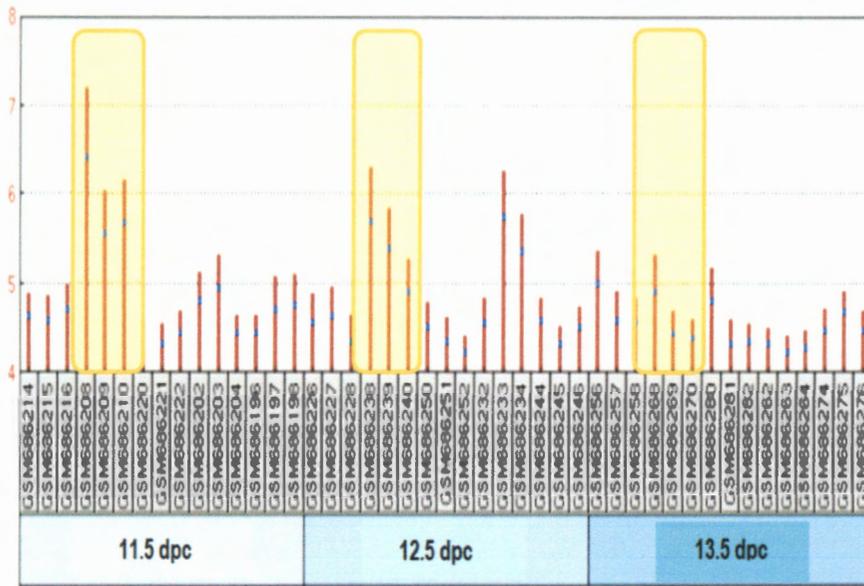


Figura 8: Perfil de expresión del microRNA 20a durante el desarrollo embrionario del ratón. Los recuadros amarillos encierran las barras correspondientes al nivel de expresión del microRNA en el ovario (Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/75373552](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/75373552)).

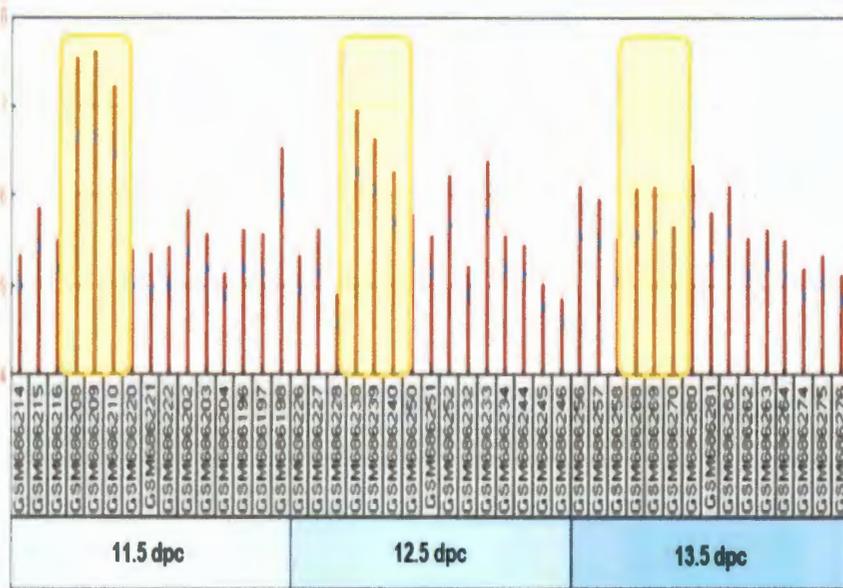


Figura 9: Perfil de expresión del microRNA 17 durante el desarrollo embrionario del ratón. Los recuadros amarillos encierran las barras correspondientes al nivel de expresión del microRNA en el ovario (Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/75373549](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/75373549)).

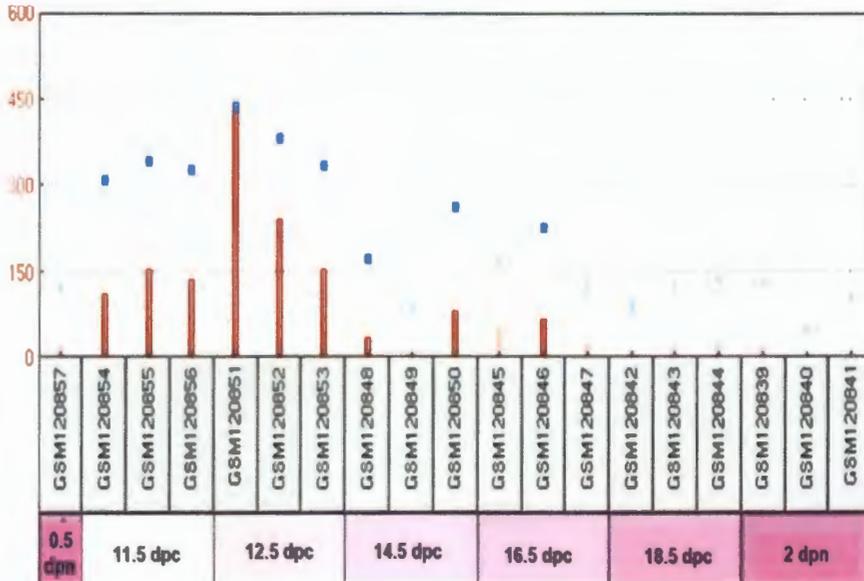


Figura 10: Perfil de expresión del microRNA 295 en el ovario durante el desarrollo embrionario del ratón (Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/27794898](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/27794898)).

b) Ubicación del MRE en la 3'UTR del RNAm de *Foxl2*.

Tomando como base la secuencia del transcrito primario del RNAm de *Foxl2* proporcionada por NCBI Nucleotide y la secuencia codificante del mismo gene proporcionada por el portal de internet NCBI CCDS Database, se localizaron las regiones no codificantes (UTR por sus siglas en inglés) 5' y 3' (Figura 11).

```

1  CACCAGGAGAGCACAGCC TCCGGGCTGCC CGGCCGCGGAGAGCCGGC TTTGTGTCATGATG
61  GCCAGCTACC CCGAGC CCGAAGACACG GCGGGGACCCTGCTGGC TCCGGAGAGCGGACGC
121  GCAGTCAAAGAGGCCGAGGCGTCGCCG CCGAGT CCCGGC AAGGGAGGCGGACAACACCG
181  GAGAAACCAGACCCCGCGCAG AAGCCC CCGTAC TCGTAC GTGGC GTCAT CGCCAT GCGG
241  ATCC GCGAGAGCGCCGAGAAGAGGCTC ACTCTG TCCGGC ATCTA CCAAGTA CATCAT AGCC
301  AAGT TCCCCT TCTACGAGAAGAACAAGAAGGGC TGGCAGAATAGCATCCGCCACAACCTC
361  AGCC TCAAAGAGTGCT TCATC AAGGTGCCGCG GAGGGC GCGGGCGAGCCGAAGGGCAAC
421  TACT GGACGC TCGACC CCGCC TCGAG GACATG TTCGAG AAGGGCACTA CCGGCGCCG
481  CGCC GCATGAAGCGGC CTTT CCGCCG CCGCCC GCTCAC TTCAGCCCGGCAAGGGGCTC
541  TTCGGAGCGGAGGAG CCGCGG TGGTGG TCGGGC GTGCC GGAGC TGGGGC CGATGGCTAT
601  GGCT ACCTGGCGCCAC CCAAG TACCTG CAATCGGGGTTCTCAA CAACTC CTGGCC CCTG
661  CCGCAGCCTC CCTCGC CCATGCCCTAC GCCTCC TGCCAGATGGC GCGGC TCGGGCGCC
721  GCTGCTGCAGCCGCTGCAGCC GCCGGC CCGGGC AGCCCC GGTGC AGCCGC GGTGGT CAAG
781  GGGCTGGCGGCCCCG CCGCC TCCTAC GGGCCGTACTCG CGCGT GCAGAGCATGGC GCTG
841  CCTC CCGGCG TCGTGA ACTCC TACAAC GGCCTG GGGGGC CCTCC TGCCGC ACCACC CCG
901  CCGC CACCGC CGCCGC ACCCT CACCCG CACCCT CACGCA CATCA TCTGCA CGCGGC CGCT
961  GCGC CCCCCG CAGCCC CGCCA CACCAC GGGGCT GCCGCG CCTCC CCCGGT CAGCT CAGT
1021  CCGCCAGCC CGGCC ACCGCC GCGCCC CCGGCA CCGCGC CCCAC GAGCGC GCCCGCCCTG
1081  CAGT TCGCCT GCGCCC GGCAA CCCGAGCTCGCCATGATG CATTGCTCATACTGGGACCAC
1141  GACAGCAAAGACGGGCGCTGCACTCGCTG GATCTC TTAGT GCCAAC CCGCGCG GGA
1201  GCGG TCCCCC ACCCCT ATCCC GGGAGT GGAGGA GCCGAGCTCGGTCG CAGCGCAGCAG
1261  CCAGCCTGACAGCGCGCACTC CGGGACAGCTTC TGGATGCAGAGCCCTCGAGCGGT CTGC
1321  CCTT CCTCGGTCCGCC CCGCT CCTGCGACTCCGCTTTGT CGCCT CCGCTGCTCCTCCGGT
1381  GCTC TTCCCC GCCGCGGCCTC TGCTTT CCGTGT GCTGTGCCGGAGGCCGCCACT CCGT
1441  GCTT TCCGCGGGCCTCCTCTC CTCACC GCAGGGAGTGAGTCCCC GGCCGAGGTGCGGTCG
1501  AAGT GTCTGAGACGCAGCTTACCTCTT GGCCCT CTCTTC CAGGT CCGTGGACTCAA GCTC
1561  GATT TTATTT TTAATT CCCCACCCCGACTGCT GCGACT AGAAGCGTAGGCTGCT GGG
1621  GAAGAGGGAC CCACAC TACCGGAGAAT GGAAGAACGTG TCTGGTCGCTC TGCGAT CCTT
1681  CCTGGA ACTGATCAGAAGCCGCTTGCAGAGGGG CCCACT GGGCGGGGCGGGGTTGAGCC
1741  CCAGGCTGGAGCAGGGACAGC CTCGTT CCGCGGCCTGCAACCGAGTTCATCCCC CGCT
1801  CCTT GTGAGG CCGTGG TGCTC CCGCTC CGCAGAGCACC CATAGGGCACC TCCAGGCCAG
1861  GTCT TTATGAAAAAGATTGGT GAGGCT TTTGAAAATATTAAAAATACTT TTTAAAGAAA
1921  AAAAGAAAGAGGGGAGAGAATAAAACAT TCATGGGGGGT GGGGAGGAGAAATGTAATGGC
1981  CTTGGAGTTT GCTAAAACCAAACAACAAAATCAAAGTT TTGGT TTTCTT CATCGACCCCT
2041  GCTGGGAAAT TTGTGT AAGAA TTCCCGTGGTGA CTTCAT TAGGC TGTGTT CAGAGGGAGG
2101  AGAAAATAAC TAGCTAAAATAAGGTTT CCACTA CAAATTAGGAA TTTCTT TTCTAT TTA
2161  AAGT TGAACT CAAAACAAAT TCCCCG GATCTT CCGATT CTGCC CCGGAT GCCAGAAGAG
2221  ATCT CTGCCT GGCTGGTACACACCGCC CAGAIGACTC CTATC CCTGAT TTTTGT TTTT
2281  CCAA TGCTTT GTTTCT TCCACCTT CGGAAGGAGAAATGT GAAAC TCGTCA TGGCCGGCCC
2341  ACACGGGCTT GTGCCCCAGC CCGCTGCCCCGAAATCCC GTGAC CTGGTGGTTGAGTAAT
2401  GTCT TTCGGGGACCAAATTTT CTAGAGGGA ACTAG CCACTTTT TTGTGTTTGTACGTG
2461  TGTGAGGGCGTCCCTTGTCAAT TCCCAAATAAA TTTTTT TGTTT TTTGTT TTTCTT TTA

```

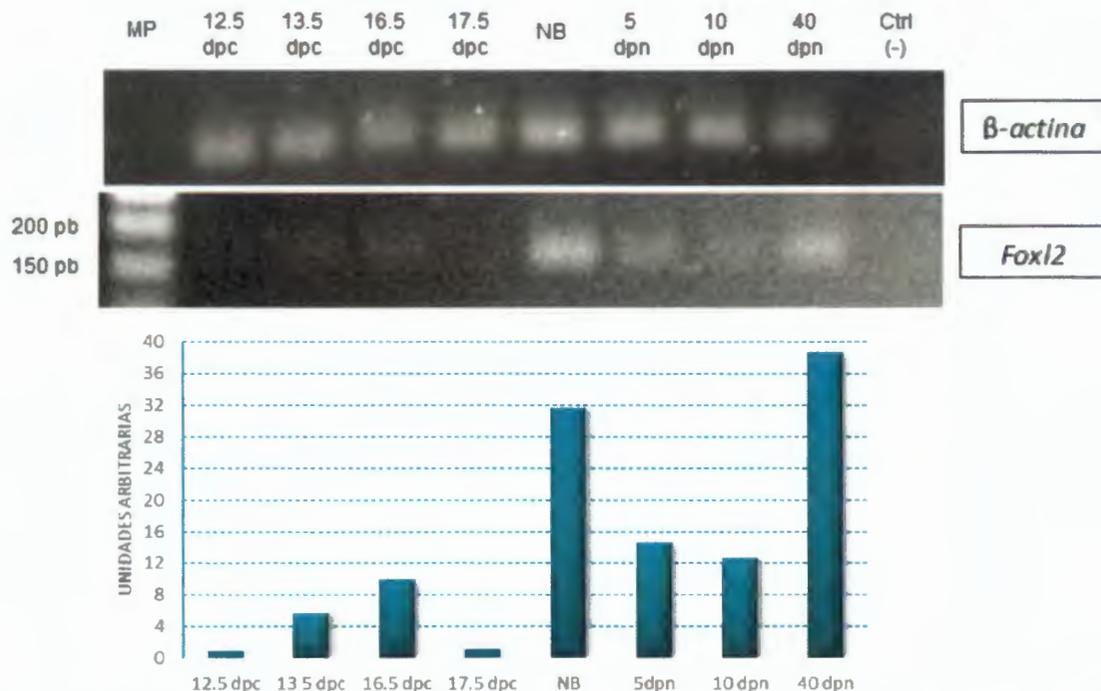
Figura 11: Secuencia del transcrito primario del RNAm de *Foxl2* donde se muestran: en negro, las 5' UTR y 3' UTR; en rojo, la secuencia codificante y resaltado en turquesa el MRE de los microRNAs seleccionados (Fuentes: [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM\\_012020.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_012020.2) y [www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS23430.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS23430.1)).



### c) Validación de la expresión de *Foxl2* mediante RT-PCR

Para validar el perfil de expresión de *Foxl2* reportado vía internet, la reacción de retrotranscripción se efectuó a partir de RNAs procedentes de ovarios de ratona de diferentes edades. Luego, los cDNA obtenidos fueron utilizados para realizar reacciones de PCR del gen  $\beta$ -actina (control positivo) y de *Foxl2*. Para establecer la muestra control negativo, se mezclaron todos los reactivos de PCR, excepto la alícuota de cDNA que actuaría como cadena molde.

La electroforesis reveló que  $\beta$ -actina, al ser un gen constitutivo, se encuentra expresado con la misma intensidad a lo largo del perfil, mientras que *Foxl2* se expresa solamente en los días 13.5, 16.5, NB, 5, 10 y 40, con la característica de que a partir del nacimiento la expresión aumenta entre 6 y 30 veces con respecto al día 13.5 de desarrollo, pero también es oscilatoria. Además, se encontró que *Foxl2* tuvo productos de amplificación de entre 150 y 200 pb que concuerdan con el resultado de 168 pb esperado (Figura 14).



**Figura 14:** Perfil de expresión de *Foxl2* obtenido a partir de reacciones de PCR y electroforesis en gel de agarosa (MP= marcador de peso molecular, dpc= días post coito, NB= recién nacido, dpn= días post natales, pb= pares de bases).

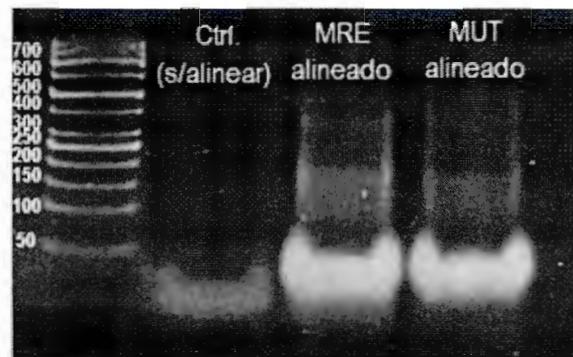
### **Análisis del silenciamiento de *Foxl2* por el microRNA 295**

Para validar si la 3'UTR del RNAm de *Foxl2* es blanco del microRNA 295 se utilizó un sistema vector reportero de doble luciferasa (psiCHECK-2). Se construyeron reporteros que contienen la secuencia de DNA que contiene el MRE (silvestre o mutante) de la 3'UTR de *Foxl2* río abajo del gen *Renilla* luciferasa y se co-transfectaron con el microRNA 295 en la línea celular 3T6-Swiss albino ATCC® CCL-96™ para monitorear cambios en la expresión génica.

#### *a) Clonación del sistema vector reportero*

Para formar los insertos que se ligaron al vector, se diseñaron dos cebadores -sentido y antisentido- que al hibridarse codifican el MRE silvestre del microRNA 295 (reportado en la página web Target Scan Mouse). El MRE mutado (MUT), que no es reconocido por el microRNA, se formó a partir de otros dos cebadores -sentido y antisentido- a cuya secuencia se le modificaron algunos nucleótidos (con respecto a la secuencia del MRE silvestre). Para hibridarse, los cebadores fueron sometidos a incubación de 75 y 25°C en un medio adecuado para su alineamiento.

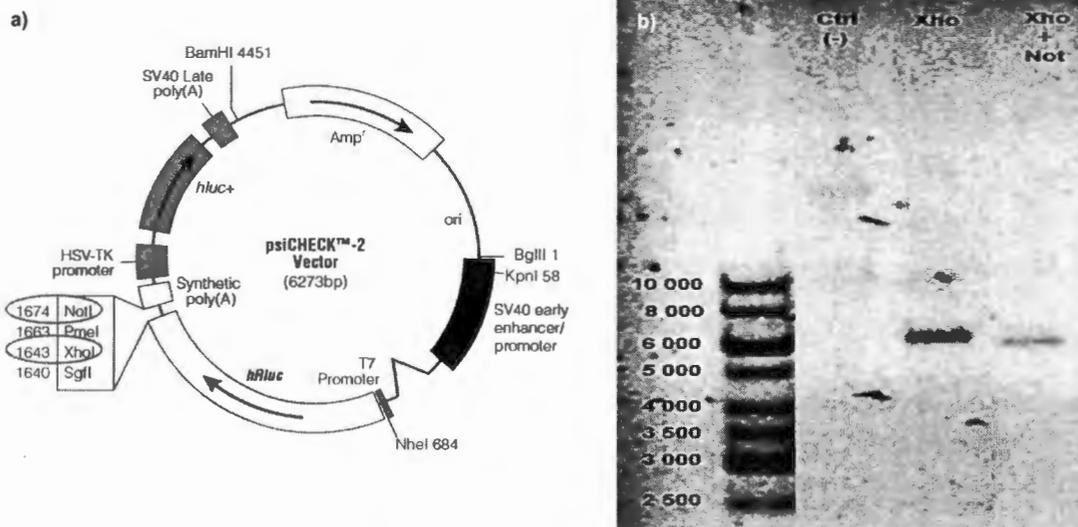
La electroforesis reveló diferencia en el patrón de migración de los cebadores que fueron hibridados en comparación con un cebador aislado. Aquellos que fueron alineados manifestaron una ligera menor migración que el control debido a que en conjunto hacen la molécula más pesada y es más difícil que ésta migre a lo largo del gel. Además, la diferencia en la intensidad de las bandas indica que la concentración de ADN en las muestras hibridadas es mayor (Figura 15).



**Figura 15:** Electroforesis en gel de acrilamida donde se observa la diferencia en los patrones de migración e intensidad de las bandas entre los cebadores hibridados y el cebador sin hibridar (control negativo.)

A continuación, el plásmido psiCHECK-2 se digirió con las endonucleasas *XhoI* y *NotI* para generar el corte donde se clonaron los MRE (silvestre o mutado). La electroforesis mostró que la digestión con *XhoI* trascendió en una banda de aproximadamente 6 273 pb (tamaño total del vector) debido a que en la secuencia del ADN plasmídico la enzima tiene solo un sitio de corte (nucleótido 1 643) y como consecuencia el plásmido simplemente se lineariza. Mientras, la doble digestión con *XhoI* y *NotI* resultó en dos bandas: una de 31 pb y otra de 6 242 pb. Los fragmentos presentes en el gel correspondieron con los productos esperados y permitieron así corroborar la eficiencia de ambas endonucleasas (Figura 16).

Al término del proceso de digestión, se sometió al vector a una reacción de desfosforilación (para evitar su recircularización) y a los insertos -MRE y MUT- a una reacción de fosforilación (para promover su ligación al vector). Inmediatamente después, ambos elementos se unieron en una reacción de ligación que conformó el último paso en la construcción de los sistemas psiCHECK-*FoxI2*-MRE y psiCHECK-*FoxI2*-MUT.



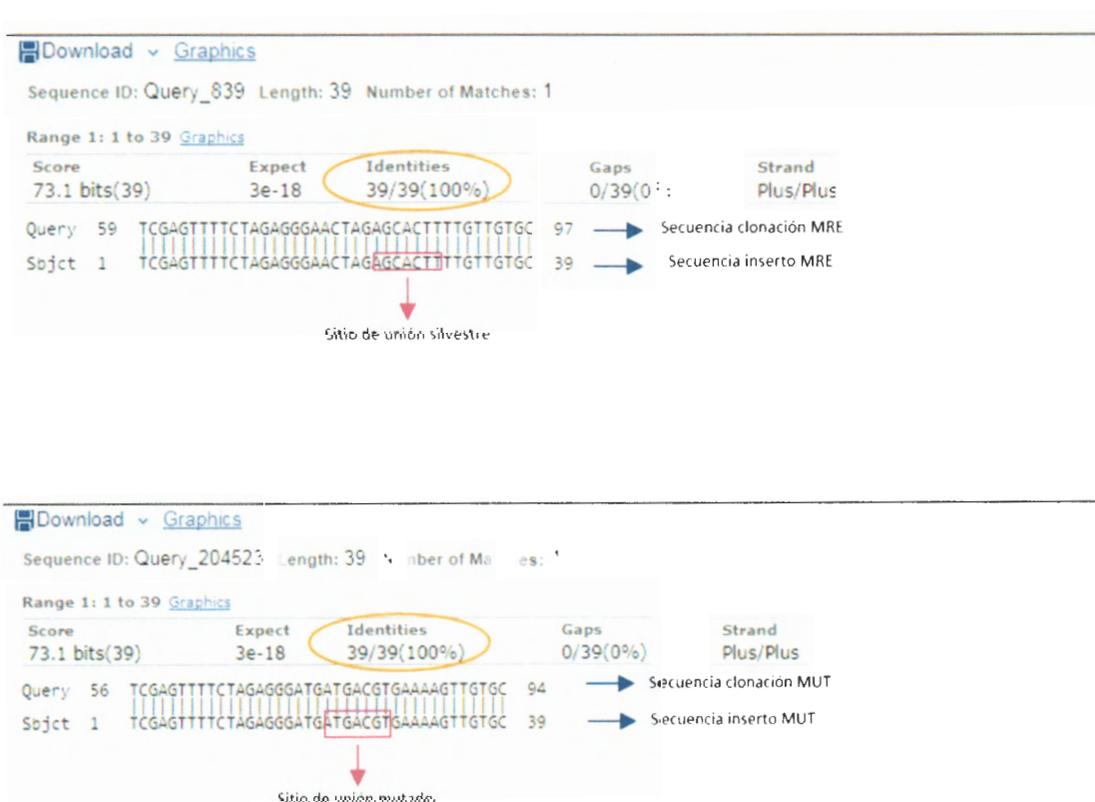
**Figura 16:** a) estructura del plásmido psiCHECK-2 Vector que muestra los sitios de corte de las endonucleasas de restricción *XhoI* y *NotI*, y b) electroforesis en gel de agarosa donde se observan los productos de digestión del vector psiCHECK-2 con *XhoI* y *NotI*.

Para amplificar las construcciones recién generadas, la transformación bacteriana se llevó a cabo en la cepa DH5 $\alpha$ . Posteriormente, se realizó la extracción de dichas construcciones bajo el protocolo del kit para lisis alcalina en midiprep QIAGEN® Plasmid Purification y las muestras obtenidas se sometieron a análisis de secuenciación en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

#### b) Secuenciación

Esta prueba fue realizada bajo el método de Sanger con la finalidad de confirmar que el proceso de clonación ocurrió correctamente. Para ejecutar el análisis se utilizó un "primer" que permitiera la elongación de la cadena de ADN recombinante desde el extremo 5' del inserto ligado. Como resultado se obtuvieron las secuencias del vector "vacío" (psiCHECK-2) así como de cada uno de los vectores con secuencia insertada (psiCHECK-*FoxI2*-MRE y psiCHECK-*FoxI2*-MUT) y se analizaron con ayuda del programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

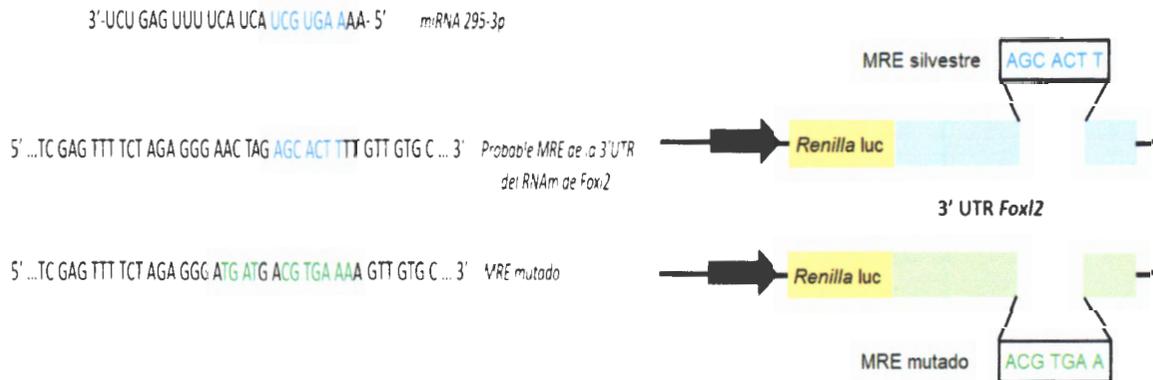
Más tarde, con el software BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se evaluó si las secuencias de interés fueron ligadas al vector a través de la identificación de regiones de similitud entre las secuencias de los insertos y las secuencias obtenidas en el análisis de Sanger. Al comparar las secuencias obtenidas de las construcciones psiCHECK-Fox/2-MRE y psiCHECK-Fox/2-MUT con las secuencias de sus respectivos insertos hubo completa concordancia entre ellas lo que indica, que la clonación ocurrió de manera exitosa y que el DNA recombinante derivado es justamente el que se esperaba obtener (Figura 17).



**Figura 17: Análisis en BLAST de las secuencias obtenidas. Se muestra el alineamiento y comparación entre secuencias de los vectores clonados y las secuencias de los insertos. Existe total igualdad entre secuencias correspondientes.**



La estructura final de cada construcción, en la zona donde se ligó el inserto, concluyó de la siguiente forma:



**Figura 18: Secuencia madura del microRNA 295 y su probable MRE en la 3'UTR del RNAm de FoxI2. Construcciones psiCHECK-FoxI2-MRE y psiCHECK-FoxI2-MUT que contienen la secuencia de ADN que puede o no unirse al microRNA 295.**

c) *Transfección transitoria de la línea celular 3T6-Swiss albino ATCC® CCL-96™ y ensayo dual de genes reportero para evaluar la interacción microRNA-RNAm.*

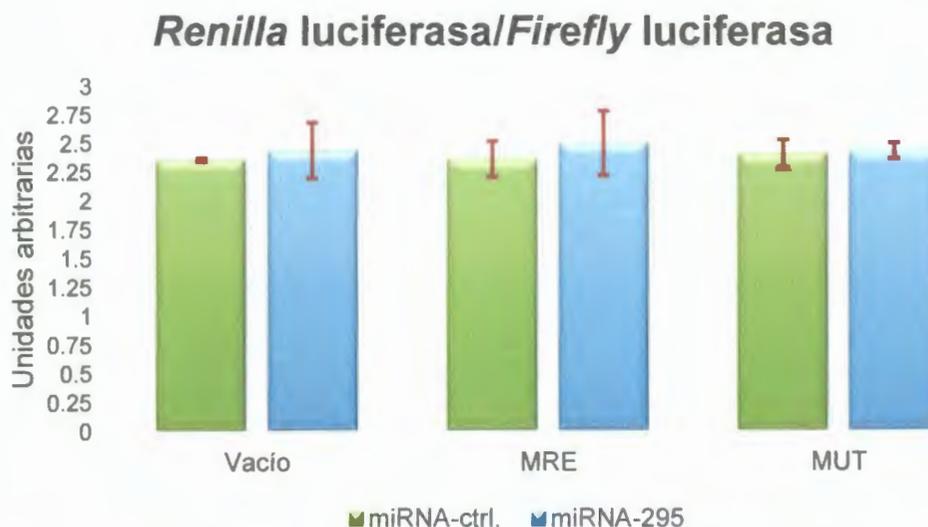
Mediante el uso de Lipofectamina, células en cultivo de la línea 3T6-Swiss albino ATCC® CCL-96™ fueron co-transfectadas con un imitador de microRNA (control negativo o microRNA 295) y el vector reportero (psiCHECK-2, psiCHECK-FoxI2-MRE o psiCHECK-FoxI2-MUT) para establecer 6 grupos de estudio en los que se evaluó la interacción del microRNA con el RNAm híbrido *Renilla* luciferasa-FoxI2 (Tabla 6).

Grupo de estudio	Imitador de microRNA transfectado	Vector transfectado
1	control negativo	psiCHECK-2 (vacío)
2	microRNA 295	psiCHECK-2 (vacío)
3	control negativo	psiCHECK-FoxI2-MRE
4	microRNA 295	psiCHECK-FoxI2-MRE
5	control negativo	psiCHECK-FoxI2-MUT
6	microRNA 295	psiCHECK-FoxI2-MUT

**Tabla 6: Grupos de estudio establecidos para evaluar la interacción del microRNA 295 con el RNAm híbrido *Renilla* luciferasa-FoxI2.**

Después del lisado celular, las mediciones en el luminómetro evidenciaron que *Renilla* luciferasa no reduce su expresión por efecto de la interacción del microRNA con el RNAm. Al comparar la expresión de *Renilla* luciferasa con la de *Firefly* luciferasa (que funciona como un reportero de normalización intraplasmático) en el sistema vacío, se puede observar que el imitador del microRNA 295 no inhibe la expresión de *Renilla* luciferasa debido a que en este sistema no existe secuencia blanco que pueda ser reconocida.

De manera muy similar a lo observado en el sistema vacío y en contraste con el efecto esperado, cuando el sistema transfectado fue psiCHECK-*FoxI2*-MRE, el microRNA 295 no tuvo efecto sobre la expresión de la proteína pese a que en este vector si se encuentra presente la posible secuencia blanco del microRNA. Finalmente, el mismo fenómeno fue detectado al transfectar el vector psiCHECK-*FoxI2*-MUT a causa de que la secuencia insertada en él se encuentra mutada y por lo tanto el microRNA no es capaz de reconocerla (Gráfica 1).



**Gráfica 1: Relación en la expresión de *Renilla* luciferasa/*Firefly* luciferasa (media  $\pm$  error estándar). Se observa que ante la presencia del microRNA 295 la expresión de *Renilla* luciferasa en ningún caso se altera.**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los microRNAs son RNAs no codificantes de cadena corta que en células eucariotas regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional a través del apareamiento de bases con su RNAm blanco (Wahid *et. al.*, 2010). Tienen diferentes funciones reguladoras en el desarrollo y proliferación celular, así como en procesos de hematopoyesis, miogénesis, cardiogénesis y osteogénesis (Gangaraju y Lin, 2009); incluso, actúan como oncogenes o genes supresores de tumor (Voorhoeve, 2010) por lo que han adquirido importancia al ser considerados como biomarcadores para el pronóstico y diagnóstico de cáncer (Zhang *et.al.*, 2007; Ling *et. al.*, 2017). Se ha propuesto también que la manipulación de su biogénesis y actividad podría resultar en el desarrollo de terapias eficientes contra esta y otras clases de patologías (Christopher *et al.*, 2016).

En el aspecto reproductivo, también están presentes. Por ejemplo, en ovario los microRNAs participan en la regulación de la señalización hormonal durante el ciclo estral (Toms *et. al.*, 2018); en útero se encuentran relacionados con el fenómeno de implantación a través de la adquisición de la receptividad endometrial (Zheng *et al.*, 2017) y en oviducto, promueven el correcto desarrollo de los cilios que capturan y transportan a los ovocitos hasta la región ampular (Wu *et. al.*, 2014). Todos estos estudios sugieren que los microRNAs juegan papeles muy importantes en la reproducción, sin embargo, hasta el momento no se ha investigado qué microRNAs intervienen en la activación folicular del ratón a través de la regulación de la expresión de *Foxl2*.

Durante la etapa de activación folicular, *Foxl2* es un gen de particular interés debido a que promueve el mantenimiento de las células de la granulosa, así como la correcta diferenciación del folículo primordial (Georges *et. al.*, 2014). Aquí, se validó experimentalmente el perfil de expresión de *Foxl2* reportado *in silico* y aunque el perfil obtenido no fue idéntico al previamente documentado, se observó que los días de expresión del gen coinciden perfectamente con la determinación ovárica, el rompimiento de los quistes de ovogonias, la formación de los folículos primordiales

y su diferenciación en folículos primarios (Eggers *et. al.*, 2014; Smith *et. al.*, 2014; Schmidt *et. al.*, 2004).

En el presente trabajo, mediante la consulta de la base de datos MGI, se determinó que la 3'UTR del RNAm de *Foxl2* es blanco probable de 148 microRNAs, todos ellos expresados en diferentes etapas de vida y órganos del cuerpo. Cada uno, se encontró listado de manera descendente de acuerdo con su probabilidad de aparearse con la 3'UTR del RNAm y puesto que analizar el efecto regulador de los 148 microRNAs resultaba inviable, se procedió a realizar una minuciosa selección tomando como base tres criterios de inclusión: 1) mayor nivel de probabilidad de apareamiento con la 3'UTR, 2) expresión en ovario en el momento de la activación folicular y 3) correlación negativa con la expresión de *Foxl2*. Al término, se encontró que durante la etapa de activación folicular existe en el ovario, expresión de tres microRNAs que tienen alta probabilidad de interacción con el RNAm así como expresión inversamente proporcional a la de *Foxl2*, lo que denota su función inhibitoria sobre la expresión del gen. De ellos, dos cuentan con el mismo MRE (microRNA 17 y microRNA 20a) y uno (microRNA 295) tiene un MRE que comienza un nucleótido antes con respecto a los otros dos. Según la búsqueda *in silico*, este hallazgo se debe a que los microRNAs que tienen el mismo MRE pertenecen a la misma familia génica mientras que el que difiere pertenece a otra.

En este estudio, durante la investigación de las características particulares de cada microRNA se observó que las bases de datos consultadas tienen al sitio web miRBase como una de sus fuentes principales de información. miRBase, clasifica a los microRNAs en diferentes familias agrupándolos de manera que cada una de ellas comparta un ancestro común (Ding *et. al.*, 2011) tomando en cuenta que, en la biogénesis de estas moléculas cada microRNA tiene diferentes orígenes (Kim *et. al.*, 2009). La clasificación, además, revela que los grupos de genes que actúan como precursores de los miembros de una misma familia tienen la misma secuencia y/o configuración estructural lo que a su vez les concede funciones en común (Kaczkowski *et. al.*, 2009).

Tradicionalmente se ha señalado que la forma en que ocurren las relaciones microRNA-gen blanco incluyen que un microRNA tiene la capacidad de regular uno o varios genes (Bonci *et. al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013). Sin embargo, más recientemente se ha manifestado que las relaciones también pueden ser del tipo donde varios microRNAs regulan la expresión de un mismo gen (Hashimoto *et. al.*, 2013). En analogía con lo anterior y de acuerdo con lo expresado por el equipo de Brennecke, (2005), aquí, se evidenció la existencia de dos secuencias casi idénticas que constituyen el MRE de microRNAs que pertenecen a diferentes familias, por lo que suponemos que dentro de la 3' UTR de *Foxl2* ésta es una región de gran importancia que representa un punto clave en su regulación por microRNAs.

Posterior al análisis *in silico* y derivado de la selección realizada, se decidió adoptar únicamente al microRNA 295 como candidato para validar experimentalmente su efecto regulador sobre el RNAm de *Foxl2*. Acerca de éste microRNA, previamente se ha demostrado que tiene funciones muy importantes durante las primeras etapas de desarrollo embrionario del ratón debido a que mantiene la pluripotencialidad de las células madre (Yuan *et. al.*, 2017). Además, se ha revelado que el grupo de microRNAs donde se encuentra agrupado tiene la tarea de promover la supervivencia de células madre a través de la inhibición de los reguladores apoptóticos Casp2 y Ei24 (Zheng *et. al.*, 2011). En el contexto reproductivo, se manifestó que cuenta con un papel fundamental en la fertilidad murina ya que al inhibir su expresión, los embriones que presentan esta condición tienen altas tasas de mortalidad y aquellos que sobreviven manifiestan problemas de fertilidad a causa de un defecto en la migración de las células germinales primordiales hacia la cresta gonadal (Medeiros *et. al.*, 2011).

La metodología empleada para validar el efecto regulador del microRNA 295 consistió en la clonación de un vector reportero (donde se insertó el fragmento de la secuencia de la 3'UTR que contiene el MRE) así como su posterior co-transfección con el microRNA 295 en la línea celular 3T6 Swiss Albino para evaluar la expresión del RNAm híbrido luciferasa-*Foxl2*. Al término del proceso de clonación,

las secuencias obtenidas por el método de Sanger evidenciaron que el vector ligó correctamente la secuencia de interés a su estructura.

En la presente investigación, pese a que los datos reportados *in silico* indican que el RNAm de *Foxl2* es blanco del microRNA 295 en el momento de la activación folicular, los experimentos realizados para certificar dicha información arrojaron resultados adversos. Los resultados mostrados en la Gráfica 1 (pág. 46) manifiestan que el microRNA 295 no es capaz de silenciar la expresión de *Foxl2* durante la activación folicular tal vez porque durante esta etapa el microRNA 295 podría tener otros genes blanco y *Foxl2* podría estar regulado por otros microRNAs. Para corroborar esta información, es necesario realizar más estudios a través de los cuales se examine la interacción de *Foxl2* con otros microRNAs, comenzando por el microRNA 17 y el microRNA 20a que son aquellos cuyo análisis *in silico* indica que están presentes en el ovario durante la activación folicular y que comparten MRE con el microRNA 295.

En vista de que los gametos son las únicas células capaces de dar origen a un nuevo ser vivo y mediante las cuales es posible transmitir la información genética de una generación a otra, su correcto desarrollo y maduración son vitales para alcanzar el éxito reproductivo. En consecuencia, el estudio de la función de los microRNAs durante la foliculogénesis resulta fundamental para entender detalladamente los mecanismos básicos que rigen dicho proceso a fin de generar nuevas alternativas que permitan diagnosticar y tratar eficazmente patologías derivadas de alteraciones en su curso (Carletti y Christenson, 2009; Maalouf *et. al.*, 2016; Gross *et. al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

- ✓ El perfil de expresión de *Foxl2* reportado *in silico* coincide mayormente con el obtenido experimentalmente en el presente estudio y concuerda perfectamente con la determinación ovárica, el rompimiento de los quistes de ovogonias, la formación de los folículos primordiales y su diferenciación en folículos primarios.
- ✓ De acuerdo con la información obtenida *in silico*, *Foxl2* es blanco probable de 148 microRNAs que se expresan en diferentes etapas de la vida y órganos del cuerpo.
- ✓ Durante la activación folicular, en el ovario se expresan 3 microRNAs que tienen como blanco a *Foxl2*. Los microRNA 17 y 20a pertenecen a la misma familia y tienen el mismo MRE mientras que el microRNA 295 corresponde a otra familia y por lo tanto su MRE varía en un nucleótido con respecto al de los otros dos.
- ✓ Dentro de la región 3' UTR de *Foxl2*, la secuencia de nucleótidos que forma el MRE de los microRNAs 17, 20a y 295, podría ser una región imprescindible para la regulación de la expresión de *Foxl2* por microRNAs.
- ✓ En concordancia con el ensayo dual de genes reportero para evaluar la interacción microRNA-RNAm, el microRNA 295 no mostró ser capaz de silenciar la expresión de *Foxl2* debido a que éste podría ser regulado por otros microRNAs.
- ✓ El estudio de la función de los microRNAs durante la foliculogénesis es fundamental para entender los mecanismos básicos que la rigen.

## PERSPECTIVAS

- ✓ Determinar los perfiles de expresión de los microRNAs 17 y 20a desde el día 12.5 de desarrollo embrionario hasta el día 40 post natal.
- ✓ Determinar, a través del modelo de gen reportero, si los microRNAs 17 y 20a son reguladores de la expresión de *Foxl2*.
- ✓ De resultar inhibidores de *Foxl2*, evaluar el efecto silenciador de los microRNAs 17 y 20a en ovarios *ex vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adhikari, D., y Liu, K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*, 30(5), 438–464. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0048>
2. Adhikari, D., Flohr, G., Gorre, N., Shen, Y., Yang, H., Lundin, E., ... Liu, K. (2009). Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 15(12), 765–770. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap092>
3. Adhikari, D., Zheng, W., Shen, Y., Gorre, N., Hämäläinen, T., Cooney, A. J., ... Liu, K. (2010). Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, 19(3), 397–410. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp483>
4. Bachvarova, R., De Leon, V., Johnson, A., Kaplan, G., y Paynton, B. V. (1985). Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*, 108(2), 325–331.
5. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
6. Bartel, D. P. (2009). MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
7. Bannister, S. C., Smith, C. A., Roeszler, K. N., Doran, T. J., Sinclair, A. H., y Tizard, M. L. V. (2011). Manipulation of estrogen synthesis alters MIR202\* expression in embryonic chicken gonads. *Biology of Reproduction*, 85(1), 22–30. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088476>
8. Bentsi-Barnes, I. K., Kuo, F.-T., Barlow, G. M., y Pisarska, M. D. (2010). Human Forkhead L2 Represses Key Genes in Granulosa Cell Differentiation Including Aromatase, P450scc, and Cyclin D2. *Fertility and Sterility*, 94(1), 353–356. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.050>

9. Blount, A. L., Schmidt, K., Justice, N. J., Vale, W. W., Fischer, W. H., y Bilezikjian, L. M. (2009). FoxL2 and Smad3 Coordinately Regulate Follistatin Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 7631–7645. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806676200>
10. Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., ... Maria, R. D. (2008). The miR-15a–miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nature Medicine*, 14(11), 1271–1277. <https://doi.org/10.1038/nm.1880>
11. Brenkman, A. B., y Burgering, B. M. T. (2003). FoxO3a eggs on fertility and aging. *Trends in Molecular Medicine*, 9(11), 464–467. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2003.09.003>
12. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., y Cohen, S. M. (2005). Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biology*, 3(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085>
13. Caburet, S., Georges, A., L'Hôte, D., Todeschini, A.-L., Benayoun, B. A., y Veitia, R. A. (2012). The transcription factor FOXL2: at the crossroads of ovarian physiology and pathology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356(1–2), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.019>
14. Carletti, M. Z., y Christenson, L. K. (2009). MicroRNA in the ovary and female reproductive tract. *Journal of Animal Science*, 87(14 Suppl), E29-38. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1331>
15. Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W., y DePinho, R. A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5630), 215–218. <https://doi.org/10.1126/science.1086336>
16. Christopher, A. F., Kaur, R. P., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., y Bansal, P. (2016). MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspectives in Clinical Research*, 7(2), 68–74. <https://doi.org/10.4103/2229-3485.179431>

17. Chu, C.-Y., y Rana, T. M. (2007). Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 412–419. <https://doi.org/10.1002/jcp.21230>
18. Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Servel, N., Xia, X., Pannetier, M., ... Veitia, R. (2002). Evolution and expression of FOXL2. *Journal of Medical Genetics*, 39(12), 916–921. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.12.916>
19. Cordeiro, M. H., Kim, S.-Y., Ebbert, K., Duncan, F. E., Ramalho-Santos, J., y Woodruff, T. K. (2015). Geography of follicle formation in the embryonic mouse ovary impacts activation pattern during the first wave of folliculogenesis. *Biology of Reproduction*, 93(4), 88. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131227>
20. Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., ... Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics*, 27(2), 159–166. <https://doi.org/10.1038/84781>
21. Dai, A., Sun, H., Fang, T., Zhang, Q., Wu, S., Jiang, Y., ... Hu, Y. (2013). MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2. *FEBS Letters*, 587(15), 2474–2482. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.023>
22. De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Burns, K. H., Adashi, E. Y., Matzuk, M. M., y Eppig, J. J. (2004). Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Developmental Biology*, 275(2), 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.028>
23. de Sousa Lopes, S. M. C., Hayashi, K., y Surani, M. A. (2007). Proximal visceral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors. *BMC Developmental Biology*, 7, 140. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-140>
24. Ding, J., Zhou, S., y Guan, J. (2011). miRFam: an effective automatic miRNA classification method based on n-grams and a multiclass SVM. *BMC Bioinformatics*, 12, 216. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-216>

25. Edson, M. A., Nalam, R. L., Clementi, C., Franco, H. L., Demayo, F. J., Lyons, K. M., ... Matzuk, M. M. (2010). Granulosa cell-expressed BMPR1A and BMPR1B have unique functions in regulating fertility but act redundantly to suppress ovarian tumor development. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.), 24(6), 1251–1266. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0461>
26. Eggers, S., Ohnesorg, T., y Sinclair, A. (2014). Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(11), 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.163>
27. Eichenlaub-Ritter, U., y Peschke, M. (2002). Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update*, 8(1), 21–41.
28. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., y Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews. Genetics*, 9(2), 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>
29. Fortin, J., Boehm, U., Deng, C.-X., Treier, M., y Bernard, D. J. (2014). Follicle-stimulating hormone synthesis and fertility depend on SMAD4 and FOXL2. *The FASEB Journal*, 28(8), 3396–3410. <https://doi.org/10.1096/fj.14-249532>
30. Gangaraju, V. K., y Lin, H. (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(2), 116–125. <https://doi.org/10.1038/nrm2621>
31. 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*, 52(1), R17-33. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0159>
32. Ginsburg, M., Snow, M. H., y McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* (Cambridge, England), 110(2), 521–528.
33. Gross, N., Kropp, J., y Khatib, H. (2017). MicroRNA Signaling in Embryo Development. *Biology*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/biology6030034>

34. Hannon, P. R., y Curry, T. E. (2018). Folliculogenesis. In M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edition) (pp. 72–79). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64628-7>
35. Hashimoto, Y., Akiyama, Y., y Yuasa, Y. (2013). Multiple-to-Multiple Relationships between MicroRNAs and Target Genes in Gastric Cancer. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062589>
36. Hirano, M., Wada-Hiraike, O., Fu, H., Akino, N., Isono, W., Sakurabashi, A., ... Osuga, Y. (2017). The Emerging Role of FOXL2 in Regulating the Transcriptional Activation Function of Estrogen Receptor  $\beta$ . *Reproductive Sciences* 24:133-141. <https://doi.org/10.1177/1933719116651150>
37. Hunt, P. A., y Hassold, T. J. (2008). Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in Genetics: TIG*, 24(2), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.11.010>
38. John, G. B., Gallardo, T. D., Shirley, L. J., y Castrillon, D. H. (2008). Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology*, 321(1), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.017>
39. Kaczkowski, B., Torarinsson, E., Reiche, K., Havgaard, J. H., Stadler, P. F., y Gorodkin, J. (2009). Structural profiles of human miRNA families from pairwise clustering. *Bioinformatics*, 25(3), 291–294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn628>
40. Kim, V. N., Han, J., y Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(2), 126–139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
41. Kim, J. Y. (2012). Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 39(1), 10–14. <https://doi.org/10.5653/cerm.2012.39.1.10>
42. Kotipalli, A., Gutti, R., y Mitra, C. K. (2016). Dynamics of miRNA biogenesis and nuclear transport. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 13(5), 22–34. <https://doi.org/10.1515/jib-2016-305>

43. Lanner, F. (2014). Lineage specification in the early mouse embryo. *Experimental Cell Research*, 321(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.004>
44. Laplante, M., y Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
45. Ling, H, Girnita, L, Buda O, Calin, G.A (2017). Non-coding RNAs: the cancer genome dark matter that matters! *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0740>
46. Loffler, K. A., Zarkower, D., y Koopman, P. (2003). Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology*, 144(7), 3237–3243. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0095>
47. Maalouf, S. W., Liu, W. S., y Pate, J. L. (2016). MicroRNA in ovarian function. *Cell and Tissue Research*, 363(1), 7–18. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2307-4>
48. McLaughlin, E. A., y McIver, S. C. (2009). Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*, 137(1), 1–11. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0118>
49. Medeiros, L. A., Dennis, L. M., Gill, M. E., Houbaviy, H., Markoulaki, S., Fu, D., ... Jaenisch, R. (2011). Mir-290-295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), 14163–14168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111241108>.
50. Monniaux, D. (2016). Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*, 86(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.017>
51. Monniaux, D., Cadoret, V., Clément, F., Dalbies-Tran, R., Elis, S., Fabre, S., ... Uzbekova, S. (2018). Folliculogenesis☆. In Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64550-6>

52. Nikolic, A., Volarevic, V., Armstrong, L., Lako, M., y Stojkovic, M. (2016). Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1741072>
53. Nunes C, Silva J, Silva V, Torgal I, Fardilha M. (2015). Signalling pathways involved in oocyte growth, acquisition of competence and activation. *Human fertility*. DOI: 10.3109/14647273.2015.1006692.
54. Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz, J. E., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., ... Schlessinger, D. (2005). Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Human Molecular Genetics*, 14(14), 2053–2062. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi210>
55. Pan, H., O'brien, M. J., Wigglesworth, K., Eppig, J. J., y Schultz, R. M. (2005). Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. *Developmental Biology*, 286(2), 493–506. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.023>
56. Pangas, S. A., y Rajkovic, A. (2015). Chapter 21 - Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. In T. M. Plant y A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 947–995). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00021-1>
57. Pepling, M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 44(12), 622–632. <https://doi.org/10.1002/dvg.20258>
58. Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA (New York, N.Y.)*, 11(12), 1753–1761. <https://doi.org/10.1261/rna.2248605>
59. Qin, N., Fan, X.-C., Xu, X.-X., Tyasi, T. L., Li, S.-J., Zhang, Y.-Y., ... Xu, R.-F. (2015). Cooperative Effects of FOXL2 with the Members of TGF- $\beta$  Superfamily on FSH Receptor mRNA Expression and Granulosa Cell Proliferation from Hen Prehierarchical Follicles. *PloS One*, 10(10), e0141062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141062>

60. Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., ... Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5863), 611–613. <https://doi.org/10.1126/science.1152257>
61. Rosario, R., Blenkiron, C., y Shelling, A. N. (2013). Comparative study of microRNA regulation on FOXL2 between adult-type and juvenile-type granulosa cell tumours in vitro. *Gynecologic Oncology*, 129(1), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.12.034>
62. Sarraj, M. A., y Drummond, A. E. (2012). Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. *Reproduction (Cambridge, England)*, 143(2), 151–163. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0247>
63. Saatcioglu, H. D., Cuevas, I., y Castrillon, D. H. (2016). Control of Oocyte Reawakening by Kit. *PLOS Genetics*, 12(8), e1006215. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006215>
64. Sacchi, S., Marinaro, F., Xella, S., Marsella, T., Tagliasacchi, D., y La Marca, A. (2017). The anti-Müllerian hormone (AMH) induces forkhead box L2 (FOXL2) expression in primary culture of human granulosa cells in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(9), 1131–1136. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0980-9>
65. Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.-C., y Treier, M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development (Cambridge, England)*, 131(4), 933–942. <https://doi.org/10.1242/dev.00969>
66. Schultz, R. M., y Wassarman, P. M. (1977). Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Journal of Cell Science*, 24(1), 167–194.
67. Schultz, R. M., LaMarca, M. J., y Wassarman, P. M. (1978). Absolute rates of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75(9), 4160–4164.
68. Smith, P., Wilhelm, D., y Rodgers, R. J. (2014). Development of mammalian ovary. *Journal of Endocrinology*, 221(3), R145–R161. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0062>
69. Su, Y.-Q., Sugiura, K., Woo, Y., Wigglesworth, K., Kamdar, S., Affourtit, J., y Eppig, J. J. (2007). Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*, 302(1), 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.008>
70. Suh, N., y Blelloch, R. (2011). Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development*, 138(9), 1653–1661. <https://doi.org/10.1242/dev.056234>
71. Toms, D., Pan, B., y Li, J. (2018). Endocrine Regulation in the Ovary by MicroRNA during the Estrous Cycle. *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00378>
72. Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., ... Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1171–1181. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh124>
73. Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., ... Treier, M. (2009). Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139(6), 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>
74. Vlachos, I. S., y Hatzigeorgiou, A. G. (2013). Online resources for miRNA analysis. *Clinical Biochemistry*, 46(10–11), 879–900. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.03.006>
75. Voorhoeve, P. M. (2010). MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805 (1), 72–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.09.003>

76. Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., y Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(11), 1231–1243. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013>
77. Wang, T., Li, F., y Tang, S. (2015). MiR-30a upregulates BCL2A1, IER3 and cyclin D2 expression by targeting FOXL2. *Oncology Letters*, 9(2), 967–971.
78. Wear, H. M., McPike, M. J., y Watanabe, K. H. (2016). From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. *Journal of Ovarian Research*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0246-7>
79. Wu, L., Fan, J., y Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4034–4039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510928103>
80. Wu, J., Bao, J., Kim, M., Yuan, S., Tang, C., Zheng, H., ... Yan, W. (2014). Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), E2851–E2857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407777111>
81. Yang, S., Wang, S., Luo, A., Ding, T., Lai, Z., Shen, W., ... Wang, S. (2013). Expression patterns and regulatory functions of microRNAs during the initiation of primordial follicle development in the neonatal mouse ovary. *Biology of Reproduction*, 89(5), 126. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.107730>
82. Yuan, K., Ai, W.-B., Wan, L.-Y., Tan, X., y Wu, J.-F. (2017). The miR-290-295 cluster as multi-faceted players in mouse embryonic stem cells. *Cell y Bioscience*, 7, 38. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0166-2>
83. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., y Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>

84. Zhang, H., Risal, S., Gorre, N., Busayavalasa, K., Li, X., Shen, Y., ... Liu, K. (2014). Somatic Cells Initiate Primordial Follicle Activation and Govern the Development of Dormant Oocytes in Mice. *Current Biology*, 24(21), 2501–2508. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.023>
85. Zhang, B., Chen, L., Feng, G., Xiang, W., Zhang, K., Chu, M., y Wang, P. (2017). MicroRNA Mediating Networks in Granulosa Cells Associated with Ovarian Follicular Development. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4585213>
86. Zhao, Y., Zhang, Y., Li, J., Zheng, N., Xu, X., Yang, J., ... Zhang, M. (2018). MAPK3/1 participates in the activation of primordial follicles through mTORC1-KITL signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 226–237. <https://doi.org/10.1002/jcp.25868>
87. Zheng, G. X. Y., Ravi, A., Calabrese, J. M., Medeiros, L. A., Kirak, O., Dennis, L. M., ... Sharp, P. A. (2011). A latent pro-survival function for the mir-290-295 cluster in mouse embryonic stem cells. *PLoS Genetics*, 7(5), e1002054. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002054>
88. Zheng, W., Zhang, H., y Liu, K. (2014). The two classes of primordial follicles in the mouse ovary: their development, physiological functions and implications for future research. *Molecular Human Reproduction*, 20(4), 286–292. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau007>
89. Zheng, Q., Zhang, D., Yang, Y., Cui, X., Sun, J., Liang, C., Qin, H., Yang, X., Liu, S., Yang, Q. (2017). MicroRNA-200c impairs uterine receptivity formation by targeting FUT4 and  $\alpha$ 1,3-fucosylation. *Cell Death y Differentiation* 24, 2161-2172. <http://bdi.uam.mx:2182/articles/cdd2017136>
90. EMBL-EBI European Molecular Biology Laboratory 2016, *Expression Atlas* [Página web], consultado el 16 de enero 2016, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)
91. Griffiths-Jones lab Faculty of life sciences University of Manchester 2014, *miRBase* [Página web], consultado el 20 de enero 2016, [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)
92. National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine 2015, *NCBI GenBank* [Página web], consultado el 24 de enero 2016, [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)

## Bibliografía

93. The Jackson Laboratory 2016, *Mouse Genome Informatics* [Página web], consultado: 16 de enero 2016, [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)
94. National Center for Biotechnology Information, U.S National Library of Medicine 2016, *Gene Expression Omnibus (GEO) Profiles*[Página web], consultado: 25 de septiembre 2016, [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles)