

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Estudio de la etiología genética de la insuficiencia ovárica primaria (POI): genes FMR1 y FMR2

TESIS DOCTORAL

Maitane Barasoain Hernández

Leioa, 2015

Estudio de la etiología genética de la insuficiencia ovárica primaria (POI): genes FMR1 y FMR2

Memoria para la obtención del grado de Doctor en Biología presentada por:

Maitane Barasoain Hernández

Trabajo de tesis dirigido por:

Prof. Dra. M^a Isabel Arrieta Sáez

Prof. Dr. Gorka Barrenetxea Ziarrusta

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Leioa, 2015

Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una ayuda de formación y perfeccionamiento del personal investigador (BFI09.212), concedida por el Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco. Igualmente, este trabajo ha sido posible gracias a la financiación por parte de este mismo ente del proyecto “Estudio del gen FMR1 y la genotoxicidad de fármacos antihipertensivos” (IT-409-07) y al Vicerrectorado de Investigación de la UPV/EHU por la financiación del proyecto “Estudio del gen FMR1 y la genotoxicidad de fármacos antihipertensivos” (GIU 10/05) y de la Unidad de Formación e Investigación, ELDUNANOTEK (UFI 11/32). Finalmente, la obtención de las muestras fue posible gracias a la labor de recolección liderada por el Dr. Gorka Barrenetxea y llevada a cabo por Amaia Carrillo y Cristina Pérez. De igual forma, este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo técnico y humano del Servicio de Genómica y Proteómica de SGiker (UPV/EHU).

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

AGRADECIMIENTOS

Éste ha sido un camino largo, con sus rosas y sus espinas. Me gustaría agradecer a todas las personas que de una u otra manera me han ayudado a terminar esta tesis.

Indudablemente este proyecto no hubiera sido posible sin la ayuda de la Dra. M^a Isabel Arrieta. Fue una casualidad encontrarte cuando todavía era estudiante de biología y a lo largo de estos años han sido muchas las cosas que he aprendido junto a ti. Gracias por darme tanto.

Por supuesto no me olvido del Dr. Gorka Barrenetxea, que ha puesto todo de su parte desde el primer momento para que este proyecto saliera adelante.

Agradecer también al resto del grupo: Iratxe, Mertxe y Juanma, que aunque no habéis estado físicamente, siempre me habéis ayudado en lo que habéis podido. Como dijo Iratxe: ¡somos un equipo! Lucía y Paula también habéis sido un gran apoyo en esta última etapa.

Importante también la ayuda de Amaia y Cristina, que se han encargado de la recolección y recogida de muestras.

Por otro lado, no quiero dejar de agradecer a la gente que me ha ayudado con las técnicas, en especial las Dras. Paula e Isabel y el resto de compañeros de la Unidad de Genética Molecular y UI&D del Departamento de Genética Humana del Centro de Genética Médica Dr. Jacinto de Magalhães de Oporto, porque aunque la estancia fue corta, me llevo una gran experiencia. A la Dra. Begoña Criado que me puso en contacto con ellas y con la que siempre es un placer pasar un rato. A Fernando e Irati, del Servicio de Genómica y Proteómica de la UPV/EHU, que me han ayudado en todo lo que han podido con las electroforesis capilares y la secuenciación. Tampoco me quiero olvidar de la Dra. Arantza Urkaregi por su inestimable ayuda con los cálculos estadísticos.

Dar las gracias a las donantes voluntarias que de forma altruista han donado las muestras utilizadas ya que sin su colaboración este proyecto no hubiera sido posible.

A mis chicas del cole que estoy segura que se alegrarán por mí. ¡Espero que esto dure todavía muchos más años!

Tampoco me olvido de la gente del departamento de “BioCel” de la Facultad de Medicina y Odontología de la UPV/EHU, porque me han hecho sentir una más y eso se agradece y mucho.

Fundamental dar las gracias a mis niñas, Cata, Rocío, Arantza, Eri y Marta, que han “sufrido” lo mismo que yo y eso ayuda, porque sin ellas creo que no hubiera acabado. Siempre habéis tenido las palabras adecuadas en los momentos precisos y me habéis dado el empujón que necesitaba. Nuestros días buenos y los no tan buenos, momentos de crisis pero también de alegrías que hemos compartido café tras café, dentro y fuera de la universidad. Con una desde la guardería, con otras desde primero de carrera y con otras desde tercero son muchas cosas compartidas y ya os habéis convertido en una parte demasiado importante en mi vida.

A Hugo, ya no hay nada que te pueda decir que no sepas, siempre has estado ahí cuando lo he necesitado y sé que siempre estarás. Gracias por el apoyo incondicional durante estos años, por confiar en mí y obligarme a confiar en mí misma, por hacerme ver el lado positivo, porque contigo siempre hay algo bueno. Esta tesis es en parte tuya.

Y por último, agradecer de forma especial a mi familia: aita, ama, porque sin vosotros no estaría donde estoy. Soy lo que soy gracias a vosotros. A Borja, que me has metido caña para que esto saliera adelante. Tampoco quiero olvidarme del resto de la familia, los que están cerca y los que no lo están tanto, porque se han interesado siempre por mí y solo con eso me basta.

ÍNDICE

ÍNDICE

Índice.....	i
Índice de figuras.....	vii
Índice de tablas.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
1.MENOPAUSIA.....	3
1.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS	3
1.2. DEFINICIÓN	6
1.3. FISIOLÓGÍA: CAMBIOS ENDOCRINOS	9
1.4. EFECTOS CLÍNICOS.....	10
1.5. TRATAMIENTO PALIATIVO DE LOS SÍNTOMAS DE LA MENOPAUSIA	12
2.FALLO OVÁRICO PREMATURO/INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA.....	13
2.1. DEFINICIÓN E INCIDENCIA	13
2.2. NOMENCLATURA	13
2.3. DIAGNÓSTICO DE LA INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA.....	15
2.4. ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA.....	15
2.4.1. Anomalías cromosómicas	16
2.4.2. Causas autoinmunes.....	19
2.4.3. Causas metabólicas	20
2.4.4. Otras causas	20
2.5. TRATAMIENTO	21
3.GEN FMR1	23

3.1.	SITIOS FRÁGILES	23
3.1.1.	Definición	23
3.1.2.	Clasificación	23
3.2.	CARACTERÍSTICAS DEL GEN	26
3.3.	ALELOS DEL GEN	28
3.4.	REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.....	28
3.4.1.	Metilación	29
3.4.2.	Acetilación	29
3.5.	MUTACIÓN DINÁMICA: EXPANSIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS.....	30
3.5.1.	Expansión de trinucleótidos: Enfermedades	31
3.5.2.	Inestabilidad de la repetición CGG.....	32
3.6.	LA PROTEÍNA: FMRP	36
3.6.1.	Dominios de unión	37
3.6.2.	Función reguladora post-transcripcional.....	37
3.6.3.	Función neuronal y plasticidad sináptica.....	38
3.7.	PATOLOGÍAS ASOCIADAS.....	39
3.7.1.	Síndrome del X frágil	41
3.7.2.	Ataxia tremor asociada al X frágil (FXTAS).....	51
3.7.3.	Insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil.....	56
3.7.4.	Relación con el cáncer	66
3.7.5.	Otras patologías asociadas	67
4.	GEN FMR2	69
4.1.	CARACTERÍSTICAS	69
4.2.	PROTEÍNA AFF2/FMR2	71
4.3.	SÍNDROME FRÁGIL XE.....	73

4.4. INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA ASOCIADA AL GEN FMR2	74
OBJETIVOS.....	75
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
1.MUESTRA ANALIZADA.....	81
1.1. PACIENTES	81
1.1.1. Subgrupos	81
1.2. CONTROLES.....	82
2.MÉTODOS ANALÍTICOS.....	83
2.1. EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO	83
2.1.1. Separación de células sanguíneas.....	83
2.1.2. Lisis de hematíes	83
2.1.3. Lisis de leucocitos y digestión de proteínas.....	84
2.1.4. Fenolización del DNA.....	84
2.1.5. Precipitación del DNA con etanol.....	84
2.2. ANÁLISIS DEL DNA EXTRAÍDO.....	85
2.2.1. Cuantificación.....	85
2.2.2. Gen FMR1	85
2.2.3. Gen FMR2	93
3.MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	97
3.1. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS	97
3.2. ESTADÍSTICOS DE VARIABILIDAD O DISPERSIÓN	97
3.3. PRUEBA DE INDEPENDENCIA	98
3.4. OTROS TEST UTILIZADOS	99

4.SOLUCIONES UTILIZADAS	101
RESULTADOS	103
1.ANÁLISIS DE LA REPETICIÓN CGG DEL GEN FMR1	105
1.1. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS.....	105
1.1.1. Pacientes y control	106
1.1.2. Subgrupos de pacientes y control	110
1.2. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS.....	112
1.2.1. Pacientes y control	112
1.2.2. Subgrupos de pacientes.....	115
2.ANÁLISIS DE LAS INTERRUPCIONES AGG EN LA SECUENCIA REPETITIVA CGG	117
2.1. PATRÓN DE INTERRUPCIONES AGG	117
2.2. NÚMERO DE INTERRUPCIONES AGG	122
2.3. POSICIÓN DE LA PRIMERA INTERRUPCIÓN AGG	128
2.4. ANÁLISIS DE LA LONGITUD DE REPETICIONES PURAS.....	132
2.5. DISTRIBUCIÓN DE LA LONGITUD DE LOS TRACTOS DE REPETICIONES PURAS	137
3.ANÁLISIS DE LA REPETICIÓN CCG DEL GEN FMR2	149
3.1. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS.....	149
3.1.1. Pacientes y control	149
3.1.2. Subgrupos de pacientes y control	152
3.2. DIVERSIDAD DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS	153
3.2.1. Pacientes y control	153
3.2.2. Subgrupos de pacientes y control	155
DISCUSIÓN	159

1.INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA Y ETIOLOGÍA GENÉTICA	161
2.GEN FMR1	163
2.1. ANÁLISIS DE LA REPETICIÓN CGG	163
2.1.1. Muestra total de pacientes y control	164
2.1.2. Asociación entre el tamaño de la repetición CGG del gen FMR1 y la insuficiencia ovárica primaria	167
2.2. ANÁLISIS DE LAS INTERRUPCIONES AGG EN LA SECUENCIA REPETITIVA CGG	170
2.2.1. Número de interrupciones AGG.....	171
2.2.2. Patrón de interrupciones AGG	174
2.2.3. Longitud de repeticiones puras.....	177
2.3. MECANISMOS MOLECULARES Y MODELOS ANIMALES DE INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA.....	180
2.3.1. Modelos murinos	181
2.3.2. Investigaciones en humanos.....	182
3.GEN FMR2	185
CONCLUSIONES	189
1.GEN FMR1	191
1.1. LONGITUD DE LA REPETICIÓN CGG	191
1.2. ESTRUCTURA INTERNA DE LA REPETICIÓN CGG.....	191
2.GEN FMR2	192
2.1. LONGITUD DE LA REPETICIÓN CCG	192
BIBLIOGRAFÍA.....	193
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS	225
ANEXO.....	231

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. 1:	Ejemplo de espermatogénesis y oogénesis	4
Figura I. 2:	Desarrollo folicular	5
Figura I. 3:	Fases del climaterio	7
Figura I. 4:	Observación microscópica del FS FRAXA	25
Figura I. 5:	Representación esquemática del gen FMR1	27
Figura I. 6:	Representación esquemática de la cromatina del gen FMR1	30
Figura I. 7:	Teoría mGluR del FXS	38
Figura I. 8:	El gen FMR1 es responsable de tres desórdenes, FXS, FXPOI y FXTAS, que aparecen cada uno de ellos a edades más avanzadas	39
Figura I. 9:	Longitud de la repetición CGG, expresión de FMRP y consecuencia clínica	40
Figura I. 10:	Localización de los 82 genes clonados en el cromosoma X	43
Figura I. 11:	Expresión citogenética del sitio frágil FRAXA mediante microscopía óptica en una metafase masculina analizada por Lubs HA. en 1969	44
Figura I. 12:	Expansión trinucleotídica por deslizamiento de la DNA polimerasa	46
Figura I. 13:	Relación entre el gen FMR1 que contiene la expansión CGG, los transcritos FMR1-mRNA y el FXTAS	53
Figura I. 14:	Relación no lineal entre número de repeticiones CGG y riesgo de POI	57
Figura I. 15:	Expresión de FMRP en ovarios humanos	64
Figura I. 16:	Localización del gen FMR2 en el <i>locus</i> Xq28	69
Figura I. 17:	Región de los sitios frágiles sensibles al folato FRAXA, FRAXE y FRAXF en Xq27.3-q28	70
Figura III. 1:	Ejemplo del perfil del producto de la PCR obtenido por TP-PCR	89
Figura III. 2:	Ejemplos de electroferogramas resultantes de la TP-PCR	90
Figura III. 3:	Ejemplos de electroferogramas obtenidos por la PCR multiplex	95
Figura IV. 1:	Frecuencias alélicas de la repetición CGG en el grupo de pacientes y en el grupo control	108
Figura IV. 2:	Distribución de las frecuencias de las tres clases alélicas en el grupo de pacientes (a) y en el grupo control (b)	109

Figura IV. 3:	Distribución de frecuencias alélicas en función de la secuencia interna de la repetición CGG en el grupo de pacientes y en el grupo control	121
Figura IV. 4:	Gráfico de cajas (box plot) que representa el número total de repeticiones CGG para cada número de interrupciones AGG en el grupo de pacientes	123
Figura IV. 5:	Distribución del número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el grupo de pacientes	124
Figura IV. 6:	Distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en el grupo de pacientes	139
Figura IV. 7:	Distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo de pacientes	140
Figura IV. 8:	Distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en el grupo control	146
Figura IV. 9:	Frecuencias alélicas de la repetición CCG en pacientes y control	151
Figura V. 1:	Vías de expansión de la repetición CGG	172

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. 1:	Clasificación de los sitios frágiles (Sutherland 2007)	24
Tabla III. 1:	Condiciones para la amplificación de la repetición CGG	86
Tabla III. 2:	Componentes utilizados en TP-PCR.....	88
Tabla III. 3:	Primers utilizados en secuenciación	91
Tabla III. 4:	Componentes utilizados en la PCR simétrica	91
Tabla III. 5:	Componentes utilizados en la PCR asimétrica	92
Tabla III. 6:	Primers para PCR multiplex.....	93
Tabla III. 7:	Componentes utilizados en la PCR multiplex.....	94
Tabla IV. 1:	Frecuencias alélicas de la repetición CGG en el grupo de pacientes y en el grupo control.....	107
Tabla IV. 2:	Prevalencia de alelos intermedios y premutados del gen FMR1 en los subgrupos de pacientes (Grupo 1-Grupo 3) y en el grupo control.....	110
Tabla IV. 3:	Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo de pacientes	112
Tabla IV. 4:	Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo control	114
Tabla IV. 5:	Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo 1 de pacientes	115
Tabla IV. 6:	Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo 2 de pacientes	116
Tabla IV. 7:	Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo 3 de pacientes	116
Tabla IV. 8:	Patrón de interrupciones AGG en el grupo de pacientes	119
Tabla IV. 9:	Patrón de interrupciones AGG en el grupo control	120
Tabla IV. 10:	Número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el grupo de pacientes	122
Tabla IV. 11:	Número de interrupciones AGG en función de la categoría CGG en el grupo 1 de pacientes	125

Tabla IV. 12: Número de interrupciones AGG en función de la categoría CGG en el grupo 2 de pacientes	126
Tabla IV. 13: Número de interrupciones AGG en función de la categoría CGG en el grupo 3 de pacientes	126
Tabla IV. 14: Número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el grupo control	127
Tabla IV. 15: Posición de la primera interrupción AGG en función de la categoría de longitud total de la repetición en el grupo de pacientes.....	129
Tabla IV. 16: Posición de la primera interrupción AGG en función de la categoría CGG en los tres subgrupos de pacientes	130
Tabla IV. 17: Posición de la primera interrupción AGG en función de la categoría de longitud total de la repetición en el grupo control	131
Tabla IV. 18: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo de pacientes	132
Tabla IV. 19: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo 1 de pacientes	134
Tabla IV. 20: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo 2 de pacientes	135
Tabla IV. 21: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo 3 de pacientes.....	135
Tabla IV. 22: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo control	136
Tabla IV. 23: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo de pacientes	142
Tabla IV. 24: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo 1 de pacientes.....	143
Tabla IV. 25: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo 2 de pacientes.....	144
Tabla IV. 26: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo 3 de pacientes.....	144
Tabla IV. 27: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo control	147
Tabla IV. 28: Frecuencias alélicas de la repetición CCG en pacientes y en el grupo control ..	150

Tabla IV. 29: Prevalencia de alelos intermedios y premutados del gen FMR1 en los subgrupos de pacientes (Grupo 1-Grupo 3) y en el grupo control.....	152
Tabla IV. 30: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo de pacientes.....	154
Tabla IV. 31: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo control.....	155
Tabla IV. 32: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo 1 de pacientes.....	156
Tabla IV. 33: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo 2 de pacientes.....	156
Tabla IV. 34: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo 3 de pacientes.....	157
Tabla V. 1: Comparación del número de repeticiones CCG del gen FMR2 entre diferentes poblaciones.....	187

INTRODUCCIÓN

1. MENOPAUSIA

1.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

La capacidad reproductiva de una mujer depende principalmente de dos factores, el número de folículos presentes en el ovario durante la edad reproductiva y la calidad de los ovocitos en estos folículos. El número de folículos de una mujer está determinado genéticamente antes del nacimiento, durante el desarrollo embrionario, y es lo que se denomina **reserva folicular ovárica**, pero sólo unos cientos de éstos completan su desarrollo, mientras que la mayor parte se atresian durante el reclutamiento.

El reclutamiento inicial y la consiguiente pérdida de folículos comienzan en la vida fetal y continúan a lo largo del período de vida. Cuando la reserva ovárica se sitúa por debajo de cierto nivel se dan una serie de eventos reproductivos, como los periodos irregulares, que terminan finalmente en la menopausia. La menopausia coincide con un recuento de unos pocos cientos de folículos en los ovarios (Sherman SL. et al., 2007).

La **ovogénesis** u **oogénesis** se refiere al proceso de desarrollo y maduración de un ovocito y es una forma de gametogénesis, equiparable en cierto modo a la espermatogénesis aunque con ciertas diferencias. El ovocito se define como célula germinal femenina que está en proceso de convertirse en un óvulo maduro.

En la ovogénesis, la formación de los óvulos tiene lugar en los ovarios, los órganos reproductores femeninos. Las células hijas que resultan de dos divisiones meióticas, reciben igual cantidad de material genético, pero no reciben igual cantidad de citoplasma. Sin embargo, todos los espermatozoides que se producen durante la espermatogénesis reciben igual cantidad de material genético y citoplasma (Figura I.1).

Durante el desarrollo embrionario, la **ovogonia** u **oogonia**, célula precursora de los óvulos, da lugar al **ovocito primario**, al proliferar la ovogonia por divisiones mitóticas. Los ovocitos primarios comienzan la primera división meiótica antes del nacimiento,

deteniéndose en profase I hasta la pubertad, gracias a la liberación de la sustancia inhibidora de la maduración del ovocito por parte de las células foliculares. Con el inicio de la pubertad, un folículo madura de forma completa en cada ciclo ovárico, produciéndose la ovulación. Éste proceso es largo y puede transcurrir un año desde el reclutamiento del folículo hasta dicha ovulación.

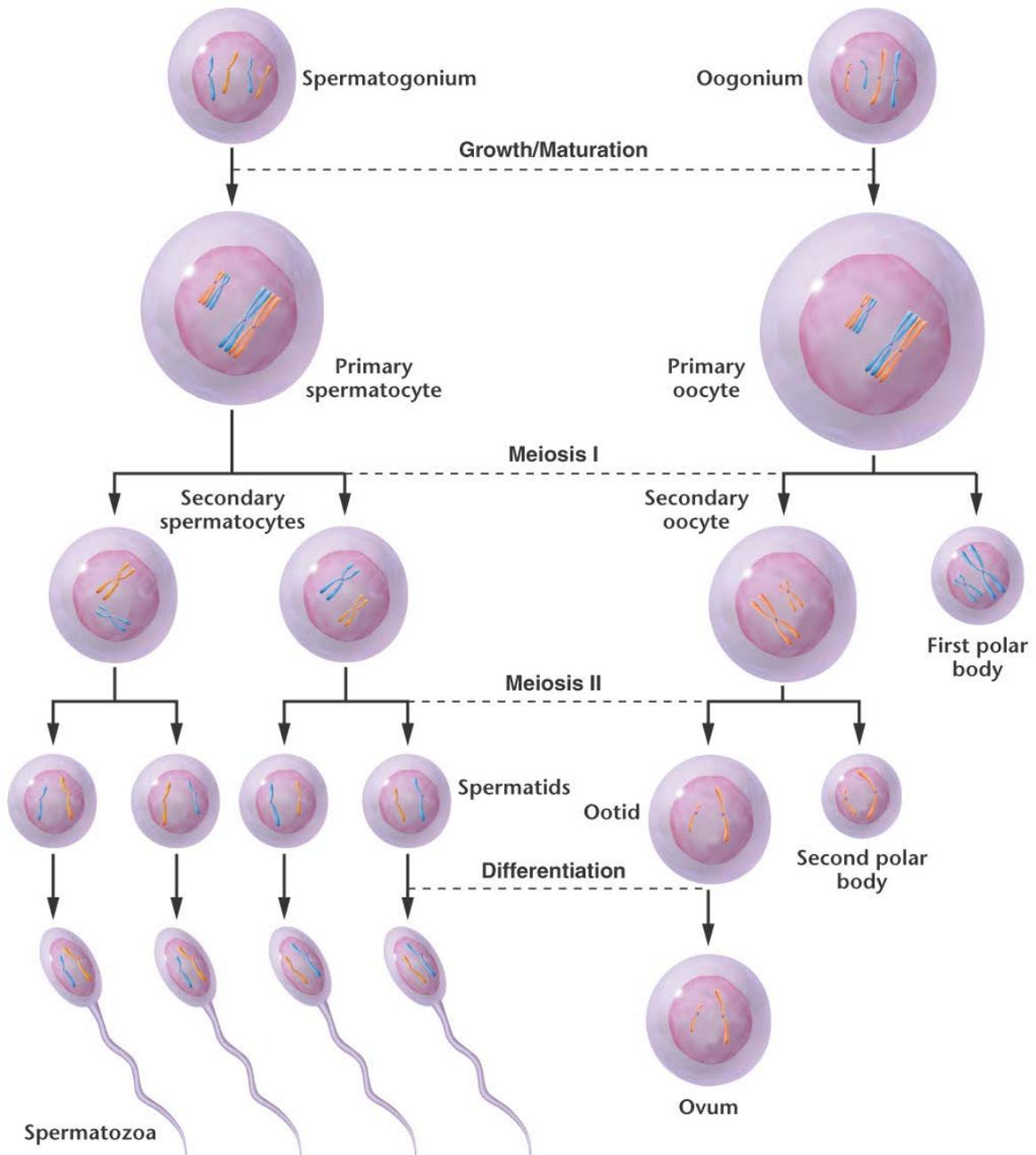


Figura I. 1: Ejemplo de espermatogénesis y oogénesis

A medida que el folículo madura, el ovocito primario aumenta de tamaño y tras el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) se reinicia la meiosis hasta finalizar la primera división meiótica, dando lugar a dos células haploides desiguales, el **ovocito secundario** que recibe la mayor parte del citoplasma y el **primer corpúsculo polar**, una célula pequeña y no funcional que degenera rápidamente. El ovocito secundario comienza la segunda división meiótica deteniéndose en la metafase, de forma que esta segunda división sólo finalizará en caso de fecundación. Si se diera una fecundación el ovocito secundario daría lugar a un **óvulo fecundado** y al **segundo corpúsculo polar** que termina degenerándose (Sánchez F. y Smitz J. 2012).

La **foliculogénesis** es el proceso de maduración del folículo ovárico, una estructura formada por células de la granulosa (de origen epitelial) y de la teca (de origen conjuntivo) que rodean el ovocito y dentro de la cual se desarrolla la ovogénesis.

A medida que se forma el ovocito primario, éste es rodeado por células del tejido epitelial que forman una monocapa de células de la granulosa aplanadas. El ovocito primario rodeado por esta capa de células constituye el llamado **folículo primordial** (Figura I.2). Los ovocitos que no se rodean de células de la granulosa se pierden, probablemente vía apoptosis.

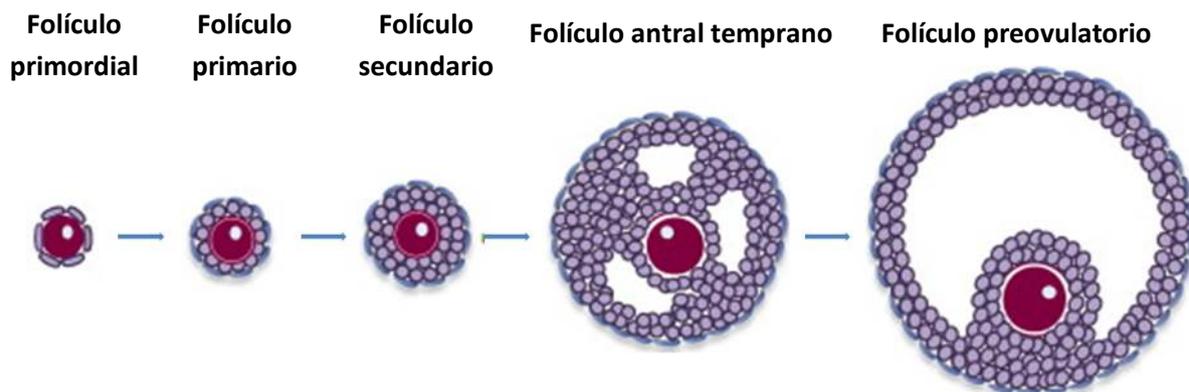


Figura I. 2: Desarrollo folicular. Modificado de Sánchez F. y Smitz J. 2012

La población de folículos primordiales servirá como fuente de desarrollo de folículos y/u ovocitos hasta el final de la vida reproductiva de la mujer. Hasta que esto ocurra,

se produce un continuo reclutamiento de folículos procedentes de este conjunto de folículos primordiales y que comienza con la formación de los **folículos primarios**. Durante este periodo, el ovocito inicia una etapa intensa de crecimiento y las células de la granulosa que le rodean adquieren forma cuboidal y proliferan. El ovocito primario se rodea entonces de una capa de material glicoproteico acelular amorfo, la zona pelúcida, que es segregada por las células de la granulosa. Cuando el folículo primario cuenta con más de una capa de células de la granulosa pasa a denominarse **folículo secundario**. Posteriormente se reclutan las células de la teca, y las células de la granulosa adquieren receptores para la hormona folículo estimulante (FSH). Éstos son ya **folículos preantrales**.

Durante la foliculogénesis, las células de la granulosa y de la teca juegan un papel importante para el desarrollo y crecimiento del folículo. Estas células sintetizan y secretan diversas hormonas y factores de crecimiento que incluyen inhibina, FOXL2, hormonas esteroideas y otros factores de crecimiento y diferenciación como BMP5 y GDF9 y son a su vez regulados por las gonadotropinas FSH y LH (Shelling AN. 2010). Gracias a la influencia de las gonadotropinas los folículos antrales se desarrollan hasta la etapa de **folículo de De Graaf** o **folículo preovulatorio**.

1.2. DEFINICIÓN

La **menopausia** es una etapa de la vida que se caracteriza por el cese de la menstruación de forma definitiva. Ocurre aproximadamente a los 50,7 años (McKinlay SM. et al., 1992) (51,4 años según la Asociación Española para el Estudio de la Menopausia. AEEM, <http://www.aeem.es>) y oscila entre los 48 y los 54 años. La edad media de aparición de la menopausia ha variado poco en el último siglo, al contrario que la edad de la menarquía que se ha visto reducida durante la primera mitad del siglo XX, ocurriendo a edades más tempranas por la mejora de las condiciones de vida y salud (Biro FM. et al., 2003; Carrascosa A. et al., 2004; Ferrández-Longás A. 2005; Marco-Hernández M. et al., 2008).

La clasificación basada en la edad de aparición es la siguiente:

- Menopausia temprana: entre los 40 y los 44 años.
- Menopausia tardía: después de los 55 años.
- Menopausia precoz o fallo ovárico prematuro: antes de los 40 años.

El origen de la menopausia radica en el agotamiento folicular de los ovarios. La aparición de la menopausia puede ser natural, cuando ocurre de forma gradual y progresiva por el normal envejecimiento del ovario, y puede ser también artificial, provocada por la extirpación de los ovarios con o sin histerectomía, o por mecanismos destructores de las células germinales (radiaciones o quimioterapia).

Existen además factores que pueden acelerar el ritmo de pérdida de la dotación folicular, adelantando la edad de aparición de la menopausia natural, tales como la exposición a productos tóxicos, antidepresivos, estrés, enfermedad inflamatoria pélvica o cirugía ginecológica por procesos benignos como la endometriosis. El tabaco puede alterar también el proceso de envejecimiento ovárico y adelantar la edad de la menopausia hasta en 2 años. El consumo de alcohol, sin embargo, se asocia a una aparición de la menopausia más tardía (Álvarez-García E. y Labandeira A. 2010).

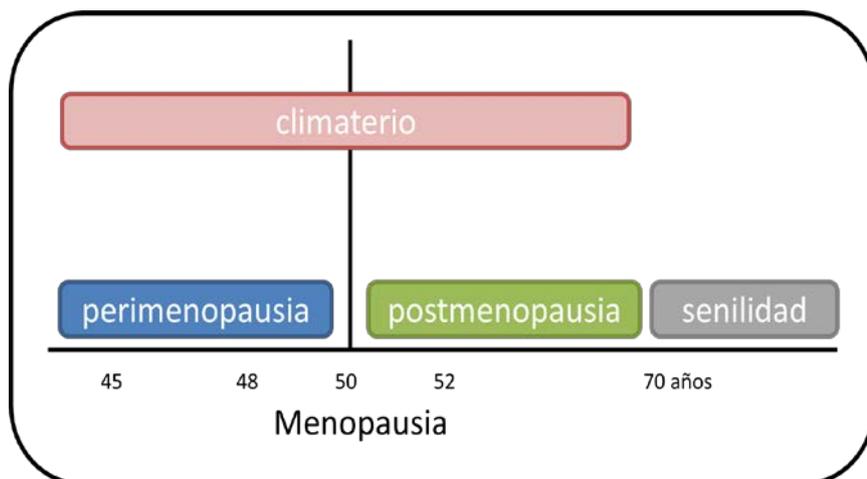


Figura I. 3: Fases del climaterio

El término menopausia hace referencia a un hecho puntual y por eso es preferible utilizar el término climaterio. Se denomina **climaterio** al periodo amplio en la vida de una mujer en que se produce el paso progresivo del estado reproductivo o período fértil de la vida al no reproductivo, como consecuencia del agotamiento folicular (Figura I.3).

En este periodo, la mujer comienza a perder progresivamente su función ovárica, generándose una disminución también gradual en la síntesis de hormonas femeninas:

- **Perimenopausia.** En la mayoría de las mujeres, suele darse un primer período, conocido como perimenopausia, en el que se desarrolla una transición hacia la menopausia, durante un tiempo aproximado de unos 5 años, aunque puede ser más corto y precoz en mujeres fumadoras y sujetas a estrés, al igual que en mujeres operadas de útero y ovarios. En la perimenopausia, se producen diferentes cambios que pueden afectar a dos niveles:
 - **Físico**, como son la prolongación de la etapa entre menstruaciones (opsomenorrea), los síntomas vasomotores, la sequedad en la piel y mucosas (también en la vagina), el cambio en la distribución de la masa corporal y el inicio de un incremento en el ritmo de pérdida de la masa ósea.
 - **Psicológico**, produciéndose cambios emocionales, depresión, ansiedad o pérdida de la capacidad de atención.
- **Menopausia.** Posteriormente se produce la menopausia propiamente dicha, delimitada por la fecha de la última menstruación y caracterizada por la pérdida de la capacidad fértil de la mujer y el cese de la producción hormonal propia del ovario.
- **Postmenopausia.** El periodo posterior a la menopausia se denomina postmenopausia y es la etapa en la que se producen las complicaciones o síntomas derivados de la falta de hormonas.

1.3. FISIOLÓGÍA: CAMBIOS ENDOCRINOS

La **depleción ovocitaria** causante de la menopausia se produce de forma lenta y progresiva. El ovario envejece por una rápida disminución en el número de folículos y por ende de ovocitos, por atresia (mayormente) o consumo. Este proceso comienza en la etapa embrionaria y se extiende hasta la menopausia. A las 20 semanas de vida intrauterina, los fetos femeninos poseen en ambos ovarios unos 6-7 millones de células germinales. En el momento del nacimiento, este número ha disminuido hasta una cifra de 2 millones. Con la primera regla (menarquía) la proporción ha disminuido hasta 400-500.000 folículos y de éstos, solamente llegan a la ovulación 400-500, es decir, la mujer tiene una media de 400-500 menstruaciones a lo largo de su etapa fértil.

El ovario es una glándula con doble función:

- **Hormonal**, al producir hormonas (estrógenos, progesterona y en menor medida andrógenos) necesarias para el desarrollo femenino, junto con otras como la hormona antimülleriana (AMH) o inhibina B.
- **Reproductora**, al liberar óvulos (ovulación) necesarios para la reproducción.

Mientras dura el periodo fértil y en cada ciclo, ambas funciones se desarrollan en paralelo, de forma continua y repetitiva y en el proceso están involucradas también otras glándulas como la hipófisis, encargada de la producción de FSH y LH.

El **envejecimiento ovárico** está programado desde el nacimiento. Primero declina la función reproductora y luego la función hormonal por lo que los cambios endocrinos empezarán a observarse ya en la perimenopausia.

Se liberarán además ovocitos defectuosos (reducción en la fecundidad) y clínicamente se darán alteraciones como la pérdida de regularidad de los ciclos, produciéndose sangrados irregulares, tanto en la duración, como en la cantidad y también en el intervalo de los ciclos pudiendo ser estos:

- Ciclos muy cortos: polimenorrea, intervalos inferiores a 21 días.
- Ciclos muy largos: opsomenorrea u oligomenorrea, intervalos superiores a 35 días.
- Ciclos anárquicos: ataxia menstrual, se manifiestan de forma anárquica.

El **agotamiento de la reserva ovárica** implica un aumento paralelo de las hormonas LH y FSH, siendo este último mayor que el de la LH, debido a la supresión de la inhibina B, que es un factor de retroalimentación de la FSH y a la mayor vida media de la FSH. Las concentraciones de FSH son siempre superiores a las de un ciclo normal incluso en pico ovulatorio y suelen permanecer estables durante años. La LH, también aumenta respecto a un ciclo normal, pero puede sufrir fluctuaciones dependiendo de los niveles de estrógenos. Éstos proceden mayoritariamente de la conversión de andrógenos a estrógenos a nivel del tejido adiposo.

Durante la menopausia se produce también un descenso en la concentración de la hormona antimülleriana (AMH), por disminución del pool de folículos antrales que ocurre paralela a la del pool de folículos primordiales, y de estrógenos y progesterona por agotamiento folicular. Previamente, durante la perimenopausia, se observa una elevación de los niveles de estradiol, un tipo de estrógeno, cuyos valores disminuyen en la menopausia.

El diagnóstico de la menopausia es clínico, ante la constatación de un año de amenorrea. Las hormonas a valorar para el diagnóstico de la menopausia son principalmente: la FSH cuya concentración se eleva por encima de 40 IU/L y el estradiol cuyos valores se situarán por debajo de 30-50 pg/ml.

1.4. EFECTOS CLÍNICOS

Como ya se ha comentado, la edad media de la menopausia no ha variado en el último siglo, sin embargo la esperanza de vida ha aumentado y se sitúa alrededor de los 82 años para la mujer española. Por tanto, los efectos negativos del déficit hormonal sobre el organismo en los años postmenopáusicos son importantes ya que afectan casi

a un tercio de la vida de una mujer. Los cambios en los niveles hormonales pueden causar una variedad de síntomas y prolongarse de meses a años.

- **Síntomas menopáusicos:**

Algunas mujeres experimentan muy pocos síntomas, mientras que en otras éstos pueden llegar a ser muy molestos. Entre los más comunes encontramos:

- Inestabilidad vasomotora: Incluye sofocos y sudores nocturnos
- Atrofia del tejido urogenital
- Sequedad vaginal
- Sequedad cutánea
- Síntomas psicológicos: insomnio, irritabilidad, depresión, letargia/fatiga, pérdida de la libido

- **Síntomas postmenopáusicos:**

Durante la postmenopausia, periodo que sigue a la fecha de la última hemorragia menstrual y que llega hasta la senilidad (duración aproximada de 10-20 años), los síntomas más frecuentes son:

- A corto plazo
 - Vasomotores: sofocos, sudoración
 - Psicológicos y del sistema nervioso central: depresión, nerviosismo, irritación, insomnio, etc.
 - Sexuales: disminución de la libido
- A largo plazo
 - Osteoarticulares: osteoporosis, aumento del riesgo de fracturas óseas

- Endocrino-metabólicos: diabetes, obesidad, etc.
- Cardiovasculares: arterioesclerosis, ictus

1.5. TRATAMIENTO PALIATIVO DE LOS SÍNTOMAS DE LA MENOPAUSIA

Ante todo se debe establecer en qué etapa se encuentra la mujer y cuál es la sintomatología específica que está padeciendo para establecer el tratamiento más adecuado.

En principio cualquier mujer en edad menopáusica es candidata a recibir Tratamiento Hormonal Sustitutivo (THS) siempre y cuando sus beneficios superen sus posibles riesgos. Esta valoración y la posterior administración del THS deben realizarlas un especialista.

Habitualmente se utilizan estrógenos sintéticos o una combinación de estrógenos y progestágenos. Para aquellas mujeres en las que el tratamiento hormonal sustitutivo no es adecuado, existen tratamientos alternativos que deben emplearse de forma individualizada, en función de las necesidades de cada mujer.

2. FALLO OVÁRICO PREMATURO/INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA

2.1. DEFINICIÓN E INCIDENCIA

El fallo ovárico prematuro (POF) se define como el cese de los periodos menstruales antes de los 40 años, acompañado de una deficiencia de las hormonas sexuales y elevados niveles de gonadotropinas en suero. El término fue acuñado por Albright en 1942 para enfatizar que el defecto primario de la disfunción ovárica se encuentra en el ovario (De Vos M. et al., 2010).

Tiene una prevalencia del 1 % en la población general femenina de origen caucásico y afroamericano (Luborsky JL. et al., 2003). La prevalencia es menor en mujeres japonesas (0,14 %) y chinas (0,5 %). También afecta al 0,1 % de mujeres por debajo de los 30 años y al 0,01 % de mujeres por debajo de los 20 años (Coulam CB. et al., 1986). El POF da lugar a infertilidad y está asociado con los riesgos comunes de la menopausia natural.

2.2. NOMENCLATURA

La nomenclatura de esta condición ha sido cuestionada en los últimos años por varios autores (Nelson LM. 2009; Panay N. y Kalu E. 2009; Welt CK. 2008; Shelling AN. 2010). Se cree que el término “Fallo ovárico prematuro”, aunque ampliamente utilizado, es inadecuado ya que sugiere un fallo irreversible del ovario. Tiene además connotaciones negativas de “fallo” para las mujeres que reciben el diagnóstico y se ha argumentado que no refleja la progresión hacia el final de los ciclos menstruales.

Hay un porcentaje de mujeres diagnosticadas con POF en las que el cese de la función ovárica no siempre es permanente. Al contrario que la menopausia, el 50 % de las mujeres diagnosticadas con POF espontáneo presentan una función ovárica

intermitente y el 5-10 % tiene embarazos espontáneos (Panay N. y Kalu E. 2009). En estos casos el uso del término POF no sería del todo acertado y por ello se han propuesto distintos términos alternativos como:

- **Menopausia prematura.** El término menopausia prematura, aunque es utilizado por algunos médicos por el hecho de ser simple y entendible para las pacientes, tampoco se considera apropiado.
- **Disfunción ovárica prematura.** Algunos autores prefieren el término disfunción ovárica prematura (POD) que refleja de manera más adecuada la naturaleza reversible de esta condición y evita la idea de fallo.
- **Insuficiencia ovárica primaria.** Más recientemente, se ha sugerido el uso del término insuficiencia ovárica primaria (POI) (Rebar RW. 2009; Welt CK. 2008). Welt diferencia tres subtipos dentro del término POI:
 - *Oculto:* niveles normales de gonadotropinas, fecundidad disminuida y menstruaciones regulares.
 - *Bioquímica:* niveles elevados de gonadotropinas, fecundidad disminuida y menstruaciones regulares.
 - *Patente:* niveles elevados de gonadotropinas, fecundidad reducida y menstruaciones irregulares o ausentes.

Aún así, la terminología más adecuada para describir esta condición sigue siendo tema de debate. El término POI es al que más importancia se está otorgando en la actualidad porque explica mejor la variabilidad del cuadro, incluida su infrecuente reversibilidad, porque no lleva incorporado el cese definitivo, y porque remarca el origen propiamente ovárico (Menoguía, Menopausia precoz, AEEM). Por ello, en este trabajo, se utilizará el término **POI** definido como la pérdida de la función hormonal ovárica en una mujer menor de 40 años.

2.3. DIAGNÓSTICO DE LA INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA

La mayoría de las mujeres a las que se les diagnostica POI no tienen ningún signo o síntoma previo al cese de los periodos menstruales (Woad KJ. et al., 2006). De hecho, normalmente tienen una historia menstrual, una edad de la menarquía y una fertilidad normal.

El diagnóstico de POI se basa principalmente en la aparición de amenorrea durante 3-6 meses, presencia de altos niveles de la hormona FSH, por encima de 40 IU/L, en al menos dos ocasiones separadas en el tiempo y niveles bajos de estrógenos, aproximadamente 50 pg/ml. El aumento de la hormona FSH es uno de los primeros signos de envejecimiento reproductivo.

Los niveles de la hormona AMH se consideran actualmente un buen marcador de depleción folicular. Esta hormona varía mínimamente durante el ciclo menstrual y su descenso a niveles indetectables puede ser una señal del inicio de la última etapa de la transición menopáusica (Álvarez-García E. y Labandeira A. 2010).

2.4. ETIOLOGÍA DE LA INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA

La etiología de la POI es desconocida, pero son varios los mecanismos planteados que incluyen una reducción en el número de ovocitos o reserva ovárica, una atresia folicular acelerada y alteraciones en el reclutamiento folicular o maduración.

Aunque la mayoría de los casos de POI son idiopáticos hay tres causas principales para el desarrollo de esta patología: anomalías cromosómicas, alteraciones genéticas y alteraciones en el sistema autoinmune. Con menor implicación, también se han relacionado con el desarrollo de POI defectos metabólicos y otras causas.

2.4.1. Anomalías cromosómicas

Entre las posibles alteraciones cromosómicas encontramos:

a. Cambios numéricos y estructurales en el cromosoma X

La presencia de un único cromosoma X es suficiente para permitir la diferenciación del ovario, sin embargo, la presencia de dos cromosomas X activos es una condición necesaria para el desarrollo normal de la maduración y función ovárica.

El cromosoma X contiene importantes genes determinantes de la función ovárica.

▪ Cambios numéricos

- Síndrome de Turner: se caracteriza citogenéticamente por una monosomía del cromosoma X (45,X). Tiene una incidencia de 1:2500 mujeres. Aproximadamente en el 60 % de los casos, las mujeres presentan un cariotipo en mosaico. Clínicamente, el síndrome se caracteriza por baja estatura, disgenesia gonadal con amenorrea primaria, infantilismo sexual, cuello con presencia de pliegues cutáneos en la parte posterior y cúbito valgo.

El fallo ovárico en estas mujeres deriva de una atresia folicular acelerada que lleva a una pérdida de ovocitos y como consecuencia a una infertilidad.

- Trisomía X: la trisomía del cromosoma X (47,XXX) se da en 1:1000 mujeres, aunque aproximadamente sólo se diagnostican el 10 % de los casos. Frecuentemente, las mujeres 47,XXX son perfectamente normales. Con una frecuencia más baja, puede manifestarse con un menor desarrollo de características sexuales secundarias, esterilidad y retraso mental.

Un estudio realizado en mujeres con POI identificó una trisomía del X en el 3 % de los casos. Un alto porcentaje de estos casos se asociaron además a enfermedades autoinmunes (Goswami R. et al., 2003).

▪ Cambios estructurales

- Deleciones o translocaciones en el brazo q del cromosoma X: a lo largo del brazo largo del cromosoma X, ente los *loci* cromosómicos Xq13.3 y q27 se localiza una “región crítica” para el desarrollo y función del ovario (Persani L. et al., 2009), por lo que deleciones o translocaciones en esta región pueden llevar a la aparición de POI.
- Deleciones en el brazo p del cromosoma X: deleciones en el brazo corto del cromosoma X también dan lugar a insuficiencia ovárica primaria.

b. Anomalías genéticas

Se han identificado un número creciente de genes cuyas mutaciones están asociadas con POI.

▪ Cromosomas sexuales

Se han analizado un número abundante de genes como candidatos para causar POI pero, de momento, ninguno ha sido aceptado como marcador genético. La mayoría de genes estudiados hasta el momento están relacionados con distintos procesos de la maduración folicular. Muchos de los genes candidatos tienen su *locus* en el cromosoma X. Se han diferenciado tres regiones, designadas como POI-1 (Xq21.3–q27), POI-2 (Xq13.3–q21.1) y POI-3 (Xp11.2–p22.1). Para los genes FMR1 y BMP15 la asociación ha sido ampliamente demostrada.

- El gen **FMR1** (*Fragile X mental retardation 1*, *309550), en el que profundizaremos más adelante, se localiza en Xq27.3 y es uno de los objetivos del presente trabajo de tesis. Diversos estudios proponen que la premutación del gen FMR1 es la causa del 6 % de los casos de POI (Conway GS. et al., 1995; Sherman SL. 2000a; Sherman SL. et al., 2007; Pouresmaeili F. y Fazeli Z. 2014).
- El gen **FMR2** (*Fragile X mental retardation 2*, *300806), también denominado gen AFF2, se localiza en Xq28. Se sitúa a 150-600 kb del gen FMR1. Murray y

colaboradores (1998) encontraron un exceso de alelos de este gen con menos de 11 repeticiones CCG al analizar mujeres con POI. Posteriormente secuenciaron estos alelos y detectaron microdeleciones en el gen FMR2, que eran la causa de la POI en el 1,5 % de las mujeres analizadas. Este gen también es uno de los objetivos del presente trabajo de tesis.

- El gen BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*), localizado en Xp11.22, pertenece a la familia de los TGF- β (*Transforming growth factor β*) involucrados en procesos celulares que suceden durante el desarrollo embrionario y la formación tisular. Varios estudios han demostrado que la proteína codificada por este gen, junto a otro factor de crecimiento, el Gdf9, se expresan específicamente en el ovocito y que esta expresión se mantiene en niveles altos durante el proceso de maduración folicular y ovulación (Su YQ. et al., 2004). Se han identificado mutaciones de este gen en ratones y ovejas que dan lugar a una ovulación alterada (Su YQ. et al., 2004; McNatty KP. et al., 2005). Un estudio realizado en humanos mostraba una mutación en BMP15 en dos hermanas con amenorrea primaria que habían heredado la mutación de su padre (Di Pasquale E. et al., 2004).

▪ **Cromosomas autosómicos**

Se han localizado también genes relacionados con la insuficiencia ovárica primaria en diversos cromosomas autosómicos.

- GDF9 (*Growth differentiation factor 9*), localizado en el cromosoma 5, en el *locus* 5q31.1, codifica para un factor de crecimiento expresado en el ovocito que ejerce su papel en la diferenciación del propio ovocito y de las células de la granulosa y de la teca. Hembras de ratón homocigotas para este gen son infértiles y presentan ovarios de menor tamaño (Dong J. et al., 1996). Se han identificado también mutaciones en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de este gen en pacientes con insuficiencia ovárica primaria y madres de gemelos dizigóticos (Palmer JS. et al., 2006).

- LHR (*luteinizing hormone receptor*) y FSHR (*follicle-stimulating hormone receptor*), están localizados en el cromosoma 2, en los *loci* cromosómicos 2p21 y 2p21-p16 respectivamente. Codifican para receptores de las hormonas gonadotróficas FSH y LH. Estas hormonas son fundamentales para el correcto funcionamiento de la actividad menstrual. Ambas regulan la producción de las hormonas sexuales esteroideas, estradiol y progesterona, a través de las células de la teca y de la granulosa que rodean el folículo en crecimiento. Alteraciones en los receptores de ambas hormonas pueden reducir la habilidad de estos receptores para unirse a ellas, disminuyendo así su actividad.

Son comunes las mutaciones G1502A para el receptor de LH y la C566T para el receptor de FSH y ambas se han relacionado con el desarrollo de POI (Liao WX. et al., 1998; Aittomaki K. et al., 1995). Recientemente, se han estudiado hembras de ratón portadoras del gen FSHR mutado y se han visto que son estériles debido a un bloqueo en la foliculogénesis. Además, la inyección en estos ratones de un adenovirus que expresa el gen FSHR humano, restaura la actividad de la FSH y por tanto la foliculogénesis (Ghadami M. et al., 2010).

- Otros genes que se han relacionado con la aparición de POI son: INHA (*Inhibin A*) en 2q35, FOXL2 (*Forkhead box L2*) en 3q23, FOXO3a (*Forkhead box O3*) en 6q21, ER (*Estrogen Receptor*) en 6q25.1 y SF1 (*Splicing Factor 1*) en 11q13. Recientemente se ha relacionado también el gen STAG3 (*Stromal Antigen 3*), localizado en 7q22.1, que codifica una subunidad del anillo de cohesinas específico de la meiosis y que también se ha visto relacionado con la azoospermia (Caburet S. et al., 2014; Llano E. et al., 2014).

2.4.2. Causas autoinmunes

En el 14,3 % de los casos la etiología de la POI son mecanismos autoinmunes (Bachelot A. et al., 2009). Los desórdenes autoinmunes asociados son, entre otros, la enfermedad de Addison, el síndrome del ojo seco o síndrome de Sjögren, el síndrome

poliglandular autoinmune, la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (Jin M. et al., 2012).

Se han investigado varios anticuerpos como marcadores serológicos de la inmunidad ovárica, como el 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, anticuerpos contra receptores de FSH y LH, anti-tiroideos, y contra el cuerpo lúteo, la zona pelúcida u ovocitos (Forges T. et al., 2004).

Goswami y colaboradores (2006) analizaron la presencia de anticuerpos anti-peroxidasa tiroidea. En el 24 % de los casos de mujeres con POI estos anticuerpos estaban presentes. Sin embargo, ninguno se considera totalmente válido como marcador serológico que pueda confirmar un diagnóstico de POI autoinmune.

2.4.3. Causas metabólicas

Con el desarrollo de POI se han asociado también desórdenes heredables en diferentes rutas enzimáticas:

- La deficiencia en galactosa-1-fosfato uridil transferasa (galactosemia) fue el primer desorden de este tipo asociado a POI.
- Una deficiencia de aromatasa no permite la conversión de andrógenos en estrógenos dando lugar a una amenorrea primaria en mujeres.
- La falta de glicoproteína deficiente en carbohidrato o en la 17- α -hidroxialasa/17,20 desmolasa también se ha relacionado con POI (Cox L. y Liu JH. 2014).

2.4.4. Otras causas

Una cirugía pélvica o la administración de terapia contra el cáncer también pueden derivar en una POI. Tanto la radioterapia como la quimioterapia se han relacionado con el desarrollo de esta patología. El efecto de estos tratamientos en la pérdida de

función ovárica es dependiente de la dosis, la reserva ovárica de la paciente y la edad (Panay N. y Kalu E. 2009). De hecho, el ovario de aquellas que no han llegado a la pubertad es relativamente resistente a la radioterapia y a la quimioterapia (Jim M. et al., 2012). En relación a la quimioterapia, el riesgo es alto en jóvenes y aumenta en mujeres entre 21 y 25 años. Existe en cambio un bajo riesgo cuando la radioterapia no afecta a la zona pélvica. Además las mujeres a las que se les realiza una transposición ovárica previa a una radiación preservan su función ovárica en el 60-100 % de los casos (Morice P. et al., 2000).

Factores ambientales como infecciones por microorganismos o sustancias tóxicas, causantes de patologías como la tuberculosis, la malaria, la varicela y la disentería, se ha visto que pueden estar relacionados con POI (Panay N. y Kalu E. 2009). También se ha asociado insuficiencia ovárica primaria con el tabaquismo (Chang SH. et al., 2007) y la epilepsia (Klevin P. et al., 2001).

2.5. TRATAMIENTO

El tratamiento de la POI se debe abordar desde tres puntos de vista (Jin M. et al., 2012; Cox L. y Liu JH. 2014):

- *Médico*: mejorar la calidad de vida de estas mujeres y evitar la osteoporosis mediante la administración de un tratamiento hormonal sustitutivo que se aplica normalmente hasta la edad normal de aparición de la menopausia.
- *De fertilidad*: opciones reproductivas incluirían la donación de óvulos o la adopción.
- *Psicológico*: las mujeres con POI requieren un apoyo personal y emocional tras el diagnóstico para sobrellevar el impacto en su salud y sus relaciones.

3. GEN FMR1

En 1991, como resultado de los trabajos de investigación de tres equipos independientes (Verkerk AJM. et al., 1991, Yu S. et al., 1991 y Oberlé I. et al., 1991) se identificó el gen FMR1, cuyo *locus* coincidía con el sitio frágil FRAXA. Este gen recibió el nombre de ***Fragile X Mental Retardation 1*** (FMR1), asumiendo que era el primero de un número de genes todavía no identificados, asociados a este sitio frágil y relacionados con retraso mental.

3.1. SITIOS FRÁGILES

Los sitios frágiles en cromosomas humanos fueron descritos por primera vez en 1965 por Dekaban, pero no fueron considerados un factor hereditario hasta 1968 (Lejeune J. et al., 1968). Sin embargo, el término “sitio frágil” no fue introducido hasta 1970 por Margulis y colaboradores.

3.1.1. Definición

Un **sitio frágil (FS)** se define como una región cromosómica que aparece como una discontinuidad no aleatoria de la cromatina en la metafase de la división celular. Estas discontinuidades se manifiestan como roturas o gaps que pueden aparecer espontáneamente o mediante la exposición de las células a agentes químicos (Rahat A. et al., 2007). Fue en el año 1977 cuando Sutherland demostró que el medio de cultivo era un factor crítico para la expresión de los sitios frágiles.

3.1.2. Clasificación

Los FS se clasifican en base a dos criterios: la frecuencia de expresión en la población y las condiciones de cultivo bajo las cuales se expresan (Sutherland GR. 2007). De acuerdo con el primer criterio se clasifican en:

- Comunes, si se expresan constitutivamente en un pequeño porcentaje de células de una gran parte de la población.
- Raros, si se inducen en una proporción relativamente alta de las células de pocos individuos.

Estos dos grandes grupos se subdividen a su vez dependiendo de las condiciones necesarias del medio de cultivo.

La Tabla I.1 muestra la clasificación de los FS de acuerdo con la frecuencia de expresión y las condiciones de cultivo.

Tabla I. 1: Clasificación de los sitios frágiles (Sutherland 2007)

Clase	Grupo	Mecanismo inductor	Nº FS	Secuencia Característica
Raros	Grupo 1	Sensibles al folato	22	Expansión de repeticiones CGG
	Grupo 2	Inducibles por distamicina	5	Expansión de repeticiones minisatélite ricas en AT (33 pb)
	Grupo 3	Inducibles por BrdU	2	Expansión de repeticiones minisatélite ricas en AT (~ 42 pb)
Comunes	Grupo 4	Inducibles por afidicolina	76	Frecuencia alta de islas-AT
	Grupo 5	Inducibles por 5-azadicitina	4	Ninguna obvia
	Grupo 6	Inducibles por BrdU	7	Ninguna obvia

Los FS son el resultado de un fallo en la compactación de la cromatina durante la mitosis y por tanto son la manifestación de una inestabilidad genómica que generan las secuencias de DNA en esos *loci*. En concreto los FS raros muestran a nivel molecular secuencias repetitivas en tándem de distinta complejidad que tienden a sufrir expansiones o, en menor medida, contracciones (Sutherland GR. y Richards RI. 1999).

Actualmente, los FS se denominan con el término FRA que designa fragilidad, seguido del cromosoma dónde se localiza y, por último, una letra que es asignada a cada nuevo FS de un mismo cromosoma en orden alfabético de acuerdo con el momento de su localización (Berger R. et al., 1985). El FS asociado al gen FMR1, localizado en el *locus* cromosómico Xq27.3, se denomina **FRAXA**, por ser el primero que se localizó en el cromosoma X (Figura I.4). Es un sitio frágil sensible al folato y por tanto para su inducción se requiere un medio de cultivo deficiente en dicho compuesto.

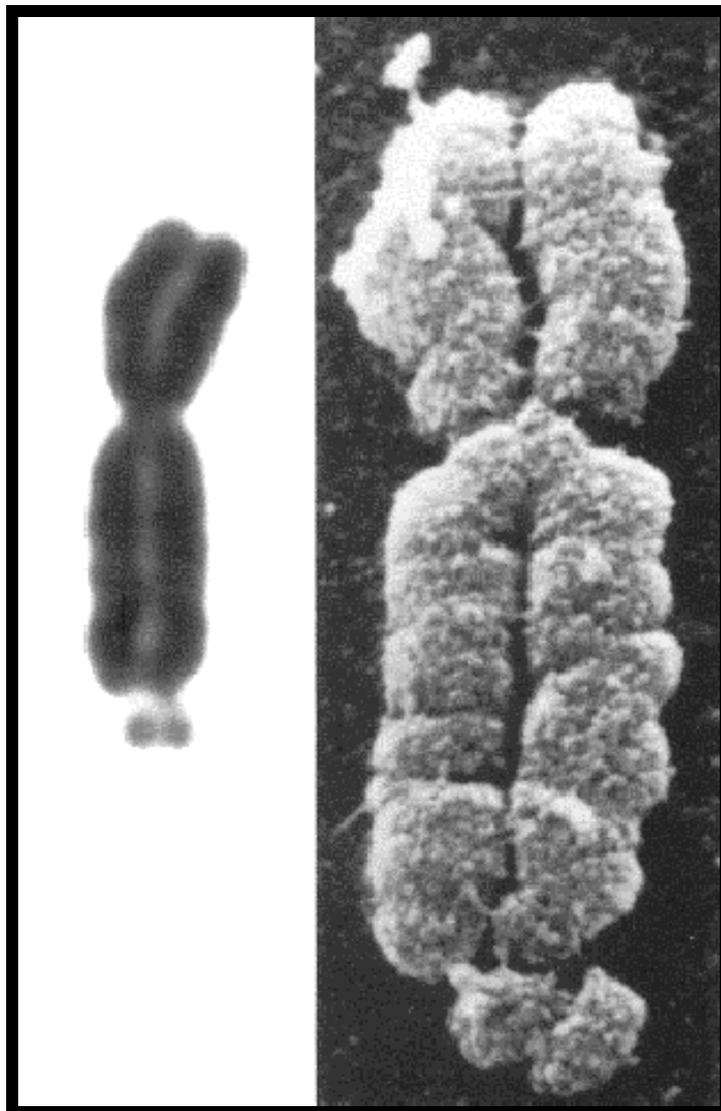


Figura I. 4: Observación microscópica del FS FRA(X). Tomado de Griffiths 2000

3.2. CARACTERÍSTICAS DEL GEN

El gen FMR1 se expande 40 kb y posee 17 exones (Figura I.5). Da lugar a un mRNA de ~4 kb (Willemsen R. et al., 2011) que consiste en:

- Una región 5' no traducida (5'UTR), que se transcribe pero no se traduce, de 0,2 kb.
- Una región 3'UTR de 1,8 kb.
- Una región codificante para la proteína, que se transcribe y se traduce, de 1,9 kb.

La proteína codificada, ***Fragile Mental Retardation Protein (FMRP)***, posee una longitud máxima de 632 aminoácidos con una masa molecular de 69 kDa.

El gen identificado posee una repetición en tándem del trinucleótido CGG en la región 5'UTR. La secuencia repetitiva CGG se localizó como parte del RNA aislado de tejido cerebral e inicialmente se asumió que codificaba para la proteína.

Posteriormente, se vio que el inicio de la traducción se situaba 69 bp aguas abajo de la secuencia repetida y que por tanto ésta estaba situada en la región 5'UTR del primer exón del gen (Ashley CT. et al., 1993).

Aguas arriba del gen, a 250 bp, se localiza una isla CpG que sirve de región reguladora del gen FMR1 (Eichler EE. et al., 1993).

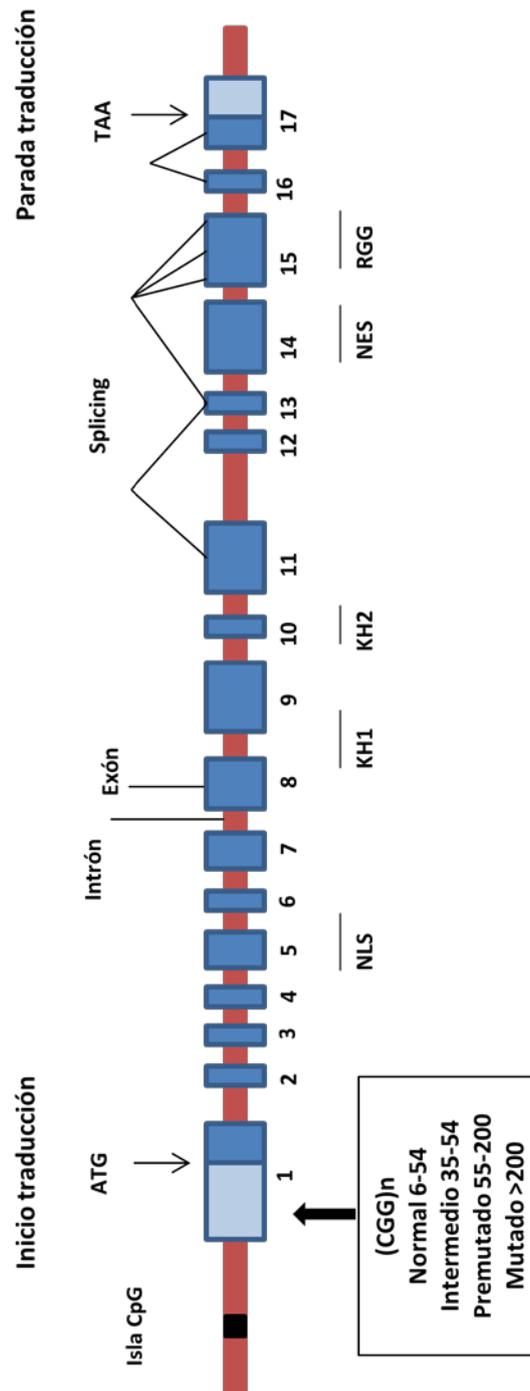


Figura I. 5: Representación esquemática del gen FMR1. Modificado de Peñarikano O. et al., 2007

3.3. ALELOS DEL GEN

La secuencia trinucleotídica CGG es polimórfica en su longitud. Se han descrito 4 alelos en función de dicha longitud:

- **Normal:** contiene entre 6 y 54 repeticiones CGG con una moda situada en 30 repeticiones.
- **Intermedio o zona gris:** esta clase comprende alelos en la zona alta del rango normal, entre 35 y 54 repeticiones CGG. Estos alelos se encuentran en el 5-9 % de la población general (Snow K. et al., 1993; Larsen LA. et al., 1997; Patsalis PC. et al., 1999a).
- **Premutado:** los alelos de esta clase se encuentran entre 55 y 200 repeticiones CGG. La prevalencia de alelos premutados en la población general se estima en 1:130-250 en mujeres y 1:250-810 en hombres (Dombrowski C. et al., 2002; Hagerman PJ. 2008; Tassone F. et al., 2014).
- **Mutado:** incluye alelos con más de 200 repeticiones CGG. La prevalencia se estima en 1:4000 hombres y aproximadamente el doble de mujeres, 1:5000-8000 (Hill MK. et al., 2010; Monaghan KG. et al., 2013).

3.4. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

En los portadores de alelos normales, intermedios y premutados, el gen FMR1 se mantiene transcripcionalmente activo y se produce la proteína FMRP. Sin embargo, cuando el número de repeticiones se sitúa por encima de 200, tanto las citosinas de la secuencia CGG como las de la isla CpG del promotor situado aguas arriba se hipermetilan, provocando el silenciamiento transcripcional del gen y la consecuente ausencia de la proteína FMRP (Warren ST. 2007). La ausencia de esta proteína es la causa del **síndrome X frágil (FXS)**.

3.4.1. Metilación

El fenómeno epigenético de metilación se produce en la posición 5' de las citosinas e induce, por un lado, la condensación de la cromatina y, por otro lado, impide la unión de factores de transcripción, como USF1, USF2 (*Upstream stimulatory factor*) y NRF-1 (*Nuclear respiratory factor*). La metilación del DNA genómico es catalizada por las DNA metiltransferasas que juegan un papel importante en el remodelado de la cromatina y la regulación de la expresión génica (Tabolacci E. et al., 2008).

3.4.2. Acetilación

Se han descrito también cambios en las histonas H3 y H4, asociadas a la región 5'UTR del gen FMR1, que normalmente se encuentran acetiladas en sus residuos de lisina. En las células con la mutación esta acetilación se ve reducida, lo que indica que las proteínas de unión a la isla CpG metilada reclutan desacetilasas de histonas (HDAC) que a su vez inducen la condensación de la cromatina y previenen la unión de la maquinaria de transcripción (Peñagarikano O. y Warren ST. 2007). Se ha observado también que la histona 3 muestra la lisina 4 desmetilada y la lisina 9 metilada (Pietrobono R. et al., 2005).

El tratamiento *in vitro* de células mutadas hipermetiladas con inhibidores de la metilación, como el compuesto 5-aza-2-desoxicitidina (5azadC), reactiva parcialmente la expresión génica (Figura 1.6), demostrando que la metilación es la causa de la inactivación del gen (Pietrobono R. et al., 2002). Estudios en células madre embrionarias han mostrado que en células que contienen hasta 1000 repeticiones CGG el gen está metilado y transcripcionalmente activo. Cuando las células comienzan a diferenciarse la transcripción del gen se elimina (Eiges R. et al., 2007). El mecanismo molecular responsable de estos cambios epigenéticos no está del todo claro y la principal cuestión es cómo la longitud de la repetición por sí misma es responsable de la metilación del DNA y de la modificación de las histonas (Oostra BA. y Willemsen R. 2009).

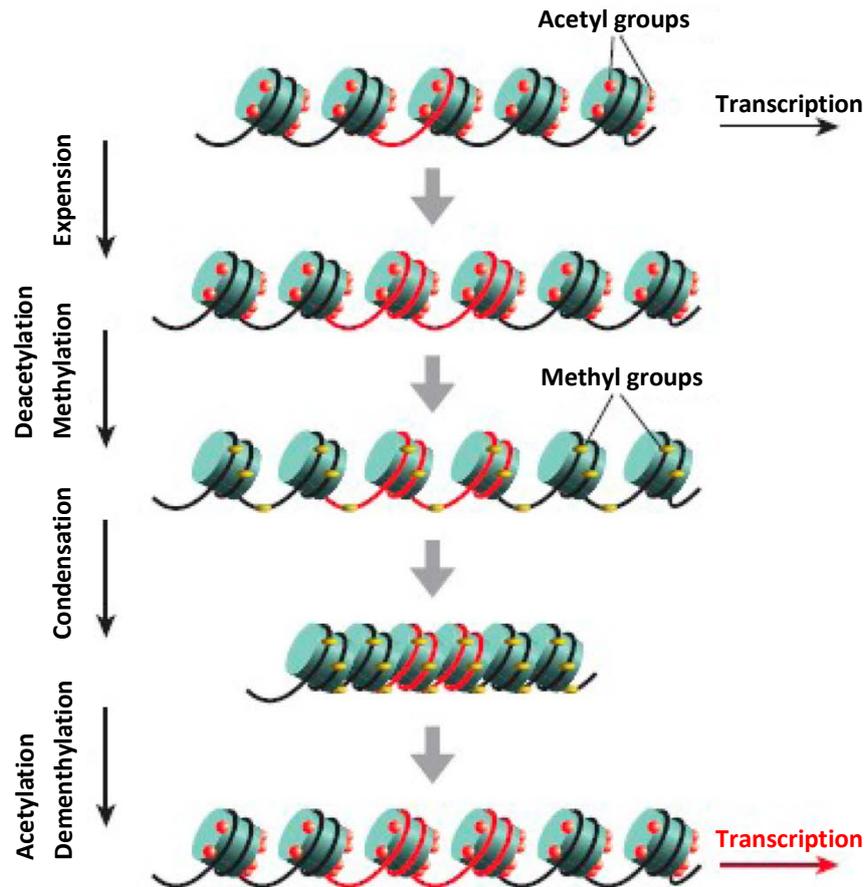


Figura I. 6: Representación esquemática de la estructura de la cromatina del gen FMR1.

Tomado de Oostra BA. y Willemsen R. 2009

De acuerdo con la Figura I.6, en una situación normal el gen activo tiene una estructura de la cromatina abierta. Cuando la repetición CGG (línea roja) está expandida se produce la desacetilación y la metilación del promotor y de la región CGG dando lugar a una cromatina empaquetada y causando la inactivación del gen. El tratamiento *in vitro* de células hipermetiladas con 5azadC resulta en la desmetilación y acetilación, de forma que la cromatina se abre y se recupera parcialmente la transcripción.

3.5. MUTACIÓN DINÁMICA: EXPANSIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS

El aislamiento y la caracterización del gen FMR1 puso de manifiesto un nuevo modelo de mutación basado en la expansión de secuencias microsatélite.

Las mutaciones pueden clasificarse de diversas maneras. La clasificación basada en la estabilidad de su transmisión a través de las generaciones, establece dos tipos de mutaciones:

- **Mutaciones estáticas:** se transmiten de forma estable a través de las generaciones. Por ejemplo, una transición o una transversión.
- **Mutaciones dinámicas:** Al contrario que las mutaciones estáticas, las secuencias microsatélite repetidas en tándem pueden modificar el número de repeticiones a través de las generaciones, y por tanto el proceso de mutación es dinámico. Las secuencias microsatélite, son repeticiones en tándem de 1 a 6 nucleótidos. Son muy comunes en los genomas eucariotas y aproximadamente el 3 % del genoma humano contiene este tipo de secuencias (Eckert KA. y Hile SE. 2009). Las repeticiones mono y binucleotídicas son polimórficas en la población general, aunque normalmente son estables cuando se transmiten entre las generaciones. En cambio, las secuencias trinucleotídicas son menos abundantes y muestran una mayor inestabilidad, pudiendo dar lugar a largas expansiones que pueden generar a su vez desórdenes genéticos.

El término mutación dinámica se introdujo para describir el hecho de que un cambio inicial en un *locus* microsatélite aumenta la probabilidad de que se den cambios posteriores hacia la mutación. De este modo, las secuencias más largas tienen una mayor probabilidad de sufrir una expansión que secuencias más cortas. Además, la longitud de la secuencia repetida se correlaciona con la severidad de la enfermedad. Los síntomas son más severos y se manifiestan antes, a medida que aumenta el número de repeticiones. Esto da lugar a un concepto que se conoce como anticipación genética (Pearson CE. et al., 2005).

3.5.1. Expansión de trinucleótidos: Enfermedades

Varias patologías como la enfermedad de Huntington, la distrofia miotónica, o la enfermedad de Kennedy están causadas por la expansión de trinucleótidos y más de

20 repeticiones inestables se han visto asociadas a desórdenes neurológicos (Brouwer JR. et al., 2009).

Las enfermedades causadas por la expansión de trinucleótidos pueden clasificarse en dos grupos dependiendo del mecanismo resultante de dicha expansión:

- a. **Pérdida de función:** el producto del gen no se produce o se produce a bajos niveles. Ejemplos: Síndrome del X frágil, síndrome frágil XE (FXES) o Ataxia de Friedreich (FRDA).
- b. **Ganancia de función:** un mRNA o proteína adquiere una nueva función celular. Por tanto, dependiendo de la localización de la repetición en el gen, puede ocurrir a nivel de RNA o de proteína. Cuando la repetición se localiza en una región codificante (que se transcribe y se traduce), afectará a la estructura de la proteína y por tanto a su función. Cuando se localiza en una región no codificante (que se transcribe pero no se traduce), no afectará directamente a la estructura o función de la proteína, pero podría afectar a la función del mRNA. Ejemplos: Distrofia miotónica (MD), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Kennedy/atrofia muscular espinobulbar (SBMA) o ataxia espinocerebelar (SCA).

3.5.2. Inestabilidad de la repetición CGG

Existen varios factores de riesgo que influyen en la estabilidad de la repetición CGG del gen FMR1 durante su transmisión a la descendencia:

a. Tamaño de la repetición

La propia naturaleza repetitiva de las secuencias microsatélite les aporta una relativa propensión a mutar. El riesgo de que se den expansiones aumenta con la longitud de la repetición, de manera que los alelos expandidos tienen una mayor probabilidad de sufrir nuevas expansiones, lo que concuerda con la naturaleza dinámica de las mutaciones en secuencias microsatélite.

En el gen FMR1, la inestabilidad incrementa con el número de repeticiones de la secuencia CGG:

- Los alelos situados en el rango normal se suelen transmitir de padres a hijos de una forma estable (Murray A. et al., 1997; Lévesque S. et al., 2009).
- Los alelos intermedios tienen una estabilidad variable aunque son varios los autores que han descrito la expansión a mutación completa en tan sólo dos generaciones (Terraciano A. et al., 2004; Zuñiga A. et al., 2005; Fernández-Carvajal I. et al., 2009a).
- Los alelos premutados están asociados a un alto riesgo de expansión a mutación completa en una única generación (Nolin SL. et al., 2003).

b. Sexo del parental transmisor

La inestabilidad está asociada no solo al tamaño sino también al sexo. En alelos normales e intermedios la transmisión a partir de un varón es menos estable que a partir de una mujer. Los alelos premutados, sin embargo, se transmiten de forma más estable por vía paterna (Sullivan AK. et al., 2002). La expansión a mutación completa ocurre casi exclusivamente cuando un alelo premutado es transmitido de una madre a su hijo y no de un padre a su hija.

Cuando un alelo premutado es transmitido por una mujer la repetición sufre una expansión en casi todos los casos, aunque no siempre se expande a mutación completa. En el sexo femenino, la inestabilidad es además proporcional a la longitud de la repetición, por lo que alelos con más repeticiones tienen mayor riesgo de expansión (Nolin SL. et al., 2003; García- Alegría E. et al., 2007). Cuando la premutación es transmitida por un varón, el alelo puede expandirse, contraerse o mantenerse inalterado (Nolin SL. et al., 1996), siendo el riesgo de expansión a mutación completa poco frecuente.

Los hombres portadores de la mutación completa presentan alelos premutados en el esperma (Reyniers HE. et al., 1993). Estos alelos premutados no se encuentran

metilados. La falta de metilación se produce porque hay un proceso de contracción específico en las células germinales que generan estos tejidos entre las semanas 13 y 17 del desarrollo embrionario y éstas escapan a la metilación de la isla CpG que se produce en otros tejidos (Reyniers HE. et al., 1999). En mujeres se produce un proceso de expansión que quizá esté ligado a la larga duración de la meiosis ovogénica. De esta forma, en los fetos femeninos con la mutación completa procedentes de madres con la premutación, la expansión CGG está presente en las células germinales (Malter HE. et al., 1997).

c. Pureza de la repetición

La secuencia de repeticiones CGG no es pura, sino que está interrumpida por un triplete diferente: AGG. En la población general, las repeticiones CGG se ven interrumpidas por un triplete AGG cada 9 o 10 unidades de repetición $[(CGG)_9AGG(CG G)_9AGG(CG G)_n]$ (Zhou Y. et al., 2006).

El número de interrupciones AGG en los diferentes tipos de alelos es:

- La mayoría de alelos normales e intermedios tienen dos interrupciones (Oostra BA. y Willemsen R. 2003).
- Los alelos premutados, en cambio, suelen contener ninguna o una sola interrupción AGG en el extremo 5' de la repetición (Eichler EE. et al., 1994; Zhong N. et al., 1995; Murray A. et al., 1997).

▪ Longitud de repeticiones puras e inestabilidad

Basándose en el modelo mutacional a pasos que originaba el síndrome (normal-premutación-mutación), Kunst y Warren (1994) señalaron que los alelos que a la larga darían lugar a cromosomas X mutados eran aquellos con más de 24 repeticiones puras.

Las investigaciones de Eichler (1994) y Zhong (1995) señalaron que los alelos con más de 33 repeticiones puras eran frecuentemente transmitidos de manera inestable.

Larsen y colaboradores (2000) revisaron los datos disponibles en la bibliografía sobre la relación de la estructura de la repetición y la estabilidad en las transmisiones. Agruparon los alelos en función del tracto más largo de repeticiones puras, sin tener en cuenta el número y la posición de la interrupción, y observaron que se daba una relación exponencial entre la longitud de la repetición pura y la inestabilidad de los alelos.

Nolin y colaboradores (2003) encontraron que el alelo más pequeño en sufrir una expansión a mutación completa en una sola generación contenía 59 repeticiones sin interrupciones AGG.

En el año 2013 el grupo de Nolin ha estudiado la inestabilidad durante la transmisión en alelos entre 45 y 69 repeticiones CGG y ha determinado que el número de interrupciones AGG y el número de repeticiones CGG no interrumpidas en el extremo 3' se correlaciona con dicha inestabilidad. En este estudio confirman que ambos factores predicen mejor la inestabilidad de un alelo que la propia longitud de la repetición.

En base a todas estas observaciones se ha propuesto que la ausencia de interrupciones AGG y la longitud de las repeticiones CGG sin interrupciones son un importante mecanismo de inestabilidad. El triplete AGG evita el solapamiento del DNA durante la replicación. Sin estas interrupciones el resultado es una secuencia larga y pura de repeticiones CGG en el extremo 3', lo que implica una mayor susceptibilidad a la expansión en futuras generaciones (Poon PM. et al., 2006).

d. Elementos en “cis”

Los elementos en “cis” con el gen FMR1 pueden afectar también a la estabilidad. Los más estudiados son microsatélites flanqueantes y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

- **Microsatélites flanqueantes**

En todas las poblaciones estudiadas los alelos mutados están en desequilibrio de ligamiento con marcadores microsatélites flanqueantes. Los más analizados son DXS548 y FRAXAC1 (Arrieta I. et al., 2003). En ambos casos la secuencia que se repite en tándem es el dinucleótido CA y se localizan a 150 y a 7 kb de la repetición CGG respectivamente (Richards RI. et al., 1991; Riggins GJ. et al., 1992).

- **Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)**

Se ha sugerido que marcadores más estables como los SNPs pueden proporcionar un avance en la investigación sobre el origen de la inestabilidad de la repetición CGG del gen FMR1 (Curlis Y. et al., 2005). El más estudiado ha sido el SNP ATL1, situado en el intrón 1 del gen FMR1 y a 5,6 kb de la repetición CGG. Este SNP presenta polimorfismo para los nucleótidos de adenina y guanina. Un estudio realizado por Crawford y colaboradores (Crawford DC. et al., 2000a) en una muestra con la mutación X frágil utilizando los marcadores microsatélites FRAXAC1 y DXS548 junto con el SNP ATL1, señalaba la importancia del uso de este último SNP a la hora de conocer el riesgo de expansión de la secuencia CGG. Investigaciones posteriores de Brightwell y colaboradores (Brightwell G. et al., 2002) sugieren que la asociación entre ATL1 y los marcadores microsatélite flanqueantes probablemente reflejan la historia mutacional de la expansión. Trabajos previos de nuestro grupo no apoyan esta sugerencia (Barasoain M. et al., 2012).

3.6. LA PROTEÍNA: FMRP

La proteína **FMRP** se expresa preferentemente en el cerebro y los testículos. Debido al mecanismo de *splicing* alternativo, el transcrito primario del gen FMR1 puede generar al menos 12 isoformas de la proteína con pesos moleculares entre 67-80 kDa. Tiene un papel importante en la regulación de la síntesis proteica en las dendritas de las neuronas (Schneider A. et al., 2009), necesario para el aprendizaje y la memoria (Sidorov MS. et al., 2013).

3.6.1. Dominios de unión

FMRP es una proteína de unión al mRNA, cuya distribución subcelular es principalmente citoplásmica. Aún así, se ha visto que ciertas isoformas se localizan en el núcleo, lo que es consistente con las señales de localización (NLS) y exportación nuclear (NES) que contiene la proteína, e indican que FMRP viaja entre el núcleo y el citoplasma (Peñagarikano O. et al., 2007).

Los motivos mejor caracterizados son los responsables de su unión al mRNA: dos dominios KH (*K Homology*) en los exones 8 y 10, una caja RGG (Arginina-Glicina-Glicina) en el exón 15 (Ashley CT. et al., 1993) y un dominio de unión al RNA en la región amino terminal de la proteína (Adinolfi S. et al., 2003). La caja RGG se une a una estructura G-quartet, que está presente en varios de los mRNA asociados con la proteína FMRP. A su vez, los dominios KH son importantes para la interacción de FMRP con polirribosomas.

3.6.2. Función reguladora post-transcripcional

La proteína FMRP se asocia con polirribosomas unidos al retículo endoplásmico y a ribosomas libres en el citoplasma en una asociación dependiente de RNA que se produce vía partículas de ribonucleoproteínas (RNP). Estas RNPs contienen proteínas como FXR1P y FXR2P (dos proteínas homólogas a FMRP codificadas por genes autosómicos), nucleolina, YB-1, NUFIP1, CYFIP1 y CYFIP2 (Oostra B. y Willemsen R. 2009). Como consecuencia de esta asociación, FMRP suprime la traducción de un grupo específico de mRNAs (Garber K. et al., 2006). Varios estudios han identificado mRNAs a los que FMRP se une y se ha visto que éstos codifican para proteínas con un papel importante en la función y maduración neuronal y en la plasticidad sináptica (Brown V. et al., 2001; Darnell JC. et al., 2001). Entre los mRNA cuya expresión está regulada por la proteína FMRP están también los mRNAs codificados por el gen FMR1.

3.6.3. Función neuronal y plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica es esencial para la memoria y el proceso de aprendizaje e incluye la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD). Estos procesos son importantes no sólo para la actividad sináptica en adultos sino también para la maduración durante el desarrollo de las espinas dendríticas, que aparecen inmaduras en los afectados por el FXS.

La plasticidad sináptica se expresa tanto a nivel pre como post-sináptico. En este último caso la LTD puede producirse por la activación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) o receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). A su vez, esta activación lleva a la internalización de receptores AMPA, necesaria para la LTD, y a la expresión de FMRP (Huber KM. 2006) y otras proteínas.

De acuerdo con la teoría denominada **“teoría mGluR del Síndrome X Frágil”** (Figura I.7) propuesta por Bear y colaboradores (2004): como consecuencia de la síntesis de la proteína FMRP, ésta actúa como un inhibidor de la traducción de ciertas proteínas que reducen la internalización de receptores AMPA. En ausencia de FMRP, como se da en los individuos con FXS, esta internalización se ve aumentada resultando en un exceso de LTD (Schneider A. et al., 2009).

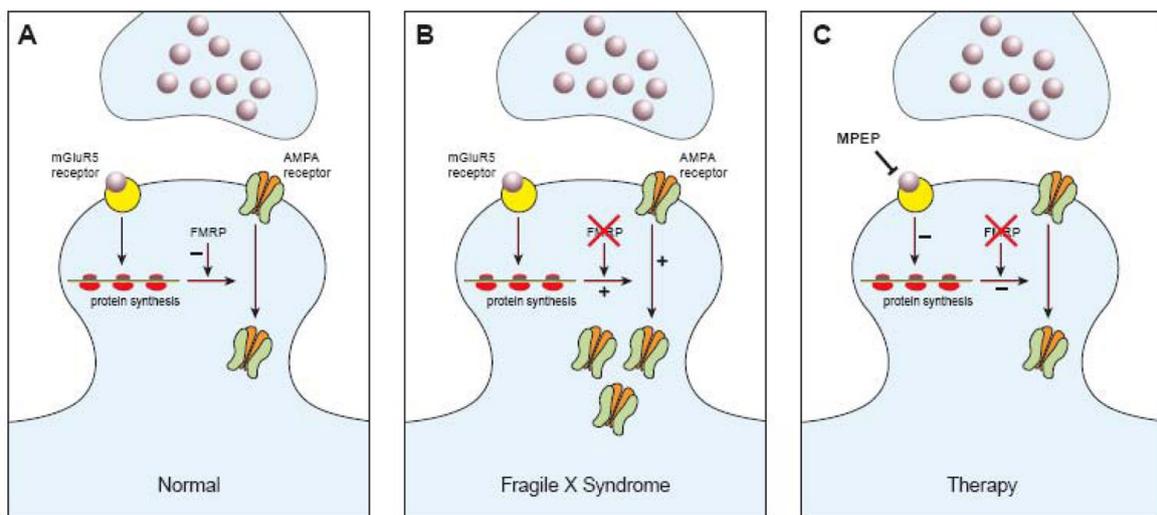


Figura I. 7: Teoría mGluR del FXS. Tomado de Oostra BA. y Willemsen R. 2009

Existen trabajos en ratones knock-out para el gen FMR1 que utilizando antagonistas del receptor 5 de glutamato (mGluR5), como es el MPEP, reducen la internalización de los receptores AMPA provocada por la ausencia de FMRP (Yan QJ. et al., 2005).

FMRP también reprime la traducción de la proteína APP (*Amyloid precursor protein*) uniéndose a su mRNA. APP se expresa principalmente en las neuronas y dendritas, promueve la formación de sinapsis en el cerebro en formación y es importante para la hiperexcitabilidad cortical y la plasticidad sináptica (Westmark CJ. y Malter JS. 2007). La ausencia de FMRP da lugar a altos niveles de APP.

3.7. PATOLOGÍAS ASOCIADAS

El gen FMR1 se asocia principalmente a tres patologías diferentes (Figura I.8): el síndrome del X frágil (FXS), la insuficiencia ovárica primaria (FXPOI) y el síndrome de ataxia tremor (FXTAS).

La etiología del FXS es principalmente la expansión de la repetición trinucleotídica CGG en la región 5' UTR del gen FMR1 hasta el rango mutado. Se propone que el gen FMR1 es el único responsable del FXS (Peñagarikano O. et al., 2007).

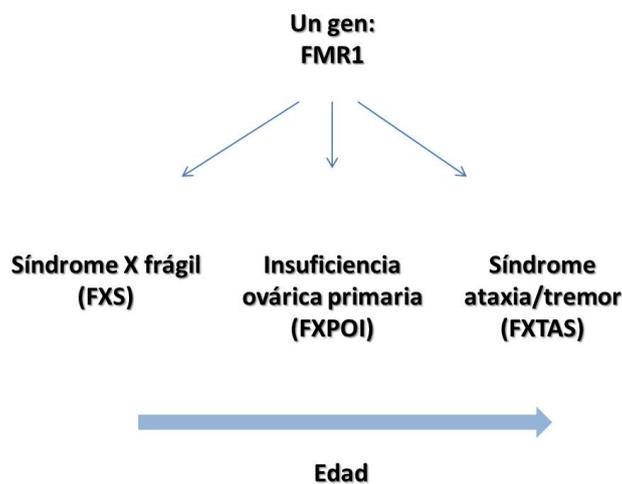


Figura I. 8: El gen FMR1 es responsable de tres desórdenes, FXS, FXPOI y FXTAS, que aparecen cada uno de ellos a edades más avanzadas

Los alelos premutados comprendidos entre las 55 y 200 repeticiones hasta fechas relativamente recientes no estaban asociados a ninguna patología. Hoy en día es evidente que están relacionados principalmente con FXPOI y FXTAS. Los alelos intermedios, entre 35 y 54 repeticiones CGG, están también relacionados con el desarrollo de FXPOI y FXTAS.

La presencia de características fenotípicas asociadas a alelos premutados condujo al análisis de la expresión del gen FMR1. Las investigaciones llevadas a cabo por Tassone y colaboradores (2000a, 2000b) y Tassone y Hagerman (2003) han mostrado que los niveles de FMR1 mRNA se elevan hasta 10 veces más de lo normal (2-8 veces más en linfocitos) en individuos portadores de la premutación, a pesar de que la expresión proteica se ve levemente reducida (Figura I.9).

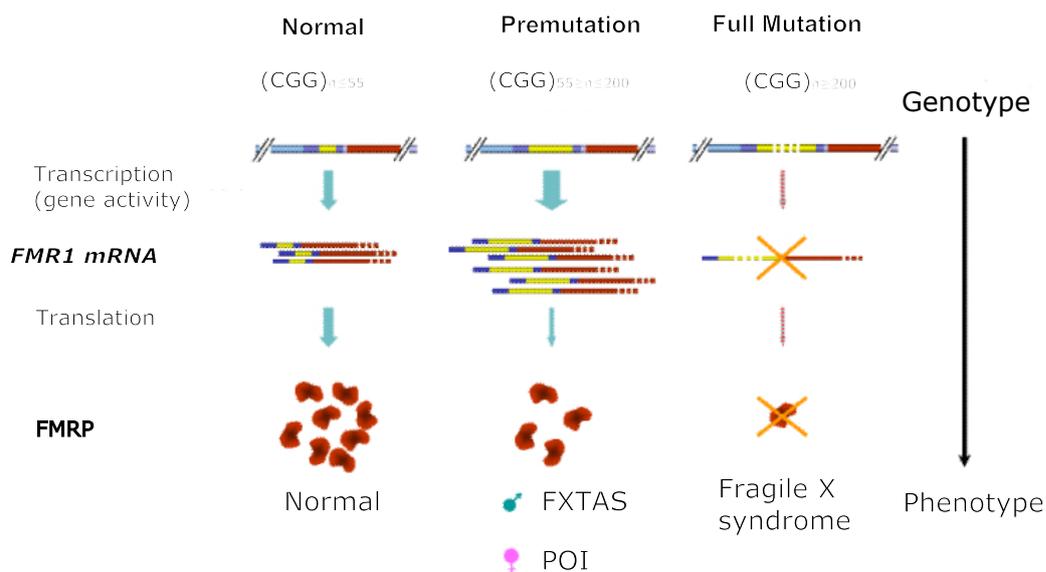


Figura I. 9: Longitud de la repetición CGG, expresión de FMRP y consecuencia clínica. Tomado de Willemsen R. et al., 2011

En el año 2011, Tassone y colaboradores determinaron que en los alelos premutados existían diferentes puntos de inicio de la transcripción y la poliadenilación que daban lugar a unos niveles de expresión diferente en estos alelos respecto a los del rango normal. Esto, junto con el hecho de que los desórdenes asociados a la premutación no

aparecen en individuos con FXS, señala que el mecanismo que genera las patologías asociadas a la premutación es diferente que el que genera el FXS.

3.7.1. Síndrome del X frágil

En 1866 Gregor J. Mendel postuló la existencia de unidades de herencia dominantes y recesivas basándose en la observación de los resultados de cruzamientos realizados en la planta del guisante *Pisum sativum*. A principios del siglo XX se estableció el actual concepto de gen como tal unidad de herencia y los postulados de Mendel, donde se describen como se transmiten los genes de padres a hijos, son conocidos como herencia mendeliana. En 1911 el trabajo de Thomas H. Morgan localizó por primera vez un gen en un cromosoma (cromosoma X) al detectar que en *Drosophila melanogaster* el carácter ojos blancos afectaba sólo a machos y que por tanto no seguía un modelo mendeliano. Postuló que podía existir una característica recesiva que afectara sólo a machos si el gen responsable de la misma estuviera en el cromosoma X. Esto fue el inicio de la “teoría cromosómica de la herencia”.

Estudios previos en humanos como el de Johnson (1897) o posteriores como el de Penrose (1938) habían encontrado una mayor incidencia de hombres que presentaban retraso mental en comparación con mujeres, lo que llevó a pensar que el retraso mental tenía un componente ligado al cromosoma X. En 1943, James Martin y Julia Bell publicaron el primer pedigrí que mostraba un retraso mental con una herencia ligada al cromosoma X. Fue denominado Síndrome de Martin y Bell, en honor a sus autores.

Sin embargo, la idea de que la inteligencia humana estuviera afectada por genes ligados al X no fue del todo aceptada hasta 1974, cuando Lehrke estimó que el 25-50 % del retraso mental podía ser atribuido a mutaciones en el cromosoma X. Esta estimación, aunque demasiado alta, establecía un nuevo concepto, el retraso mental ligado al cromosoma X (XLMR).

a. Retraso mental ligado al cromosoma X: XLMR

El retraso mental se puede definir como una discapacidad caracterizada por unas limitaciones significativas para desarrollar habilidades intelectuales y alcanzar un nivel de inteligencia apropiado para cada grupo de edad, que se origina antes de los 18 años. Actualmente hay más de 900 desórdenes genéticos asociados con el retraso mental (Rejeb I. et al., 2009) y se estima que el 1-3 % de la población general se encuentra afectada por esta condición (Chiurazzi P. et al., 2008), con un coeficiente intelectual por debajo de los valores considerados normales (IQ < 70). El 15-20 % de estos casos se cree que están ligados al cromosoma X y entre ellos, el FXS supone el 20 % de los casos de XLMR, siendo la condición más prevalente.

En la última revisión bibliográfica de Chiurazzi y colaboradores (Chiurazzi P. et al., 2008) las condiciones de retraso mental ligado al X se clasifican en tres clases según su presentación clínica:

- **Síndromes:** caracterizados por anomalías congénitas múltiples y defectos en órganos o tejidos diferentes (aunque también incluido) del cerebro.
- **Desórdenes neuromusculares:** caracterizados por síntomas neurológicos o musculares (epilepsia, distonía o debilidad muscular entre otros), sin presencia de malformaciones.
- **Condiciones no específicas:** el retraso mental es la única manifestación clínica consistente.

Según esta clasificación se conocen 215 condiciones de XLMR. En la Figura I.10 se observa el ideograma del cromosoma X con la posición de los 82 genes conocidos ligados a retraso mental. Los genes que aparecen en negrita causan síndromes, los marcados en gris precedidos por un signo + causan desórdenes neuromusculares y los precedidos por un asterisco están involucrados en condiciones no específicas.

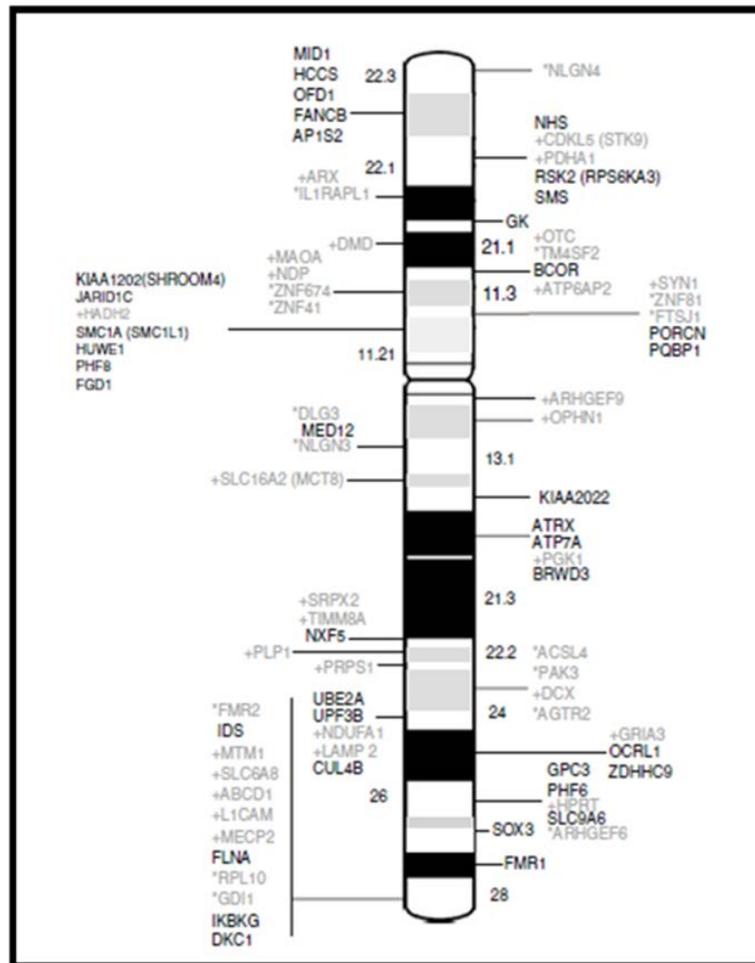


Figura I. 10: Localización de los 82 genes clonados en el cromosoma X. Tomado de Chiurazzi P. et al., 2008

b. Identificación del síndrome X frágil

Unos años después de la publicación del pedigrí de Martin y Bell, en 1969, Lubs detectó una segunda constricción en el final del brazo largo de un cromosoma del grupo C (Figura I.11) en cuatro varones con retraso mental y tres mujeres portadoras obligatorias de la misma familia. El cromosoma fue identificado posteriormente por autoradiografía como un cromosoma X. Esta constricción, que sirvió de marcador citogenético, se localizó más tarde en Xq27.3 (Harrison CJ. et al., 1983), que corresponde con el sitio frágil FRA(X). Supuso además la primera evidencia de su origen molecular.

Hasta una década más tarde del pedigrí de Martin y Bell no se volvió a encontrar una familia con las mismas características (Giraud F. et al., 1976; Harvey J. et al., 1977). Al mismo tiempo, Sutherland (1977, 1979) demostró que para la expresión citogenética de sitios frágiles eran necesarias unas condiciones de cultivo especiales. Para observar la fragilidad del cromosoma X era necesario un medio deficiente en ácido fólico.



Figura I. 11: Expresión citogenética del sitio frágil FRAXA mediante microscopía óptica en una metafase masculina analizada por Lubs HA. en 1969

Una vez aceptada la existencia de sitios frágiles y el modo de inducir su expresión, Richards y colaboradores (1981) analizaron el pedigrí original de Martin y Bell y encontraron que en los hombres afectados se expresaba la variación citogenética descrita anteriormente por Lubs, que ellos describieron como un sitio frágil. Al síndrome, hasta entonces conocido como Síndrome de Martin y Bell, se le denominó **Síndrome del X frágil** (OMIM #300264).

c. Paradoja de Sherman: un nuevo patrón de herencia

La existencia de un marcador citogenético permitió la identificación de un gran número de familias que mostraban el cromosoma X marcador, revelando así la naturaleza sindrómica de este desorden.

Los resultados del análisis de estas familias apuntaban a un modo de herencia más complicado que un modelo simple de herencia recesiva ligada al X, como inicialmente se había pensado. Junto con la existencia de mujeres afectadas heterocigotas para el X frágil, un número de pedigrís mostraban hombres no afectados que transmitían el marcador citogenético a sus hijas. Si el síndrome era recesivo las mujeres portadoras no deberían estar afectadas y además era sorprendente que los varones portadores de un gen tan deletéreo no estuvieran afectados. En 1984 Sherman y colaboradores analizaron 110 pedigrís y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- El 20 % de los hombres que portaban el gen mutado no estaban afectados. Estos individuos fueron denominados varones transmisores normales (NTM o *Normal Transmitting Males*).
- El 30 % de las mujeres portadoras mostraban cierto grado de discapacidad mental.
- El riesgo de heredar el síndrome dependía de la posición de un individuo en el pedigrí. Las madres de NTM mostraban un riesgo tres veces menor de tener hijos afectados que las hijas de NTM.
- La tasa de mutación estimada fue de $7.2 \cdot 10^{-4}$, teniendo en cuenta que no existían casos esporádicos, la prevalencia del síndrome y la falta de reproducción de los individuos afectados. Era la tasa de mutación más alta descrita en un desorden genético humano.

A este tipo de herencia y de transmisión que no coincidía con resultados previos se le denominó **Paradoja de Sherman** y su origen no fue resuelto hasta 1991, año en que el gen responsable del síndrome fue identificado. Al mismo tiempo se describía un nuevo mecanismo mutacional, la expansión de repeticiones trinucleotídicas, que explicaba el particular modo de herencia del FXS.

d. Mutación X frágil

El FXS fue la primera de un número creciente de patologías generadas por el mismo mecanismo mutacional, la expansión de repeticiones trinucleotídicas.

▪ ¿Cómo se produce la expansión?

Se propone que la causa más frecuente que lleva a la variabilidad en el número de repeticiones CGG de la región 5' UTR del gen FMR1 es:

- **Alineación incorrecta de las hebras complementarias durante la replicación del DNA:** Durante la síntesis de una nueva hebra, la hebra molde, debido a su naturaleza repetitiva, podría plegarse formando una estructura secundaria, de forma que la DNA polimerasa se disociaría temporalmente de esta hebra y al volverse a asociar lo haría a una o varias repeticiones anteriores, creando un fragmento extra de DNA repetitivo que si no se repara crearía una expansión.

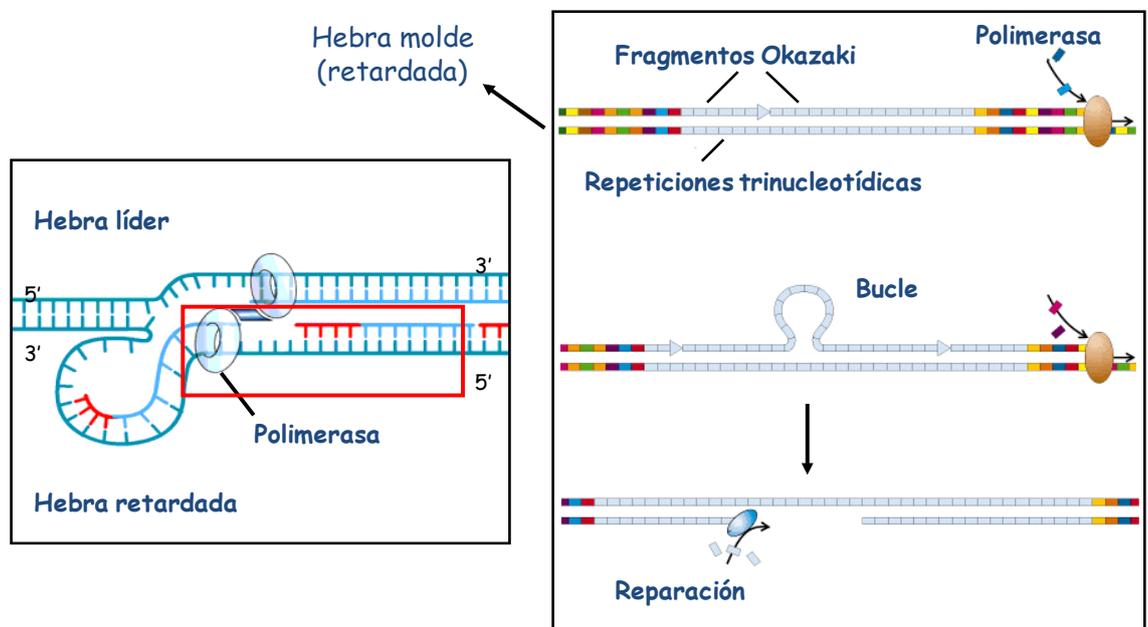


Figura I. 12: Expansión trinucleotídica por deslizamiento de la DNA polimerasa.

Modificado de Warren ST. 1997

- **Contribución de los fragmentos de Okazaki:** Richards y Sutherland (1994) propusieron que este proceso ocurriría expresamente en los fragmentos de Okazaki (Figura I.12). Estos fragmentos se generan durante la replicación de la hebra retardada y están anclados a la misma por secuencias únicas, no repetitivas, por lo que si la secuencia repetitiva es larga el fragmento en esta región se anclaría por una o ninguna secuencia única, mostrando un mayor riesgo de sufrir un deslizamiento. Cuando se produce este deslizamiento las enzimas de reparación del DNA añaden nucleótidos a la hebra molde para hacerla complementaria a la nueva hebra formada, generándose una expansión.

Apoiando esta idea se vio que la ausencia de la enzima FEN1 (*Flap Endonuclease 1*), necesaria para el correcto procesamiento de los fragmentos de Okazaki, aumenta la inestabilidad de la repetición (White PJ. et al., 1999). Inicialmente se produce una acumulación gradual de una o pocas repeticiones por generación, mientras que las expansiones masivas tienen lugar por deslizamientos continuos debidos a que la secuencia repetitiva al formar estructuras alternativas, bloquea el proceso de replicación.

- **¿Cuándo se produce la expansión?**

Se han planteado dos teorías en relación al momento en que se produce la expansión:

- **Modelo de expansión postzigótica:** sugiere que la expansión ocurriría mitóticamente en las células somáticas después de que se haya producido la diferenciación de la línea celular germinal, lo que ocurre aproximadamente en el quinto día de desarrollo (Rousseau F. et al., 1991; Reyners HE. et al., 1993). Este modelo surgió tras la observación de que la mutación estaba ausente en el esperma de los varones afectados. El modelo implicaría que debía haber un mecanismo que diferenciase entre una premutación transmitida vía paterna, que no se expandiría, y una premutación transmitida vía materna, que es la que sufriría la expansión.

- **Modelo de expansión prezigótica:** supone que la expansión ocurriría durante la gametogénesis. Malter y colaboradores (1997) apoyaron este modelo mediante sus estudios en tejido gonadal fetal, ya que encontraron que un feto de 16 semanas que mostraba una mutación completa en su tejido somático solamente poseía alelos con mutación completa en los ovarios, lo que sugiere que el momento de expansión debe ocurrir antes de la diferenciación germinal. Estas observaciones, junto con el hecho de que el esperma de adultos afectados sólo muestra premutaciones, condujeron a argumentar que la espermatogénesis no es capaz de mantener mutaciones completas y que sufre un proceso de selección natural contra las mismas. Esta aparente selección contra largas repeticiones se ha descrito también en otras enfermedades causadas por expansión de trinucleótidos, como la distrofia miotónica (Jansen G. et al., 1994).

- **Variaciones en la mutación**

En los últimos años se han descrito casos de individuos portadores de la mutación completa en los que ni la repetición CGG, ni el promotor del gen se encuentran metilados (Tabolacci E. et al., 2008). Estos individuos son aparentemente normales, lo que demuestra que es la metilación y no la elongación de la repetición *per se*, lo que causa el típico fenotipo X frágil.

Existen también individuos cuya mutación se encuentra metilada solamente en un determinado porcentaje de sus células (mosaicismo de metilación) y que muestran un nivel de expresión proteica correspondiente al de las células no metiladas (Nolin SL. et al., 1996). Se ha encontrado también que hay mosaicismo a nivel del número de repeticiones, es decir, que en un mismo individuo encontramos células con diferentes tamaños de expansión. Se pueden encontrar mosaicismos mutación/premutación (lo que ocurre en al menos el 15 % de los varones y un 6 % de las mujeres con FXS), mutación/tamaño normal (presentes en aproximadamente el 1 % de los varones con FXS) o, debido a la inestabilidad de la mutación completa, diferentes tamaños en el rango de la mutación (Milá M. et al., 1996). Por tanto, el mosaicismo permite que

algunas células en un individuo portador de mutación expresen la proteína, y suele detectarse en aquellos pacientes con una forma más leve del síndrome.

Por otro lado, se han descrito hasta 15 deleciones completas o parciales del gen FMR1 que oscilan entre 1,6 kb y 13 mb (Gedeon AK. et al., 1992) que dan lugar a la ausencia de proteína FMRP y que, por tanto, generan el fenotipo X frágil. En casos excepcionales, se han descrito también otro tipo de mutaciones, pequeños cambios puntuales de la secuencia del gen FMR1 que aunque no provocan la ausencia de proteína, también generan el fenotipo X frágil (De Boulle K. et al., 1993; Handt M. et al., 2014; Myrick LK. et al., 2014). La mutación I304N (una sustitución de isoleucina por asparragina en el aminoácido 304) (De Boulle K. et al., 1993), en el segundo dominio KH da lugar a una proteína que no se asocia con polirribosomas (Siomi H. et al., 1993).

e. Fenotipo X frágil

El síndrome del X frágil es la forma más común de discapacidad cognitiva hereditaria y de autismo. Estudios epidemiológicos estiman que la prevalencia de este síndrome en la población general es de 1:2500-1:8000 mujeres y aproximadamente 1:5000 hombres (Hagerman PJ. 2008; Fernández-Carvajal I. et al., 2009b; Tassone F. 2014). Engloba un amplio rango de disfunciones clínicas, cognitivas y de comportamiento que afectan en mayor medida a los varones.

▪ Disfunciones clínicas

El fenotipo típico del FXS incluye las siguientes características:

- Cara alargada con frente amplia y mentón prominente
- Orejas grandes y despegadas
- Hiperlaxitud articular (con movilidad aumentada) que normalmente disminuye con la edad

- Testículos grandes en varones al llegar a la pubertad (macroorquidismo). Se considera macroorquidismo cuando el volumen testicular supera los 30 ml. Aunque esta característica no es exclusiva del FXS, está presente en el 80 % de los varones afectados

Otras características frecuentes que se han descrito son: cabeza grande (macrocefalia), paladar alto y arqueado o estrabismo, que se da en el 30-50 % de los casos. En las extremidades los hallazgos más habituales son los pies planos, manos con dedos algo ensanchados en su extremo distal, pulpejo de las yemas de los dedos salientes o rodillas que se incurvan hacia atrás.

Son comunes las anomalías en el tejido conectivo que da lugar a la hiperextensibilidad de las articulaciones y pueda afectar a las válvulas del corazón. Asimismo, los pacientes con FXS suelen presentar otitis, alergias o apnea del sueño. Un 15 % sufre de epilepsia y algunos pacientes muestran sobrepeso, dando lugar en los casos más extremos al llamado fenotipo “Prader-Willi-like” (que recuerda al síndrome Prader–Willi).

En relación a la morfología cerebral, las características frecuentemente observadas son: dilatación de los ventrículos cerebrales y las anomalías en el tamaño de algunas estructuras cerebrales, como el hipocampo o el núcleo caudado, de mayor tamaño, o el giro temporal superior y el vermis cerebeloso, que tienen un tamaño reducido respecto al normal. En algunos estudios estas anomalías se han relacionado con el rendimiento intelectual de los niños con FXS, y con el estado de metilación del gen FMR1.

▪ **Disfunciones cognitivo-conductuales**

A **nivel cognitivo**, el 80-90 % de los varones con FXS presenta una deficiencia intelectual, situándose el coeficiente intelectual (IQ) en el rango de retraso mental moderado a severo. La mayoría sufre un importante trastorno de atención que tiene como característica principal la imposibilidad de responder a cualquier estímulo y dificultades en el área matemática. Además tienen problemas de aprendizaje y de

lenguaje (aparición tardía, lenguaje repetitivo y déficit en habilidades comunicativas). Por el contrario tienen una buena capacidad de imitación y memoria a largo plazo.

A **nivel conductual**, es característica la hiperactividad (Hagerman RJ. et al., 2009) y una timidez extrema evitando el contacto ocular, además de movimientos estereotipados, ansiedad, perseverancia y en algunos casos agresividad, sobre todo durante la adolescencia y juventud.

De acuerdo con lo señalado, el FXS también se ha relacionado con el autismo (Hagerman RJ. et al., 2009; Besterman AD. et al., 2014). El 18-36 % cumple los criterios del trastorno autista (*Autistic Disorder, AD*), mientras que el 43-67 % presenta un trastorno del espectro autista (*Autistic Spectrum Disorder, ASD*). Nuestro equipo de investigación llevó a cabo un análisis citogenético del sitio frágil Xq27.3 en población diagnosticada como autista. Los resultados de este estudio mostraron una asociación positiva entre el autismo y este sitio frágil (Arrieta I. et al., 1996).

▪ **Manifestaciones en mujeres**

Las manifestaciones clínicas y las disfunciones cognitivo-conductuales en mujeres afectadas por el FXS son más leves debido, según la hipótesis de Lyon, a la inactivación al azar durante el desarrollo embrionario de uno de los cromosomas X. Tienen un IQ medio de 80, con un retraso en general situado entre los niveles leve y límite, aunque también existen mujeres con mutación completa e inteligencia normal. Suelen presentar problemas emocionales y de relación social como ansiedad o timidez y problemas de atención e impulsividad.

3.7.2. Ataxia tremor asociada al X frágil (FXTAS)

a. Descubrimiento del síndrome

El síndrome **FXTAS** (OMIM #300263) fue descrito por primera vez en 2001 por Hagerman, Leehey y colaboradores en varones portadores de alelos premutados de edad avanzada (50-60 años de edad) y lo definieron como un desorden neurológico

multisistémico con temblor y ataxia como signos principales. El análisis de estos hombres surgió tras darse cuenta de que varios de los abuelos de niños con FXS sufrían temblor, problemas de equilibrio y pérdida de la función mental (Hagerman PJ. y Hagerman RJ. 2002, 2004). Debido a estas características, las personas afectadas habían sido diagnosticadas como casos de Parkinson atípico lo que ha mantenido sin detectar la etiología de esta patología hasta fechas relativamente recientes.

b. Fenotipo clínico y criterio diagnóstico

Los primeros casos descritos presentaban un fenotipo clínico que incluía temblor intencional progresivo seguido de ataxia (Hagerman RJ. et al., 2001). Otros síntomas característicos que han sido descritos en portadores de la premutación son el parkinsonismo, pérdidas de memoria, déficit cognitivo, atrofia cerebral generalizada e impotencia (Leehey MA. et al., 2002, 2003; Berry-Kravis E. et al., 2003; Jacquemont S. et al., 2003; Tassone F. et al., 2007a).

El diagnóstico de FXTAS está basado en una combinación de síntomas clínicos y de resultados obtenidos en pruebas radiológicas. Las características radiológicas más relevantes son:

- Atrofia cerebral y lesiones en la sustancia blanca en el pedúnculo cerebeloso medio (Brunberg JA. et al., 2002). Jacquemont y colaboradores (2003) demostraron que los daños en el pedúnculo cerebeloso medio se presentaban solamente en el 50 % de los pacientes.
- Descenso de la intensidad de la señal de T1 y un aumento de la T2 en la sustancia blanca profunda del cerebelo. Estos datos suponen un criterio más estricto.
- Pérdida de volumen cerebelar y cerebral que se dan en una alta frecuencia.
- Pérdida de células de Purkinje, gliosis y espongirosis de la sustancia blanca profunda del cerebelo.

c. Características moleculares

A nivel molecular, se ha propuesto un mecanismo de ganancia de función del RNA (Hagerman RJ. y Hagerman PJ. 2002). Este modelo de ganancia de función se había propuesto previamente para la distrofia miotónica que está causada por una expansión del trinucleótido CTG.

El mecanismo propuesto para el FXTAS se muestra en la Figura I.13 (Oostra BA. y Willemsen R. 2003): Los transcritos de FMR1-mRNA que contienen la expansión CGG son incorporados en partículas mRNP y trasladados fuera del núcleo. Estos transcritos no pueden unirse a la subunidad ribosómica 40S de modo que la traducción se ve afectada reduciéndose los niveles de FMRP en la célula nerviosa. En respuesta a los bajos niveles de FMRP y por mecanismos aún desconocidos se da un aumento en los niveles de factores de transcripción específicos, lo que da lugar a un aumento de la transcripción de FMR1 y por tanto a un aumento de los niveles de FMR1-mRNA.

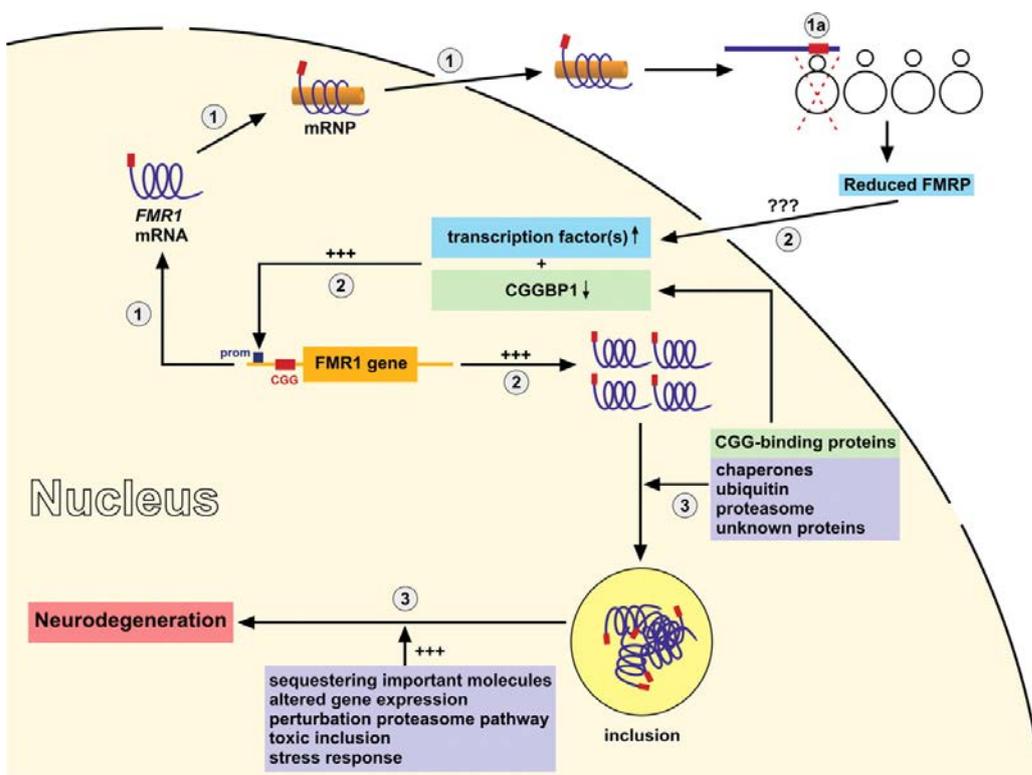


Figura I. 13: Relación entre el gen FMR1 que contiene la expansión CGG, los transcritos FMR1-mRNA y el FXTAS. Tomado de Oostra BA. y Willemsen R. 2003

Alternativamente, los transcritos con largas repeticiones CGG pueden secuestrar altas cantidades de proteínas de unión a CGG lo que también resulta en un aumento de la transcripción de FMR1. La célula nerviosa intenta eliminar los niveles elevados de FMR1-mRNA mediante el uso de chaperonas y componentes de la ruta de degradación ubiquitina-proteosoma. En caso de no conseguirlo se producen las inclusiones intranucleares. Éstas desencadenan una neurodegeneración al activar las rutas de señalización neurotóxica, pudiendo influir en este proceso diversos mecanismos.

Aunque este síndrome se asociaba exclusivamente a portadores de alelos en el rango de la premutación, recientemente se han publicado casos de FXTAS en individuos portadores de alelos intermedios (Hall D. et al., 2012; Liu Y. et al., 2013) y en hombres con mosaicismo tanto a nivel de metilación (individuos que muestran alelos metilados y no metilados) (Loesch DZ. et al., 2012) como a nivel de repeticiones (individuos que muestran alelos con mutación completa y alelos premutados) (Pretto DI. et al., 2013).

d. Inclusiones intranucleares

La presencia de inclusiones intranucleares junto con las características clínicas son los factores clave del FXTAS. Las inclusiones intranucleares se distribuyen ampliamente a lo largo del cerebro, sobre todo en la amígdala y el hipocampo (Greco CM. et al., 2002, 2006). Estas inclusiones han sido descritas en hombres con alelos a partir de 70 repeticiones. Son positivas para ubiquitina y se han localizado tanto en neuronas como en astrocitos. Tanto el número como el tamaño de las inclusiones aumentan con la edad, lo que se relaciona con el carácter progresivo del FXTAS (Willemsen R. et al., 2003).

El número de inclusiones se correlaciona con el tamaño de la repetición CGG (Greco CM. et al., 2006; Tassone F. et al., 2007b). El número elevado de transcritos presente en los portadores de la premutación daría lugar al secuestro o plegamiento incorrecto de proteínas celulares con un efecto citotóxico acumulativo y a la formación de las típicas inclusiones. Los ratones transgénicos para la premutación muestran niveles de transcritos de FMR1 de 2 a 3,5 veces más elevados que los ratones controles, sin

diferencia en los niveles de proteína FMRP. Esto junto con el hecho de que el FXTAS no se presente en individuos portadores de la mutación completa refuerza la hipótesis de que las inclusiones no se forman por déficit de la proteína FMRP (Tassone F. et al., 2007b).

El análisis del contenido de las inclusiones intranucleares en humanos, ratones y moscas ha demostrado la presencia de más de 30 proteínas diferentes (Iwahashi CK. et al., 2006; Jin P. et al., 2007; Sofola OA. et al., 2007; Brouwer JR. et al., 2008; Berman RF. y Willemsen R. 2009; Wenzel HJ. et al., 2010). El FMR1-mRNA también estaba presente en estas inclusiones, lo que refuerza el modelo de toxicidad del RNA propuesto para el FXTAS (Tassone F. et al., 2004).

e. Influencia del sexo

Se han diagnosticado también mujeres con FXTAS portadoras de la premutación, si bien en menor número y con un fenotipo menos severo que en varones. En 2004, Hagerman y colaboradores describieron 5 casos de mujeres con alelos premutados que recibieron un diagnóstico de FXTAS y que presentaban temblor intencional y ataxia, parkinsonismo y neuropatía periférica, aunque sin déficit cognitivo.

La penetrancia de este síndrome difiere entre hombres y mujeres, y aumenta con la edad y el número de repeticiones CGG. Aproximadamente el 40 % de los hombres portadores de la premutación y el 8-16 % de las mujeres portadoras con 50 o más años desarrollan FXTAS (Jacquemont S. et al., 2004). En términos de prevalencia, uno de cada 3000 hombres y un menor número de mujeres en la población general se estima que desarrollará FXTAS (García-Arocena D. y Hagerman PJ. 2010). De acuerdo con la hipótesis de Lyon, la diferencia entre sexos puede deberse a la proporción de cromosomas X normales activos en el sexo femenino.

3.7.3. Insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil

Como se ha señalado previamente, desde 1969 el análisis de familias con retraso mental mostró que en varones afectados se expresaba un sitio frágil que sirvió como marcador citogenético y que se localizó en el *locus* Xq27.3. A la patología se le denominó en 1981 síndrome del X frágil.

En 1986, Fryns detectó un aumento en la tasa de gemelos entre mujeres portadoras y planteó la posibilidad de una disfunción ovárica. En 1987, se celebró en Denver uno de los primeros congresos que reunió a investigadores y familias afectadas por el FXS. Uno de los temas objeto de debate fue la aparición temprana de menopausia en mujeres portadoras. En 1991, Cronister y colaboradores encontraron que el 13 % de las mujeres portadoras desarrollaba una menopausia antes de los 40 años. Este porcentaje era significativamente mayor que en controles (5 %). La identificación del gen FMR1 en 1991 y el desarrollo de las técnicas de diagnóstico permitieron analizar y conocer los alelos del gen. Desde 1994 hasta la actualidad se han ido acumulando evidencias que indican que las mujeres portadoras de alelos premutados e intermedios tienen riesgo de sufrir POI. Las mujeres con mutación completa tienen, en cambio, el mismo riesgo de sufrir POI que la población general, es decir un 1 %.

a. POI y alelos premutados

Schwartz y colaboradores (1994) fueron los primeros en evidenciar una asociación entre un desorden reproductivo y la premutación del gen FMR1. Unos años más tarde, Allingham-Hawkins y colaboradores (1999) realizaron un estudio internacional para determinar la prevalencia de POI entre mujeres no portadoras y portadoras de la premutación o de la mutación completa. Estimaron que el 16 % de las mujeres con premutación presentaban POI. Estudios posteriores han confirmado esta prevalencia (Vianna-Morgante AM. et al., 1999; Murray A. et al., 2000a; Mallolas J. et al., 2001; Hundscheid RD. et al., 2003; Sullivan AK. et al., 2005; Wittenberger MD. et al., 2007; Streuli I. et al., 2009). La prevalencia de menopausia temprana entre mujeres con premutación es aproximadamente del 20 % (revisado en Sherman SL. et al., 2007).

Por tanto, sólo un porcentaje de las mujeres que portan alelos premutados sufren una disfunción ovárica. Por ello es importante la identificación de factores que influyan en la variabilidad clínica y que ayuden a identificar a aquellas mujeres con riesgo de sufrir complicaciones reproductivas. Los factores que se han relacionado con el gen FMR1 son: el tamaño de la repetición, el patrón de inactivación del cromosoma X y el origen parental de la mutación.

▪ Tamaño de la repetición

A nivel molecular, se ha visto que el tamaño de la repetición CGG influye en el riesgo de sufrir POI, aumentando la prevalencia y disminuyendo la edad de la menopausia a medida que aumenta el tamaño de la repetición. Sin embargo, se ha demostrado que la asociación entre el número de repeticiones, la edad de la menopausia y la prevalencia de POI no es lineal (Ennis S. et al., 2006; Sullivan AK. et al., 2005; Allen EG. et al., 2007), siendo un número medio de repeticiones (~80-99 repeticiones) en el rango de la premutación el de mayor riesgo de sufrir POI y a edades más tempranas (Figura I.14). Hunter y colaboradores (2008) demostraron la influencia de factores genéticos aditivos en la edad de aparición de la POI.

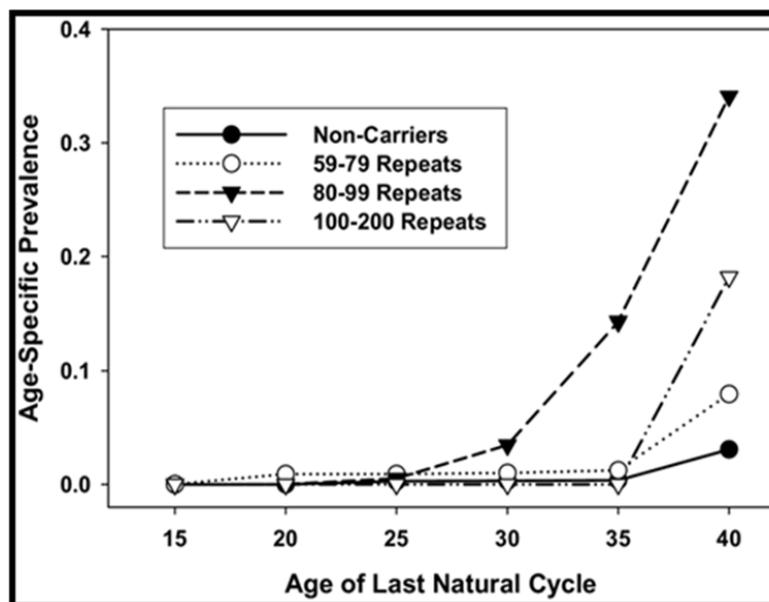


Figura I. 14: Relación no lineal entre número de repeticiones CGG y riesgo de POI. Tomado de Wittenberger MD. et al., 2007

▪ Patrón de inactivación

Debido a que el gen FMR1 tiene su *locus* en el cromosoma X es lógico pensar que un factor de riesgo pudiera ser la inactivación del cromosoma X. Según la *hipótesis de Lyon*, la inactivación de este cromosoma es un fenómeno estocástico que se produce en las células somáticas en una etapa temprana del desarrollo embrionario femenino con el fin de lograr una compensación de la dosis génica respecto a varones. La inactivación es al azar, en unos casos puede inactivarse el cromosoma X proveniente del padre y en otros el proveniente de la madre. A no ser que haya consanguinidad es altamente improbable que los dos cromosomas X sean portadores del alelo premutado del gen FMR1. De acuerdo con lo señalado, la severidad de la disfunción ovárica estaría relacionada con la proporción de cromosomas X activos con alelos premutados. Sin embargo, ciertos estudios señalan que la inactivación se ha correlacionado con el riesgo de FXTAS en mujeres (Berry-Kravis E. et al., 2005) pero no se ha encontrado en mujeres premutadas con disfunción ovárica (Murray A. et al., 2000a; Sullivan AK. et al., 2005). Esta falta de asociación se podría ver justificada por dos posibles hipótesis:

1. El análisis del patrón de inactivación se ha realizado en sangre, no siendo éste el tejido adecuado.
2. El efecto tóxico propio de la premutación tiene lugar en un estado del desarrollo en el que todavía están activos ambos cromosomas X.

▪ Origen parental

Se ha discutido la influencia del origen parental del cromosoma X. En el año 2000, Hundscheid y colaboradores propusieron que el origen parental del alelo premutado tenía un efecto en la manifestación de la POI. Las mujeres que habían recibido la premutación de sus padres tenían mayor riesgo de adquirir POI que las que la habían recibido de sus madres, señalando la impronta genómica como un factor de riesgo de POI. Sin embargo, otros estudios no muestran evidencias claras de dicha asociación (Murray A. et al., 2000b; Sherman SL. 2000b; Vianna-Morgante AM. y Costa SS. 2000; Mallolas J. et al., 2001; Sullivan AK. et al., 2005).

- **Perfil hormonal y otras características del ciclo menstrual**

- **Hormona FSH**

Se ha observado que mujeres portadoras de la premutación que aún no presentan la menopausia muestran niveles más altos de FSH, signo de envejecimiento reproductivo, en comparación con las mujeres no portadoras (Murray A. et al., 1999b; Hundscheid RD. et al., 2001; Welt CK. et al., 2004). La FSH es una medida de la reserva ovárica y valores basales (día 2-5 del ciclo) de esta hormona superiores a 10 IU/L indican que esta reserva ovárica se encuentra disminuida, lo que normalmente va acompañado de una fertilidad reducida. Como ya se ha indicado en el apartado relativo a la menopausia, mujeres en esta fase presentan valores superiores a 40 IU/L. Sin embargo, Sullivan y colaboradores (2005) encontraron niveles elevados de FSH sólo en mujeres de 30-39 años portadoras de la premutación pero no en mujeres con edades superiores o inferiores, sugiriendo que portadoras de la premutación no tendrían problemas asociados a la función ovárica a edades tempranas. Recientemente, De Geyter y colaboradores (2014) estudiaron un grupo de 372 mujeres infértiles, de las cuáles 5 tenían alelos premutados y no hallaron una asociación entre los niveles de FSH y el número de repeticiones CGG.

- **Hormona AMH**

Varios estudios han mostrado que mujeres portadoras de la premutación muestran niveles más bajos de la hormona antimülleriana (AMH) (Rohr J. et al., 2008; De Caro JJ. et al., 2008). Estos autores analizaron los niveles de AMH en mujeres portadoras de alelos premutados con más y menos de 70 repeticiones y encontraron que los niveles de AMH eran significativamente menores en el grupo de mujeres con más de 70 CGGs, independientemente del grupo de edad (La FSH sólo era significativamente mayor en un rango medio de edad).

La AMH es un miembro de la familia de factores de crecimiento transformadores de tipo β (TFG- β) que se produce exclusivamente en las células de la granulosa de los folículos antrales y que, por tanto, refleja el tamaño de la reserva funcional del ovario,

es decir, el pool de folículos con capacidad de respuesta a un estímulo mediante FSH. Su nivel sérico basal es indicativo, por tanto, del número de folículos. Parece jugar un papel fundamental en el reclutamiento de la cohorte y en la transición de folículo primordial a folículo en desarrollo (Bonilla-Musoles F. et al., 2009).

Rohr y colaboradores (2008) demostraron que, en mujeres con un alto número de repeticiones CGG, la AMH es un marcador de declive ovárico temprano más adecuado que la FSH, además de ser más sensible a la hora de predecir los primeros signos de disfunción ovárica. Sin embargo, al igual que con la FSH, existen estudios que no han encontrado asociación entre los niveles de AMH y el número de repeticiones CGG (De Geyter C. et al., 2014; Kline J. et al., 2014).

- **Otros factores hormonales**

Welt y colaboradores (2004) propusieron que las mujeres portadoras de la premutación con ciclos menstruales debían tener un perfil hormonal característico de una senescencia ovárica avanzada. Analizaron otros marcadores indirectos de la reserva ovárica y encontraron que en estas mujeres se daba un descenso de la inhibina B en la fase folicular y una disminución de la inhibina A y progesterona en la fase lútea. Sin embargo no encontraron diferencias en los niveles de estradiol o LH.

En mujeres portadoras de la premutación con menopausia, la reducción en los niveles de estrógenos asociada a una menopausia a edades más tempranas se encuentra ligada a su vez a otros problemas de salud, incluyendo un riesgo mayor de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y una mayor mortalidad global. Hundscheid y colaboradores (2003) solamente encontraron una disminución estadísticamente significativa en la densidad mineral ósea en mujeres portadoras de la premutación.

- **Otras características**

En relación a otras características del ciclo menstrual en portadoras de la premutación:

- No se han encontrado diferencias en la edad de la menarquía (Allen EG. et al., 2007).
- Presentan más frecuentemente ciclos irregulares (Schwartz CE. et al., 1994) y además una fase folicular reducida que da lugar a ciclos más cortos (Welt CK. et al., 2004).
- Al estudiar mujeres portadoras de la premutación que no presentan signos de disfunción ovárica, se ha señalado que estas mujeres muestran una reducción en la edad media de la menopausia en comparación con las mujeres no portadoras (Hundscheid RD. et al., 2000; Murray A. et al., 2000a). Sullivan y colaboradores (2005) establecieron esta reducción en 5 años.
- Algunos estudios (Sherman SL. et al., 1996; Murray A. et al., 2000a; Hundscheid RD. et al., 2003) han analizado la asociación entre la premutación y un aumento en la tasa de gemelos dicigóticos. Se ha sugerido que esta asociación puede deberse al aumento en los niveles de FSH que daría lugar a su vez a un incremento de la ovulación múltiple. Aún así, esta asociación no está del todo clara, ya que no hay datos suficientes que confirmen la existencia de una mayor frecuencia de gemelos dicigóticos en mujeres portadoras de la premutación frente a mujeres no portadoras.

▪ Alelos premutados en mujeres con POI

Una vez la prevalencia de POI entre mujeres con premutación fue establecida, se condujeron diferentes estudios para conocer la frecuencia de alelos premutados entre mujeres con una insuficiencia ovárica primaria idiopática. Dichos trabajos han sido y continúan siendo importantes a la hora de establecer un criterio clínico que ayude a determinar aquellas mujeres que presentan una disfunción ovárica de causa desconocida que se beneficiarían de un análisis genético.

Conway y colaboradores (1995) fueron los primeros en llevar a cabo un análisis de este tipo en mujeres con POI idiopático. Analizaron 37 mujeres con POI entre las que no

encontraron ningún alelo con mutación completa, pero sí dos portadoras de alelos premutados en 9 mujeres con POI familiar. Llevaron a cabo nuevos análisis y concluyeron que la frecuencia de premutación en mujeres con POI esporádico y POI familiar era de 1,6 % y 16 % respectivamente.

Tras el estudio de Conway y colaboradores, han sido varios los autores que han examinado grupos de mujeres con POI a partir de clínicas de infertilidad, clínicas de ginecología, laboratorios genéticos o muestras generales. En estos estudios, la frecuencia de premutación depende del diseño de cada estudio. Teniendo en cuenta aquellos realizados a partir de clínicas de reproducción que separan claramente las mujeres con POI esporádico de el familiar, la estimación de portadoras de premutación es de 3,2 % y 11,5 % respectivamente (Sherman SL. et al., 2007; De Caro JJ. et al., 2008).

b. POI y alelos intermedios

La POI se ha relacionado también con los alelos intermedios del gen FMR1 (Bretherick KL. et al., 2005; Bodega B. et al., 2006). Bretherick y colaboradores (2005) encontraron que el 14,2 % de los alelos en mujeres con POI tenía entre 35 y 54 repeticiones CGG. Bodega y colaboradores (2006) propusieron que esta relación entre los alelos intermedios y la POI podría depender del patrón de interrupciones AGG. Otros autores, en cambio, no han encontrado dicha asociación, siendo la frecuencia de alelos intermedios similar tanto en pacientes como en controles (Bennett CE. et al., 2010).

Pastore y colaboradores (2012) encontraron que alelos entre 35 y 44 CGGs estaban sobrerrepresentados en mujeres con una reserva ovárica disminuida que todavía presentaban menstruaciones. Streuli y colaboradores (2009) también hallaron un mayor porcentaje de alelos con más de 40 repeticiones (22 % vs. 3 %) en mujeres con una insuficiencia ovárica primaria oculta. Karimov y colaboradores (2011) publicaron resultados similares en la frecuencia de alelos intermedios y premutados en estas mujeres.

De acuerdo con lo señalado, en las mujeres con alelos intermedios y premutados del gen FMR1, se da una continua pérdida de reserva ovárica que puede dar lugar a ciclos menstruales irregulares, descenso en la fertilidad o fluctuaciones hormonales. Estos alelos tienen, por tanto, un riesgo de sufrir una insuficiencia ovárica que incluya una menor fecundidad y una respuesta ovárica deficiente. Para abarcar todos estos síntomas, Welt propuso en 2008 el uso del término **insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil (FXPOI; OMIM #300264)** para los casos en que la disfunción ovárica estuviera asociada al gen FMR1.

c. Mecanismos celulares y moleculares

Los mecanismos moleculares que comprometen la función ovárica son desconocidos. Se propone que podrían ocurrir en diferentes estadios del desarrollo folicular (Sherman SL. et al., 2007) pudiendo verse relacionados con:

- Una disminución inicial de la reserva ovárica
- Alteraciones en el reclutamiento folicular
- Incremento de la atresia folicular
- Alteración en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal

La proteína FMRP se expresa en diversas áreas que pueden afectar a cualquiera de estos procesos como son el cerebro y regiones críticas para la regulación hormonal. Investigaciones recientes en ovario de rata han demostrado que FMRP también se expresa en células de la granulosa y de la teca y en células germinales durante todas las etapas del desarrollo folicular (Ferder I. et al., 2013). Un estudio realizado en un varón con FXTAS mostró la presencia de inclusiones intranucleares en neuronas de la glándula pituitaria (Greco CM. et al., 2007). Las células gonadotróficas de la glándula pituitaria producen y secretan FSH y LH, fundamentales hormonas reguladoras del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Un defecto en la producción de estas hormonas daría lugar a un reclutamiento folicular alterado en mujeres portadoras de la premutación.

Una cuestión importante es conocer por qué esta disfunción ovárica se encuentra limitada a las mujeres portadoras de alelos premutados e intermedios, mientras que no se observa en portadoras de la mutación completa. Los niveles de mRNA generados por la transcripción del gen FMR1 son más altos en los portadores de alelos premutados e intermedios, por lo que se ha propuesto un efecto directo o indirecto de este aumento de mRNA, al igual que ocurre en el FXTAS.

Conway y colaboradores (1995) fueron los primeros en sugerir un efecto tóxico de los altos niveles de mRNA generados que podrían dar lugar a una reducción de la reserva ovárica antes del nacimiento. Otra hipótesis propuesta ha sido la desubicación de los transcritos (Murray A. et al., 1998). Sullivan y colaboradores (2005) sugirieron que la disfunción ovárica asociada a los alelos premutados e intermedios podría ser considerada como un desorden de aparición tardía. Se acumularía el efecto tóxico del mRNA produciendo un aumento en la atresia o apoptosis de los folículos.

Investigaciones más recientes han señalado que existe una elevada expresión de FMRP tanto en ovocitos como en células de la granulosa en ovarios de mujer durante la foliculogénesis (Figura I.15).

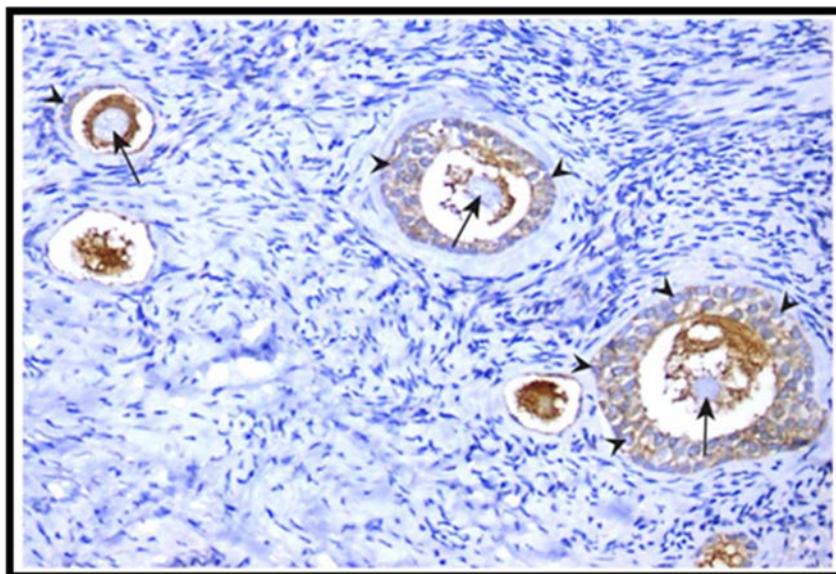


Figura I. 15: Expresión de FMRP en ovarios humanos. Tomado de Willemsen R. et al., 2011

En el rango de la premutación existiría una elevada cantidad de mRNA en los ovarios y por tanto una alta toxicidad. También señalaron que es posible que el tamaño de la repetición confiera una conformación específica al mRNA y que por tanto, la interacción con otras proteínas y mRNAs dependa de esta conformación (Willemsen R. et al., 2011).

Lu y colaboradores (2012) analizaron un ratón portador de un alelo premutado en el que observaron que el aumento de mRNA que se produce en este rango de repeticiones es suficiente para causar una reducción en el número de folículos en los ovarios dando lugar a una fertilidad deficiente. Sin embargo, Hoffman y colaboradores (2012) han demostrado, también en modelo de ratón, que el desarrollo y establecimiento del pool de folículos primordiales es normal, pero que se produce una pérdida acelerada de folículos, sugiriendo que el problema es intrínseco al ovario. Han observado además anomalías en estos folículos, incluyendo un tamaño reducido y un bajo número de células de la granulosa.

Es interesante comentar también la clasificación que hacen Gleicher y colaboradores en relación al número de repeticiones CGG y su correlación con los mecanismos celulares y moleculares (Gleicher N. et al., 2010a, 2012a, 2012b):

- **Clasificación**

Estos autores consideran el rango normal entre 26 y 34 CGG (media de 30 CCG) y diferencian en mujeres tres genotipos, normal cuando ambos alelos se encuentran dentro del rango normal, heterocigoto cuando uno de los alelos está fuera del rango normal y homocigoto cuando los dos alelos están fuera del rango normal. Dentro de los llamados heterocigotos y homocigotos diferencian a su vez varios subgenotipos dependiendo de si el alelo o alelos fuera del rango normal se encuentra(n) por encima (alto) o por debajo (bajo) de este rango. De esta manera dentro de las mujeres heterocigotas diferencian entre heterocigoto normal/bajo cuando un alelo está en el rango normal y otro por debajo de 26 CGG y heterocigoto normal/alto con un alelo

normal y otro por encima de 34 CGG. Dentro de los homocigotos, diferencian entre homocigoto bajo/bajo, alto/bajo o alto/alto.

- **Correlación**

El subgenotipo heterocigoto normal/bajo lo han relacionado con un patrón de envejecimiento ovárico específico, caracterizado por un reclutamiento folicular abundante y por tanto, una reserva ovárica funcional excesiva a edades tempranas. Este reclutamiento folicular activo lleva a un agotamiento rápido de la reserva ovárica funcional y da lugar a una reserva ovárica disminuida a edades tempranas (Gleicher N. et al., 2010b, 2012a, 2013a). También han asociado este subgenotipo a un mayor riesgo autoinmune (Gleicher N. et al., 2010b). Por otro lado han relacionado este subgenotipo con mutaciones en BRCA1/2, de modo que mujeres con mutaciones en estos genes mostraban en un porcentaje elevado el subgenotipo heterocigoto normal/bajo (Gleicher N. et al., 2013b, Weghofer A. et al., 2012). Recientemente, han rechazado que exista una correlación entre BRCA y FMR1 en mujeres con cáncer de ovario (Gleicher N. et al., 2014a).

3.7.4. Relación con el cáncer

Desde hace unos años se investiga la relación entre la proteína FMRP y el cáncer. De hecho se ha visto que los pacientes con FXS tienen un riesgo menor de sufrir cáncer (Schultz-Pedersen S. et al., 2001), una menor expresión del oncogén Wnt7 (Rosales-Reynoso MA. et al., 2010) y un descenso en la invasión de tumores cerebrales (Kalkunte R. et al., 2007). En 2013, Lucá y colaboradores señalaron que los niveles de FMRP y FMR1-mRNA se correlacionan con marcadores genéticos del cáncer de mama agresivo y con la probabilidad de que éste metastatice en el pulmón. Este estudio ha encontrado que la proteína FMRP se encuentra altamente expresada en cáncer de mama y que altos niveles de FMR1-mRNA se asocian a una mayor probabilidad de que pacientes con cáncer de mama sufran una metástasis en el pulmón. Sus resultados sugieren también que FMRP actúa como regulador de un grupo de mRNAs relacionados con la progresión del cáncer.

3.7.5. Otras patologías asociadas

En individuos portadores de la premutación, además de la FXPOI y el FXTAS, se han descrito problemas psiquiátricos en adultos y problemas en el desarrollo neuronal que incluyen retraso en el desarrollo y déficit social y de comportamiento. Estos últimos incluyen a su vez discapacidad intelectual, problemas de atención (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD), trastorno del espectro del autismo (*Autistic Spectrum Disorder*, ASD) y un aumento en la frecuencia de ataques epilépticos en la infancia. Farzin y colaboradores (2006) detectaron una mayor tasa de ASD (79 % vs. 0 %, $p < 0.001$) y ADHD (93 % vs. 13 %, $p < 0.0001$) en portadores de la premutación en comparación con controles. El ASD también se ha visto asociado a alelos intermedios del gen FMR1 (Loesch DZ. et al., 2009).

Chonchaiya y colaboradores (2012) encontraron que los ataques epilépticos se daban con mayor frecuencia entre portadores de alelos premutados en comparación con la población normal (28 % vs. 1 %). Desórdenes de tipo inmune como la fibromialgia o el hipotiroidismo se han visto asociados a mujeres portadoras de alelos premutados (Coffey SM. et al., 2008; Winarni TI. et al., 2012). También se asocian a la premutación otros problemas como depresión (Roberts JE. et al., 2009), ansiedad (Bourgeois JA. et al., 2011), migrañas (Au J. et al., 2013), hipertensión o apnea del sueño (Hamlin AA. et al., 2011, 2012).

Se ha propuesto recientemente el término “**desorden del espectro X frágil**” (FXSD; *Fragile X spectrum disorder*) para remarcar la continuidad existente en la implicación clínica desde los alelos intermedios hasta los alelos mutados del gen FMR1 (Lozano R. et al., 2014).

4. GEN FMR2

El gen FMR2, también llamado **AFF2** se localiza en Xq28 (Figura I.16), a unos 150-600 kb del gen FMR1. Coincide con el sitio frágil **FRAXE**, un *locus* frágil raro y sensible al folato, identificado por Sutherland y Baker en 1992.

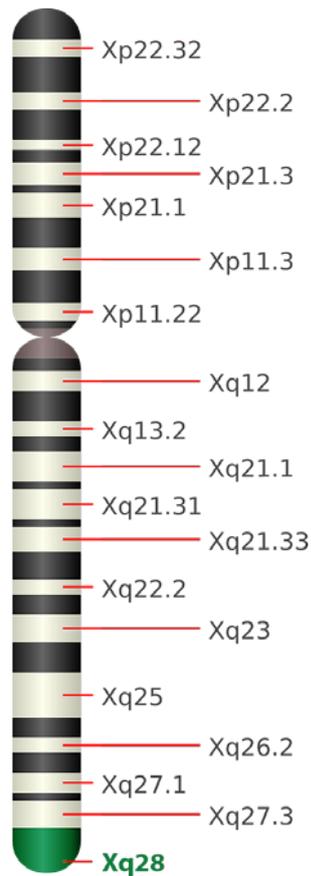


Figura I. 16: Localización del gen FMR2 en el *locus* Xq28

4.1. CARACTERÍSTICAS

El análisis de pacientes con retraso mental cuya patología podía estar asociada al cromosoma X llevó al descubrimiento del FS FRAXE. Como ya se ha señalado previamente la investigación llevada a cabo en un número grande de pacientes con retraso mental asociado a un FS expresado en la región distal del brazo q del

cromosoma X permitió aislar y caracterizar el FS FRAXA y el gen FMR1. Estas investigaciones señalaron también que:

- En algunos individuos con retraso mental y en sus familias la repetición CGG del gen FMR1 no mostraba la expansión.
- Con cierta frecuencia se expresaba un FS en la región cromosómica Xq27.3-q28.

Estudios posteriores demostraron que en esta región había dos FS sensibles al folato, FRAXE y FRAXF (Sutherland y Baker 1992; Parrish et al., 1994) (Figura I.17). En 1993 se aisló un fragmento de DNA que contenía el FS FRAXE y se detectó la presencia de una secuencia CCG repetida en tándem que se propuso como responsable de la expresión del FS que tiene su *locus* en Xq28 (Knight et al., 1993).

Los trabajos de tres grupos de investigación (Chakrabarti L. et al., 1996; Gecz J. et al., 1996; Gu Y. et al., 1996) permitieron identificar en 1996 un gen relacionado con retraso mental al que se denominó FMR2 porque, después del FMR1, era el segundo gen relacionado con retraso mental y ligado al cromosoma X. Fue el primer gen relacionado con un XLMR familiar no específico (Gecz J. 2000).

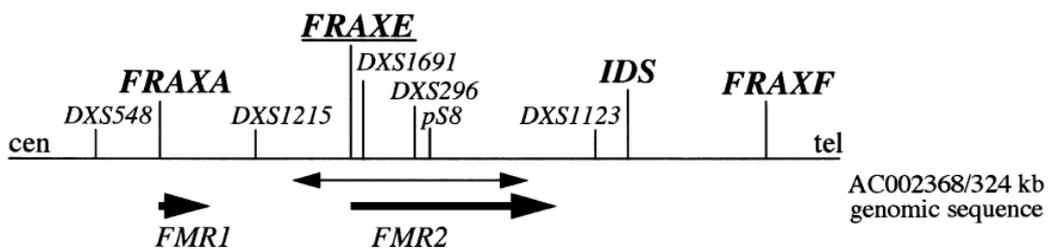


Figura I. 17: Región de los sitios frágiles sensibles al folato FRAXA, FRAXE y FRAXF en Xq27.3-q28

El gen FMR2 es un gen largo que se organiza en 21 exones (Gecz J. et al., 1997). El exón más grande es el 11, con 1001 bp. El intrón más grande es el 1, con 150855 bp. El segundo en tamaño es el intrón 3 con 147110 bp. El gen contiene aproximadamente 500 kb. Posee una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio de activación muy conservado. La región 3'UTR tiene 9,2 kb.

La región 5'UTR tiene un trinucleótido CCG repetido en tándem. La repetición CCG del gen FMR2, al igual que la repetición CGG del gen FMR1, es polimórfica en la población general aunque en este gen es una repetición pura sin interrupciones. Los alelos del rango considerado como normal tienen entre 6 y 30 CCGs y son estables durante su transmisión. La frecuencia más alta encontrada en la población general oscila entre 16 y 18 repeticiones. Los alelos intermedios (31-60 CCGs) pueden variar ligeramente en número cuando son transmitidos de padres a hijos. Los alelos premutados (61-200 CCGs) pueden expandirse a mutación completa (>200 CCGs). La expansión da lugar a la metilación de la isla CpG situada en la región promotora y como consecuencia al silenciamiento del gen FMR2.

Durante la maduración del pre-RNA la eliminación de intrones presenta un *splicing* alternativo para los exones 2, 3, 5, 7 y 21. Las proteínas generadas son isoformas a excepción de una forma pequeña (aproximadamente 437 aminoácidos) cuyo transcrito finaliza en el exón 10. Se ha descrito un transcrito de 8,75 kb que se localiza en la placenta, fibroblastos adultos y cerebro adulto (Gecz J. et al, 1997), un transcrito de 9,5 kb expresado en el hipocampo y en la amígdala (Chakrabarti L. et al., 1996) y una isoforma de 13,7 kb expresada en el cerebro fetal (Gecz J. y Mulley JC. 1999). Esta última es la isoforma más larga, está compuesta por 1311 aminoácidos y contiene dos NLS.

4.2. PROTEÍNA AFF2/FMR2

La proteína codificada por el gen, denominada con el mismo nombre (**AFF2/FMR2**) se localiza en las llamadas “manchas” o “speckles” nucleares, que son estructuras intranucleares consideradas como lugares de almacenamiento o modificación de factores relacionados con el *splicing* del pre-mRNA. Es una proteína de unión al RNA involucrada en la regulación del *splicing* alternativo mediante su interacción con la estructura G-quartet del RNA (Bensaid M. et al., 2009).

AFF2/FMR2 forma parte de una familia génica denominada AFF o AF4/FMR2 de genes dispersos. Esta familia está formada por cuatro genes:

- AFF2/FMR2 en el cromosoma X y en el *locus* cromosómico Xq28.
- AFF1/AF4 (Morrissey J. et al., 1993) en el cromosoma 4 y en el *locus* cromosómico 4q21.
- AFF3/LAF4 (Ma C. et al., 1996) en el cromosoma 2 y en el *locus* cromosómico 2q11.2-q12.
- AFF4/AF5q31 (Taki T. et al., 1999) en el cromosoma 5 y en el *locus* cromosómico 5q31.

Entre el 60-88 % de las proteínas de esta familia génica tiene dominios de homología:

- Dominios N-terminal de 90 aminoácidos (NTD).
- AFF1/AF4, AFF2/FMR2 y AFF3/LAF4 contienen una secuencia de 175 aminoácidos que es un dominio de homología.
- Una secuencia de 64 aminoácidos rica en serina que es un dominio de activación (AD).
- Una secuencia de 20 aminoácidos que es una NLS.
- Una secuencia de 240 aminoácidos que es un dominio homólogo C-terminal.

El grado de homología entre FMR2 y las proteínas de la familia génica es 24 % con AFF1/AF4, 20 % con AFF3/LAF4 y 30 % con AFF4/AF5q31

AFF2/FMR2 destaca por encima del resto de miembros de su familia como un potente activador transcripcional (Hillman MA. y Gecz J. 2001). Su papel en el desarrollo cerebral no es del todo conocido. Se conoce que FMR2 se expresa en el cerebro, en regiones de síntesis de neuronas por lo que se ha sugerido un papel en la diferenciación neuronal. En *Drosophila*, el gen Lilliputian (Lilli), el único ortólogo conocido de la familia AFF, es indispensable para una correcta embriogénesis (Tang AH. et al., 2001).

4.3. SÍNDROME FRÁGIL XE

La expansión a mutación completa de la repetición CCG en la región 5'UTR del gen FMR2 y como consecuencia la ausencia de la proteína producida por el gen (Stettner GM. et al., 2011), da lugar al **síndrome frágil XE** o retraso mental ligado a FRAXE (FRAXE, #309548). Éste conlleva una discapacidad intelectual no sindrómica que afecta aproximadamente a 1:25000-1:50000 varones nacidos (Chiurazzi P. et al., 2008). Las características del síndrome son:

- Retraso mental: de medio a moderado ($50 < IQ < 85$).
- Déficit de comportamiento: problemas de atención, hiperactividad, comportamiento autista, esquizofrenia y desorden obsesivo-compulsivo (Bensaid M. et al., 2009).
- Alteraciones en el fenotipo: cara alargada, hipoplasia facial, dientes irregulares, anomalías nasales, clinodactilia.

También se han descrito individuos afectados con deleciones completas del gen FMR2 (Gedeon AK. et al., 1995; Gecz J. et al, 1996; Stettner GM. et al., 2011; Sahoo T. et al., 2011), microdeleciones, mutaciones puntuales e inserciones.

La expresión de FS FRAXE no está siempre relacionada con retraso mental. Algunos estudios familiares han señalado que varones citogenéticamente positivos para FRAXE y portadores de la mutación completa metilada no muestran una discapacidad intelectual. De acuerdo con lo señalado, aunque todos los pacientes con mutación completa tienen ausencia de la proteína FMR2, no todos los pacientes que no expresan el gen FMR2 tienen un retraso mental (Gu Y. y Nelson DL. 2003). Hay varias hipótesis propuestas para explicar este hecho:

- Mosaicismo en la repetición CCG y en la metilación: se propone que el grado de metilación y expansión en el cerebro o en el sistema nervioso central puede ser diferente del de las células utilizadas en el análisis (linfocitos o fibroblastos).

- Variación en el momento de la metilación entre individuos y/o tejidos: esto puede originar diferentes efectos en la diferenciación y función celular, dando lugar a diferentes fenotipos.
- Redundancia génica: FMR2 forma parte de una familia génica. Los genes de esta familia se expresan en el cerebro, especialmente en el cerebro fetal. Es posible por tanto que los efectos de la deficiencia de FMR2 puedan ser compensados por las proteínas generadas por otros genes de la familia.

4.4. INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA ASOCIADA AL GEN FMR2

Desde la identificación del gen FMR2 en 1996 además de la contribución de FRAXE/FMR2 en la etiología del XLMR, el gen FMR2 se ha asociado también a otros fenotipos, entre ellos, la insuficiencia ovárica primaria (Murray A. et al., 1998, 1999a).

Basándose en los estudios de portadores de expansiones del trinucleótido CGG en la región 5'UTR del gen FMR1, Murray y colaboradores (1998) realizaron un análisis a 147 mujeres con insuficiencia ovárica primaria. Entre las 147 mujeres analizadas, 6 tenían el gen FMR1 premutado. En relación al gen FMR2, ninguna de ellas tenía el gen mutado o premutado, sin embargo, había un número elevado de mujeres con alelos de menos de 11 repeticiones CCG. El porcentaje de alelos con menos de 11 repeticiones era del 1,5 % en mujeres con POI y sólo del 0,04 % en la población general femenina.

Se ha encontrado también una asociación entre los alelos con menos de 11 repeticiones CCG del gen FMR2 y los alelos premutados del gen FMR1. A pesar de los resultados obtenidos, la relación entre la expansión CCG del gen FMR2 y la POI no está confirmada.

OBJETIVOS

Desde la identificación del gen FMR1 en 1991, han sido varios los autores que han estudiado su asociación con una insuficiencia ovárica primaria (POI) en mujeres.

El término insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil (FXPOI) se ha propuesto en aquellos casos en los que la disfunción ovárica esté asociada al gen FMR1:

- Aproximadamente el 16 % de las mujeres portadoras de alelos premutados sufren POI, mientras que alelos en este rango se encuentran en el 3,2 % de mujeres con POI y en el 11,5 % de mujeres con historia familiar de POI.
- La insuficiencia ovárica primaria también se ha asociado a alelos en la zona gris o intermedios. Mujeres portadoras de estos alelos pueden sufrir una disminución en su reserva ovárica que dé lugar a ciclos menstruales irregulares, fluctuaciones hormonales o fertilidad disminuida.

Los estudios realizados desde 1998 no han encontrado una relación entre los alelos mutados del gen FMR2 y POI. Sin embargo, si se ha encontrado una correlación entre los alelos pequeños con menos de 11 repeticiones CCG y la insuficiencia ovárica primaria. El porcentaje de alelos con un número de repeticiones menor que 11 es del 1,5 % en mujeres con POI y sólo del 0,04 % en la población general femenina.

Se ha encontrado también una asociación entre los alelos con menos de 11 repeticiones CCG del gen FMR2 y los alelos premutados del gen FMR1. A pesar de los resultados obtenidos, la relación entre la expansión CCG del gen FMR2 y POI no está confirmada.

El **objetivo principal de esta Tesis** es analizar la contribución de los genes FMR1 y FMR2 en el desarrollo de problemas de índole reproductivo en una muestra de pacientes con una disfunción ovárica de etiología no conocida del País Vasco. Esta muestra de pacientes se ha comparado con una muestra control con una vida reproductiva normal.

Para cumplir con este objetivo general, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar la longitud de la repetición CGG del gen FMR1 y determinar la distribución de frecuencias alélicas en función de las cuatro clases alélicas definidas (normal, zona gris o intermedia, premutación, mutación completa).

2. Evaluar la estructura interna de la secuencia repetitiva: el número y posición de las interrupciones AGG en la secuencia CGG. Este objetivo incluye, a su vez, el análisis de:
 - El número de interrupciones para determinar si la pérdida de interrupciones es un factor determinante en la expansión de la secuencia repetitiva.
 - La longitud de repeticiones puras, sin interrupciones AGG, que identificará la existencia de alelos potencialmente inestables.
 - La posición del tracto con repeticiones puras largas. Se analizará la existencia de una determinada polaridad en la variabilidad de la repetición, es decir, si existe una preferencia en la posición del tracto con repeticiones puras largas.

3. Analizar la longitud de la repetición CCG del gen FMR2 y determinar la distribución de frecuencias alélicas en función de las cuatro clases alélicas definidas (normal, intermedia, premutación, mutación completa).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRA ANALIZADA

El conjunto de la muestra de pacientes y control abarca un total de 115 mujeres. Todas las personas que conforman la muestra mostraron su conformidad en participar en el estudio y accedieron a firmar un consentimiento informado (anexos 1 y 2). A cada muestra se le asignó un código que consiste en una letra, P o C según sean pacientes o control respectivamente, seguida de un número para diferenciar a cada individuo del mismo grupo (P1-P68 y C1-C47).

1.1. PACIENTES

El grupo de pacientes está compuesto por 68 mujeres que presentaban una disfunción ovárica de causa desconocida. Las muestras se han obtenido a través de Centros de Reproducción Asistida, Ginecología y Obstetricia del País Vasco.

De todas ellas se obtuvo un informe completado por su especialista en infertilidad que incluía datos relacionados con su condición reproductiva, junto con datos relativos a edad, hábitos tabáquicos y enfermedades propias o de familiares que pudieran estar relacionadas con el síndrome del X frágil.

La media de edad de este grupo es de $36 \pm 4,31$ años (rango de 23 a 55 años).

1.1.1. Subgrupos

El grupo de pacientes se ha dividido en tres subgrupos:

- a. **Grupo 1:** incluye mujeres con ciclos irregulares, fecundidad reducida y niveles de la hormona FSH <10 IU/L.
- b. **Grupo 2:** incluye mujeres con ciclos irregulares, fecundidad reducida y elevados niveles de FSH (≥ 10 IU/L).

- c. **Grupo 3:** incluye mujeres que presentaron amenorrea al menos durante cuatro meses consecutivos y niveles de FSH ≥ 10 IU/L.

Según la clasificación de Welt (2008) el grupo 1 se incluiría en la definición de mujeres con insuficiencia ovárica primaria oculta. El grupo 2 correspondería a una insuficiencia ovárica primaria bioquímica. Las mujeres del grupo 3 se clasificarían como mujeres con insuficiencia ovárica primaria patente.

1.2. CONTROL

El grupo control está compuesto por 47 mujeres sin ningún problema de índole reproductiva.

La media de edad de este grupo es de $43,23 \pm 20,83$ años (rango de 20 a 83 años).

2. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1. EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

La extracción de DNA a partir de leucocitos de sangre periférica se ha realizado mediante métodos tradicionales (Sambrook J. et al., 1989). Para ello se recogen de 10 a 20 ml de sangre periférica en tubos provistos con el anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®). Posteriormente, los pasos a realizar para la obtención del DNA son los siguientes:

2.1.1. Separación de células sanguíneas

La sangre se lava mediante la adición de Suero Fisiológico recién hecho hasta alcanzar unos 45 ml totales. Posteriormente se centrifuga durante 15 minutos a 4 °C y 3000-5000 rpm. De esta manera se obtiene un *pellet* formado por un botón de células rojas y una capa de células blancas sobre su superficie. Se elimina el sobrenadante con cuidado de no eliminar la capa de células blancas que contiene los leucocitos. Se repite el proceso una segunda vez para un óptimo lavado de las células, añadiendo en este caso hasta 35 ml de Suero Fisiológico.

2.1.2. Lisis de hematíes

A continuación se procede a lisar las células rojas para su eliminación, conservando así las células blancas. Para ello se añade al paquete celular un Tampón de Lisis de Eritrocitos hasta alcanzar un volumen de 45 ml dejando actuar durante 30 minutos a 4 °C, agitando de vez en cuando. Se centrifuga durante 15 minutos a 4 °C y 3000 rpm. El sobrenadante se elimina por decantación, obteniendo un *pellet* compuesto únicamente por células blancas. Este proceso se repite también, alcanzando los 35 ml, para conseguir una mayor pureza.

2.1.3. Lisis de leucocitos y digestión de proteínas

Una vez que ya se dispone de las células blancas, se procederá a su lisis mediante la adición de 25 ml de Nonidet P-40, un detergente que disuelve lípidos y aminoácidos, y a la centrifugación durante 15 minutos a 4 °C y 3500 rpm. A continuación, una vez eliminado el sobrenadante por decantación, se prosigue con la digestión de lípidos y proteínas mediante la adición de 10 ml de Solución A y 200 µl de Proteinasa k, que deberá actuar a 56 °C durante 8-12 horas.

2.1.4. Fenolización del DNA

Una vez degradados los lípidos y proteínas celulares se procederá a arrastrarlos mediante un proceso de fenolización. Para ello se añaden 10 ml de la solución Fenol/Cloroformo/Isoamílico. Debe agitarse la mezcla vigorosamente hasta su completa homogenización y centrifugarse durante 10 minutos a 8 °C y 3000 rpm. Tras la centrifugación aparecerán dos fases, la inferior que contiene el Fenol debe desecharse mientras que la superior contendrá el DNA. Este paso se repite para eliminar correctamente los lípidos y proteínas.

Posteriormente se añaden 10 ml de la solución Cloroformo/Isoamílico, lo que eliminará los restos de Fenol. La mezcla debe también agitarse vigorosamente y centrifugarse del mismo modo, desechando de nuevo la fase inferior.

2.1.5. Precipitación del DNA con etanol

Tras los pasos previos se dispone del DNA en una fase acuosa, y se procede a su precipitación. Para ello se añaden 800 µl de solución de Cloruro Sódico 5 M y se agita la muestra suavemente. A continuación se añaden 20 ml de Etanol Absoluto frío (-20 °C) invirtiendo la mezcla suavemente hasta ver aparecer el DNA en forma de precipitado blanco fibroso. La “medusa” de DNA debe lavarse en una solución de Etanol al 70 % y finalmente se disuelve en 0,5-1 ml de agua ultrapura.

2.2. ANÁLISIS DEL DNA EXTRAÍDO

2.2.1. Cuantificación

La cuantificación del DNA extraído nos permite, por un lado, cuantificar la concentración de DNA de la que se dispone y, por otro lado, determinar su pureza. El procedimiento se lleva a cabo mediante un espectrofotómetro que nos proporciona la medida de absorbancia de la luz ultravioleta a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. El DNA tiene un máximo de absorción a 260 nm. Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm. La relación entre ambas absorbancias es indicativa de la pureza del DNA y es aconsejable que oscile entre 1,6 y 2. Para la cuantificación del DNA se debe tener en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg de DNA /ml.

2.2.2. Gen FMR1

a. Tamaño de la repetición CGG

El tamaño de la repetición CGG del gen FMR1 se ha analizado mediante el kit comercial “Abbott Fragile X kit”. Una ventaja de este kit es que incluye dos tipos de primers, uno específico para la región amplificada del gen FMR1 y otro que amplifica una región control (llamado en el kit Gender primer). Este último amplifica una región de 203 bp en el cromosoma X y una región de 107 bp en el cromosoma Y, de forma que sirve de control interno tanto para muestras de origen masculino como femenino.

Se deben realizar diferentes pasos que incluyen:

- **Amplificación de la repetición CGG por PCR**

Las amplificaciones por PCR se realizan en un volumen total de reacción de 20 µl. Cada reacción contiene: 1,4 µl de agua ultrapura, 13 µl de High GC PCR Buffer, 0,6 µl de

Gender Primer, 0,8 µl de FMR1 Primer, 1,2 µl de TR PCR Enzyme Mix y 3 µl de DNA genómico (20 ng/µl).

Hay que tener en cuenta que los primers son fotosensibles por lo que durante su mezcla deben estar protegidos de la luz. Es conveniente realizar todo el proceso a 4 °C. Para una mezcla adecuada de los componentes se ha centrifugado el mix durante 10-20 segundos entre 500-2000 xg. Las reacciones de PCR en este trabajo se han llevado a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Las condiciones de la amplificación se describen en la Tabla III.1.

Tabla III. 1: Condiciones para la amplificación de la repetición CGG

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
98,5	10 segundos	15
58,0	1 minuto	
75,0	6 minutos	
98,5 (↑ 0,1°C /ciclo)	10 segundos	15
56,0	1 minuto	
75,0	6 minutos	
4	Infinito	

▪ **Electroforesis para comprobar el producto de dicha amplificación**

Para comprobar que la amplificación se ha llevado a cabo correctamente se visualiza el producto de la PCR en un gel de agarosa al 2,5 % en solución TAE 1X. El producto de la PCR que va a ser testado se mezcla con un tampón de carga con dos objetivos, por una parte al aportar una mayor densidad impide que la muestra se salga del pocillo y por otra permite calcular el momento de finalización de la electroforesis gracias al colorante que lleva en su composición. Se carga también un marcador de tamaño. Una vez cargado el gel se realiza la electroforesis a 100 voltios. El buffer utilizado es, al igual

que en la elaboración del gel, TAE 1X. Una vez terminada la electroforesis se comprueban el tamaño de las bandas en un transiluminador.

▪ **Limpieza de los productos de la PCR**

Una vez se ha comprobado que la amplificación ha sido óptima se procede a la limpieza del producto de la PCR. Para ello se realiza una mezcla de 3 µl del enzima Clean Up (incluida en el kit) y 2 µl del producto de PCR y ésta se mantiene durante 10 minutos a 75 °C.

▪ **Electroforesis capilar para determinar el tamaño de los amplificadores**

Se determina el tamaño de las amplificaciones mediante una electroforesis capilar. Previamente debe añadirse al producto de la PCR ya limpio una mezcla de 3 µl del marcador de tamaño ROX 1000 (incluido en el kit) y 17 µl de Formamida. La mezcla se calienta a 93 °C durante 30 segundos para desnaturalizar el DNA. Transcurridos los 30 segundos se deja bajar la temperatura de la mezcla hasta 25 °C. A esta temperatura las muestras están preparadas para su migración en el secuenciador automático.

El modelo de secuenciador automático utilizado ha sido el ABI 3130XL (Applied Biosystems). Para cada muestra se realizan dos electroforesis, una para fragmentos pequeños (5-70 CGGs) y otra para fragmentos grandes (65-645 CGGs). Las condiciones de ambas carreras se señalan en el anexo 3. Los resultados han sido analizados con el software Genescan 3.7 (Applied Biosystems).

Tras la electroforesis capilar obtenemos el número de pares de bases de cada alelo, pero para calcular el número de repeticiones CGG se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Repeticiones CGG} = (\text{Tamaño bp} - 193) / 3$$

b. Número y posición de las interrupciones AGG

Las interrupciones AGG se han determinado mediante la técnica “Triplet-Primed PCR” o TP-PCR. Esta técnica se basa en una reacción de PCR con tres primers, dos son específicos del gen FMR1 y otro es complementario a la región de repeticiones del triplete CGG. Para esta técnica hemos utilizado el kit comercial “AmplideX™ FMR1 PCR” (Asuragen).

Los componentes y los volúmenes utilizados en la reacción de PCR se muestran en la Tabla III.2.

Tabla III. 2: Componentes utilizados en TP-PCR

Reactivo	Volumen
Tampón de amplificación	11,45 µl
Primers F, R FAM FMR1	0,50 µl
Primer CGG FMR1	0,50 µl
Diluyente	0,50 µl
Mezcla de polimerasa	0,05 µl
gDNA (20 ng/ µl)	2 µl
Volumen total	15,00 µl

Las condiciones de la amplificación son las siguientes:

- 5 minutos de incubación a 95 °C
- 10 ciclos de 35 segundos de desnaturalización a 95 °C, 35 segundos de annealing a 62 °C y 4 minutos de extensión a 68 °C
- 20 ciclos de 35 segundos de desnaturalización a 97 °C, 35 segundos de annealing a 62 °C y 4 minutos + 20 segundos/ciclo de extensión a 68 °C
- 10 minutos de extensión final a 72 °C

El electroferograma resultante incluye los productos de PCR de longitud completa generados a partir de los primers específicos que abarcan la región de repeticiones CGG y los picos de repeticiones CGG obtenidos por la TP-PCR (Figura III.1 y Figura III.2). Los productos de esta PCR corresponden a los amplicones de las PCRs individuales de cada combinación del primer repetido con el primer inverso. Los picos correspondientes a las repeticiones CGG están separados por 3 bp, como es de esperar. El perfil de picos ofrece una información de confirmación sobre la cigosidad y la presencia de secuencias AGG intercaladas.

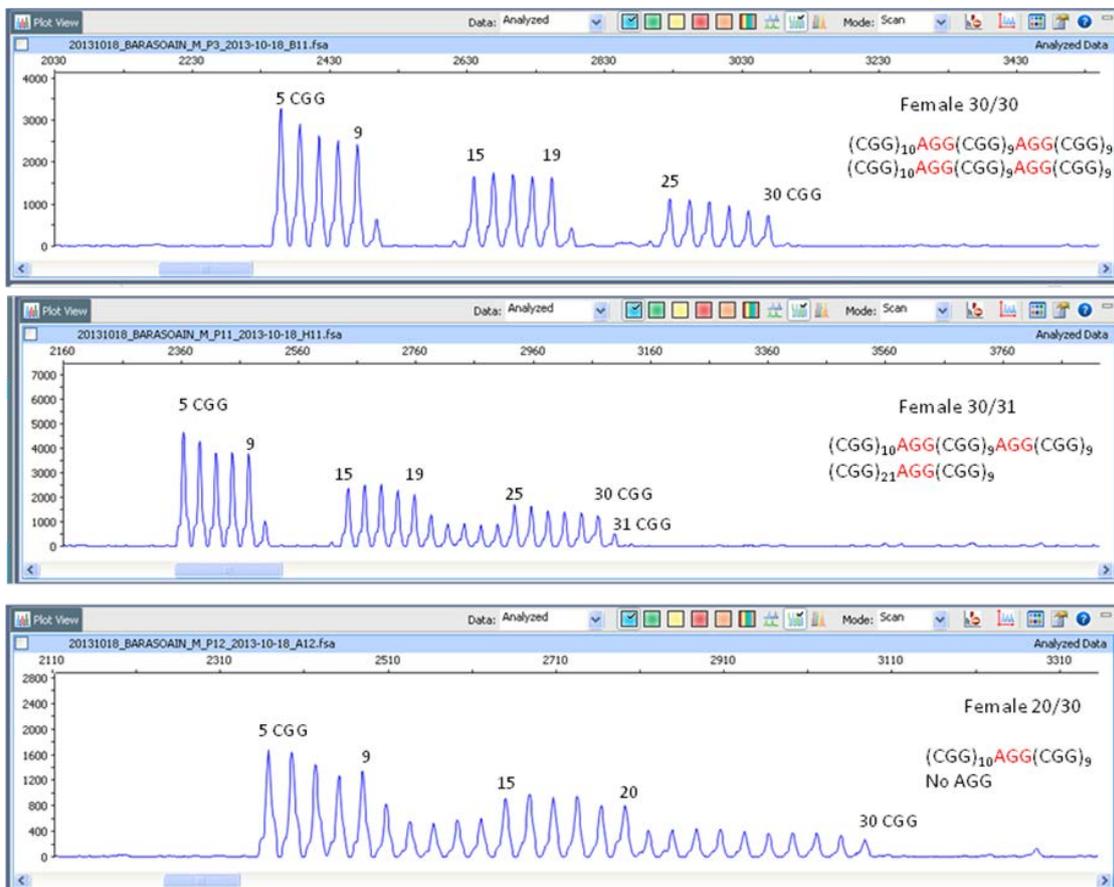


Figura III. 2: Ejemplos de electroferogramas resultantes de la TP-PCR

c. Secuenciación

El proceso de secuenciación ha sido utilizado para complementar los resultados de la TP-PCR debido a la complejidad del análisis del cromosoma X en mujeres. Los resultados obtenidos en el análisis de las interrupciones AGG son corroborados mediante esta técnica.

El método de secuenciación implica dos pasos, el primero es una PCR simétrica y el segundo es el proceso de secuenciación en sí, que conlleva una PCR asimétrica. Los primers utilizados son iguales en ambas reacciones (Tabla III.3).

Tabla III. 3: Primers utilizados en secuenciación

Primer	Secuencia
FMR1_CGG_R	5' AGC CAA GTA CCT TGT AGA AAG CG 3'
FMR1_CGG_F	5' TGA CGT GGT TTC AGT GTT TAC 3'

▪ PCR simétrica

Los componentes para la reacción de PCR simétrica se muestran en la Tabla III.4.

Tabla III. 4: Componentes utilizados en la PCR simétrica

Reactivo	Concentración
dH ₂ O	Hasta 50 µl
Immomix Red (2x)	1x
Betaina (1,5M)	0,45 M
FMR1_CGG_R (10pmol/µl)	10 pmol
FMR1_CGG_F (10pmol/µl)	10 pmol
DNA (300 ng/µl)	300 ng

Las condiciones de amplificación son:

- 7 minutos de incubación a 96 °C
- 40 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 96 °C, 45 segundos de annealing a 60 °C y 3 minutos de extensión a 68 °C

- 15 minutos de extensión final a 68 °C

Se comprueba si la reacción ha sido adecuada migrando el producto de PCR en un gel de agarosa al 2 %.

Después de la PCR simétrica se incluye un paso intermedio de purificación enzimática del producto de la PCR, en este caso con el enzima ExoSAP-IT. Para ello se mezclan 6 µl del producto de PCR y 2 µl del enzima y se incuba la mezcla a 37 °C durante 30 minutos, con el fin de degradar primers y nucleótidos sobrantes, seguido de 15 minutos a 80 °C para inactivar el enzima.

▪ PCR asimétrica

A continuación se lleva a cabo la reacción de secuenciación o PCR asimétrica. En este caso se prepara una reacción de secuenciación para cada primer (Forward o Reverse) y se añade todo el producto de PCR purificado previamente para una mayor eficacia. Los componentes para la reacción de PCR asimétrica se muestran en la Tabla III.5.

Tabla III. 5: Componentes utilizados en la PCR asimétrica

Reactivo	Volumen
dH ₂ O	Hasta 15 µl
Bid Dye Terminator Cycle Sequencing Mix	2 µl
Betaina (5M)	5 µl
FMR1_CGG_F o FMR1_CGG_R (5pmol/µl)	1 µl
DNA	5 µl

Las condiciones son:

- 6 minutos de incubación a 95 °C
- 27 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95 °C, 5 segundos de annealing a 50 °C y 4 minutos de extensión a 60 °C
- 10 minutos de extensión final a 60 °C

Una vez completada la reacción, el nuevo producto es purificado y analizado por electroforesis capilar.

Como en las técnicas anteriores antes de migrar las muestras se mezclan con Formamida. Las condiciones de la electroforesis capilar son similares a las aplicadas en el análisis de fragmentos, con la excepción del voltaje aplicado que en este caso es de 13,2 KV y la matriz que es remplazada por Big Dye Terminator v1.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems). Los resultados son analizados con el software Sequence Scanner V1.0 (Applied Biosystems).

2.2.3. Gen FMR2

El tamaño de la repetición CCG del gen FMR2 se ha analizado mediante una PCR multiplex. El uso de esta técnica tiene dos objetivos: en primer lugar analizar el número de repeticiones CCG del gen AFF2/FMR2 y en segundo lugar comprobar los resultados obtenidos en análisis previos en relación al número de repeticiones CGG del gen FMR1.

Esta PCR consiste en la combinación de dos parejas de primers que amplifican regiones de ambos genes del cromosoma X. Los primers utilizados se muestran en la Tabla III.6 y se encuentran marcados con diferentes fluorocromos (6-FAM y HEX).

Tabla III. 6: Primers para PCR multiplex

Primer	Secuencia	Marcaje
FMR1_CGG_R*	5' CCA TCT TCT CTT CAG CCC TGC 3'	6-FAM
FMR1_CGG_F	5' TTC GGT TTC ACT TCC GGT G3'	
AFF2_CGG_F*	5' TGT GAG TGT GTA AGT GTG TGA TGC TGC C 3'	HEX
AFF2_CGG_R	5' CCG CGC GCA CCC AGC GAC 3'	

Los componentes de esta PCR y sus concentraciones fueron optimizados para una reacción de PCR múltiple (Tabla III.7). Las condiciones de amplificación son:

- 10 minutos de incubación a 98 °C

- 42 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 98 °C, 45 segundos de annealing a 58 °C y 2 minutos 30 segundos de extensión a 68 °C
- 10 minutos de extensión final a 68 °C

Tabla III. 7: Componentes utilizados en la PCR multiplex

Reactivo	Concentración
dH ₂ O	Hasta 25 µl
Betaina (5M)	1M
Accutaq Buffer 10X	1X
dATP (10mM)	0,12 mM
dCTP (10mM)	0,12 mM
dTTP (10mM)	0,12 mM
dGTP (10mM)	0,02 mM
7-deaza dGTP, Li-Salt (10mM)	0,4 mM
DMSO 100 %	4,8 %
FMR1_CGG_F (10pmol/µl)	10 pmol
FMR1_CGG_R (10pmol/ µl)	10 pmol
AFF2_CGG_F (10pmol/ µl)	6 pmol
AFF2_CGG_R (10pmol/) µl	6 pmol
AccuTaq polymerase (5U/ µl)	1.75 U
DNA (300ng/µl)	300 ng

Una vez realizada la amplificación, las muestras se preparan para poder realizar una electroforesis capilar en un secuenciador automático (ABI 3130XL de Applied Biosystems).

La preparación de las muestras requiere los siguientes pasos:

- Se mezclan 4 µl del producto de la PCR con 15 µl de Formamida y 0,5 µl del marcador de tamaño ROX 500 (Applied Biosystems)
- Para desnaturalizar el DNA se somete la mezcla a 93 °C

Las muestras se migran en un capilar de 36 cm con el polímero POP7 durante 20 minutos a 60 °C y un voltaje de 15 KV. Los resultados han sido analizados con el software GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems).

En la Figura III.3 se puede observar tres ejemplos de electroferogramas obtenidos en este trabajo en los que se visualizan los picos correspondientes a la repetición CCG del gen FMR2 y a la repetición CGG del gen FMR1.

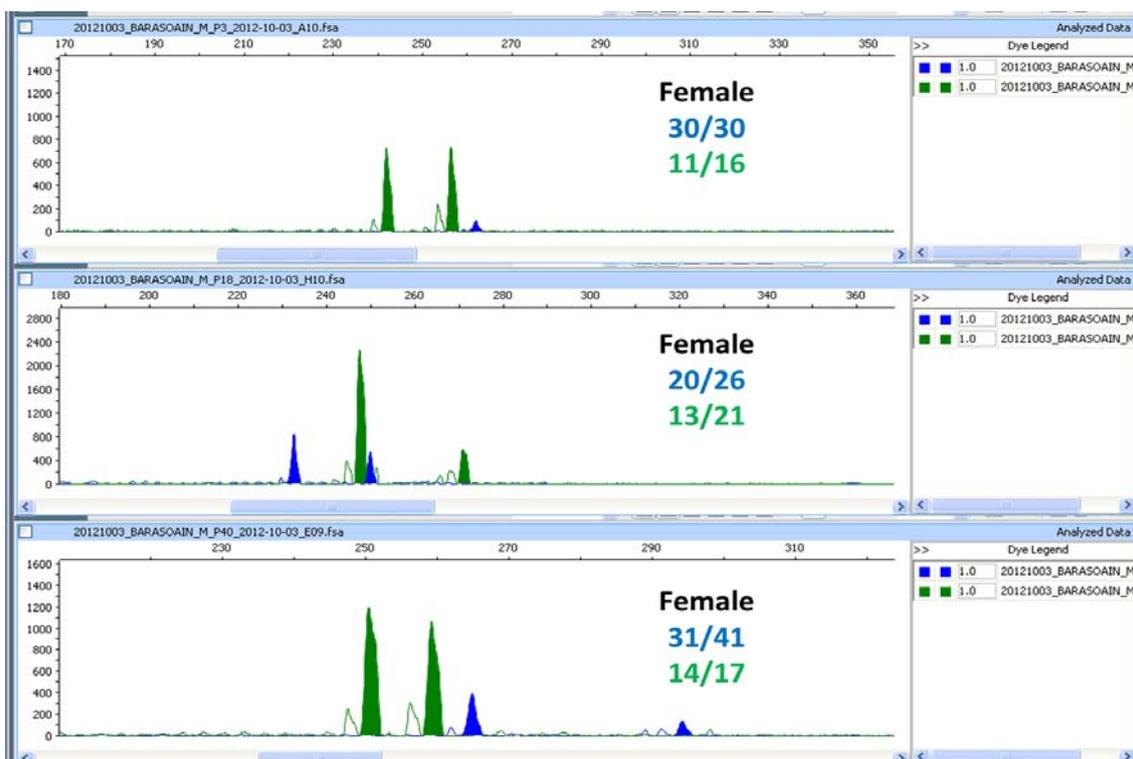


Figura III. 3: Ejemplos de electroferogramas obtenidos por la PCR multiplex

La determinación del número de repeticiones CCG para el gen AFF2/FMR2 y la comprobación de las repeticiones CGG del gen FMR1 se calcula conociendo el número de repeticiones de una muestra control y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Número tripletes} = \left[\frac{|A - B|}{3} \right] + C$$

“A” representa la distancia de migración de la muestra en pares de bases que es directamente proporcional al tamaño del fragmento, “B” es la distancia de migración de la muestra control y “C” el número de tripletes de la muestra control.

3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los resultados del presente trabajo se ha llevado a cabo con el paquete estadístico SPSS v.19.

3.1. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS

La descripción de la estructura genética de los genes FMR1 y FMR2 se ha realizado mediante la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los marcadores. Estas frecuencias se han calculado de la siguiente manera (Nei M. 1987):

$$\text{Frecuencia alélica} = n_a/2N$$

$$\text{Frecuencia genotípica} = n_g/N$$

Donde:

N = tamaño muestral

n_a = frecuencia observada del alelo

n_g = frecuencia observada del genotipo

3.2. ESTADÍSTICOS DE VARIABILIDAD O DISPERSIÓN

La variabilidad genética de una población describe la heterogeneidad existente entre los individuos y viene dada por el número y frecuencia de los alelos de un gen. Existen diferentes medidas de diversidad o variabilidad genética.

El equilibrio de Hardy-Weinberg, expuesto a principios del siglo XX, establece que en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio. Cualquier desviación del equilibrio indica que los cruces entre individuos no se realizan al azar.

Frecuencia esperada de homocigotos = p^2 y q^2

Frecuencia esperada de heterocigotos = $2pq$

Donde $p+q = 1$

El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg se realiza comparando las frecuencias genotípicas observadas y esperadas en función de las frecuencias alélicas. La prueba utilizada para esta comparación es la bondad de ajuste (χ^2). Cuando las diferencias son significativas será porque ambos conjuntos de datos son distintos siendo estas diferencias no debidas al azar y por tanto la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (Vizmanos-Pérez JL. 2014). En los casos en los que las frecuencias esperadas son menores de 1 y hay más de un 20 % menor de 5, se utiliza el test de probabilidad (G).

La heterocigosidad (H_0) nos da una medida de la variabilidad genética de un *locus* en una población y se define como la proporción de heterocigotos para dicho *locus*. Es la suma de las proporciones de individuos heterocigotos encontrados en cada una de las posiciones analizadas divididas por el número total de posiciones. Por otro lado, la heterocigosidad esperada (H_e), o diversidad genética (Nei M. 1987), representa la probabilidad de que dos alelos o haplotipos tomados al azar en una muestra sean diferentes. Se estima a partir de las frecuencias observadas de alelos, suponiendo que la población presenta las proporciones determinadas por el equilibrio Hardy-Weinberg (asumiendo cruzamientos al azar):

$$H_e = 1 - (\sum p_i^2)$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i .

3.3. PRUEBA DE INDEPENDENCIA

La prueba de independencia se aplica cuando deseamos comparar una variable en dos situaciones o poblaciones diferentes. Para representar los datos se utilizan las llamadas

tablas de contingencia que sirven para determinar la presencia de relación o asociación estadística entre grupos de dos o más variables categóricas.

Se establece una hipótesis nula en la que las frecuencias de los datos de las filas son independientes de los de las columnas, no estando las variables asociadas. Los grados de libertad se calculan como: $(n^{\circ} \text{ filas}-1) \cdot (n^{\circ} \text{ columnas}-1)$.

Los tests estadísticos aplicados son el test de independencia de la χ^2 y el test de probabilidad (G). Cuando los grados de libertad sean 1, debe aplicarse la corrección de Yates y en el caso de que alguna de las frecuencias esperadas sean menor que 1 o más del 20 % sean menores que 5, es preferible utilizar el test exacto de Fisher.

El nivel de significación aceptado en todos los test estadísticos utilizados en este trabajo es de 0,05 (5 %).

3.4. OTROS TEST UTILIZADOS

- **Prueba T:**

Se ha utilizado para comparar el número de alelos intermedios y premutados del gen FMR1 entre el grupo de pacientes y el control. Como se indica posteriormente en el apartado de resultados estos alelos están ausentes en el grupo control por lo que no es posible comparar ambos grupos con el test de la χ^2 .

- **Prueba de Kruskal-Wallis:**

Se trata de un método no paramétrico, que no asume normalidad de los datos. Se ha utilizado para comprobar la correlación entre el número de interrupciones AGG y el número de repeticiones CGG del gen FMR1.

Posteriormente se ha comparado cada grupo de interrupciones (0, 1, 2 o 3 AGGs) con los tres grupos restantes mediante la prueba de Tukey-Kramer. Este test se ha realizado con el sistema estadístico R.

4. SOLUCIONES UTILIZADAS

Betaina (5 M): Dilución de 5,8575 g de Betaina por cada 10 ml de agua destilada. Esta dilución se mantiene congelada a -20 °C.

Betaina (10 M): Dilución de 11,715 g de Betaina por cada 10 ml de agua destilada. Esta dilución se mantiene congelada a -20 °C.

Cloroformo/isoamílico: Mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 24:1. La mezcla debe ser equilibrada con un volumen igual de Tris 20 mM a pH=8,1. Se agita durante 3 horas y se conserva a 4 °C.

Cloruro de magnesio 1 M: Dilución de 203,30 g de cloruro de magnesio por cada 1000 ml de agua destilada. Esta disolución debe esterilizarse y se conserva a temperatura ambiente.

Cloruro sódico 5 M: Dilución de 292,20 g de cloruro sódico por cada 1000 ml de agua destilada. Esta disolución debe esterilizarse y se conserva a temperatura ambiente.

EDTA 0,25 M: Dilución de 93,15 g de EDTA en 1000 ml de agua destilada. El pH de esta disolución debe ser pH=8. Se conserva a temperatura ambiente.

Fenol/cloroformo/isoamílico: Mezcla de fenol equilibrado, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Se agita durante 3 horas y se conserva a 4 °C en una botella opaca.

SDS al 10 %: Dilución de 100 g de SDS en 1000 ml de agua destilada. Se conserva a temperatura ambiente.

Solución A: Dilución de 2 ml de cloruro sódico 5 M, 10 ml de EDTA 0,25 M y 5 ml de SDS al 10 % hasta 1000 ml de agua destilada.

Suero fisiológico: Dilución de 9 g de cloruro sódico en 1000 ml de agua destilada.

Tampón de lisis de eritrocitos: Dilución de 5 ml de cloruro de magnesio 1 M y 10 ml de Tris 2 M hasta 1000 ml de agua destilada.

TAE 1X: Dilución de 20 ml de TAE 50X por cada 980 ml de agua destilada.

Tris 2 M: Dilución de 242,28 g de Tris en 1000 ml de agua destilada. Se debe ajustar el pH de esta disolución a pH=7,5. Esta disolución debe esterilizarse y se conserva a temperatura ambiente.

Tris 20 mM: Dilución de 2,4228 g de Tris en 1000 ml de agua destilada. El pH de esta disolución debe ajustarse a pH=8,1.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LA REPETICIÓN CGG DEL GEN FMR1

La repetición CGG pertenece a una clase de secuencias repetitivas conocidas como microsatélites. Las mutaciones en microsatélite tienen una naturaleza dinámica donde la expansión depende de la longitud de las repeticiones y de su estructura interna. Por tanto, además de la longitud de la repetición, la longitud de repeticiones CGG puras sin interrupciones parece estar correlacionado con el riesgo de expansión.

El análisis de la repetición CGG se va a realizar para conocer su influencia en la etiología de la POI y para profundizar en las causas de su inestabilidad.

1.1. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS

El análisis de la distribución de las frecuencias alélicas se ha llevado a cabo en:

- **La muestra total de pacientes**
- **La muestra control total**
- **Los subgrupos de pacientes divididos en función de:**
 - **Tipo de ciclo**
 - **Nivel de fecundidad**
 - **Niveles de la hormona FSH**
- **El conjunto total de alelos**
- **Los alelos agrupados en función de su longitud:**
 - **Alelo normal: < 35 repeticiones CGG**
 - **Alelo intermedio o zona gris: 35-54 repeticiones CGG**
 - **Alelo premutado: 55-200 repeticiones CGG**

1.1.1. Pacientes y control

En la **muestra total de pacientes y control** el análisis de las frecuencias alélicas se ha llevado a cabo en 230 cromosomas X, correspondientes a 68 pacientes y 47 mujeres control. La distribución de los alelos y de las frecuencias alélicas absolutas y relativas de la repetición trinucleotídica CGG en pacientes y control se encuentra representada en la Tabla IV.1. Entre los 230 cromosomas X analizados se han encontrado 29 alelos de diferente longitud, que oscilan entre 18 y 70 repeticiones CGG.

Tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control los alelos más frecuentes son los que tienen 20, 29, 30 y 31 repeticiones CGG. Estos 4 alelos engloban casi el 70 % de los individuos analizados.

En el **grupo de pacientes** los alelos oscilan entre 20 y 70 repeticiones CGG. El más frecuente tiene 30 repeticiones CGG (36,76 %), seguido de los alelos con 20 (13,24 %), 29 (11,03 %) y 31 (10,29 %) repeticiones CGG.

En el **grupo control** los alelos oscilan entre 18 y 34 repeticiones CGG. El más frecuente tiene 30 repeticiones CGG (42,55 %) seguido de los alelos con 29 (17,02 %), 31 (12,77 %) y 20 (10,62 %) repeticiones CGG.

El análisis de la homogeneidad en la distribución de frecuencias alélicas entre el grupo de pacientes y el grupo control no ha mostrado diferencias significativas ($G^2_{28}=39,77$, $p=0,069$), aunque el valor de p está cerca del nivel de significación.

Tabla IV. 1: Frecuencias alélicas de la repetición CGG en el grupo de pacientes y en el grupo control

Nº repeticiones CGG	Pacientes		Control	
	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
18	0	0,0000	1	0,0106
20	18	0,1324	10	0,1064
21	1	0,0074	1	0,0106
22	0	0,0000	3	0,0319
23	6	0,0441	1	0,0106
24	1	0,0074	2	0,0213
25	0	0,0000	1	0,0106
26	1	0,0074	0	0,0000
27	1	0,0074	0	0,0000
28	1	0,0074	0	0,0000
29	15	0,1103	16	0,1702
30	50	0,3676	40	0,4255
31	14	0,1029	12	0,1277
32	6	0,0441	4	0,0426
33	1	0,0074	1	0,0106
34	1	0,0074	2	0,0213
36	3	0,0221	0	0,0000
38	3	0,0221	0	0,0000
39	1	0,0074	0	0,0000
41	2	0,0147	0	0,0000
42	1	0,0074	0	0,0000
43	2	0,0147	0	0,0000
44	2	0,0147	0	0,0000
45	1	0,0074	0	0,0000
49	1	0,0074	0	0,0000
50	1	0,0074	0	0,0000
56	1	0,0074	0	0,0000
65	1	0,0074	0	0,0000
70	1	0,0074	0	0,0000
TOTAL	136	1	94	1

La Figura IV.1 muestra de forma gráfica los diferentes alelos y su frecuencia porcentual en los grupos de pacientes y control.

En la muestra de pacientes hay 13 alelos que superan las 34 repeticiones CGG. En el grupo control, sin embargo, no hay alelos con más de 34 repeticiones CGG.

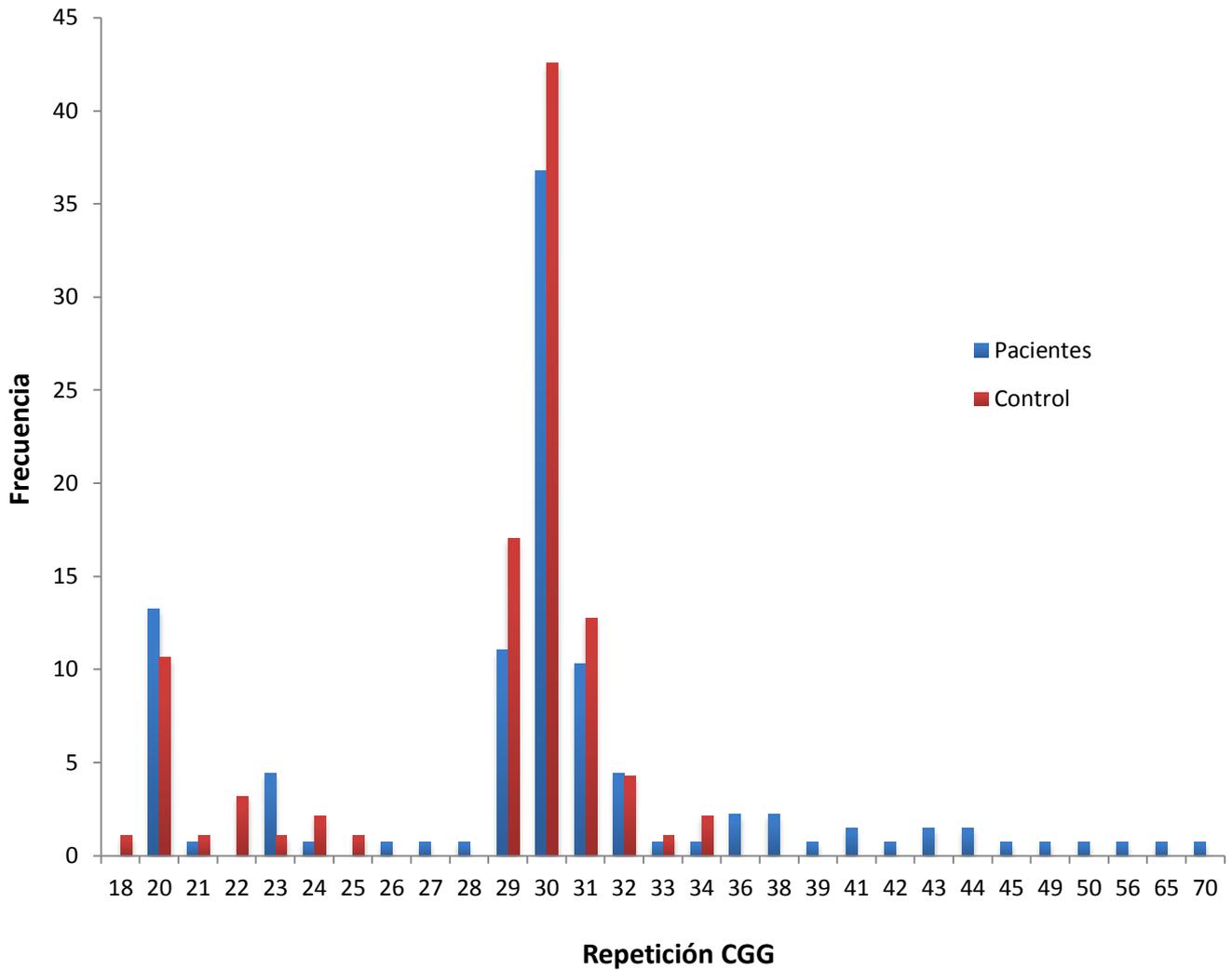
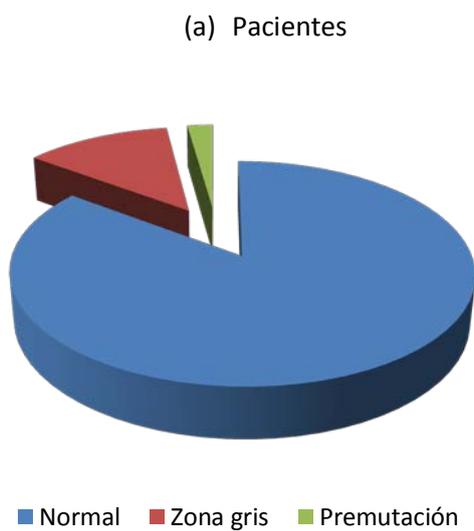


Figura IV. 1: Frecuencias alélicas de la repetición CGG en el grupo de pacientes y en el grupo control

La Figura IV.2 muestra la distribución de las frecuencias de los tres tipos de alelos en función del número de repeticiones CGG (Normal, intermedio o zona gris y premutado) encontrada en el grupo de pacientes y en el grupo control.



(b) Control

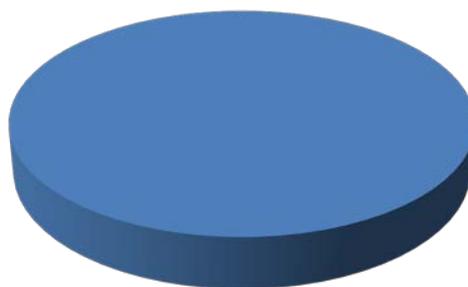


Figura IV. 2: Distribución de las frecuencias de las tres clases alélicas en el grupo de pacientes (a) y en el grupo control (b)

La agrupación de los alelos en categorías en función de su longitud muestra que, en el grupo de pacientes, el 12,50 % de ellos presenta un número de repeticiones englobado en la zona gris (35-54 CGG). En este grupo se han detectado tres alelos (2,21 %) dentro del rango de la premutación, con 56, 65 y 70 repeticiones CGG. En el grupo control, ninguno de los alelos se encuentra en la zona gris y tampoco se han detectado alelos en el rango de la premutación, siendo las diferencias con el grupo de pacientes estadísticamente significativas ($t=4,670$, $p<0,0001$).

1.1.2. Subgrupos de pacientes y control

De acuerdo con lo señalado en el apartado de Materiales y Métodos, el grupo de pacientes se ha dividido en tres subgrupos, para realizar un análisis más detallado y conocer a cuál de los subgrupos de pacientes se asocian preferentemente los alelos intermedios y premutados.

Los datos de las frecuencias alélicas de alelos intermedios y premutados en los distintos subgrupos de pacientes y en el grupo control se encuentran resumidos en la Tabla IV.2. También se ha añadido la frecuencia de alelos con más de 35 repeticiones CGG que englobaría la frecuencia de alelos intermedios y premutados.

Tabla IV. 2: Prevalencia de alelos intermedios y premutados del gen FMR1 en los subgrupos de pacientes (Grupo 1-Grupo 3) y en el grupo control

	Pacientes			Control
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
Nº individuos	31	27	10	47
Alelos 35-54	9 (14,52%)	5 (9,25%)	3 (15%)	0
Alelos 55-200	2 (3,23%)	1 (1,85%)	0	0
Alelos ≥ 35	11 (17,74%)	6 (11,11%)	3 (15%)	0

Al analizar los tres subgrupos de pacientes por separado se observa que:

- **Grupo 1:** incluye a 31 mujeres con ciclos irregulares, fecundidad reducida y niveles de la hormona FSH <10 IU/L. El 17,74 % de los alelos tiene más de 35 repeticiones CGG.

Entre los alelos con más de 35 repeticiones, 9 (14,52 %) están en el rango intermedio y 2 (3,23 %) están en el rango de la premutación.

- **Grupo 2:** compuesto por 27 mujeres con ciclos irregulares, fecundidad reducida y elevados niveles de FSH. El 11,11 % de los alelos tiene más de 35 repeticiones CGG.

Entre los alelos con más de 35 repeticiones, 5 (9,25 %) oscilan entre 35-54 repeticiones CGG y están por tanto dentro del rango intermedio o zona gris y 1 (1,85 %) está en el rango de la premutación.

- **Grupo 3:** conformado por 10 mujeres que presentaron amenorrea al menos durante cuatro meses consecutivos y niveles de FSH ≥ 10 IU/L.

En este grupo no hay alelos premutados. Hay 3 alelos (15 %) que tienen entre 35 y 54 repeticiones.

Cuando comparamos los tres subgrupos de pacientes entre sí no existen diferencias significativas ($p > 0,05$ en todos los casos, χ^2). En cambio, cuando comparamos la frecuencia de alelos con más de 35 repeticiones CGG las diferencias son significativas entre los grupos 1 y 2 y el grupo control ($p < 0,05$, Test t-Student). No hay diferencias significativas entre el grupo 3 y el control ($t = 1,747$, $p = 0,083$), aunque el valor de p está cerca del nivel de significación.

1.2. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

El análisis de la distribución de las frecuencias genotípicas se ha llevado a cabo en:

- **La muestra total de pacientes**
- **La muestra control total**
- **Los subgrupos de pacientes**

1.2.1. Pacientes y control

En el **grupo de pacientes** la distribución de frecuencias genotípicas observadas para el *locus* CGG se encuentra representada en la Tabla IV.3.

El número de genotipos posibles, fruto de la combinación de los 26 alelos de diferente longitud identificados en la muestra de pacientes, es de 351. De ellos se han detectado 36. Tal y como era de esperar, los genotipos más frecuentes están formados por la combinación de los alelos predominantes, que corresponden a 20, 29 y 30 repeticiones CGG.

Al contrario de lo que ocurría en la distribución de frecuencias alélicas, no existe un genotipo claramente destacado, sino que los valores se encuentran homogéneamente distribuidos entre los genotipos formados por los alelos principales. De este modo, el más frecuente es el 30-30, compuesto por dos alelos de 30 repeticiones CGG (13,24 %), seguido de los genotipos 20-30 y 29-30 (10,29 % en ambos casos).

Hay que señalar que, de los 36 genotipos diferentes encontrados, 26 son muy poco frecuentes y corresponden solo a una paciente, lo que está en concordancia con la distribución de frecuencias alélicas para la secuencia trinucleotídica CGG, donde solamente unos pocos alelos destacan por su frecuencia, mientras que la gran mayoría de ellos están muy levemente representados.

Tabla IV. 3: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo de pacientes

Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
20-23	1	0,0147	29-39	1	0,0147
20-26	1	0,0147	29-41	1	0,0147
20-29	2	0,0294	30-30	9	0,1324
20-30	7	0,1029	30-31	4	0,0588
20-31	3	0,0441	30-32	4	0,0588
20-32	2	0,0294	30-33	1	0,0147
20-36	1	0,0147	30-34	1	0,0147
20-38	1	0,0147	30-36	1	0,0147
21-30	1	0,0147	30-38	2	0,0294
23-29	1	0,0147	30-45	1	0,0147
23-30	2	0,0294	30-70	1	0,0147
23-49	1	0,0147	31-31	1	0,0147
23-50	1	0,0147	31-41	1	0,0147
24-29	1	0,0147	31-42	1	0,0147
27-29	1	0,0147	31-44	1	0,0147
28-36	1	0,0147	31-56	1	0,0147
29-30	7	0,1029	43-43	1	0,0147
29-31	1	0,0147	44-65	1	0,0147

El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg ha mostrado un resultado no significativo, no existiendo diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas ($G^2_{35}=25,52$, $p=0,88$), por lo que se puede asumir que el *locus* CGG se encuentra en equilibrio.

En el **grupo control** la distribución de frecuencias genotípicas observadas para el *locus* CGG se encuentra representada en la Tabla IV.4.

El número de genotipos posibles es de 91 (13 alelos de diferente longitud) y se han detectado 21 diferentes.

Tabla IV. 4: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo control

Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
18-30	1	0,0213	29-29	2	0,0426
20-22	1	0,0213	29-30	5	0,1064
20-29	2	0,0426	29-31	2	0,0426
20-30	5	0,1064	29-32	1	0,0213
21-29	1	0,0213	29-33	1	0,0213
22-30	1	0,0213	30-30	8	0,1702
22-32	1	0,0213	30-31	8	0,1702
23-29	1	0,0213	30-32	1	0,0213
24-30	1	0,0213	30-34	2	0,0426
24-31	1	0,0213	31-32	1	0,0213
25-29	1	0,0213			

El grupo control también se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, al no haber diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas ($G^2_{20}=12,12$, $p=0,912$).

La heterocigosidad observada obtenida para este *locus* es de 83,82 % en el caso de los pacientes y de 78,72 % en la muestra control. La heterocigosidad esperada es de 81,82 % en el grupo de pacientes y 75,8 % en el grupo control. Estos valores concuerdan con la presencia de alelos predominantes y con una distribución homogénea de valores entre los mismos.

Cuando se comparan los valores de homocigotos y heterocigotos observados y esperados según el equilibrio de Hardy-Weinberg, en ambos grupos las diferencias no son significativas (pacientes: $\chi^2_1=0,565$, $p=0,452$; controles: $\chi^2_1=0,297$, $p=0,586$). Por tanto, las distribuciones de individuos homocigotos y heterocigotos observados y esperados son homogéneas, indicando de nuevo que este *locus* se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

1.2.2. Subgrupos de pacientes

Las Tablas IV.5, IV.6 y IV.7 corresponden a las frecuencias genotípicas detectadas en los tres subgrupos de pacientes.

En los **grupos 1 y 3** el genotipo más frecuente es el 30-30 (19,5 % y 20 % respectivamente). En el **grupo 2**, en cambio, prevalecen los genotipos 20-30 y 29-30 (18,52 % en ambos casos). Los genotipos más frecuentes en los tres subgrupos de pacientes coinciden con los obtenidos en la totalidad de los pacientes.

Tabla IV. 5: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo 1 de pacientes

Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
20-26	1	0,0323	30-30	6	0,1935
20-29	1	0,0323	30-31	2	0,0645
20-30	1	0,0323	30-32	2	0,0645
20-32	1	0,0323	30-33	1	0,0323
21-30	1	0,0323	30-34	1	0,0323
23-30	2	0,0645	30-38	1	0,0323
23-50	1	0,0323	31-42	1	0,0323
27-29	1	0,0323	31-44	1	0,0323
29-30	2	0,0645	31-56	1	0,0323
29-39	1	0,0323	43-43	1	0,0323
29-41	1	0,0323	44-65	1	0,0323

Tabla IV. 6: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo 2 de pacientes

Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
20-29	1	0,0370	30-30	1	0,0370
20-30	5	0,1852	30-31	1	0,0370
20-31	3	0,1111	30-32	1	0,0370
20-36	1	0,0370	30-36	1	0,0370
23-29	1	0,0370	30-45	1	0,0370
24-29	1	0,0370	30-70	1	0,0370
28-36	1	0,0370	31-31	1	0,0370
29-30	5	0,1852	31-41	1	0,0370
29-31	1	0,0370			

Tabla IV. 7: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG en el grupo 3 de pacientes

Genotipo	N	Frecuencia
20-23	1	0,10
20-30	1	0,10
20-32	1	0,10
20-38	1	0,10
23-49	1	0,10
30-30	2	0,20
30-31	1	0,10
30-32	1	0,10
30-38	1	0,10

En relación al número de pacientes que en los diferentes grupos portan al menos un alelo de más de 35 repeticiones CGG, en todos los subgrupos de pacientes el porcentaje es superior al 20 %. En el grupo 1, una de las mujeres presentaba un genotipo 44-65, con un alelo intermedio y uno premutado. Teniendo en cuenta el grupo de pacientes globalmente, el 4,41 % de las mujeres tiene un alelo premutado, porcentaje que se eleva hasta el 25 % al considerar alelos entre 35 y 54 repeticiones CGG.

2. ANÁLISIS DE LAS INTERRUPCIONES AGG EN LA SECUENCIA REPETITIVA CGG

El análisis detallado de la secuencia 5'UTR del gen FMR1 mostró que aunque la unidad repetitiva es el trinucleótido CGG, existen unas interrupciones AGG cada 9-10 unidades de repetición. Estas interrupciones influyen en la estabilidad de la repetición.

2.1. PATRÓN DE INTERRUPCIONES AGG

De acuerdo con lo señalado, se ha determinado la estructura interna de la repetición CGG en la muestra analizada, con el objetivo de profundizar en los factores de inestabilidad de la secuencia repetitiva.

El análisis del patrón de interrupciones se ha llevado a cabo en:

- **La muestra total de pacientes**
- **La muestra control total**

En el **grupo de pacientes** la Tabla IV.8 muestra: el tamaño de las repeticiones CGG, el patrón de interrupciones AGG y las correspondientes frecuencias absolutas y relativas.

Entre los 136 cromosomas analizados en el grupo de pacientes, se han identificado 39 alelos con diferente patrón de interrupciones AGG y 26 alelos si tenemos en cuenta la longitud total de la repetición. Ocho de los alelos a pesar de tener el mismo número de repeticiones CGG tienen un patrón de interrupciones AGG diferente.

Teniendo en cuenta la posición de las interrupciones AGG, la heterocigosidad esperada para el *locus* CGG es de un 85,38 %. Este porcentaje es muy similar al esperado para el *locus* CGG cuando se tiene en cuenta exclusivamente la longitud de la repetición (81,82 %). Esta pequeña diferencia parece indicar que las interrupciones no tienen un

papel determinante en la variabilidad del *locus* por lo que se espera que haya estructuras internas predominantes para determinadas longitudes totales:

- El 90 % de los alelos con la longitud más frecuente, 30 repeticiones, posee la estructura interna $(CGG)_{10} AGG (CGG)_9 AGG (CGG)_9$ o lo que es lo mismo 10+9+9.
- El segundo alelo más frecuente, con 20 CGGs, muestra una estructura predominante 10+9 (94,4 %).
- El 93,3 % de los alelos con 29 repeticiones presentan una secuencia 9+9+9.

El hecho de que determinadas estructuras sean predominantes hace que las mayores frecuencias de los alelos atendiendo a su estructura interna concuerden con las mayores frecuencias en función de la longitud total de la repetición:

- La secuencia predominante es 10+9+9 (33,09 %) con 30 repeticiones.
- La segunda secuencia predominante es 10+9 (12,5 %) con 20 repeticiones.
- La tercera secuencia predominante es 9+9+9 (10,29 %) con 29 repeticiones.

Tabla IV. 8: Patrón de interrupciones AGG en el grupo de pacientes

Alelos CGG	Secuencia AGG	N	Frecuencia	Alelos CGG	Secuencia AGG	N	Frecuencia
20	10+9	17	0,1250	33	9+9+13	1	0,0074
	9+10	1	0,0074	34	34	1	0,0074
21	10+10	1	0,0074	36	9+26	1	0,0074
23	9+13	1	0,0074		9+9+17	1	0,0074
	13+9	5	0,0368		16+9+9	1	0,0074
24	14+9	1	0,0074	38	10+7+9+9	1	0,0074
26	16+9	1	0,0074		9+9+18	1	0,0074
27	27	1	0,0074		10+9+17	1	0,0074
28	18+9	1	0,0074	39	9+9+9+9	1	0,0074
29	9+9+9	14	0,1029	41	9+9+21	2	0,0147
	19+9	1	0,0074	42	9+32	1	0,0074
30	10+9+9	45	0,3309	43	9+9+23	2	0,0147
	30	1	0,0074	44	9+9+24	2	0,0147
	20+9	4	0,0294	45	45	1	0,0074
31	10+9+10	9	0,0662	49	9+9+29	1	0,0074
	21+9	2	0,0147	50	9+9+30	1	0,0074
	9+11+9	2	0,0147	56	9+9+36	1	0,0074
	20+10	1	0,0074	65	9+9+45	1	0,0074
32	12+9+9	1	0,0074	70	70	1	0,0074
	9+12+9	5	0,0368				

En el **grupo control**, la Tabla IV.9 muestra el tamaño de las repeticiones CGG, el patrón de interrupciones AGG y las respectivas frecuencias absolutas y relativas.

Tabla IV. 9: Patrón de interrupciones AGG en el grupo control

Alelos CGG	Secuencia AGG	N	Frecuencia	Alelos CGG	Secuencia AGG	N	Frecuencia
18	18	1	0,0106	30	10+9+9	36	0,3830
20	10+9	10	0,1064		20+9	4	0,0426
21	21	1	0,0106	31	10+9+10	5	0,0532
22	9+12	2	0,0213		21+9	5	0,0532
	12+9	1	0,0106		10+20	1	0,0106
23	13+9	1	0,0106		9+9+10	1	0,0106
24	14+9	1	0,0106	32	10+21	1	0,0106
	13+10	1	0,0106		9+12+9	3	0,0319
25	15+9	1	0,0106	33	9+9+13	1	0,0106
29	9+9+9	15	0,1596	34	34	2	0,0213
	9+19	1	0,0106				

Entre los 94 cromosomas analizados en el grupo control se han identificado 21 alelos con diferente patrón de interrupciones AGG, 13 si tenemos en cuenta la longitud total de la repetición. Seis alelos con el mismo número de repeticiones CGG tienen un patrón de interrupciones AGG diferente.

La heterocigosidad esperada en este caso es de 80,58 %, de nuevo similar a la esperada considerando sólo la longitud de la repetición (75,8 %). Las estructuras más frecuentes vuelven a repetirse en la población control siendo la más común la estructura 10+9+9 (38,30 %), seguida de la estructura 9+9+9 (15,96 %) y 10+9 (10,64 %).

La Figura IV.3, muestra de manera gráfica la distribución de frecuencias alélicas en función de la secuencia interna de la repetición CGG en pacientes y control.

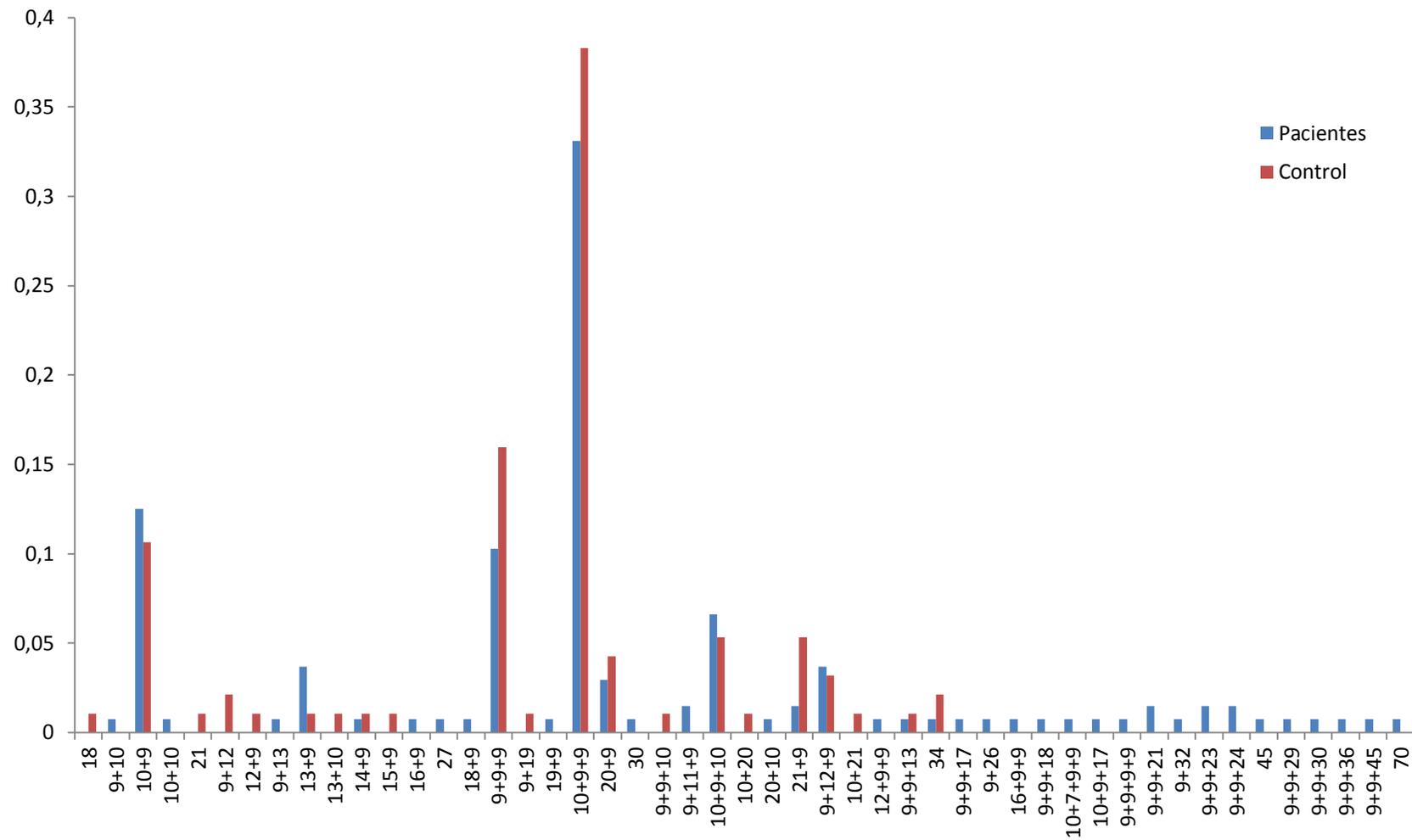


Figura IV. 3: Distribución de frecuencias alélicas en función de la secuencia interna de la repetición CGG en el grupo de pacientes y en el grupo control

2.2. NÚMERO DE INTERRUPCIONES AGG

Con el objetivo de identificar si la pérdida de interrupciones AGG es un factor determinante en la inestabilidad del número de repeticiones CGG, se ha analizado el número de interrupciones que muestra la secuencia interna de la repetición en el **grupo de pacientes** y en el **grupo control**.

El análisis en el **grupo de pacientes** se ha realizado:

- **En función del tipo de alelo**
- **En los subgrupos de pacientes**

En el **grupo de pacientes** la Tabla IV.10 muestra la distribución del número de interrupciones AGG en función del **tipo de alelo**.

Tabla IV. 10: Número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el grupo de pacientes

Nº interrupciones	Normal		Zona gris		Premutado		Total	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia
0	3	0,0259	1	0,0588	1	0.3333	5	0,0368
1	36	0,3103	2	0,1176	0	0	38	0,2794
2	77	0,6638	12	0,7059	2	0.6667	91	0,6691
3	0	0	2	0,1176	0	0	2	0,0147
Total	116	1	17	1	3	1	136	1

El número de interrupciones detectado en la totalidad del grupo de pacientes oscila entre 0 y 3.

Se han identificado 5 alelos que no presentan ninguna interrupción (3,68 %) y poseen una longitud de 27, 30, 34, 45 y 70 repeticiones CGG. El porcentaje de alelos que muestran una sola interrupción es de 27,94 %. La mayoría de los alelos, el 66,91 %, presentan dos interrupciones. Existen dos alelos (1,47 %) que presentan tres interrupciones.

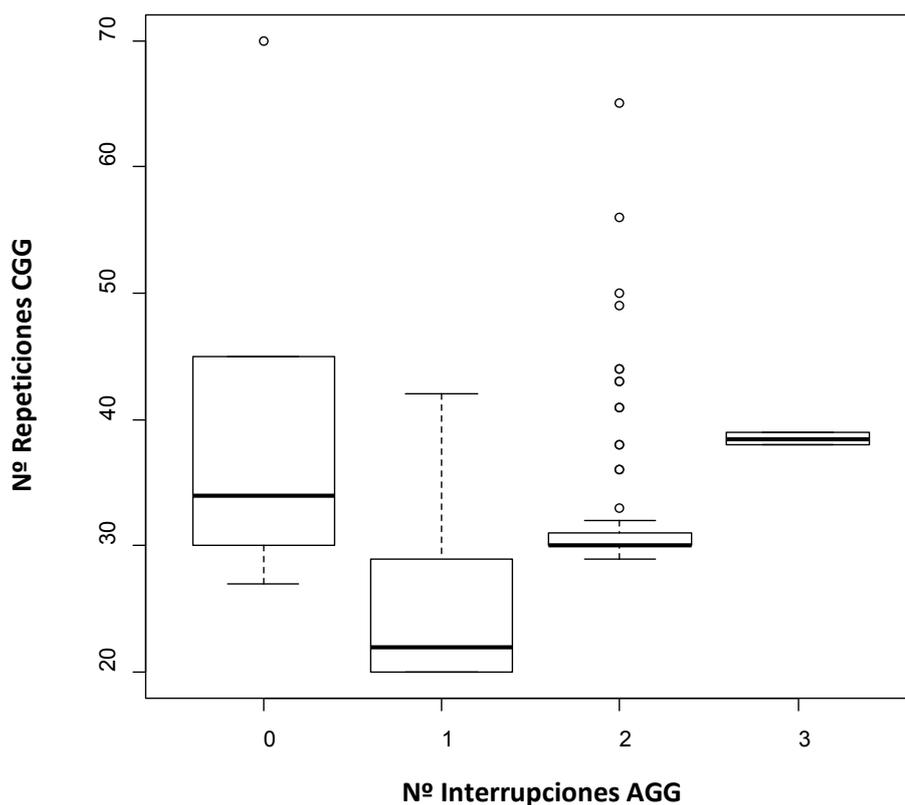


Figura IV. 4: Gráfico de cajas (box plot) que representa el número total de repeticiones CGG para cada número de interrupciones AGG en el grupo de pacientes

La Figura IV.4 representa los diferentes alelos en función del número de repeticiones CGG por cada interrupción AGG. Los 5 alelos sin interrupciones AGG tienen entre 27 y 70 repeticiones CGG. Los 38 alelos con una interrupción varían entre 20 y 42 repeticiones CGG, con 11 alelos de diferente longitud. Los 91 alelos con dos interrupciones AGG oscilan entre 29 y 65 CGG, con 14 alelos de diferente longitud. Los 2 alelos con 3 interrupciones AGG tienen 38 y 39 repeticiones CGG.

La relación entre la longitud total de repeticiones CGG y el número de interrupciones AGG se ha realizado mediante el test Kruskal-Wallis, por no seguir los datos una distribución normal. El resultado es significativo ($K=47.1798$, $p<0,0001$) de forma que el número de repeticiones CGG varía según el número de interrupciones AGG. Se ha comparado cada grupo de interrupciones (0, 1, 2 o 3 AGGs) con los tres grupos restantes mediante la prueba de Tukey-Kramer y la mayor diferencia se encuentra entre los alelos con 1 y 2 interrupciones.

La Figura IV.5 muestra de forma gráfica la distribución del número de interrupciones en función del tipo de alelo.

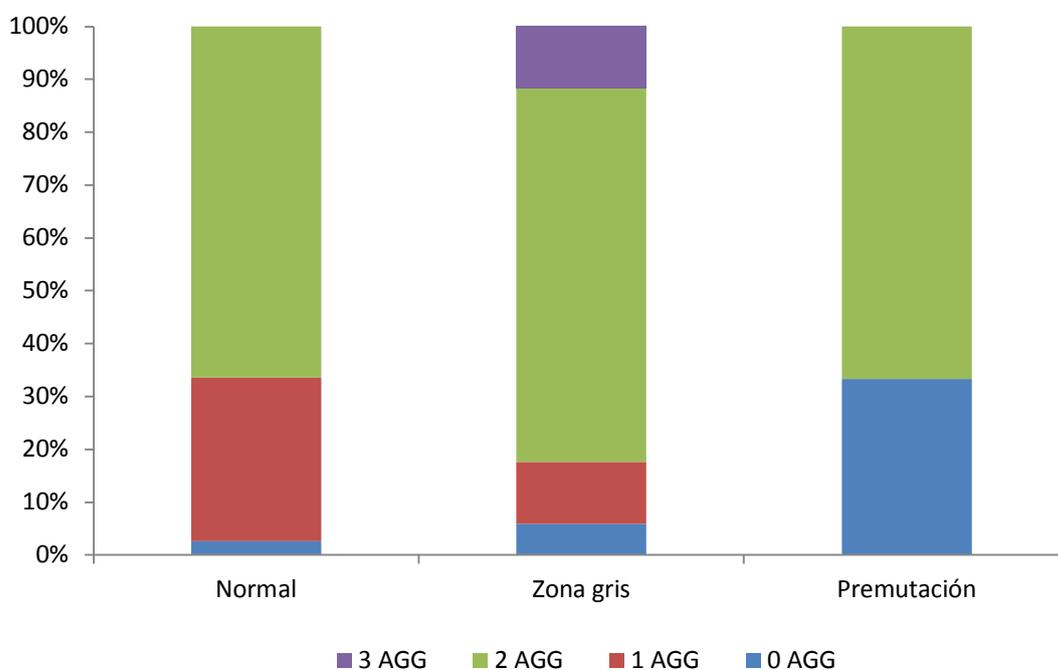


Figura IV. 5: Distribución del número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el grupo de pacientes

El análisis de independencia entre el número de interrupciones y el rango de longitud CGG es significativo ($G^2_6=15,695$, $p=0,015$), por lo que ambas distribuciones están asociadas, existiendo diferencias entre los alelos normales, intermedios y premutados.

El análisis de asociación entre las posibles combinaciones ha mostrado que la mayor diferencia en la distribución viene dada por los alelos con tres interrupciones AGG, que

aparecen exclusivamente en la zona gris y suponen el 11,76 % de los alelos englobados en este rango ($G^2_1=8,443$, $p=0,004$). Esta asociación tiene sentido ya que alelos con menos de 35 repeticiones CGG difícilmente pueden tener 3 interrupciones.

La Tabla IV.11 muestra la distribución del número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el **grupo 1 de pacientes**.

En el grupo 1 de pacientes, los alelos más frecuentes en este grupo son, al igual que en el grupo de pacientes global, los que tienen dos interrupciones (70,97 %).

Entre los alelos del rango normal, el porcentaje de alelos con dos interrupciones es de 68,63 %, el 25,49 % presenta una sola interrupción y el 5,88 % restante no tiene interrupciones. Los alelos intermedios también presentan predominantemente dos interrupciones (77,78 %). Entre estos alelos destaca uno con tres interrupciones que supone el 11,11 %. En este grupo de pacientes los dos alelos premutados contienen, de nuevo, dos interrupciones.

Tabla IV. 11: Número de interrupciones AGG en función de la categoría CGG en el grupo 1 de pacientes

Nº interrupciones	Normal		Zona Gris		Premutado		Total	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia
0	3	0,0588	0	0	0	0	3	0,0484
1	13	0,2549	1	0,1111	0	0	14	0,2258
2	35	0,6863	7	0,7778	2	1	44	0,7097
3	0	0	1	0,1111	0	0	1	0,0161
Total	51	1	9	1	2	1	62	1

La Tabla IV.12 muestra la distribución del número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el **grupo 2 de pacientes**.

En este grupo los alelos con dos interrupciones son predominantes (62,69 %). No hay ningún alelo con tres interrupciones. Hay además dos alelos sin interrupciones que se engloban en los rangos intermedio y premutado, suponiendo el 20 % de los alelos intermedios y el 100 % de los alelos premutados.

Tabla IV. 12: Número de interrupciones AGG en función de la categoría CGG en el grupo 2 de pacientes

Nº interrupciones	Normal		Zona Gris		Premutado		Total	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia
0	0	0	1	0,2	1	1	2	0,0370
1	17	0,3542	1	0,2	0	0	18	0,3333
2	31	0,6458	3	0,6	0	0	34	0,6296
3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	48	1	5	1	1	1	54	1

Por último, la Tabla IV.13 muestra la distribución del número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el **grupo 3 de pacientes**.

Tabla IV. 13: Número de interrupciones AGG en función de la categoría CGG en el grupo 3 de pacientes

Nº interrupciones	Normal		Zona Gris		Total	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia
0	0	0	0	0	0	0
1	6	0,3529	0	0	6	0,3
2	11	0,6471	2	0,6667	13	0,65
3	0	0	1	0,3333	1	0,05
Total	17	1	3	1	20	1

En este caso, cabe destacar la ausencia de alelos sin interrupciones y la presencia de un alelo con tres interrupciones dentro del rango intermedio que supone el 33,33 %. Entre los alelos intermedios tampoco hay ningún alelo con una interrupción.

En relación al análisis de independencia entre el número de interrupciones y el rango de longitud CGG, en el grupo 2 de pacientes existen diferencias significativas entre el rango normal, intermedio y premutado y en el grupo 3 existen diferencias significativas entre el rango normal e intermedio ($p < 0,05$ en ambos casos, G^2). Las diferencias, en cambio, no son significativas en el grupo 1 ($G^2_6 = 7,072$, $p = 0,314$).

En el **grupo control** la Tabla IV.14 muestra la distribución del número de interrupciones AGG entre los alelos normales de este grupo.

Tabla IV. 14: Número de interrupciones AGG en función del tipo de alelo en el grupo control

Nº interrupciones	Normal	
	N	Frecuencia
0	4	0,0426
1	29	0,3085
2	61	0,6489
3	0	0
Total	94	1

En el grupo control, 4 alelos no presentan ninguna interrupción (4,26 %), mientras que el 30,85 % presenta una AGG y el 64,89 % presenta dos. En este caso no se han encontrado alelos con tres interrupciones.

La distribución dentro del rango normal de repeticiones CGG es bastante similar al encontrado en el grupo de pacientes. No existen diferencias significativas entre ambos grupos en la distribución del número de interrupciones AGG ($G^2_3 = 2,344$, $p = 0,504$).

No existen diferencias significativas al comparar el grupo control con los tres subgrupos de pacientes por separado ($p > 0,05$ en todos los casos, G^2).

2.3. POSICIÓN DE LA PRIMERA INTERRUPCIÓN AGG

Se ha determinado la posición de la primera interrupción AGG, considerado un factor de inestabilidad de la repetición CGG. El análisis se ha llevado a cabo en:

- **La muestra total de pacientes**
- **Los subgrupos de pacientes**
- **La muestra control total**

Se han dividido las estructuras internas encontradas en el total de la muestra de pacientes y control en cuatro patrones diferentes de acuerdo a la posición de la primera interrupción. De este modo tendremos:

1. Patrón 9+n: cuando la primera interrupción se localiza en la posición 10
2. Patrón 10+n: cuando la primera AGG se encuentra en la posición 11
3. Patrón n+9: engloba aquellas estructuras cuya primera interrupción no coincide con las posiciones 10 ni 11
4. Patrón sin interrupciones AGG

En la Tabla IV.15 se puede observar la frecuencia de cada patrón en función de la categoría de longitud total del alelo en el **grupo de pacientes**.

Sin tener en cuenta el tipo de alelo, el patrón más común es el 10+n con la primera interrupción en la 11ª posición (54,41 %). El segundo en frecuencia es el patrón 9+n, con la primera interrupción en la 10ª posición, que está presente en el 28,68 % de los alelos. El patrón n+9 tiene una frecuencia de 13,24 %. Hay además un 3,68 % de alelos que no tienen interrupciones AGG y no siguen por tanto ninguno de los patrones descritos.

Tabla IV. 15: Posición de la primera interrupción AGG en función de la categoría de longitud total de la repetición en el grupo de pacientes

	Normal		Zona Gris		Premutado		Total	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia	N	Frecuencia
9+n	24	0,2069	13	0,7647	2	0,6667	39	0,2868
10+n	72	0,6207	2	0,1176	0	0,0000	74	0,5441
n+9	17	0,1466	1	0,0588	0	0,0000	18	0,1324
No AGG	3	0,0259	1	0,0588	1	0,3333	5	0,0368
Total	116	1	17	1	3	1	136	1

Teniendo en cuenta el tamaño de los alelos:

- En el grupo de pacientes la estructura 9+n aparece con una frecuencia diferente según el tipo de alelo, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($G^2=31,122$, $p<0,0001$). Mientras que el 76,47 % de los alelos intermedios y el 66,67 % de los alelos premutados sigue este patrón, solo el 20,69 % de los alelos normales de este grupo presenta este tipo de estructura.
- El patrón 10+n es el más frecuente entre los alelos normales (62,07 %), mientras que solo supone el 11,76 % de los alelos intermedios y no está presente entre los alelos premutados.
- El patrón n+9 tiene una menor frecuencia en el rango normal e intermedio, mientras que no se observa entre los alelos premutados.
- Los alelos sin interrupciones AGG, en cambio, aumentan su frecuencia según aumenta el número de repeticiones CGG, suponiendo el 33,33 % de los alelos premutados y solo el 2,59 % de los alelos normales.

La Tabla IV.16 muestra la frecuencia de cada patrón según la posición de la primera interrupción AGG en los **tres subgrupos de pacientes**.

Tabla IV. 16: Posición de la primera interrupción AGG en función de la categoría CGG en los tres subgrupos de pacientes

	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3	
	N	ZG	P	N	ZG	P	N	ZG
9+n	9	9	2	11	3	0	4	1
10+n	30	0	0	30	0	0	12	2
n+9	9	0	0	7	1	0	1	0
No AGG	3	0	0	0	1	1	0	0
Total	51	9	2	48	5	1	17	3

N: Normal; ZG: Zona Gris; P: Premutación

Teniendo en cuenta el tamaño de los alelos:

- En los alelos normales el patrón 10+n es el más frecuente en los tres grupos. La segunda estructura en relación a la frecuencia es la 9+n. Sólo el grupo 1 tiene, en el rango normal, alelos sin ninguna interrupción.
- En los alelos intermedios el patrón 9+n es el más frecuente en los grupos 1 y 2. En el grupo 3, sin embargo, el más frecuente es el patrón 10+n.
- Sólo los grupos 1 y 2 tienen alelos premutados. La estructura de los alelos premutados en el grupo 1 es la 9+n y el único alelo premutado del grupo 2 no tiene interrupciones.

Las diferencias en relación a la posición de la primera interrupción AGG en función de la longitud de la repetición CGG son estadísticamente significativas para los grupos 1 y 2 ($p < 0,05$ en ambos casos, χ^2), pero no para el grupo 3 ($\chi^2 = 0,280$, $p = 0,869$).

En el **grupo control** la Tabla IV.17 muestra la frecuencia de cada patrón entre los alelos normales de este grupo.

De nuevo el patrón más común es el 10+n con la primera interrupción en la 11ª posición (56,38 %). El segundo patrón más frecuente es el 9+n, con la primera interrupción en la 10ª posición de los alelos (24,47 %). La estructura n+9 y la estructura sin interrupciones AGG son menos comunes y engloban el 14,89 % y el 4,26 % respectivamente.

Tabla IV. 17: Posición de la primera interrupción AGG en función de la categoría de longitud total de la repetición en el grupo control

	Normal	
	N	Frecuencia
9+n	23	0,2447
10+n	53	0,5638
n+9	14	0,1489
No AGG	4	0,0426
Total	94	1

Cuando comparamos los grupos de pacientes y control no existen diferencias significativas en la distribución de alelos en los patrones sugeridos ($\chi^2_3=0,562$, $p=0,905$). Las diferencias tampoco son significativas cuando comparamos el grupo control con cada subgrupo de pacientes ($p>0,05$ en todos los casos, G^2).

2.4. ANÁLISIS DE LA LONGITUD DE REPETICIONES PURAS

Una vez analizada la distribución del número de interrupciones entre las distintas categorías de longitud de la repetición CGG y determinado que los alelos mayores poseen la misma distribución que los englobados en el rango normal, se ha realizado un análisis de la distribución de repeticiones puras ya que, consecuentemente, los alelos intermedios deberán tener mayor longitud de repeticiones puras para dar lugar al número total de repeticiones que presentan. La longitud de repeticiones puras se considera larga cuando alcanza las 15 repeticiones.

El análisis de la longitud de las repeticiones puras se ha realizado en:

- **La muestra total de pacientes**
- **Los subgrupos de pacientes**
- **La muestra control total**

En el **grupo de pacientes** la Tabla IV.18 muestra, en frecuencias absolutas y porcentuales, la distribución de la longitud de repeticiones puras de los alelos en función tanto de la categoría de longitud CGG a la que pertenecen como del número de interrupciones que presentan.

Tabla IV. 18: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo de pacientes

Nº interrupciones	Normal		Zona gris		Premutación		Total	
	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15
0	0	3 (23,01)	0	1 (6,67)	0	1 (33,33)	0	5 (16,13)
1	26 (25,24)	10 (76,92)	0	2 (13,33)	0	0	26 (24,76)	12 (38,71)
2	77 (74,76)	0	0	12 (80,00)	0	2 (66,66)	77 (73,33)	14 (45,16)
3	0	0	2 (100)	0	0	0	2 (1,91)	0
Total	103 (100)	13 (100)	2 (100)	15 (100)	0	3 (100)	105 (100)	31 (100)

En los alelos normales solo el 11,21 % de los alelos tienen trectos largos de repeticiones CGG puras, mientras que el 88,24 % de los alelos intermedios y todos los alelos premutados presentan esta característica. Al comparar estadísticamente en los tres tipos de alelos el porcentaje de trectos largos de repeticiones CGG puras los resultados obtenidos señalan que hay diferencias estadísticamente significativas entre los alelos normales e intermedios ($G^2_1=43,193$, $p<0,0001$) y entre los alelos normales y premutados ($\chi^2_1=12,564$ $p<0,0001$).

De acuerdo con lo señalado, el análisis de independencia entre la longitud de las repeticiones puras y la categoría de longitud total de la repetición ha señalado que ambas variables están asociadas.

El análisis de la longitud de repeticiones puras respecto al número de interrupciones en el grupo de pacientes ha mostrado la existencia de asociación entre ambas variables ($G^2_3=20,469$, $p<0,0001$). Mientras que los alelos con trectos cortos de repeticiones puras muestran preferentemente dos interrupciones (73,33 %) ($\chi^2_1=8,58$, $p=0,003$), los alelos con trectos largos de repeticiones puras muestran ninguna (16,13 %) ($G^2_1=15,454$, $p<0,0001$), o una interrupción (38,71 %) ($\chi^2_1=2,313$, $p=0,128$). Esta diferencia significativa entre alelos con trectos largos y cortos de repeticiones puras parece indicar un papel estabilizador de la interrupción AGG en la secuencia repetitiva, ya que el 54,84 % de los alelos con largas repeticiones puras presentan ninguna o una interrupción AGG.

Cuando analizamos la longitud total de la repetición CGG y la longitud de repeticiones puras con respecto al número de interrupciones se ha visto que, entre los alelos con trectos largos de repeticiones puras, la distribución del número de interrupciones está asociada a la categoría de longitud total ($G^2_4=26,586$, $p<0,0001$).

El 23,01 % de los alelos con largas repeticiones puras del rango normal no muestran interrupciones y el 76,92 % muestran una interrupción, mientras que estos alelos en el rango intermedio y en el premutado muestran preferentemente dos interrupciones (80 % y 66,66 % respectivamente). Estos datos sugieren que la pérdida de

interrupciones AGG no provoca la expansión de un alelo normal hacia el rango intermedio o premutado.

Las Tablas IV.19, IV.20 y IV.21 muestran en los **subgrupos de pacientes** y en frecuencias absolutas la longitud de las repeticiones puras en función del tipo de alelo y del número de interrupciones AGG.

En el **grupo 1 de pacientes** (Tabla IV.19), entre los alelos normales, el 84,31 % tienen tractos cortos de repeticiones puras y sólo el 15,69 % tienen tractos largos de repeticiones puras con una (62,5 %) o ninguna (37,5 %) interrupción. En los alelos intermedios, la mayoría (88,89 %) tienen tractos largos de repeticiones puras con una (12,5 %) o dos (87,5 %) interrupciones AGG y sólo un alelo (11,11 %) que posee tres interrupciones tiene tractos cortos de repeticiones puras. En el rango premutado todos los alelos tienen tractos largos de repeticiones puras y dos interrupciones AGG.

Tabla IV. 19: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo 1 de pacientes

Nº interrupciones	Normal		Zona Gris		Premutación		Total	
	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15
0	0	3	0	0	0	0	0	3
1	8	5	0	1	0	0	8	6
2	35	0	0	7	0	2	35	9
3	0	0	1	0	0	0	1	0
Total	43	8	1	8	0	2	44	18

En el **grupo 2 de pacientes** (Tabla IV.20), el 10,42 % de los alelos normales tiene tractos largos de repeticiones CGG puras, con una (80 %) o dos (20 %) interrupciones AGG. Todos los alelos intermedios y premutados tienen tractos largos de repeticiones CGG puras. El número de interrupciones AGG en estos alelos varía: el único alelo premutado no tiene interrupciones al igual que uno de los alelos intermedios (20 %), otro alelo intermedio tiene una sola interrupción y los tres alelos restantes (60 %) tienen dos interrupciones.

Tabla IV. 20: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo 2 de pacientes

Nº interrupciones	Normal		Zona Gris		Premutación		Total	
	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15
0	0	0	0	1	0	1	0	2
1	13	4	0	1	0	0	13	5
2	30	1	0	3	0	0	30	4
3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	43	5	0	5	0	1	43	11

En el **grupo 3 de pacientes** (Tabla IV.21), todos los alelos normales tienen trectos cortos de repeticiones CGG puras, mientras que 66,67 % de los alelos intermedios tienen trectos largos de repeticiones CGG puras, en este caso con dos interrupciones AGG.

Tabla IV. 21: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo 3 de pacientes

Nº interrupciones	Normal		Zona Gris		Total	
	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15
0	0	0	0	0	0	0
1	6	0	0	0	6	0
2	11	0	0	2	11	2
3	0	0	1	0	1	0
Total	17	0	1	2	18	2

Al analizar los tres grupos de pacientes por separado, sólo teniendo en cuenta el número de repeticiones CGG puras, se observa en todos los grupos que la mayoría de los alelos intermedios (Grupo 1: 88,89 %; Grupo 2: 100 %; Grupo 3: 66,67 %) y todos los alelos premutados tienen trectos largos de repeticiones CGG puras en comparación con los alelos del rango normal, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$ en todos los casos, G^2).

Cuando analizamos la longitud total de la repetición CGG y la longitud de repeticiones puras con respecto al número de interrupciones se ha visto que, al igual que ocurría en el grupo de pacientes general, entre los alelos con trectos largos de repeticiones puras, la distribución del número de interrupciones está asociada a la categoría de longitud total del alelo. Sin embargo, las diferencias solo son significativas para el grupo 1 ($G^2_4=19,797$, $p=0,001$).

En el **grupo control**, la Tabla IV.22 muestra la longitud de las repeticiones puras en función del número de interrupciones AGG en los alelos normales de este grupo.

Tabla IV. 22: Distribución de las interrupciones AGG entre los alelos CGG en el grupo control

Nº interrupciones	Normal	
	<15	≥15
0	0	4 (23,53)
1	16 (20,78)	13 (76,47)
2	61 (79,22)	0
3	0	0
Total	77 (100)	17 (100)

En el grupo control, el 81,92 % tiene menos de 15 repeticiones CGG puras y corresponde a alelos con una (20,78 %) o dos (79,22 %) interrupciones AGG. En este grupo solo el 18,09 % de los alelos tienen más de 15 repeticiones CGG puras y corresponde a alelos con ninguna (23,53 %) o una (76,47 %) interrupción AGG.

Al comparar estadísticamente entre pacientes y control la frecuencia de alelos con repeticiones puras cortas y largas y sin tener en cuenta en los pacientes la categoría de longitud CGG (22,79 % repeticiones puras largas) los resultados señalan:

- No existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo total de pacientes y el grupo control ($\chi^2_1=0,488$, $p=0,485$).
- No existen diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos de pacientes y el grupo control ($p>0,05$ en todos los casos, χ^2).

2.5. DISTRIBUCIÓN DE LA LONGITUD DE LOS TRACTOS DE REPETICIONES PURAS

Una vez que se ha determinado la existencia de variación en la longitud de repeticiones puras entre los diferentes alelos, se ha analizado si existe una determinada polaridad en la variabilidad de la repetición, es decir, si existe una preferencia en el tracto que sufre el aumento de repeticiones. El análisis se ha realizado en:

- **La muestra total de pacientes teniendo en cuenta la estructura de la repetición. Esta estructura puede dividirse en tres partes enmarcadas por las interrupciones:**
 - **Los alelos con tres interrupciones tendrán un tracto 5', dos tratos medios y un tracto 3'**
 - **Los alelos con dos interrupciones tendrán un tracto 5', un tracto medio limitado por ambas interrupciones y un tracto 3'**
 - **Los alelos con una sola interrupción poseerán un tracto 5' y uno 3'**
 - **Los alelos sin interrupciones no han sido considerados para este análisis**
- **La muestra de pacientes dividida en función del tipo de alelo**
- **Los subgrupos de pacientes**
- **La muestra control teniendo en cuenta la subestructura de la repetición**

En el **grupo de pacientes** la distribución de la longitud de cada tracto se encuentra representada en la Figura IV.6.

En el **tracto 5'** esta distribución oscila entre 9 y 21 repeticiones CGG, con una moda en 10 repeticiones CGG (56,92 %), seguida de 9 repeticiones CGG (29,23 %). Sólo el 8,46 % de los alelos tiene longitudes mayores de 15 repeticiones.

Las estructuras internas predominantes entre los alelos con largas repeticiones puras son n+9 (90,91 %) con una única interrupción AGG o n+9+9 (9,09 %) con dos interrupciones.

La distribución del **tracto medio** varía entre 7 y 12 repeticiones CGG, predominando ampliamente la longitud de 9 repeticiones CGG (91,49 %).

La distribución del **tracto 3'** muestra un amplio rango, de 9 a 45 repeticiones CGG, siendo la longitud dominante en este tracto de nuevo la de 9 repeticiones CGG (77,86 %), seguido por la longitud de 10 repeticiones CGG pero con una frecuencia mucho menor (9,16 %). El porcentaje de alelos con repeticiones largas en este tracto es de un 11,45 %.

La estructura interna predominante en el tracto 3' para los alelos con repeticiones largas es 9+9+n (80 %), seguido de 9+n (13,33 %) y 10+9+n (6,67 %).

El porcentaje de alelos con largas repeticiones puras en el tracto 3' es algo mayor que en el tracto 5'. Los resultados señalan que:

- La diferencia, sin embargo, no es significativa ($\chi^2_1=0,359$, $p=0,549$).
- Los alelos con largas repeticiones puras aparecen tanto en el tracto 5' como en el 3'.

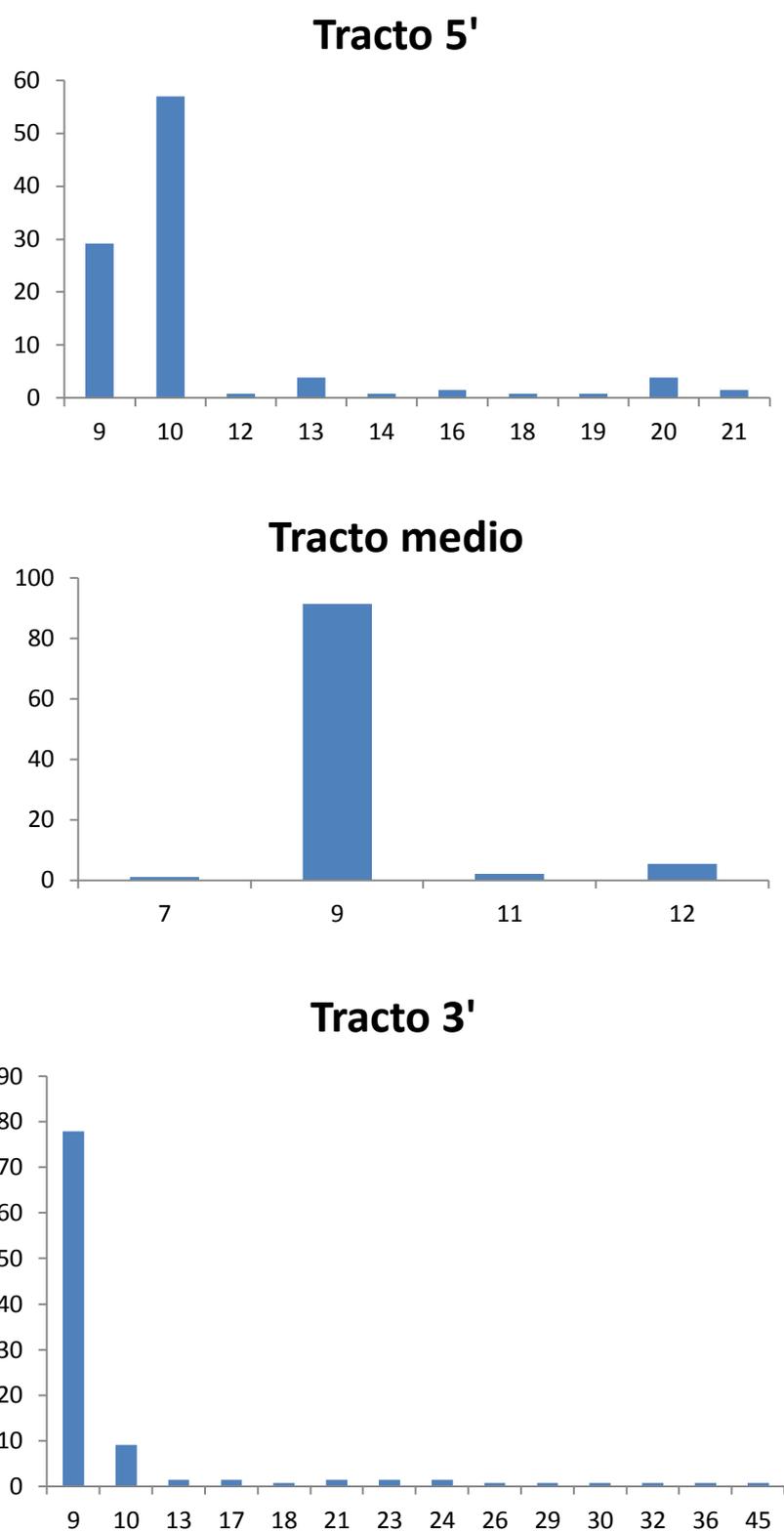


Figura IV. 6: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en el grupo de pacientes

En el grupo de pacientes la Figura IV.7 muestra de forma gráfica la distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en los alelos normales, intermedios y premutados.

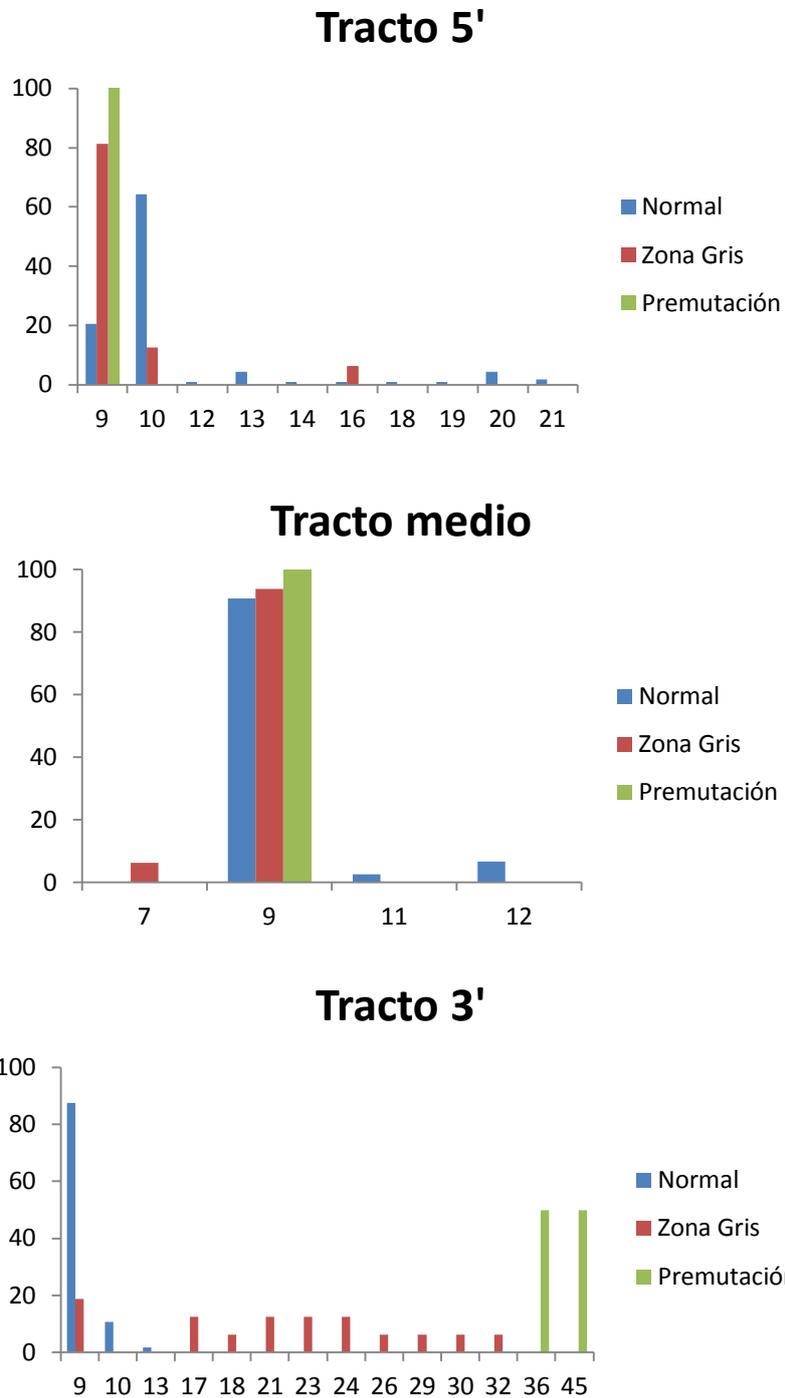


Figura IV. 7: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo de pacientes

En el **tracto 5'**, el análisis de homogeneidad entre las distribuciones ha mostrado diferencias significativas entre los alelos normales e intermedios, por lo que la distribución de la longitud de la repetición en este tracto es diferente ($G^2_9=28,200$, $p=0,001$). Las diferencias no son significativas cuando comparamos los alelos normales con los premutados ($G^2_9=6,198$, $p=0,720$).

Los alelos normales abarcan un rango de longitudes amplio, de 9 a 21 repeticiones CGG con una distribución homogénea entre las diferentes longitudes. En cambio, en los alelos intermedios este rango se reduce de 9 a 16 CGG, con solo tres longitudes representadas, 9 (81,25 %), 10 (12,5 %) y 16 (6,25 %). Entre los alelos normales la longitud predominante es la de 10 repeticiones (64,29 %), seguido de la de 9 repeticiones CGG (20,54 %). Existen diferencias significativas entre la longitud predominante de cada clase ($p<0,0001$, χ^2). Los dos alelos premutados muestran en ambos casos 9 repeticiones.

La estructura interna que muestran los alelos con tractos largos de repeticiones puras en 5', es $n+9$ para todos los alelos del rango normal y $n+9+9$ para el alelo de la zona gris. Los alelos premutados no presentan tractos largos de repeticiones puras en este extremo.

En el **tracto medio**, el análisis de homogeneidad entre las distribuciones de los grupos de alelos no ha mostrado diferencias significativas entre los alelos normales y los alelos intermedios y premutados ($p>0,05$ en ambos casos, G^2).

Los alelos normales e intermedios engloban un espectro estrecho de longitudes (9-12 CGG en el rango normal y 7-9 CGG en el rango intermedio). Los alelos normales muestran una mayor variabilidad aunque en ambos casos la longitud más frecuente es la de 9 repeticiones que abarca el 90,79 % de los alelos normales y el 93,75 % de los alelos intermedios. Los dos alelos premutados muestran en ambos casos 9 repeticiones.

El análisis de la distribución de la longitud del **tracto 3'** también ha mostrado diferencias significativas en función de la categoría de longitud total de la repetición

(Normal vs. zona gris: $G^2_{11}=69,650$, $p<0,0001$; Normal vs. premutación: $G^2_4=20,172$, $p<0,0001$).

En este tracto, el rango de repeticiones que abarcan los alelos de la zona normal (9-13 CGG) es menor que en la zona gris (9-32 CGG). Los alelos normales muestran preferentemente 9 repeticiones CGG (87,61 %) en este tracto, al igual que los alelos intermedios aunque en menor proporción (18,75 %), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2_1=123,018$, $p<0,0001$). Los alelos premutados muestran 36 y 45 repeticiones puras en este tracto.

La estructura interna que manifiestan los alelos con tractos largos de repeticiones puras en 3' muestra también diferencias en función de la categoría de longitud total de la repetición. Entre los alelos de la zona gris con tractos largos de repeticiones puras en 3' destaca la estructura 9+9+n (76,92 %), seguida de 9+n (15,38 %) y 10+9+n (7,69 %). Todos los alelos premutados presentan la estructura 9+9+n. Ningún alelo normal presenta tractos largos de repeticiones puras en 3'.

La Tabla IV.23 muestra la distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo (Normal, zona gris, premutado) en el **grupo de pacientes**.

Tabla IV. 23: Distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo de pacientes

Tracto	Normal		Zona gris		Premutación		Total	
	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15
5'	102	10	15	1	2	0	119	11
Medio	78	0	16	0	2	0	94	0
3'	113	0	3	13	0	2	116	15
Total	293	10	34	14	4	2	329	26

El análisis de los alelos con tractos largos de repeticiones CGG ha mostrado que existe una asociación entre la categoría de longitud total de la repetición CGG y la posición de

dicho tracto (Normal vs. zona gris: $G^2_1=25,899$, $p<0,0001$; Normal vs. premutación: $G^2_1=10,813$, $p=0,001$). Los alelos englobados en el rango normal que muestran tractos largos de repeticiones CGG lo hacen preferentemente en la región 5', mientras que los alelos intermedios y premutados lo hacen preferentemente en la región 3'.

Las Tablas IV.24, IV.25 y IV.26 muestran en frecuencias absolutas la distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo para cada **subgrupo de pacientes** por separado.

En el **grupo 1** de pacientes (Tabla IV.24), teniendo en cuenta el tipo de alelo, los alelos normales tienden a tener largas repeticiones puras (3,82 %) en el tracto 5'. Los alelos intermedios y premutados presentan con mayor frecuencia largas repeticiones puras (30,77 % y 33,33 % respectivamente) en el tracto 3'.

En el extremo 3' la estructura interna más frecuente es 9+9+n (90 %). En cambio, en el extremo 5' la estructura más frecuente es n+9 (100 %).

Tabla IV. 24: Distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo 1 de pacientes

Tracto	Normal		Zona Gris		Premutación		Total	
	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15
5'	43	5	9	0	2	0	54	5
medio	35	0	8	0	2	0	45	0
3'	48	0	1	8	0	2	49	10
Total	126	5	18	8	4	2	148	15

En el **grupo 2** de pacientes (Tabla IV.25) ocurre algo similar. Los alelos intermedios presentan largas repeticiones puras de manera más frecuente en el extremo 3' (36,36 %) que en el 5', al contrario que los alelos normales, que cuando tienen largas repeticiones puras lo hacen en el extremo 5' (3,94 %).

De nuevo, la estructura interna más frecuente en el extremo 3' es 9+9+n (66,67 %) mientras que en el extremo 5' en cambio, la estructura más frecuente es n+9 (66,67 %).

Tabla IV. 25: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo 2 de pacientes

Tracto	Normal		Zona Gris		Total	
	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15
5'	43	5	3	1	46	6
medio	31	0	3	0	34	0
3'	48	0	1	3	48	3
Total	122	5	7	4	128	9

En el **grupo 3** de pacientes (Tabla IV.26), los alelos normales no presentan en ningún tracto largas repeticiones puras. Los alelos intermedios, sin embargo, presentan largas repeticiones puras (22,22 %) sólo en el extremo 3' donde la estructura interna más frecuente es 9+9+n (50 %).

Tabla IV. 26: Distribución de los trectos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo 3 de pacientes

Tracto	Normal		Zona Gris		Total	
	<15	≥15	<15	≥15	<15	≥15
5'	17	0	3	0	20	0
medio	11	0	3	0	14	0
3'	17	0	1	2	18	2
Total	45	0	7	2	52	2

En el conjunto de los tres subgrupos, el tracto medio no presenta repeticiones puras largas. El tracto 3' muestra un mayor porcentaje de repeticiones puras largas que el tracto 5' en los grupos 1 y 3. En el grupo 2 el tracto con más repeticiones puras largas es el tracto 5'.

En el **grupo control** la distribución de la longitud de cada tracto se encuentra representada en la Figura IV.8.

En el **tracto 5'** esta distribución oscila entre 9 y 21 repeticiones CGG, con una moda en 10 repeticiones CGG (58,89 %), seguido de 9 repeticiones CGG (25,52 %). El 10 % de los alelos tiene longitudes mayores de 15 repeticiones, siendo la estructura interna en todos los casos n+9, con una única interrupción AGG.

En el **tracto medio** sólo se han encontrado alelos con 9 o 12 repeticiones CGG, predominando ampliamente la longitud de 9 CGGs (95,08 %).

La distribución del **tracto 3'** muestra el mismo rango que el tracto 5', de 9 a 21 repeticiones CGG, siendo la longitud dominante en este tracto la de 9 repeticiones CGG (85,56 %), seguido por la longitud de 10 repeticiones CGG (7,78 %). La estructura interna predominante en el tracto 3' es 10+n (66,66 %), o 9+n (33,33 %).

El porcentaje de alelos con repeticiones largas en el extremo 3' es de un 3,33 %, un porcentaje menor que en el tracto 5'. La diferencia, sin embargo, no es significativa ($\chi^2_1=2,232$, $p=0,135$), por lo que los alelos con largas repeticiones puras lo hacen en ambos tractos

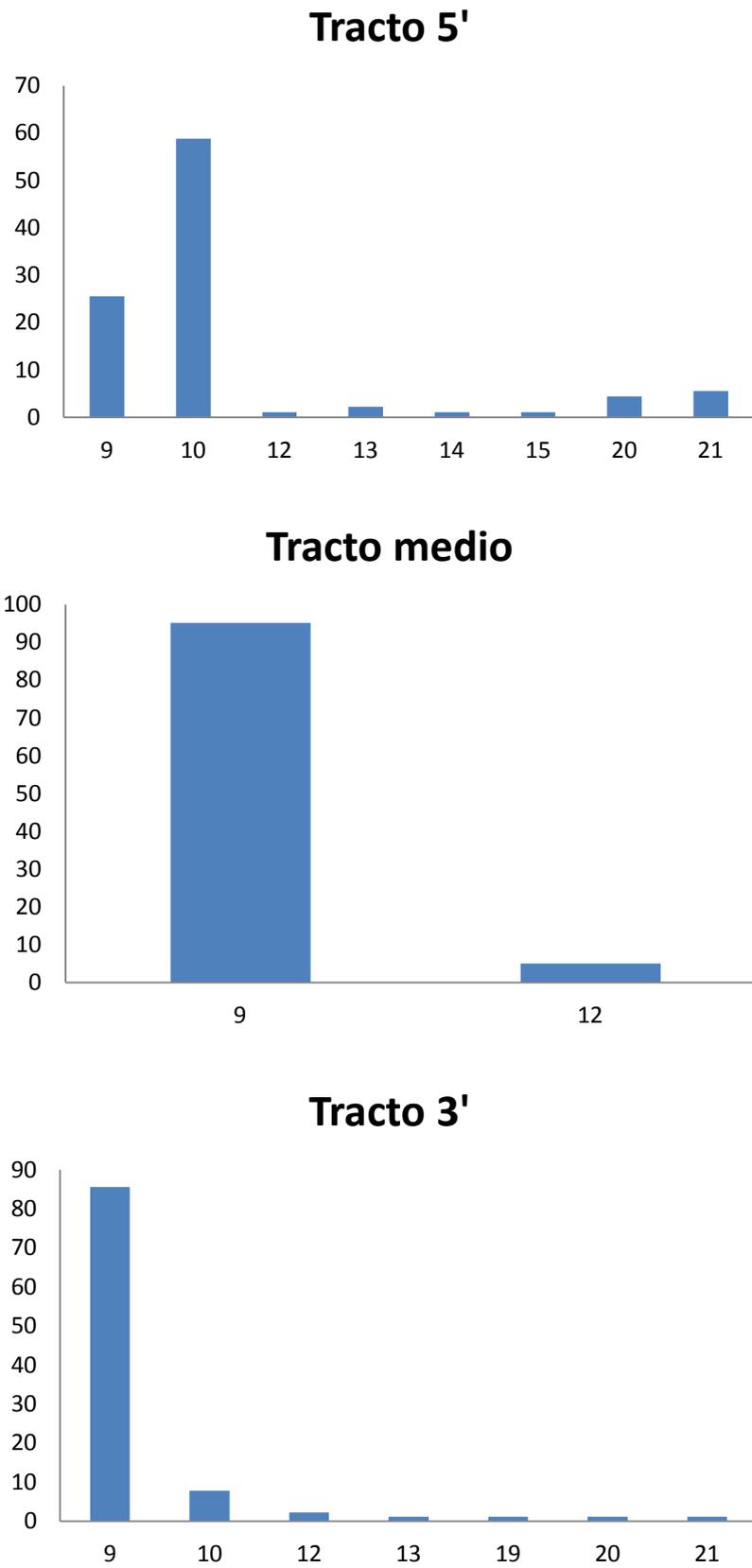


Figura IV. 8: Distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en el grupo control

La Tabla IV.27 muestra la distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en el grupo control.

Tabla IV. 27: Distribución de los tractos de repeticiones CGG puras en función del tipo de alelo en el grupo control

Tracto	Normal	
	<15	≥15
5'	80	10
Medio	61	0
3'	87	3
Total	228	13

Cuando comparamos los alelos con tractos largos de repeticiones CGG en función de la posición de dicho tracto entre pacientes y control no existen diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2_{1}=2,331$, $p=0,127$). Sin embargo, si se tiene en cuenta sólo el extremo 3', el porcentaje de alelos con largas repeticiones puras es significativamente superior en el grupo de pacientes ($p<0,05$).

Al comparar los alelos con tractos largos de repeticiones CGG puras en función de la posición de dicho tracto entre cada subgrupo de pacientes y el grupo control tampoco existen diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$ en todos los casos, G^2).

En todos los casos los alelos normales con tractos largos de repeticiones CGG puras lo hacen preferentemente en 5' y presentan la estructura n+9 en todos los casos.

3. ANÁLISIS DE LA REPETICIÓN CCG DEL GEN FMR2

3.1. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS

El análisis de la distribución de las frecuencias alélicas se ha llevado a cabo en:

- **La muestra total de pacientes**
- **La muestra control total**
- **Los subgrupos de pacientes**

3.1.1. Pacientes y control

En la muestra total de pacientes y control el análisis de las frecuencias alélicas se ha llevado a cabo en 230 cromosomas X, 136 en pacientes y 94 en la muestra control. La distribución de las frecuencias alélicas de la repetición trinucleotídica CCG en las muestras de pacientes y control se encuentra representada en la Tabla IV.28.

Teniendo en cuenta ambos grupos, se han encontrado 22 alelos de diferente longitud que oscilan entre 8 y 34 repeticiones CCG.

En el **grupo de pacientes** el alelo más común es el que tiene 14 repeticiones CCG (28,68 %), seguido del alelo de 13 repeticiones (25,74 %).

En el **grupo control**, al igual que en el grupo de pacientes, los alelos más frecuentes son los que tienen 14 (36,17 %) y 13 repeticiones CCG (21,28 %).

En ambos grupos estos dos alelos suponen más del 50 % de los alelos analizados, estando el resto más homogéneamente distribuidos. El análisis de la homogeneidad en la distribución de frecuencias alélicas entre pacientes y control no ha mostrado diferencias significativas ($G^2_{21}=29,68$, $p=0,099$).

Tabla IV. 28: Frecuencias alélicas de la repetición CCG en pacientes y en el grupo control

Nº repeticiones CCG	Pacientes		Control	
	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
8	1	0,0074	0	0,0000
9	1	0,0074	1	0,0106
10	1	0,0074	1	0,0106
11	2	0,0147	1	0,0106
12	4	0,0294	2	0,0213
13	35	0,2574	20	0,2128
14	39	0,2868	34	0,3617
15	9	0,0662	8	0,0851
16	10	0,0735	11	0,1170
17	6	0,0441	9	0,0957
18	4	0,0294	0	0,0000
19	4	0,0294	2	0,0213
20	6	0,0441	0	0,0000
21	5	0,0368	0	0,0000
22	3	0,0221	1	0,0106
23	2	0,0147	1	0,0106
24	1	0,0074	1	0,0106
25	1	0,0074	0	0,0000
26	1	0,0074	0	0,0000
27	0	0,0000	1	0,0106
28	1	0,0074	0	0,0000
34	0	0,0000	1	0,0106
TOTAL	136	1	94	1

Todos los alelos encontrados en la muestra de pacientes se clasifican como alelos normales (6-30 CCG) y sólo uno de los alelos en el grupo control, con 34 repeticiones, se localiza dentro del rango intermedio (31-60 CCG).

Los alelos con 11 o menos repeticiones CCG suponen el 3,68 % del total de alelos en el grupo de pacientes y el 3,19 % en el grupo control, no siendo las diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2_1=0,039$, $p=0,844$).

La Figura IV.9 muestra de forma gráfica los diferentes alelos y las frecuencias alélicas de la repetición CCG en pacientes y control. Se observa que la distribución de alelos es bastante homogénea entre ambos grupos.

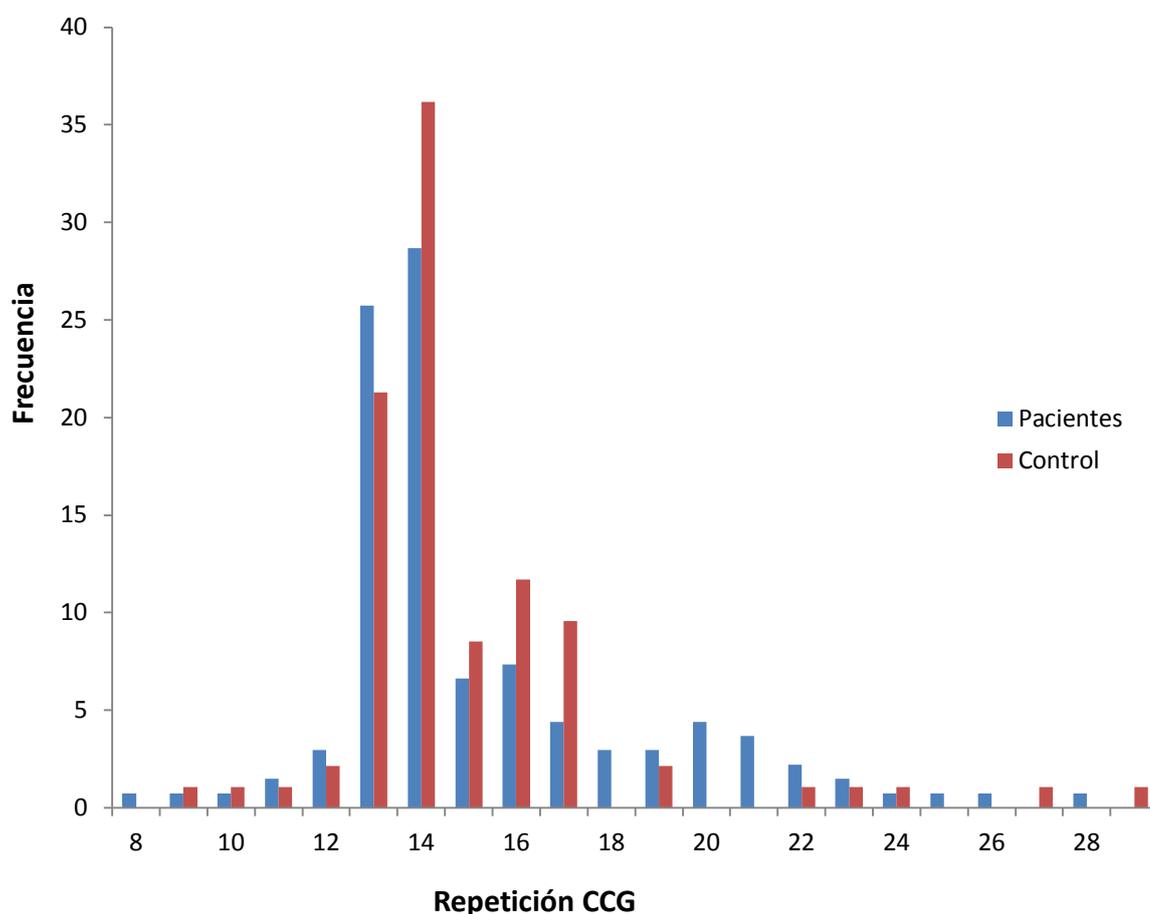


Figura IV. 9: Frecuencias alélicas de la repetición CCG en el grupo de pacientes y en el grupo control

3.1.2. Subgrupos de pacientes y control

Se ha realizado un análisis dividiendo a los pacientes en los tres subgrupos previamente señalados, para conocer si a alguno de ellos se asocian preferentemente los alelos con menos de 11 repeticiones CCG.

La Tabla IV.29 muestra las frecuencias alélicas de los alelos con ≤ 11 repeticiones CCG y con > 11 repeticiones CCG en los subgrupos de pacientes y el grupo control.

Tabla IV. 29: Prevalencia de alelos intermedios y premutados del gen FMR1 en los subgrupos de pacientes (Grupo 1-Grupo 3) y en el grupo control

	Pacientes			Control
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
Nº individuos	31	27	10	47
Alelos ≤ 11 CCG	2 (3,23%)	3 (5,55%)	0	3 (3,19%)
Alelos > 11 CCG	60 (96,77%)	51 (94,44%)	20 (100%)	91 (96,81%)

Al analizar los tres subgrupos por separado los resultados señalan que:

- **Grupo 1:** de los 62 alelos correspondientes a las 31 mujeres que conforman este grupo, 2 (3,23 %) tienen 11 o menos repeticiones CCG. Los 60 alelos restantes (96,77 %) tienen más de 11 repeticiones CCG.
- **Grupo 2:** el 5,55 % de los alelos de este grupo (3 alelos) tienen 11 o menos repeticiones CCG.
- **Grupo 3:** en este grupo de pacientes todos los alelos tienen más de 11 repeticiones CCG.

El análisis estadístico realizado muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos de pacientes por separado cuando los comparamos con el grupo control ($p > 0,05$ en todos los casos, χ^2).

3.2. DIVERSIDAD DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

El análisis de la distribución de las frecuencias genotípicas se ha llevado a cabo en:

- La muestra total de pacientes
- La muestra control total
- Los subgrupos de pacientes

3.2.1. Pacientes y control

La distribución de frecuencias genotípicas observadas para el *locus* CCG en el **grupo de pacientes** se encuentra representada en la Tabla IV.30.

El número de genotipos posibles, fruto de la combinación de los 20 alelos de diferente longitud identificados en la muestra de pacientes, es de 210. De ellos se han detectado 33. Los genotipos más frecuentes están formados por la combinación de los alelos predominantes, que corresponderían a 13 y 14 repeticiones CCG.

El genotipo más frecuente es el 13-13 (14,71 %), formado por dos alelos de 13 repeticiones CCG, seguido del genotipo 14-14 (10,29 %).

Al igual que ocurre en el gen FMR1, la mayoría de genotipos encontrados en este grupo se encuentran poco representados, destacando, como ya se ha comentado, los genotipos formados por los alelos más frecuentes.

Tabla IV. 30: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo de pacientes

Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
8-13	1	0,0147	14-16	2	0,0294
9-17	1	0,0147	14-17	3	0,0441
10-15	1	0,0147	14-19	3	0,0441
11-15	1	0,0147	14-20	3	0,0441
11-16	1	0,0147	14-22	3	0,0441
12-14	3	0,0441	14-25	1	0,0147
12-24	1	0,0147	14-28	1	0,0147
13-13	10	0,1471	15-16	1	0,0147
13-14	3	0,0441	16-16	1	0,0147
13-15	3	0,0441	16-18	1	0,0147
13-16	2	0,0294	16-21	1	0,0147
13-17	1	0,0147	17-21	1	0,0147
13-18	1	0,0147	18-20	1	0,0147
13-20	2	0,0294	18-26	1	0,0147
13-21	2	0,0294	19-23	1	0,0147
14-14	7	0,1029	21-23	1	0,0147
14-15	3	0,0441			

La distribución de frecuencias genotípicas observadas para el *locus* CGG en el **grupo control** se encuentra representada en la Tabla IV.31. Se han encontrado un total de 23 genotipos de 120 genotipos posibles (15 alelos de diferente longitud).

En este caso el genotipo más frecuente es el 14-14 (17,02 %), seguido del 14-17 (12,77 %).

Tabla IV. 31: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo control

Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
9-13	1	0,0213	14-16	1	0,0213
10-13	1	0,0213	14-17	6	0,1277
11-14	1	0,0213	14-19	2	0,0426
12-13	1	0,0213	14-22	1	0,0213
12-16	1	0,0213	15-15	1	0,0213
13-13	3	0,0638	15-16	1	0,0213
13-14	4	0,0841	15-17	1	0,0213
13-15	1	0,0213	16-16	1	0,0213
13-16	5	0,1064	16-17	1	0,0213
13-34	1	0,0213	17-23	1	0,0213
14-14	8	0,1702	24-27	1	0,0213
14-15	3	0,0638			

La heterocigosidad observada obtenida para este *locus* es de 73,53 % en el caso de los pacientes y de 72,34 % en la muestra control. La heterocigosidad esperada es de 83,26 % en el grupo de pacientes y 79,2 % en el grupo control. Estos valores concuerdan con la presencia de alelos predominantes y con una distribución homogénea de valores entre los mismos.

3.2.2. Subgrupos de pacientes y control

Las Tablas IV.32, IV.33 y IV.34 muestran las frecuencias genotípicas observadas en los tres subgrupos de pacientes.

En el **grupo 1** el genotipo más frecuente es el 14-14 (12,90 %) formado por dos alelos con 14 repeticiones CCG. El segundo genotipo en frecuencia es el 13-13 que engloba el

9,68 % de los genotipos presentes. Los genotipos 13-20, 13-21, 14-17 y 14-22 tienen una frecuencia de 6,45 % cada uno de ellos. Los genotipos más frecuentes son los homocigotos para la repetición CCG.

Tabla IV. 32: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo 1 de pacientes

Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
9-17	1	0,0323	14-16	1	0,0323
11-16	1	0,0323	14-17	2	0,0645
12-14	1	0,0323	14-19	1	0,0323
13-13	3	0,0968	14-20	1	0,0323
13-14	1	0,0323	14-22	2	0,0645
13-15	1	0,0323	14-25	1	0,0323
13-16	1	0,0323	16-16	1	0,0323
13-17	1	0,0323	16-21	1	0,0323
13-20	2	0,0645	18-20	1	0,0323
13-21	2	0,0645	18-26	1	0,0323
14-14	4	0,1290	21-23	1	0,0323

Tabla IV. 33: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo 2 de pacientes

Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
8-13	1	0,0370	14-15	2	0,0741
10-15	1	0,0370	14-17	1	0,0370
11-15	1	0,0370	14-20	1	0,0370
12-14	2	0,0741	14-22	1	0,0370
13-13	6	0,2222	14-28	1	0,0370
13-14	2	0,0741	15-16	1	0,0370
13-15	2	0,0741	16-18	1	0,0370
13-16	1	0,0370	17-21	1	0,0370
14-14	2	0,0741			

En el **grupo 2** el genotipo más frecuente es el 13-13 que supone el 22,22 % de los genotipos. Los genotipos 12-14, 13-14, 13-15, 14-14 y 14-15 tienen una frecuencia de 7,41 % cada uno de ellos. En este grupo el genotipo más frecuente es también homocigoto para la repetición CCG.

En el **grupo 3** sólo destaca el genotipo 14-19 con una frecuencia del 2 %. El resto de genotipos sólo se presentan en una paciente.

Al igual que ocurría en el grupo total de pacientes los genotipos más frecuentes son los formados por los alelos más comunes en la muestra, con 13 o 14 repeticiones CCG.

Tabla IV. 34: Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CCG en el grupo 3 de pacientes

Genotipo	N	Frecuencia
12-24	1	0,1
13-13	1	0,1
13-18	1	0,1
14-14	1	0,1
14-15	1	0,1
14-16	1	0,1
14-19	2	0,2
14-20	1	0,1
19-23	1	0,1

DISCUSIÓN

1. INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA Y ETIOLOGÍA GENÉTICA

La insuficiencia ovárica primaria (POI) es una alteración de la menopausia que lleva al cese anticipado de los periodos menstruales antes de los 40 años. Esta alteración de la vida reproductiva en las mujeres genera una infertilidad y una deficiencia de hormonas equivalente a la que sucede de manera natural durante la menopausia. Las mujeres con POI experimentan los mismos efectos clínicos pero adelantados en el tiempo con todo lo que ello conlleva a nivel óseo, articular, cardiovascular y metabólico.

Actualmente, la etiología de la insuficiencia ovárica primaria es desconocida, aunque son varias las causas tanto genéticas, autoinmunes y metabólicas que se han barajado (Jin M. et al., 2012; Silva CA. et al., 2014). Dentro de las causas genéticas, el gen FMR1, responsable del síndrome X frágil (FXS), ha sido uno de los genes más importantes asociados a POI.

El síndrome X frágil está causado principalmente por la expansión del trinucleótido CGG en la región 5'UTR del gen FMR1. Sin embargo, la insuficiencia ovárica primaria no se asocia a los alelos mutados (> 200 repeticiones CGG) causantes del FXS, sino a los alelos premutados (55-200 CGGs) e intermedios (35-54 CGGs) del gen.

Desde el primer estudio realizado por Cronister y colaboradores en el año 1991, han sido muchos los grupos que han analizado la frecuencia de portadores de alelos premutados e intermedios del gen FMR1 en mujeres que presentaban una insuficiencia ovárica primaria idiopática.

En los últimos años se ha visto que el cese de los periodos menstruales es el fenotipo más severo de disfunción ovárica entre mujeres portadoras de estos alelos y que esta condición viene precedida de una función reproductiva alterada, incluyendo diversas formas intermedias de insuficiencia ovárica (Wheeler AC. et al., 2014).

Se ha analizado adicionalmente un segundo gen, el FMR2, que se localiza próximo al gen FMR1 y que también se considera una posible causa genética de POI.

De acuerdo con lo señalado, en este trabajo se ha incluido un grupo de mujeres con problemas de fertilidad de causa desconocida, reclutadas a través de centros de medicina reproductiva e infertilidad del País Vasco en las que se ha analizado la estructura de la repetición CGG del gen FMR1 y la repetición CCG del gen FMR2.

Las mujeres que conforman la muestra de pacientes presentan una insuficiencia ovárica primaria de etiología no conocida. La mayoría se encuentra bajo un tratamiento de reproducción asistida y muchas están en proceso para recibir óvulos donados. Se ha recabado información acerca de la vida reproductiva de cada paciente, incluidos los niveles de FSH (IU/L). Se han descartado aquellas pacientes en las que la disfunción ovárica fuera secundaria a otra condición, por ejemplo enfermedades ginecológicas, radioterapia o quimioterapia. El grupo control, por su lado, está formado por mujeres con una vida reproductiva normal.

2. GEN FMR1

2.1. ANÁLISIS DE LA REPETICIÓN CGG

La longitud de la repetición CGG del gen FMR1 es un importante indicativo de la probabilidad de expandirse que muestra un alelo. Desde el descubrimiento del gen FMR1 en 1991 ha quedado claro que el riesgo de expansión de un alelo aumenta según aumenta el número de repeticiones CGG. Por ejemplo, si una mujer es portadora de un alelo con aproximadamente 100 repeticiones CGG, habrá una posibilidad cercana al 100 % de que el alelo se expanda y su(s) hijo(s) tenga(n) una mutación completa (Nolin SL. et al., 2003, 2011). Los datos publicados señalan que el alelo más pequeño en expandirse a mutación completa en una única generación contaba con 56 CGGs, teniendo la abuela del niño afectado 52 repeticiones CGG (Fernández-Carvajal I. et al., 2009a).

El límite de longitud a partir del cual un alelo comienza a ser inestable no está del todo establecido. Según el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG, *American College of Medical Genetics*) el rango considerado como intermedio o zona gris incluye alelos entre 45 y 54 repeticiones CGG. Sin embargo, autores como Schuettler y colaboradores (2011) incluyen en el rango intermedio alelos entre 31 y 54 repeticiones CGG. En este trabajo se han definido los alelos intermedios como aquellos entre 35 y 54 repeticiones CGG, incluyendo el rango superior de la categoría normal. Esta clasificación ha sido utilizada en trabajos previos de nuestro grupo (Arrieta I. et al., 2008, 2009; Barasoain M. et al., 2012, 2013, 2014) y también por otros grupos de investigación (Bretherick KL. et al., 2005; Kline JK. et al., 2014). Este conjunto de alelos son relativamente raros en la población, de hecho en la población control incluida en este estudio no se han encontrado alelos en este rango.

El equipo de investigación de Gleicher en el año 2010 propuso que el gen FMR1 tenía un papel en la función ovárica y estableció el rango normal entre 26 y 34 repeticiones CGG (Gleicher N. et al., 2010a), una clasificación diferente a la propuesta para los efectos

neuro-psiquiátricos asociados a este mismo gen (Gleicher N. et al., 2014b). Por todo ello consideramos que el rango establecido como intermedio en este trabajo es adecuado según los objetivos propuestos.

Para determinar el número de repeticiones CGG del gen FMR1 en los dos cromosomas X de cada muestra, se han utilizado dos técnicas que ha permitido corroborar el número exacto de repeticiones. Las dos técnicas se basan en una PCR que amplifica la región del gen FMR1 y que incluye las repeticiones CGG, seguida de una electroforesis capilar. La primera es un kit comercial (Abbott) que tiene dos ventajas principales: amplifica una región control del cromosoma X y del cromosoma Y, y además realiza dos carreras, una para fragmentos cortos y otra para fragmentos largos, de manera que evita los falsos negativos debidos a una mala amplificación en muestras con un número elevado de repeticiones. La segunda técnica es una PCR múltiple que ha permitido por un lado confirmar el número de repeticiones y por otro determinar al mismo tiempo el número de repeticiones CCG del gen FMR2.

2.1.1. Muestra total de pacientes y control

En primer lugar se han analizado los grupos de pacientes y control en base a las características poblacionales. Considerando ambos grupos como una única población, se han analizado 230 cromosomas X entre los que se han encontrado 29 alelos de diferente longitud, con un rango de repeticiones de 18 a 70 CGGs.

a. Frecuencias alélicas

En relación a la distribución de frecuencias alélicas, los alelos más comunes tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control son aquellos **alelos normales** con 20, 29, 30 y 31 repeticiones CGG. Más concretamente, el alelo de 30 repeticiones es el más frecuente en ambos grupos y engloba aproximadamente el 40 % de los alelos. El alelo de 29 CGGs es el segundo en frecuencia (13,48 %). El alelo de 20 CGGs tiene una frecuencia de 12,17 %, similar al 11 % encontrado anteriormente por nuestro grupo en población vasca (Peñagarikano O. et al., 2004).

La distribución de los tamaños de la repetición CGG en la población estudiada es similar a la encontrada en otras poblaciones caucásicas. En general, los alelos de 29 y 30 CGGs son los de mayor prevalencia en estas poblaciones de origen caucásico y también en la población vasca estudiada anteriormente por nuestro grupo (Arrieta I. et al., 2003; Peñagarikano O. et al., 2004). El alelo de 20 repeticiones CGG, que es el tercero en frecuencia en la población estudiada y el segundo en el grupo de pacientes, no es frecuente en otros grupos étnicos y se presenta casi exclusivamente en población caucásica (Eichler EE. et al., 1995; Eichler EE. y Nelson D. 1996; Kunst CB. et al., 1996; Wang YC. et al., 2000).

Son varios los autores que han evidenciado un fuerte efecto fundador en las poblaciones del oeste de Europa (Chakravarti A. 1992; Richards RI. et al., 1992; Oudet C. et al., 1993; Chiurazzi P. et al., 1996). En estas poblaciones existen diferencias significativas en la distribución de frecuencias alélicas y haplotípicas entre cromosomas normales encontrados en la población general y cromosomas con la mutación completa causantes del FXS (Rousseau F. et al., 1995; Crawford DC. et al., 2001). Se ha supuesto que los cromosomas mutados presentes actualmente en las poblaciones del oeste de Europa tienen su origen en cromosomas intermedios que han sufrido múltiples expansiones (Peprah E. 2012).

Respecto a los **alelos intermedios y premutados**, se han encontrado exclusivamente en el grupo de pacientes y representan respectivamente el 12,5 % y el 2,21 % de los alelos de este grupo. Si tuviéramos en cuenta la muestra global de pacientes y control habría un 7,39 % de alelos intermedios y un 1,3 % de alelos premutados entre los 230 cromosomas X analizados.

La frecuencia de alelos premutados en la población general se estima en 1:130-1:250 mujeres (Tassone F. et al., 2014), es decir entre 0,77 % y 0,4 %. La frecuencia de mujeres portadoras de un alelo premutado en el presente estudio es de 2,61 % entre las 115 mujeres analizadas, un porcentaje superior al encontrado en la población caucásica. Este porcentaje se eleva hasta el 4,41 % de las 68 mujeres englobadas en el grupo de pacientes.

En relación a los alelos intermedios, la frecuencia estimada en la población general es de un 5-9 % (Snow K. et al., 1993; Larsen LA. et al., 1997; Patsalis PC. et al., 1999a; Crawford DC. et al., 2001). El porcentaje de alelos intermedios en el grupo de pacientes es superior al esperado (12,5 %). Sin embargo, el porcentaje en el conjunto de la población analizada (7,39 %) se acerca al esperado para estos alelos.

Considerando solo el tamaño de la repetición CGG del gen FMR1, la frecuencia de alelos potencialmente inestables en la muestra estudiada es significativamente superior a la esperada en las mujeres de la población general, pudiendo atribuir esta mayor inestabilidad a la presencia de alelos intermedios y premutados en el grupo de mujeres con una insuficiencia ovárica primaria.

b. Frecuencias genotípicas

En relación a las frecuencias genotípicas, como era de esperar, en ambos grupos los genotipos predominantes son los formados por los alelos más comunes. Tanto el grupo de pacientes como el grupo control se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

La heterocigosidad esperada en el grupo de pacientes (81,82 %) en el *locus* de la repetición CGG es similar a la encontrada en otras poblaciones caucásicas (Eichler EE. et al., 1996, Crawford DC. et al., 2000b). La heterocigosidad esperada en el grupo control es, sin embargo, más baja de lo esperado (75,8 %) y similar a la encontrada previamente en población vasca (75,76 %) (Peñagarikano O. et al., 2004).

Según Richards y colaboradores (1996), valores bajos de heterocigosidad sugieren un menor riesgo de inestabilidad genética y predicen una menor incidencia de la enfermedad, lo que concuerda con el hecho de haber encontrado esta baja heterocigosidad en el grupo control que parece más estable que el grupo de pacientes. Aún así no se han encontrado diferencias significativas en los valores de heterocigosidad entre el grupo de pacientes y el grupo control.

2.1.2. Asociación entre el tamaño de la repetición CGG del gen FMR1 y la insuficiencia ovárica primaria

a. Alelos premutados y POI

Actualmente, la relación entre la insuficiencia ovárica primaria y los alelos premutados del gen FMR1 está claramente aceptada. Estos alelos se han encontrado en aproximadamente el 11 % de mujeres con POI familiar y en cerca del 3 % de mujeres con POI esporádico. Recientemente Murray y colaboradores (2014) han estimado que este último porcentaje se acerca más al 2 %. De acuerdo con lo señalado, mujeres que porten alelos en el rango de la premutación tienen un riesgo mayor de sufrir una disfunción ovárica que puede variar desde una fertilidad disminuida a una menopausia precoz.

En este trabajo, la frecuencia de alelos premutados en el grupo de pacientes es de 2,21 %, cercano al 2 % sugerido por Murray y colaboradores (2014) para mujeres con POI idiopático. Sin embargo, en el presente estudio los tres alelos premutados encontrados en el grupo de pacientes pertenecen a mujeres con ciclos irregulares, fecundidad reducida y niveles de FSH normales o elevados (grupos 1 y 2), no a mujeres con amenorrea (grupo 3). Streuli y colaboradores (2009) hallaron un 5,6 % de alelos premutados en mujeres con una reserva ovárica disminuida, un porcentaje todavía superior al observado en nuestro estudio.

Se ha tenido en cuenta también la frecuencia de mujeres portadoras de alelos premutados ya que parece que el uso de la frecuencia de alelos, subestima la frecuencia de repeticiones premutadas en una muestra de alelos mayoritariamente normales (Pastore LM. y Johnson J. 2014). En los subgrupos 1 y 2 del grupo de pacientes analizados en el presente estudio, la frecuencia de mujeres portadoras de alelos premutados es de 4,41 %. Este porcentaje es algo más elevado que el 1,3 % encontrado por otros autores (Karimov CB. et al., 2011; De Geyter C. et al., 2013) en un grupo de mujeres con baja reserva ovárica o infertilidad. Esta diferencia probablemente se deba al tamaño de la muestra, ya que estos autores analizaron más de 300 mujeres.

b. Alelos intermedios y POI

La asociación entre la POI y los alelos intermedios es controvertida. Algunos autores han sugerido que las mujeres con alelos intermedios tienen un mayor riesgo de sufrir POI (Bretherick KL. et al., 2005; Bodega B. et al., 2006), mientras que otros no han encontrado dicha asociación (Bennett CE. et al., 2010; Voorhuis M. et al., 2014).

La frecuencia de alelos intermedios en la muestra de pacientes es de 15 % para el grupo 3, mujeres con amenorrea y niveles elevados de FSH. Este porcentaje es similar al 14,2 % de alelos entre 35 y 54 CGGs publicado por Bretherick y colaboradores en mujeres con amenorrea (Bretherick KL. et al., 2005). Teniendo en cuenta el total de la muestra de pacientes, el porcentaje de alelos intermedios es de 12,50 %. Aunque en este trabajo no se han encontrado alelos intermedios en el grupo control, la incidencia de estos alelos en el grupo de pacientes sigue siendo más elevada que la encontrada previamente por nuestro grupo de investigación en población vasca (3,16 % en mujeres) (Arrieta I. et al., 2003).

Como en el caso de los alelos premutados, se ha tenido en cuenta también la frecuencia de mujeres portadoras de alelos intermedios, que se elevaría hasta el 25 % en el grupo de pacientes. La proporción de portadoras de alelos entre 35 y 44 repeticiones CGG en otros trabajos realizados en mujeres con una reserva ovárica disminuida varía entre 14 y 17 % (Streuli I. et al., 2009; Pastore LM. et al., 2012). De Geyter y colaboradores (2014) encontraron un 21,12 % de mujeres portadoras de alelos entre 35 y 54 CGGs (14,8 % entre 35 y 44 CGGs y 2,4 % entre 45 y 54 CGGs), pero en cambio, estos autores no detectaron diferencias significativas al comparar con mujeres fértiles.

Por otro lado, siguiendo la clasificación de Gleicher y colaboradores (2010, 2012, 2013, 2014), se ha comprobado también si existen diferencias entre el grupo de pacientes y control en el porcentaje de mujeres con el subgenotipo heterocigoto normal/bajo. Según este grupo este subgenotipo, compuesto por un alelo normal (26-34 CGGs) y un alelo por debajo de las 26 repeticiones CGG, estaría asociado a una menor reserva ovárica a edades tempranas y a un mayor riesgo autoinmune.

Los datos del presente estudio no muestran diferencias significativas en el porcentaje de mujeres con el subgenotipo heterocigoto normal/bajo entre pacientes y control (35,2 % en pacientes vs. 36,17 % en control).

Considerando el grupo de pacientes en su conjunto, la frecuencia de alelos con más de 35 repeticiones CGG es estadísticamente mayor que en el grupo control. Se puede considerar por tanto que, en relación al número de repeticiones CGG, los datos sugieren que entre las mujeres con signos de disfunción ovárica del País Vasco existe una mayor frecuencia de alelos premutados e intermedios. Por tanto, el gen FMR1 parece tener un papel en la etiología de la disfunción ovárica en la muestra analizada.

Cuando separamos las pacientes en los tres subgrupos descritos, como ya se ha comentado, no se observan diferencias significativas entre ellos pero podemos destacar que:

- **Grupo 1:** en estas mujeres con ciclos irregulares, fecundidad reducida y niveles de la hormona FSH <10 IU/L, el 17,74 % de los alelos tiene más de 35 repeticiones CGG, 14,52 % está en el rango intermedio y 3,23 % está en el rango de la premutación.
- **Grupo 2:** compuesto por mujeres con ciclos irregulares, fecundidad reducida y elevados niveles de FSH entre las que el 11,11 % de los alelos tiene más de 35 repeticiones CGG, 9,25 % oscila entre 35-54 CGGs y 1,85 % corresponde a alelos premutados.
- **Grupo 3:** conformado por 10 mujeres que presentaron amenorrea al menos durante cuatro meses consecutivos y niveles de FSH ≥ 10 IU/L. En este grupo no hay alelos premutados pero el 15 % tienen entre 35 y 54 repeticiones.

Los alelos premutados, por tanto, no se asocian exclusivamente a mujeres con una menopausia temprana, sino también a mujeres con signos de disfunción ovárica.

2.2. ANÁLISIS DE LAS INTERRUPCIONES AGG EN LA SECUENCIA REPETITIVA CGG

Poco después del descubrimiento del gen FMR1, se observó que las repeticiones CGG estaban interrumpidas por un triplete AGG y se propuso que este triplete influía en la estabilidad de la repetición CGG del gen durante su transmisión a la descendencia, actuando como anclaje e impidiendo su expansión (Eichler EE. et al., 1994).

Desde entonces, han sido varios los autores que han investigado el papel de las interrupciones AGG en la expansión del gen FMR1. A partir de estos estudios se puede concluir lo siguiente:

- Las interrupciones AGG influyen en la estabilidad de las repeticiones CGG del gen FMR1 durante su transmisión (Yrigollen CM. et al., 2012; Nolin SL. et al., 2013)
- La presencia o ausencia de interrupciones AGG no está correlacionada con la actividad transcripcional o traduccional del gen (Tassone F. et al., 2007c; Ludwig AL. et al., 2009; Peprah E. et al., 2010; Yrigollen CM. et al., 2011)
- Los patrones de interrupciones AGG pueden variar ampliamente entre poblaciones, pero son, en la mayoría de casos, heredados sin cambios (Eichler EE. et al., 1995; Peprah E. 2012)

En el año 2012, Yrigollen y colaboradores demostraron que alelos con el mismo número de repeticiones CGG tenían un riesgo menor de expandirse a mutación completa cuando presentaban interrupciones AGG. El riesgo estaba inversamente relacionado con el número de interrupciones. Este mismo estudio sugería también que la edad materna podía contribuir en el riesgo de expansión a mutación completa, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos (Yrigollen CM. et al., 2012).

En el año 2013, Nolin y colaboradores realizaron un estudio multicéntrico en el que analizaron 457 trasmisiones de alelos maternos con 45-69 repeticiones CGG y demostraron que las interrupciones AGG aumentan significativamente la estabilidad de

los alelos incluidos en la zona gris y en la zona baja del rango premutado durante su transmisión. De hecho, todas las mutaciones completas provenían de alelos maternos sin interrupciones AGG. Estos autores mostraron además que la magnitud del cambio en el tamaño del alelo durante una transmisión inestable se correlaciona inversamente con el número de interrupciones AGG (Nolin SL. et al., 2013).

En ambos estudios, la inclusión del patrón de interrupciones AGG en un modelo predictivo del riesgo de expansión a mutación completa mejoraba la predicción frente a modelos que solo tenían en cuenta el número de repeticiones CGG.

En el año 2014, el grupo de Yrigollen analizó un total de 710 transmisiones de 525 madres portadoras de la premutación. A partir de los resultados de la investigación concluyen que la longitud de la repetición CGG es el factor que mejor predice la inestabilidad de un alelo para expandirse a mutación completa pero que el número de interrupciones AGG y en menor medida la edad materna son también factores a tener en cuenta (Yrigollen CM. et al., 2014a). Este mismo año el grupo de Nolin aumentó el estudio previo incluyendo trasmisiones de alelos maternos y paternos con 45-90 repeticiones CGG. Los resultados de dicho estudio refuerzan la asociación entre el número de interrupciones AGG y la estabilidad de la repetición CGG (Nolin SL. et al., 2014).

2.2.1. Número de interrupciones AGG

La secuencia repetitiva CGG del gen FMR1 posee una interrupción AGG cada 9-10 unidades de repetición. Los alelos normales presentan frecuentemente dos interrupciones AGG. Es menos probable que estos alelos tengan una o ninguna interrupción y rara vez presentan más de dos interrupciones. En cambio, los alelos intermedios y premutados presentan, generalmente, una o ninguna interrupción AGG.

La Figura V.1 muestra las diferentes vías de expansión de la repetición CGG. Principalmente la expansión puede generarse por una elongación gradual de la repetición CGG o bien por la pérdida de interrupciones AGG.

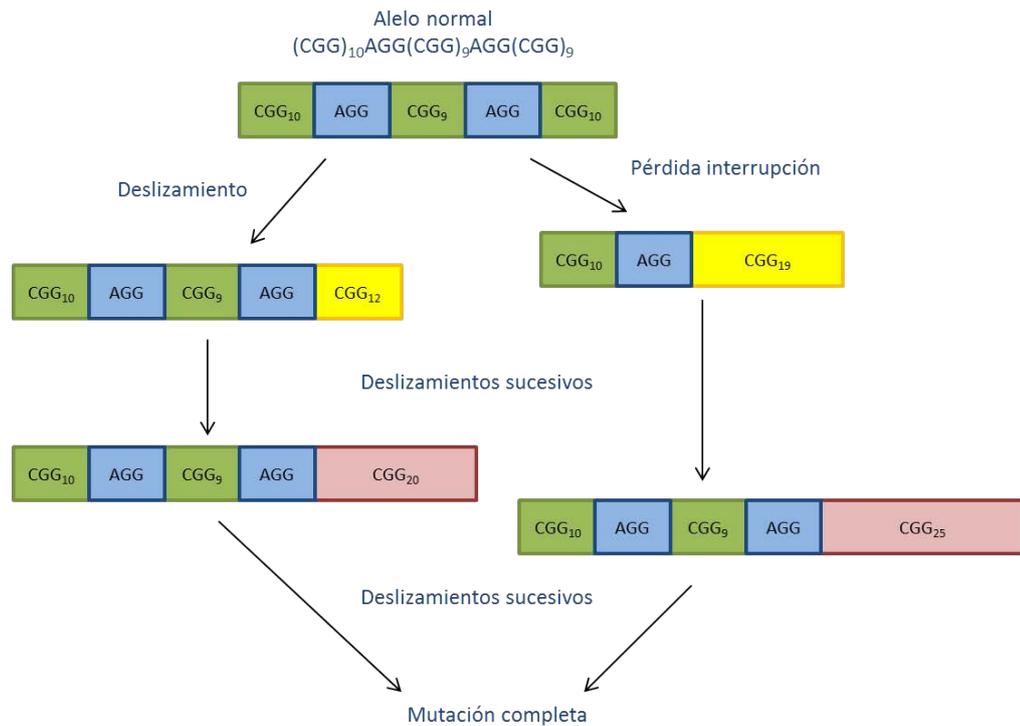


Figura V. 1: Vías de expansión de la repetición CGG

Los mecanismos que pueden llevar a la pérdida de interrupciones AGG incluyen: la conversión génica, el intercambio desigual entre cromátidas hermanas, la delección del triplete AGG o la mutación por transversión de una adenina por una citosina. Al perderse una interrupción AGG, los dos tramos de repeticiones CGG contiguos a la interrupción se unirían (Eichler EE. et al., 1996).

La pérdida de estas interrupciones, sin embargo, no parece ser un evento común. Recientemente, Nolin y colaboradores (2014) observaron que la única pérdida de interrupciones AGG en 1040 transmisiones analizadas ocurría en dos alelos maternos que habían disminuido en tamaño. Los resultados de esta investigación sugieren que el mecanismo principal de pérdida de interrupciones se produce a través de delecciones que generan tamaños de repetición más pequeños. De acuerdo con lo señalado, la

expansión de tripletes CGG en el gen FMR1 se produce, por tanto, más comúnmente por ganancia de tripletes y no por pérdida de interrupciones.

En el presente trabajo se ha analizado el número de interrupciones AGG con el fin de identificar si la pérdida de estas interrupciones es un factor importante en la expansión de la secuencia repetitiva en la muestra analizada. Los datos obtenidos no muestran diferencias significativas en el número de interrupciones AGG entre el grupo de pacientes y el grupo control. En ambos grupos el número de interrupciones oscila entre 0 y 3. La mayoría de alelos en ambos grupos muestran dos interrupciones AGG (66,91 % en pacientes y 64,89 % en control).

Los datos obtenidos al analizar los tres subgrupos de pacientes por separado señalan de nuevo que la mayoría de alelos tienen dos interrupciones y que el número de interrupciones oscila entre 0 y 3. Sin embargo, sí hay diferencias entre los grupos. En el grupo 2 no hay alelos con tres interrupciones y en el grupo 3 no hay alelos sin interrupciones.

En el grupo de pacientes, las interrupciones AGG se correlacionan con la categoría de longitud total del alelo. Aunque la mayoría de alelos normales, intermedios y premutados tienen dos interrupciones (66,38 %, 70,59 % y 66,67 % respectivamente), el porcentaje de alelos sin interrupciones es mayor según aumenta el número de repeticiones CGG (Normal: 2,59 %, Zona gris: 5,88 %, Premutación: 33,33 %). Estos datos sugieren que la pérdida de interrupciones AGG podría ser un mecanismo mediante el cual un alelo normal se expande. Esto no está en concordancia con trabajos previos de nuestro equipo de investigación en los que alelos con un número de repeticiones alto mantenían las interrupciones AGG (Arrieta I. et al., 1999; Peñagarikano O. et al., 2004).

Según Dombrowski y colaboradores (2002), la pérdida de interrupciones AGG podría considerarse un evento tardío en la ruta de mutación que lleva a la expansión de la repetición CGG. Los autores observaron que los alelos intermedios y premutados mostraban principalmente dos interrupciones AGG. Nolin y colaboradores (2003) obtuvieron resultados similares, con alelos premutados con más de 90 repeticiones CGG

que presentaban dos interrupciones. En el trabajo de Yrigollen y colaboradores (2013) todos los alelos premutados tenían también dos interrupciones AGG. Esas observaciones concuerdan con los resultados del presente trabajo en los que los alelos intermedios y premutados muestran preferentemente dos interrupciones y apoyan la sugerencia de Dombrowski de que la pérdida de interrupciones no es el suceso inicial asociado a la inestabilidad de un alelo, sino que probablemente es un suceso más tardío que ocurre antes de la expansión de un alelo hacía la mutación completa.

Es interesante destacar que el único alelo con tres interrupciones AGG pertenece a la zona gris. Es raro que alelos en este rango tengan más de dos interrupciones. Supuestamente estos alelos con tres interrupciones AGG son altamente estables y no deberían expandirse. Nolin y colaboradores (2014) encontraron solo un alelo materno con 61 repeticiones CGG y tres interrupciones que se expandió a 63 repeticiones. Macpherson y colaboradores (1995) sin embargo encontraron un alelo paterno con 29 repeticiones CGG y dos interrupciones que se expandió a 39 repeticiones CGG con tres interrupciones en una única generación.

De acuerdo con lo señalado la presencia de más de dos interrupciones AGG no siempre es signo de una mayor estabilidad. De nuevo estos datos apoyan la sugerencia de Dombrowski de que la pérdida de interrupciones no es el suceso inicial asociado a la inestabilidad.

2.2.2. Patrón de interrupciones AGG

Los alelos normales, como ya se ha comentado previamente, tienen una interrupción AGG cada nueve o diez repeticiones CGG y por tanto los patrones de interrupción 9+9+9 y 10+9+9 son predominantes en todas las poblaciones estudiadas (Yrigollen CM. et al., 2014b).

En el estudio realizado por Yrigollen y colaboradores en 2014 (Yrigollen CM. et al., 2014b) analizaron el patrón de interrupciones AGG en nueve poblaciones mundiales. El

patrón 10+9+9 era el más común excepto en las poblaciones de África-America, Asia, Indonesia, Malasia, Borneo y Tíbet en las que la estructura 9+9+9 era la más frecuente. Los datos obtenidos en este trabajo son consistentes con los publicados previamente por otros grupos (Eichler EE. y Nelson D. 1996; Kunst CB. et al., 1996; Larsen LA. et al., 2000; Dombrowski C. et al., 2002; Peñagarikano O. et al., 2004; Zhou Y. et al., 2006).

En el presente estudio la secuencia predominante tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control es 10+9+9 (35,22 %), seguida de las secuencias 9+9+9 (12,61 %) y 10+9 (11,74 %).

En el grupo de pacientes y en el grupo control la heterocigosidad esperada cuando se tienen en cuenta las interrupciones AGG no varía significativamente con respecto a la esperada cuando se tiene en cuenta solamente el número de repeticiones CGG. Este hecho parece indicar que la estructura interna de la repetición CGG aporta poca variabilidad y que la posición de las interrupciones AGG se ha mantenido inalterada a lo largo del tiempo.

Esta baja diferencia en las heterocigosidades esperadas también fue observada en las investigaciones realizadas por el grupo de Eichler (1995) y por trabajos previos de nuestro equipo de investigación (Peñagarikano O. et al., 2004). Al analizar la posición de las interrupciones señalaron que esta baja diferencia en las heterocigosidades podía deberse a la predominancia de patrones particulares para longitudes totales específicas. Esta propuesta concuerda con los datos observados en este trabajo en el que los alelos más frecuentes en cuanto al número de repeticiones CGG, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, presentan estructuras predominantes: el 90 % de los alelos con 30 CGGs tienen la estructura 10+9+9 y aproximadamente el 93 % de los alelos con 29 CGGs tienen la estructura 9+9+9.

a. Posición de la primera interrupción AGG

En 1998 Gunter y colaboradores analizaron el SNP ATL1, situado en el primer intrón del gen FMR1, en cromosomas X normales y en portadores de la mutación X frágil (Gunter C. et al., 1998). Este SNP reveló un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los

cromosomas inestables y la posición de la primera interrupción AGG y concluyeron que la posición de esta primera interrupción, la más cercana al extremo 5', se podía considerar un factor adicional que influye en la estabilidad de la repetición CGG. De esta forma, las estructuras 9+n, que presentan la primera interrupción en la posición 10, son más comunes entre los alelos intermedios y premutados en población caucásica y se heredan de forma más inestable que las estructuras 10+n, con la primera interrupción en la posición 11 (Crawford DC. et al., 2000a).

En el presente estudio y teniendo en cuenta exclusivamente la posición de la primera interrupción AGG, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control el patrón predominante es el 10+n, con la primera interrupción en la 11ª posición (54,41 % en pacientes y 56,38 % en control).

En el grupo de pacientes, la posición de la primera interrupción se correlaciona con la categoría de longitud total del alelo, de forma que alelos dentro de la zona gris y premutados muestran en mayor medida un patrón 9+n (76,47 % y 66,67 % respectivamente). Al dividir el grupo de pacientes en los tres subgrupos, de nuevo el patrón de interrupciones 10+n es el más prevalente entre los alelos del rango normal, mientras que el patrón 9+n destaca entre los alelos intermedios de los grupos 1 y 2. Los alelos premutados del grupo 1 muestran esta misma estructura y el alelo premutado del grupo 2 no tiene interrupciones.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación también encontraron resultados similares. El patrón 9+n era el predominante entre los alelos intermedios, mientras que el patrón 10+n se asociaba preferentemente a los alelos del rango normal (Arrieta I. et al., 2003, 2008).

De acuerdo a la posición de la primera interrupción AGG, el gen FMR1 en el grupo de pacientes parece ser más inestable que en el grupo control, debido a la presencia en el grupo de pacientes de alelos intermedios y premutados que presentan más frecuentemente un patrón de interrupciones del tipo 9+n, teóricamente más inestables en la transmisión.

2.2.3. Longitud de repeticiones puras

El número de repeticiones puras, sin interrupciones AGG, se ha considerado un factor de inestabilidad de la repetición CGG desde que en 1994, el grupo de Eichler y colaboradores observaron que la mayoría de alelos que se habían transmitido de manera inestable habían perdido una interrupción y habían dado lugar a alelos con largas repeticiones CGG puras. Alelos que superaban las 34 CGGs puras se transmitían siempre de manera inestable (Eichler EE. et al., 1994).

Ese mismo año, Kunst y Warren señalaron que los cromosomas X mutados derivaban de cromosomas con más de 24 repeticiones CGG puras. Propusieron además una prevalencia de alelos normales que tenían predisposición a expandirse del 2 % en población caucásica. En el presente estudio, el porcentaje de alelos con más de 24 repeticiones puras en el grupo control es de 2,13 %, cercano al 2 % propuesto por Kunst y Warren (1994) y superior al porcentaje encontrado en población vasca (Peñagarikano O. et al., 2004). El porcentaje de estos alelos en el grupo de pacientes se eleva hasta el 8,09 %.

En el año 2000, Larsen y colaboradores observaron que se daba una relación exponencial entre la longitud de repeticiones puras y la probabilidad de expandirse de un alelo (Larsen LA. et al., 2000).

El límite a partir del cual se considera que un alelo posee repeticiones puras largas es el de 15 repeticiones CGG puras. Este ha sido el límite utilizado en el presente trabajo. El porcentaje de alelos con más de 15 repeticiones CGG puras es de 22,79 % en el grupo de pacientes y de 18,09 % en el grupo control, no siendo las diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, las diferencias son significativas entre los alelos normales, intermedios y premutados dentro del grupo de pacientes. Es decir, existe una asociación entre la longitud total de la repetición y el número de repeticiones CGG puras, de forma que la mayoría de alelos intermedios (88,24 %) y todos los alelos premutados presentan largas repeticiones CGG puras. Lo mismo ocurre en los tres subgrupos de pacientes por separado.

Estos últimos datos están en concordancia con la dinámica de la mutación X frágil, en la que trectos largos de repeticiones puras se generan por un aumento gradual en el número de repeticiones o por una pérdida de interrupciones AGG (Eichler EE. et al., 1994; Kunst CB. y Warren ST. 1994; Sullivan AK. et al., 2002; Peñagarikano O. et al., 2004).

Por otro lado, se ha estudiado el número de interrupciones AGG en función de la longitud de repeticiones puras y el análisis ha mostrado que ambas variables están asociadas. Los alelos con trectos largos de repeticiones puras muestran una o ninguna interrupción, mientras que los alelos con trectos cortos muestran preferentemente dos interrupciones. Cuando nos fijamos en la categoría de longitud total, los alelos con largas repeticiones puras del rango normal son los que muestran una o ninguna interrupción, y estos mismos alelos en la zona gris y el rango premutado muestran preferentemente dos interrupciones. Según estos datos parece que la pérdida de interrupciones AGG no es la causa principal de inestabilidad de la repetición CGG ya que, como se ha observado, los alelos de la zona gris y premutados con largas repeticiones CGG puras tienen preferentemente dos interrupciones.

a. Distribución de los trectos de repeticiones puras

Una de las teorías que explica la progresión de un alelo normal a un alelo mutado supone que las expansiones se producen en el extremo 3' del gen FMR1 y que ocurre mediante pequeños incrementos en el número de repeticiones CGG. Por tanto, la mayor variabilidad en la longitud de la repetición se da en este extremo 3' (Eichler EE et al., 1994; Hirst MC. et al., 1994; Zhong N. et al., 1995; Kunst CB. et al., 1996; Peñagarikano O. et al., 2004; Arrieta I. et al., 2008). Este hecho se denomina **variabilidad polarizada**.

Por otro lado, y como ya se ha comentado previamente la primera interrupción AGG, que se localiza más cerca del extremo 5' y por tanto el número de repeticiones previo a esta interrupción es también un factor importante en la estabilidad de la repetición CGG.

En este trabajo se han analizado los diferentes tractos (5', medio y 3') que se pueden observar en la repetición CGG para conocer si existe una preferencia en el tracto que experimenta la expansión. Tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control el tracto 3' es el más variable, oscilando entre 9 y 45 repeticiones CGG, mientras que el tracto medio es el menos variable. En el tracto medio y en el 3' predomina la longitud de 9 CGGs mientras que en el tracto 5' predomina la longitud de 10 CGGs. De modo que aunque los tractos 5' y 3' tienen un rango amplio de repeticiones CGG, la moda se encuentra en el extremo inferior de la distribución.

Se ha analizado también la frecuencia de alelos con largas repeticiones puras en los tres tractos. Tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, esta frecuencia es similar en los tractos 3' y 5', no siendo las diferencias estadísticamente significativas, aunque en el tracto 3' el porcentaje es ligeramente superior. Estos resultados indican que el aumento en el número de repeticiones CGG ocurre indistintamente en los extremos 5' y 3'. Sin embargo, el porcentaje de alelos con largas repeticiones puras en el extremo 3' es significativamente superior en el grupo de pacientes en comparación con el grupo control.

En la muestra analizada los alelos con largas repeticiones puras muestran preferentemente una estructura del tipo $n+9$ en el tracto 5' y una estructura $9+9+n$ en el tracto 3'.

Cuando tenemos en cuenta la categoría de longitud total del alelo en el grupo de pacientes se ha visto que en el rango normal los alelos muestran largas repeticiones puras en el extremo 5', mientras que los alelos intermedios y premutados lo hacen preferentemente en el extremo 3'. Estos resultados concuerdan con lo observado por Crawford y colaboradores (2000b) que vieron que alelos con un número de repeticiones bajo presentaban largas repeticiones puras en el extremo 5' pero no sucedía lo mismo en alelos intermedios.

Existen también diferencias entre los diferentes tipos de alelos en la longitud predominante de cada tracto. Los alelos normales presentan preferentemente 10 CGGs

en el tracto 5' y 9 CGGs en el tracto 3'. La longitud predominante entre los alelos intermedios en ambos tractos es la de 9 CGGs, aunque en el tracto 3' esta longitud aun siendo dominante no tiene un porcentaje elevado y el rango de repeticiones encontrado en este tracto es muy variable, de 9 a 32 CGGs. Los alelos premutados muestran 10 repeticiones CGG en el tracto 5', 9 CGGs en el tracto medio y 36 y 45 CGGs en el tracto 3'. No hay diferencias entre los tres tipos de alelos en el tracto medio.

Cuando se ha dividido el grupo de pacientes en los tres subgrupos no se han observado diferencias con el grupo de pacientes general ni entre los tres subgrupos entre sí. En todos los aspectos analizados los grupos se comportan de manera similar.

Según Nolin y colaboradores (2013), el número de repeticiones ininterrumpidas en el extremo 3' es el factor que, cuando se considera por separado, mejor predice la magnitud del cambio en la longitud de la repetición para alelos entre 45 y 69 CGGs. En su trabajo observaron que los alelos con el mayor número de repeticiones CGG ininterrumpidas estaban asociados a un mayor riesgo de inestabilidad. Vieron que todos los alelos que tenían entre 61 y 69 CGGs sin interrupciones AGG eran inestables y que el porcentaje de alelos inestables se reducía según el número de CGGs ininterrumpidas disminuía. En este trabajo todos los alelos excepto dos de los alelos premutados tienen menos de 39 repeticiones CGG ininterrumpidas en el extremo 3' y según el trabajo de Nolin y colaboradores estos alelos se transmiten de forma estable en el 93 % de los casos.

2.3. MECANISMOS MOLECULARES Y MODELOS ANIMALES DE INSUFICIENCIA OVÁRICA PRIMARIA

Actualmente se conoce poco de los mecanismos que llevan al desarrollo de una insuficiencia ovárica primaria y la causas de su baja penetrancia y expresividad variable.

Está bien establecido que las mujeres portadoras de la mutación completa del gen FMR1 no sufren disfunción ovárica. Por tanto, la disminución de la proteína FMRP no parece

ser la causa de esta condición. A nivel molecular una característica diferenciadora de los alelos premutados frente a los alelos mutados es el aumento de los niveles de transcritos del gen FMR1 y un descenso moderado en los niveles de FMRP. Los niveles de FMR1-mRNA también se encuentran elevados en alelos intermedios (Allen EG. et al., 2004; Loesch DZ. et al., 2007). Este aumento de FMR1-mRNA es lo que muchos autores consideran la causa de la FXPOI y sugieren que se da una toxicidad similar a la que ocurre en el FXTAS.

Estudios de la expresión del gen FMR1, la mayoría realizados en hombres portadores de la premutación, han mostrado que los niveles de FMR1-mRNA aumentan de manera lineal con el número de repeticiones CGG. Sin embargo, el aumento en los niveles de transcritos del gen FMR1 en mujeres portadoras de la premutación no parece ser paralelo al aumento en el número de repeticiones CGG (García-Alegría E. et al., 2007; Tejada MI. et al., 2008; Schuettler J. et al., 2011), lo que podría estar relacionado con la relación no lineal entre el número de repeticiones y el riesgo de sufrir POI expuesta anteriormente por Ennis y colaboradores (2006).

Teniendo en cuenta que la investigación en humanos está en este caso limitada, el desarrollo de modelos animales y celulares que ayuden a entender la etiología de la FXPOI es importante:

2.3.1. Modelos murinos

Los modelos murinos portadores de una premutación del gen FMR1 son, hasta el momento, los mejor caracterizados (Hoffman GE. et al., 2012; Lu C. et al., 2012). Los grupos de investigación de Hoffman y Lu midieron el estado reproductivo de los ratones. La fecundidad y la fertilidad fueron normales en ambos casos. Sin embargo, los ratones del grupo de Lu y colaboradores tuvieron la primera camada a edades más avanzadas y el tamaño de esta camada fue menor. Este hecho podría ser consecuencia de una función ovárica disminuida. De hecho se encontró un número menor de folículos en

crecimiento en los ovarios de ratones de 25 días y de 9 semanas en comparación con los ratones control.

En los modelos de ratón utilizados por los equipos de Hoffman y Lu encontraron también diferencias en el desarrollo folicular y en la supervivencia de las células de la granulosa lo que es indicativo de una disfunción. Hoffman y colaboradores observaron signos de atresia en los folículos mientras que Lu y colaboradores hallaron un mayor número de células apoptóticas en los folículos de su modelo.

Otros datos resultantes de estas investigaciones fueron: una alteración en la distribución de FMRP en los ovocitos, desregulación de la vía de señalización mTOR en los ovarios, una expresión disminuida de genes implicados en la ovulación y una elevación general de las hormonas estradiol y FSH durante la vida adulta de los ratones.

Los resultados sugieren que, en estos ratones portadores de la premutación del gen FMR1, el crecimiento de los folículos se encuentra comprometido y que además la función de estos folículos es anormal (Pastore LM. y Johnson J. 2014). Estos folículos producen ovocitos de peor calidad con el gen FMR1 premutado.

2.3.2. Investigaciones en humanos

A partir de estas investigaciones en modelos animales, el siguiente paso es conocer si la calidad de los ovocitos en mujeres portadoras de alelos intermedios y premutados del gen FMR1 se ve también comprometida. En el caso de que estas mujeres presentaran un menor número de células de la granulosa, como en el caso de los ratones, se producirían niveles alterados de hormonas, y por tanto el análisis de dichas hormonas para predecir la reserva ovárica en estas mujeres no sería del todo preciso.

Investigaciones en humanos han mostrado que FMRP se expresa en los ovocitos de ovarios fetales (Rife M. et al., 2004) y en las células de la granulosa de folículos maduros (Schuettler J. et al., 2011). Más recientemente se ha visto que los niveles de FMR1-mRNA se encuentran elevados en las células de la granulosa y que además los niveles de

transcritos no se asocian de manera lineal con el número de repeticiones CGG (Elizur SE. et al., 2014).

Los grupos de Gleicher (Gleicher N. et al., 2009, 2010a) y Schuettler (Schuettler J. et al., 2011) consideran la proteína FMRP y su expresión en las células de la granulosa como una característica cuantitativa que controla la reserva ovárica: Durante la maduración folicular, las células de la granulosa expresan varias señales endocrinas y rutas de señalización controladas genéticamente que son importantes para la maduración adecuada del ovocito. Estas señales pueden verse reducidas e incluso desaparecer cuando los niveles de FMR1-mRNA y FMRP (que actúa como un represor traduccional al unirse a múltiples transcritos y controlar su nivel de traducción) se ven alterados en mujeres portadoras de alelos premutados o intermedios.

Por tanto, los niveles elevados de FMR1-mRNA que se han observado en mujeres portadoras de alelos intermedios y premutados podrían dar lugar a un efecto tóxico que lleve a una mayor atresia de los folículos (Willemsen R. et al., 2011) o a una reducción en el número de folículos en crecimiento como se ha visto en el modelo murino. En ambos casos la consecuencia sería una fertilidad disminuida.

A su vez, los niveles de FMR1-mRNA se han correlacionado tanto con el número total de repeticiones CGG como con el número de repeticiones CGG puras en 3', pero no con el número y posición de las interrupciones AGG (Yrigollen CM. et al., 2011). Es decir, la presencia de interrupciones AGG no parece afectar a la transcripción o traducción del gen FMR1.

En el presente trabajo se han encontrado diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el grupo control en los dos parámetros asociados a los niveles de transcritos. Considerando en conjunto los resultados del análisis de la estructura del gen FMR1, los datos del presente estudio sugieren que el número de repeticiones CGG y la longitud de repeticiones CGG puras en el extremo 3', correlacionados con los niveles de FMR1-mRNA, estarían asociados con un riesgo de desarrollar una disfunción ovárica. De este modo, mujeres portadoras de alelos englobados en los rangos intermedio y premutado y

que a su vez presenten más de 15 repeticiones CGG puras en 3' podrían desarrollar FXPOI. Por otro lado, aunque el número de interrupciones AGG no altere los niveles de FMR1-mRNA es un factor fuertemente asociado a la estabilidad del alelo durante su transmisión.

A partir de los resultados obtenidos, corroboramos lo sugerido por otros autores (Sherman SL. et al., 2005; Gleicher N. et al., 2014b; Pastore LM. y Johnson J. 2014) de que sería importante el análisis del gen FMR1 en mujeres que presenten algún signo de disfunción ovárica de causa desconocida. Este análisis debería incluir el estudio de la estructura del gen FMR1, tanto del número de repeticiones CGG como del patrón de interrupciones AGG. De esta manera serviría no sólo para intentar conocer la etiología de su disfunción ovárica, sino también porque, como ya se ha comentado previamente, existe una posibilidad de que alelos premutados e intermedios se expandan en tan solo unas pocas generaciones dando lugar a una mutación completa y por tanto a un síndrome del X frágil. Además, la detección de alelos dentro de estos rangos en mujeres jóvenes y el consejo genético en estos casos, sería útil y necesario para que estas mujeres planifiquen su vida reproductiva ante una posible disfunción ovárica.

La consecuencia más inmediata de una función ovárica disminuida es una fertilidad reducida. Pero una deficiencia de estrógenos prematura tendría además otras consecuencias clínicas que incluyen un mayor riesgo de osteoporosis o un aumento de la mortalidad por causas cardiovasculares (Allen EG. et al., 2014). Por otro lado, las mujeres que terminan sufriendo una menopausia a edades tempranas tienen mayores problemas de ansiedad, depresión y otros síntomas psicológicos en comparación con mujeres con una función ovárica normal (Sherman SL. et al., 2014).

3. GEN FMR2

Una vez analizado el gen FMR1 cuya relación con el desarrollo de POI está ampliamente demostrada, se ha estudiado el gen FMR2, también denominado AFF2.

FMR2 se descubrió poco tiempo después del gen FMR1 y comparte ciertas características con este último:

- Se asocia a un sitio frágil sensible al folato denominado FRAXE
- Presenta una secuencia repetitiva en la región 5'UTR. En este caso el trinucleótido que se repite es el CCG. A diferencia del gen FMR1 esta secuencia repetitiva no se ve interrumpida por un trinucleótido diferente
- Se diferencian cuatro clases alélicas: normal (6-30 CCGs), intermedia (31-60 CCGs), premutada (61-200 CCGs) y mutada (> 200 CCGs)
- Los alelos mutados del gen están asociados a una forma de retraso mental que se conoce como síndrome frágil XE

A pesar de la cercanía física y genética entre el gen FMR1 y el gen FMR2 no existe correlación entre la inestabilidad de ambos *loci* (Brown TC. et al., 1997; Sharma D. et al., 2001).

FMR2 se sitúa en el cromosoma X, a tan solo unos 150-600 kb del gen FMR1, en el *locus* cromosómico Xq28, en el brazo largo del cromosoma X. Se ha visto que en este brazo se localizan varios genes implicados en el desarrollo de POI, además de que deleciones y translocaciones que impliquen esta parte del cromosoma X también pueden ser causa de esta patología. Se han diferenciado tres regiones en el brazo q del cromosoma X relacionadas con la POI y una de ellas, la denominada POI-1, implica la región Xq21.3–q27 (Therman E. et al., 1990; Rizzolio F. et al., 2006), aunque según otros autores la región POI-1 se limitaría a la región Xq26-Xq28 (Murray A. et al., 1998; Schuettler J. et al., 2011). FMR2 estaría incluido en esta región y por tanto se puede considerar un gen candidato en el desarrollo de POI.

Murray y colaboradores (1998, 1999a) estudiaron los genes FMR1 y FMR2 en un grupo de mujeres con una insuficiencia ovárica primaria. Como previamente habían señalado otros autores, hallaron un porcentaje significativo de mujeres que eran portadoras de un alelo premutado del gen FMR1. Observaron además que el porcentaje de mujeres que portaban alelos del gen FMR2 con menos de 11 repeticiones CCG era significativamente mayor al encontrado en la población general.

A partir de los trabajos mencionados de Murray y colaboradores, el gen FMR2 ha sido considerado un gen candidato causante de POI (Goswami D. y Conway GS. 2007; De Vos M et al., 2010; Dixit H. et al., 2010; Cordts EB. et al., 2011) aunque no existen más investigaciones que hayan incluido este gen en relación al desarrollo de esta patología. Los trabajos que han analizado el gen FMR2 lo han hecho, principalmente, al estudiar pacientes con un retraso mental de causa desconocida.

En este trabajo se ha incluido el gen FMR2 con el objetivo de intentar esclarecer si existe alguna relación con el desarrollo de una insuficiencia ovárica primaria. Para ello se ha cuantificado el número de repeticiones CCG del gen FMR2 en la muestra de pacientes y en la muestra control.

Se han analizado los 230 cromosomas X y entre estos se han encontrado 22 alelos de diferente longitud, con un rango de repeticiones de 8 a 34 CCGs.

Los alelos más frecuentes tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control son los que tienen 13 y 14 repeticiones CCG que suponen casi el 50 % de los analizados. El alelo con 16 repeticiones CCG es también habitual y supone el 9,13 % del total.

En el total de la muestra solo se ha encontrado un alelo dentro del rango intermedio o zona gris que engloba alelos entre 31 y 60 repeticiones CCG. Este alelo corresponde a un individuo del grupo control y presenta 34 CCGs.

La Tabla V.1 muestra los resultados obtenidos al analizar el gen FMR2 en distintas poblaciones.

Tabla V. 1: Comparación del número de repeticiones CCG del gen FMR2 entre diferentes poblaciones

País (Población)	Nº cromosomas X	Rango CCG	Variantes alélicas	Moda	H _e	Referencia
Reino Unido (Caucásica)	86	6-25	16	15	NR	Knight SJL. et al., 1994
Canadá (Caucásica)	328	7-35	23	16	NR	Allingham-Hawkins DJ. y Ray PN. 1995
Canadá (Caucásica)	495	5-38	26	15	NR	Holden JJA. et al., 1996
Estados Unidos (Caucásica)	416	8-39	24	16	86,8	Zhong N. et al., 1996
Finlandia (Caucásica)	92	7-25	13	16	72,5	Zhong N. et al., 1996
China (Asiática)	157	9-26	17	18	87,3	Zhong N. et al., 1996
Estados Unidos (Caucásica)	487	3-35	22	15	63	Meadows KL. et al., 1996
Estados Unidos (Caucásica)	1278	3-42	34	13	NR	Brown TC. et al., 1997
Grecia, Chipre (Caucásica)	322	7-30	21	16	77	Patsalis PC. et al., 1999b
India (Caucásica)	382	3-27	20	15	83,8	Sharma D. et al., 2001
Indonesia (Asiática)	254	8-48	25	20	NR	Faradz SMH. et al., 2001

H_e: Heterocigosidad esperada; NR: No reportada

El alelo más común del gen FMR2 varía según la población analizada: el alelo con 15 repeticiones CCG es el más frecuente en un estudio realizado en población india, seguido de los alelos con 18 y 16 CCGs (Katikala L. et al., 2011). En otras poblaciones caucásicas los alelos con 15 y 16 CCGs también son los más frecuentes, mientras que los alelos con 18 y 20 CCGs son los más comunes en población asiática. El alelo con 13 CCGs fue el más frecuente en una población estadounidense.

Los alelos con mayores porcentajes encontrados en la población del presente estudio se aproximan a los más habituales hallados en otras poblaciones de origen caucásico.

En el gen FMR2, la heterocigosidad esperada para los grupos de pacientes y control es de 83,26 % y 79,2 % respectivamente. Esta heterocigosidad es algo más alta que la esperada para el gen FMR1. Según Brown y colaboradores (1997) estos valores de heterocigosidad más altos que los correspondientes al gen FMR1 pueden deberse a la falta de interrupciones en el gen FMR2 que actúan como estabilizadores de la repetición CCG del gen FMR1 y que hacen que el *locus* FRAXE tenga una mayor inestabilidad.

Siguiendo las investigaciones de Murray y colaboradores (1998, 1999a), se ha analizado la frecuencia de alelos con 11 o menos repeticiones CCG. En el presente estudio estos alelos suponen aproximadamente el 3,5 % de los alelos totales de la muestra, el 3,68 % en el grupo de pacientes y el 3,19 % en el grupo control. En este caso las diferencias no son estadísticamente significativas.

Al dividir el grupo de pacientes en los tres subgrupos para conocer si alguno de los tres podía ser más proclive a tener alelos susceptibles del gen FMR2, tampoco hemos encontrado diferencias significativas con el grupo control. El grupo 2 es el que más alelos con ≤ 11 CCGs presenta (3 alelos), mientras que el grupo 3 no muestra ningún alelo con este número de repeticiones.

Por tanto, y basándonos exclusivamente en la frecuencia de alelos con 11 o menos repeticiones CCG, no podemos concluir que el gen FMR2 esté relacionado con el desarrollo de una insuficiencia ovárica primaria en la muestra analizada.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se presentan las conclusiones más destacables del estudio.

1. GEN FMR1

1.1. LONGITUD DE LA REPETICIÓN CGG

- Los alelos más frecuentes en la muestra analizada corresponden a los esperados en población caucásica.
- La prevalencia de alelos potencialmente inestables en el grupo de pacientes (≥ 35 repeticiones CGG) es superior a la encontrada en el grupo control.
- La prevalencia de estos alelos es también superior cuando se compara cada subgrupo de pacientes por separado con el grupo control. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los tres subgrupos de pacientes.
- Los alelos intermedios y premutados del gen FMR1 en nuestro estudio se asocian no solo a una menopausia antes de los 40 años sino a otras formas intermedias de disfunción ovárica.

1.2. ESTRUCTURA INTERNA DE LA REPETICIÓN CGG

- La mayoría de alelos en la muestra analizada presentan dos interrupciones AGG.
- En los alelos normales del grupo de pacientes y el grupo control la primera interrupción AGG se localiza principalmente en la posición 11, con estructuras del tipo 10+n. Los alelos intermedios y premutados del grupo de pacientes muestran la primera interrupción en la posición 10, con estructuras del tipo 9+n.

- Los alelos intermedios y premutados del grupo de pacientes manifiestan un mayor número de repeticiones CGG puras en comparación con los alelos normales del grupo de pacientes y control.
- Los tramos de repeticiones puras en los alelos intermedios y premutados tienden a localizarse en el extremo 3'. Los alelos normales cuando tienen largas repeticiones puras lo hacen preferentemente en 5'.
- La frecuencia de alelos con repeticiones puras largas en el extremo 3' es mayor en el grupo de pacientes que en el grupo control.

En relación al gen FMR1, los datos del presente trabajo parecen indicar que hay un mayor pool de alelos de “alto riesgo” en el grupo de pacientes que podrían expandirse hacia la premutación o la mutación completa.

2. GEN FMR2

2.1. LONGITUD DE LA REPETICIÓN CCG

- Los alelos más frecuentes en la muestra analizada corresponden a los esperados en población caucásica.
- La prevalencia de alelos con 11 o menos repeticiones CCG es equivalente en los grupos de pacientes y control.

En relación al gen FMR2, los datos del presente trabajo parecen indicar que no hay una asociación entre los alelos con 11 o menos repeticiones CGG y el desarrollo de una insuficiencia ovárica primaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Adinolfi S, Ramos A, Martin SR, Dal Piaz F, Pucci P, Bardoni B, Mandel JL, Pastore A. 2003. **The N-terminus of the Fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding.** *Biochemistry* 42 (35): 10437-44.
- Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehvälaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I, de la Chapelle A. 1995. **Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure.** *Cell* 82 (6): 959-68.
- Albright F, Smith P, Fraser R. 1942. **A syndrome characterized by primary ovarian insufficiency and decreased stature.** *Am J Med Sci* 204: 625-48.
- Allen EG, He W, Yadav-Shah M, Sherman SL. 2004. **A study of the distributional characteristics of FMR1 transcript levels in 238 individuals.** *Hum Genet* 114: 439-47.
- Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, Charen K, He W, Taylor KC, Sherman SL. 2007. **Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation.** *Hum Reprod* 22 (8): 2142–52.
- Allen EG, Grus WE, Narayan S, Espinel W, Sherman SL. 2014. **Approaches to identify genetic variants that influence the risk for onset of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI): a preliminary study.** *Front Gen et* 5: 260.
- Allingham-Hawkins DJ, Ray PN. 1995. **FRAXE expression is not a common etiological factor among developmentally delayed males.** *Am J Hum Genet* 56: 72–6.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A, Jenkins EC, Brown WT, Howard-Peebles PN, Becchi C, Cummings E, Fallon L, Seitz S, Black SH, Vianna-Morgante AM, Costa SS, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Murray A, Webb J, MacSwinney F, Dennis N, Jacobs PA, Syrrou M, Georgiou I, Patsalis PC, Giovannucci Uzielli ML, Guarducci S, Lapi E, Cecconi A, Ricci U, Ricotti G, Biondi C, Scarselli B, Vieri F. 1999. **Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data.** *Am J Med Genet* 83 (4): 322-5.
- Álvarez-García E, Labandeira A. 2010. **Estudio bioquímico de la menopausia y la perimenopausia.** *Ed Cont Lab Clín (SEQC)* 13: 76-93.
- Arrieta I, Nuñez T, Gil A, Flores P, Usobiaga E, Martínez B. 1996. **Autosomal folate sensitive fragile sites in an autistic Basque sample.** *Ann Genet* 39 (2): 69-74.

- Arrieta I, Gil A, Nuñez T, Télez M, Martínez B, Criado B, Lostao CM. 1999. **Stability of the FMR1 CGG repeat in a Basque sample.** *Hum Biol* 71 (1): 55-68.
- Arrieta I, Peñagarikano O, Télez M, Ortega B, Flores P, Criado B, Veiga I, Peixoto AL, Lostao CM. 2003. **The FMR1 CGG repeat and linked microsatellite markers in two Basque valleys.** *Heredity (Edinb)* 90 (3): 206-11.
- Arrieta I, Ramírez JM, Télez M, Flores P, Criado B, Barasoain M, Huerta I, González AJ. 2008. **Analysis of the Fragile X Trinucleotide Repeat in Basques: Association of Premutation and Intermediate Sizes, Anchoring AGGs and Linked Microsatellites with Unstable Alleles.** *Current Genomics* 9: 191-9.
- Arrieta I, Télez M, Huerta I, Flores P, Criado B, Ramírez JM, Barasoain M and González AJ. 2008. **Fragile X Gene Stability in Basque Valleys: Prevalence of Premutation and Intermediate Alleles.** *Hum Biol* 80 (6): 6-12.
- Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. 1993. **FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding.** *Science* 262 (5133): 563-6.
- Au J, Akins RS, Berkowitz-Sutherland L, Tang HT, Chen Y, Boyd A, Tassone F, Nguyen DV, Hagerman R. 2013. **Prevalence and risk of migraine headaches in adult fragile X premutation carriers.** *Clin Genet* 84: 546-51.
- Bachelot A, Rouxel A, Massin N, Dulon J, Courtillot C, Matuchansky C, Badachi Y, Fortin A, Paniel B, Lecuru F, Lefrère-Belda MA, Constancis E, Thibault E, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Misrahi M, Kuttann F, Touraine P; POF-GIS Study Group. 2009. **Phenotyping and genetic studies of 357 consecutive patients presenting with premature ovarian failure.** *Eur J Endocrinol* 161 (1): 179-87.
- Barasoain M, Barrenetxea G, Ortiz-Lastra E, González J, Huerta I, Télez M, Ramírez JM, Domínguez A, Gurtubay P, Criado B, Arrieta I. 2012. **Single nucleotide polymorphism and FMR1 CGG repeat instability in two Basque valleys.** *Ann Hum Genet* 76 (2): 110-20.
- Barasoain M, Barrenetxea G, Huerta I, Télez M, Carrillo A, Pérez C, Criado B, Arrieta I. 2013. **Study of FMR1 gene association with ovarian dysfunction in a sample from the Basque Country.** *Gene* 521: 145-9.
- Barasoain M, Barrenetxea G, Huerta I, Télez M, Ortiz-Lastra E, González J, Criado B, Jorge P, Marques I, Arrieta I. 2014. **Study of the FMR1 gene structure among women with ovarian dysfunction from the Basque Country.** In: Urbano KV. (Ed.), *Advances in*

- Genetics Research, Volume 13. *Nova Science Publishers, Inc., New York*. ISBN: 978-1-63463-053-5. pp. 43-56.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST. 2004. **The mGluR theory of Fragile X mental retardation.** *Trends Neurosci* 27 (7): 370-7.
- Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN, Jacobs PA, Murray A. 2010. **Intermediate sized CGG repeat are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure.** *Hum Reprod* 25 (5): 1335–8.
- Bensaid M, Melko M, Bechara EG, Davidovic L, Berretta A, Catania MV, Gecz J, Lalli E, Bardoni B. 2009. **FRAXE-associated mental retardation protein (FMR2) is an RNA-binding protein with high affinity for G-quartet RNA forming structure.** *Nucleic Acids Res* 37: 1269-79.
- Berger R, Bloomfield CD, Sutherland GR. 1985. **Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites.** *Cytogenet Cell Genet* 40 (1-4): 490-535.
- Berman RF, Willemsen R. 2009. **Mouse models of fragile X-associated tremor ataxia.** *J Investig Med* 57: 837-41.
- Berry-Kravis E, Lewin F, Wu J, Leehey M, Hagerman R, Hagerman P, Goetz CG. 2003. **Tremor and ataxia in fragile X premutation carriers: blinded videotape study.** *Ann Neurol* 53 (5): 616-23.
- Berry-Kravis E, Potanos K, Weinberg D, Zhou L, Goetz CG. 2005. **Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in sisters related to X-inactivation.** *Ann Neurol* 57 (1): 144-7.
- Besterman AD, Wilke SA, Mulligan TE, Allison SC, Hagerman R, Seritan AL, Bourgeois A. 2014. **Towards an understanding of neuropsychiatric manifestations in fragile X premutation carriers.** *Future Neurol* 9 (2): 227-39.
- Biro FM, Lucky AW, Simbartl LA, Barton BA, Daniels SR, Striegel-Moore R, et al. 2003. **Pubertal maturation in girls and the relationship to anthropometric changes: pathways through puberty.** *J Pediatr* 142: 643-6.
- Bodega B, Bione S, Dalprà L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, Ginelli E, Marozzi A. 2006. **Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation.** *Hum Reprod* 21 (4): 952–7.

- Bonilla-Musoles F, Dolz M, Machado LE, Raga F, Bonilla Jr. F, Caballero O, Abad de Velasco L. 2009. **Fallo ovárico precoz**. En: Reproducción asistida. Abordaje en la práctica clínica. Ed.: Bonilla-Musoles, Dolz, Moreno, Raga. *Editorial Médica Panamericana (Madrid)*, pp. 117-138.
- Bourgeois JA, Seritan AL, Casillas EM, Hessler D, Schneider A, Yang Y, Kaur I, Cogswell JB, Nguyen DV, Hagerman RJ. 2011. **Lifetime prevalence of mood and anxiety disorders in fragile X premutation carriers**. *J Clin Psychiatry* 72: 175-82.
- Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP. 2005. **FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure**. *Hum Genet* 117: 376-82.
- Brightwell G, Wycherley R, Waghorn A. 2002. **SNP genotyping using a simple and rapid single-tube modification of ARMS illustrated by analysis of 6 SNPs in a population of males with FRAXA repeat expansions**. *Mol Cell Probes* 16 (4): 297-305.
- Brouwer JR, Huizer K, Severijnen LA, Hukema J, Berman RF, Oostra BA, Willemsen R. 2008. **CGG-repeat length and neuropathological and molecular correlates in a mouse model for fragile X-associated tremor/ataxia syndrome**. *J Neurochem* 107: 1671-82.
- Brouwer JR, Willemsen R, Oostra BA. 2009. **Microsatellite repeat instability and neurological disease**. *BioEssays* 31: 71-83.
- Brown TC, Tarleton JC, Go RCP, Longshore JW, Descartes M. 1997. **Instability of the FMR2 trinucleotide repeat region associated with expanded FMR1 alleles**. *Am J Med Genet* 73: 447-55.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin XK, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST. 2001. **Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in Fragile X syndrome**. *Cell* 107 (4): 477-87.
- Brunberg JA, Jacquemont S, Hagerman RJ, Berry-Kravis EM, Grigsby J, Leehey MA, Tassone F, Brown WT, Greco CM, Hagerman PJ. 2002. **Fragile X premutation carriers: Characteristic MR imaging findings in adult males with progressive cerebellar and cognitive dysfunction**. *Am J Neuroradiol* 23 (10): 1757-66.

- Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, Harrison W, Vaiman D, Ben-Neriah Z, García-Tuñón I, Fellous M, Pendás AM, Veitia RA, Vilain E. 2014. **Mutant cohesin in premature ovarian failure.** *N Engl J Med* 370 (10): 943-9.
- Chakravarti A. 1992. **Fragile X founder effect?** *Nat Genet* 1: 237-8.
- Chakrabarti L, Knight SJL, Flannery AV, Davies KE. 1996. **A candidate gene for mild mental handicap at the FRAXE fragile site.** *Hum Molec Genet* 5: 275-82.
- Carrascosa A, Yeste D, Copil A, Gusinye M. 2004. **Aceleración secular del crecimiento. Valores de peso, talla e índice de masa corporal en niños adolescentes y adultos jóvenes de la población de Barcelona.** *Med Clin (Barc)* 123: 445-51.
- Chang SH, Kim CS, Lee KS, Kim H, Yim SV, Lim YJ, Park SK. 2007. **Premenopausal factors influencing premature ovarian failure and early menopause.** *Maturitas* 58 (1): 19–30.
- Chen L, Hadd A, Sah S, Filipovic-Sadic S, Krosting J, Sekinger E, Pan R, Hagerman PJ, Stenzel TT, Tassone F, Latham GJ. 2010. **An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis.** *J Mol Diagn* 12 (5):589-600.
- Chiurazzi P, Genuardi M, Kozak L, Giovannucci-Uzielli M, Bussani C, Dagnabricarelli F, Grasso M, Perroni L, Sebastio G, Sperandeo M, Oostra Ba, Neri G. 1996. **Fragile X founder chromosomes in Italy: A few initial events and possible explanation for their heterogeneity.** *Am J Hum Genet* 64: 209-15.
- Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. 2008. **XLMR genes: update 2007.** *Eur J Hum Genet* 16 (4): 422-34.
- Chonchaiya W, Au J, Schneider A, Hessler D, Harris SW, Laird M, Mu Y, Tassone F, Nguyen DV, Hagerman RJ. 2012. **Increased prevalence of seizures in boys who were probands with the FMR1 premutation and co-morbid autism spectrum disorder.** *Hum Genet* 131 (4): 581-9.
- Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, Bronsky HE, Yuhas J, Borodyanskaya M, Grigsby J, Doerflinger M, Hagerman PJ, Hagerman RJ. 2008. **Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation.** *Am J Med Genet A* 146A: 1009-16.
- Conway GS, Hettiarachchi S, Murray A, Jacobs PA. 1995. **Fragile X premutations in familial premature ovarian failure.** *Lancet* 346 (8970): 309-10.

- Cordts EB, Christofolini DM, Dos Santos AA, Bianco B, Barbosa CP. 2011. **Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review.** *Arch Gynecol Obstet* 283 (3): 635-43.
- Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. 1986. **Incidence of premature ovarian failure.** *Obstet Gynecol* 67: 604.
- Cox L, Liu JH. 2014. **Primary ovarian insufficiency: an update.** *Int J Womens Health* 6: 235-43.
- Crawford DC, Schwartz CE, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Gunter C, Brown WT, Carpenter NJ, Howard-Peebles PN, Monaghan KG, Nolin SL, Reiss AL, Feldman GL, Rohlfes EM, Warren ST, Sherman SL. 2000a. **Survey of the fragile X syndrome CGG repeat and the short-tandem-repeat and single-nucleotide-polymorphism haplotypes in an African American population.** *Am J Hum Genet* 66 (2): 480-93.
- Crawford DC, Zhang F, Wilson B, Warren ST, Sherman SL. 2000b. **Fragile X CGG repeat structures among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability.** *Hum Mol Genet* 9: 1759-69.
- Crawford DC, Acuna J, Sherman S. 2001. **FMR1 and the Fragile X syndrome: human genome epidemiology review.** *Genet Med* 3: 359-71.
- Cronister A, Schreiner R, Wittenberger M, Amiri K, Harris K, Hagerman RJ. 1991. **Heterozygous fragile X female: historical, physical, cognitive and cytogenetic features.** *Am J Med Genet* 38 (2-3): 269-74.
- Curlis Y, Zhang C, Holden JJ, Loesch PK, Mitchell RJ. 2005. **Haplotype study of intermediate-length alleles at the fragile X (FMR1) gene: ATL1, FMRb, and microsatellite haplotypes differ from those found in common-size FMR1 alleles.** *Hum Biol* 77 (1): 137-51.
- Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB. 2001. **Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function.** *Cell* 107 (4): 489-99.
- De Boule K, Verkerk AJMH, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van Den Bos F, De Graaf E, Oostra BA, Willems PJ. 1993. **A point mutation in the FMR-1 gene associated with the Fragile X mental retardation.** *Nature Genet* 3: 31-5.
- De Caro JJ, Dominguez C, Sherman SL. 2008. **Reproductive health of adolescent girls who carry the FMR1 premutation: expected phenotype based on current knowledge of fragile x-associated primary ovarian insufficiency.** *Ann N Y Acad Sci* 1135: 99-111.

- De Geyter C, M'Rabet N, De Geyter J, Zürcher S, Moffat R, Bösch N, Zhang H, Heinimann K. 2014. **Similar prevalence of expanded CGG repeat lengths in the fragile X mental retardation I gene among infertile women and among women with proven fertility: a prospective study.** *Genet Med* 16 (5): 374-8.
- De Vos M, Devroey P, Fauser BCJM. 2010. **Primary ovarian insufficiency.** *Lancet* 376: 911-21.
- Dekaban A. 1965. **Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated.** *J Nucl Med* 6 (10): 740-6.
- Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. 2004. **Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein -15 (BMP15) gene.** *Am J Hum Genet* 75: 106-11.
- Dixit H, Rao L, Padmalatha V, Raseswari T, Kapu AK, Panda B, Murthy K, Tosh D, Nallari P, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarthy B, Singh L. 2010. **Genes governing premature ovarian failure.** *Reprod Biomed Online* 20 (6): 724-40.
- Dombrowski C, Levesque ML, Morel ML, Rouillard P, Morgan K, Rousseau F. 2002. **Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10 572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles.** *Hum Mol Genet* 11: 371-8.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. 1996. **Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.** *Nature* 383: 531-55.
- Eckert KA, Hile SE. 2009. **Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome.** *Mol Carcinog* 48 (4): 379-88.
- Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. 1993. **Fine structure of the human FMR1 gene.** *Hum Mol Genet* 2 (8): 1147-53.
- Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AI, Snow K, Thibodeau SN, Richards CS, Ward PA, Nelson D. 1994. **Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene.** *Nat Genet* 8(1): 88-94.
- Eichler EE, Hammond HA, Macpherson JN, Ward PA, Nelson D. 1995. **Population survey of the human FMR1 CGG repeat substructure suggests biased polarity for the loss of AGG interruptions.** *Human Mole Genet* 4: 2199-208.

- Eichler EE, Macpherson JN, Murray A, Jacobs PA, Chakravarti A, Nelson DL. 1996. **Haplotype and interspersed analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome.** *Hum Mol Genet* 5 (3): 319-30.
- Eichler EE, Nelson D. 1996. **Genetic variation and evolutionary stability of the FMR1 CGG repeat in six closed human populations.** *Am J Med Genet* 64: 220-5.
- Eiges R, Urbach A, Malcov M, Frumkin T, Schwartz T, Amit A, Yaron Y, Eden A, Yanuka O, Benvenisty N, Ben-Yosef D. 2007. **Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos.** *Cell Stem Cell* 1 (5): 568-77.
- Elizur SE, Lebovitz O, Derech-Haim S, Dratviman-Storobinsky O, Feldman B, Dor J, Orvieto R, Cohen Y. 2014. **Elevated levels of FMR1 mRNA in granulosa cells are associated with low ovarian reserve in FMR1 premutation carriers.** *PLoS One* 9 (8): e105121.
- Ennis S, Ward D, Murray A. 2006. **A Non-linear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers.** *Eur J Hum Genet* 14 (2): 253-5.
- Faradz SM, Leggo J, Murray A, Lam-Po-Tang PR, Buckley MF, Holden JJ. 2001. **Distribution of FMR1 and FMR2 alleles in Javanese individuals with developmental disability and confirmation of a specific AGG-interruption pattern in Asian populations.** *Ann Hum Genet* 65(Pt 2): 127-35.
- Farzin F, Perry H, Hessel D, Loesch D, Cohen J, Bacalman S, Gane L, Tassone F, Hagerman P, Hagerman R. 2006. **Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation.** *J Dev Behav Pediatr* 27 (2 Suppl): S137-44.
- Ferder I, Parborell F, Sundblad V, Chiauzzi V, Gómez K, Charreau EH, Tesone M, Dain L. 2013. **Expression of fragile X mental retardation protein and Fmr1 mRNA during folliculogenesis in the rat.** *Reproduction* 145 (4): 335-43.
- Fernández-Carvajal I, López Posadas B, Pan R, Raske C, Hagerman PJ, Tassone F. 2009a. **Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations.** *J Mol Diagn* 11: 306-10.
- Fernández-Carvajal I, Walichiewicz P, Xiaosen X, Pan R, Hagerman PJ, Tassone F. 2009b. **Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population.** *J Mol Diagn* 11: 324-9.

- Ferrández-Longás A. 2005. **Estudio longitudinal de niños españoles normales desde el nacimiento hasta la edad adulta.** *Fundación Andrea Prader, Zaragoza*: 111-2.
- Forges T, Monnier-Barbarino P, Faure GC, Bene MC. 2004. **Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology.** *Hum Reprod Update* 10: 163-75.
- Fryns JP. 1986. **The female and the fragile X: a study of 144 obligate female carriers.** *Am J Med Genet* 23 (1-2): 157-69.
- Garber K, Smith KT, Reines D, Warren ST. 2006. **Transcription, translation and fragile X syndrome.** *Curr Opin Genet Dev* 16 (3): 270-5.
- García-Alegría E, Ibáñez B, Mínguez M, Poch M, Valiente A, Sanz-Parra A, Martínez-Bouzas C, Beristain E, Tejada MI. 2007. **Analysis of FMR1 gene expression in female premutation carriers using robust segmented linear regression models.** *RNA* 13 (5): 756-62.
- García-Arocena D, Hagerman PJ. 2010. **Advances in understanding the molecular basis of FXTAS.** *Hum Mol Genet* 19: 83-9.
- Gez J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. 1996. **Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation.** *Nat Genet* 13: 105-8.
- Gez J, Bielby S, Sutherland GR, Mulley JC. 1997. **Gene structure and subcellular localization of FMR2, a member of a new family of putative transcription activators.** *Genomics* 44: 201-13.
- Gez J, Mulley JC. 1999. **Characterization and expression of a large, 13.7 kb FMR2 isoform.** *Eur J Hum Genet* 7 (2): 157-62.
- Gez J. 2000. **The FMR2 gene, FRAXE and non-specific X-linked mental retardation: clinical and molecular aspects.** *Ann Hum Genet* 64: 95-106.
- Gedeon AK Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, Manca A, Korn B, Poustka A, Yu S, Sutherland GR, Mulley JC. 1992. **Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion.** *Nat Genet* 1 (5): 341-4.
- Gedeon AK, Meinanen M, Ades LC, Kaariainen H, Gez J, Baker E, Sutherland GR, Mulley JC. 1995. **Overlapping submicroscopic deletions in Xq28 in two unrelated boys with developmental disorders: identification of a gene near FRAXE.** *Am J Hum Genet* 56: 907-14.
- Ghadami M, El-Demerdash E, Salama SA, Binhazim AA, Archibong AE, Chen X, Ballard BR, Sairam MR, Al-Hendy A. 2010. **Toward gene therapy of premature ovarian failure:**

intraovarian injection of adenovirus expressing human FSH receptor restores folliculogenesis in FSHR (-/-) FORKO mice. *Mol Hum Reprod* 16: 241-50.

Giraud F, Ayme S, Mattei JF, Mattei MG. 1976. **Constitutional chromosomal breakage.** *Hum Genet* 34: 125-36.

Gleicher N, Weghofer A, Oktay K, Barad DH. 2009. **Relevance of triple CGG repeats in the FMR1 gene to ovarian reserve.** *Reprod Biomed Online* 19: 385-90.

Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. 2010a. **Ovarian reserve determinations suggest new function of FMR1 (fragile X gene) in regulating ovarian ageing.** *Reprod Biomed Online* 20 (6): 768-75.

Gleicher N, Weghofer A, Lee IH, Barad DH. 2010b. **FMR1 genotype with autoimmunity-associated polycystic ovary-like phenotype and decreased pregnancy chance.** *PLoS One* 5 (12): e15303.

Gleicher N, Weghofer A, Kim A, Barad DH. 2012a. **The impact in older women of ovarian FMR1 genotypes and sub-genotypes on ovarian reserve.** *Plos One* 7(3): 1-4.

Gleicher N, Kim A, Weghofer A, Barad DH. 2012b. **Differences in ovarian aging patterns between races are associated with ovarian genotypes and sub-genotypes of the FMR1 gene.** *Reprod Biol Endocrin* 10: 77.

Gleicher N, Kim A, Barad DH, Shohat-Tal A, Lazzaroni E, Michaeli T, Lee HJ, Kushnir VA, Weghofer A. 2013a. **FMR1-dependent variability of ovarian aging patterns is already apparent in young oocyte donors.** *Reprod Biol Endocrin* 11: 80.

Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. 2013b. **Do BRCA1/2 mutations and low FMR1 alleles interact or not?** *Eur J Hum Gen* 1-2.

Gleicher N, McAlpine JN, Gilks CB, Kushnir VA, Lee HJ, Wu YG, Lazzaroni-Tealdi E, Barad DH. 2014a. **Absence of BRCA/FMR1 correlations in women with ovarian cancers.** *PLoS One* 9 (7): e102370.

Gleicher N, Kushnir VA, Weghofer A, Barad DH. 2014b. **How the FMR1 gene became relevant to female fertility and reproductive medicine.** *Front Genet* 29 (5): 284.

Goswami D, Conway GS. 2007. **Premature ovarian failure.** *Horm Res* 68 (4): 196-202.

Goswami R, Goswami D, Kabra M, Gupta N, Dubey S, Dadhwal V. 2003. **Prevalence of triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders.** *Fertil Steril* 80: 1052-4.

- Goswami R, Marwaha RK, Goswami D, et al. 2006. **Prevalence of thyroid autoimmunity in sporadic idiopathic hypoparathyroidism in comparison to type I diabetes and premature ovarian failure.** *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4256-9.
- Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, Chudley AE, Del Bigio MR, Jacquemont S, Leehey P, Hagerman PJ. 2002. **Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers.** *Brain* 125 (Pt 8): 1760-71.
- Greco CM, Berman RF, Martin RM, Tassone F, Schwartz PH, Chang A, Trapp BD, Iwahashi C, Brunberg J, Grigsby J, Hessler D, Becker EJ, Papazian J, Leehey MA, Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2006. **Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS).** *Brain* 129: 243-55.
- Greco CM, Soontrapornchai K, Wirojanan J, Gould JE, Hagerman PJ, Hagerman RJ. 2007. **Testicular and pituitary inclusion formation in fragile X associated tremor/ataxia syndrome.** *J Urol* 177: 1434-7.
- Gu Y, Shen Y, Gibbs RA, Nelson DL. 1996. **Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island.** *Nature Genet* 13: 109-13.
- Gu Y, Nelson DL. 2003. **FMR2 function: insight from a mouse knockout model.** *Cytogenet Genome Res* 100: 129-39.
- Gunter C, Paradee W, Crawford DC, Meadows KA, Newman J, Kunst CB, Nelson DL, Schwartz C, Murray A, Macpherson JN, Sherman SL, Warren ST. 1998. **Re-examination of factors associated with expansion of CGG repeats using a single nucleotide polymorphism in FMR1.** *Hum Mol Genet* 7 (12): 1935-46.
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ. 2001. **Intention tremor, parkinsonism and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X.** *Neurology* 57 (1): 127-130.
- Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2002. **The fragile x premutation: into the phenotypic fold.** *Current Opinion in Genetics & development* 12: 278-83.
- Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2004. **Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation.** *Am J Hum Genetics* 74 (5): 1051-6.
- Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, Kronk R, Delahunty C, Hessler D, Visootsak J, Picker J, Gane L, Tranfaglia M. 2009. **Advances in the treatment of fragile X syndrome.** *Pediatrics* 123 (1): 378-90.

- Hagerman PJ. 2008. **The fragile X prevalence paradox.** *J Med Genet* 45: 498-9.
- Hall D, Tassone F, Klepitskaya O, Leehey M. 2012. **Fragile X-associated tremor ataxia syndrome in FMR1 gray zone allele carriers.** *Mov Disord* 27 (2): 296–300.
- Hamlin A, Liu Y, Nguyen DV, Tassone F, Zhang L, Hagerman RJ. 2011. **Sleep apnea in fragile X premutation carriers with and without FXTAS.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 156B: 923-8.
- Hamlin AA, Sukharev D, Campos L, Mu Y, Tassone F, Hessler D, Nguyen DV, Loesch D, Hagerman RJ. 2012. **Hypertension in FMR1 premutation males with and without fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS).** *Am J Med Genet A* 158A: 1304-9.
- Handt M, Epplen A, Hoffjan S, Mese K, Epplen JT, Dekomien G. 2014. **Point mutation frequency in the FMR1 gene as revealed by fragile X syndrome screening.** *Mol Cell Probes* 28 (5-6): 279-83.
- Harrison CJ, Jack EM, Allen TD, Harris R. 1983. **The fragile X: a scanning electron microscope study.** *J Med Genet* 20 (4): 280-5.
- Harvey J, Judge C, Wiener S. 1977. **Familial X-linked mental retardation with and X chromosome abnormality.** *J Med Genet* 14 (1): 46-50.
- Hill MK, Archibald AD, Cohen J, Metcalfe SA. 2010. **A systematic review of population screening for fragile X syndrome.** *Genet Med* 12: 396–410.
- Hillman MA, Gecz J. 2001. **Fragile XE-associated familial mental retardation protein 2 (FMR2) acts as a potent transcription activator.** *J Hum Genet* 46 (5): 251-9.
- Hirst MC, Grewal PK, Davies KE. 1994. **Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus.** *Hum Mol Genet* 3 (9): 1553-60.
- Hoffman GE, Le WW, Entezam A, Otsuka N, Tong ZB, Nelson L, Flaws JA, McDonald JH, Jafar S, Usdin K. 2012. **Ovarian abnormalities in a mouse model of fragile X primary ovarian insufficiency.** *J Histochem Cytochem* 60 (6): 439-56.
- Holden JJA, Julien-Inalsingh C, Chalifoux M, Wing M, Scott E, Fidler K, Swift I, Maidment B, Knight SJL, Davies KE, White BN. 1996. **Trinucleotide repeat expansion in the FRAXE locus is not common among institutionalized individuals with non-specific developmental disabilities.** *Am J Med Genet* 64:420–3.
- Huber KM. 2006. **The fragile X-cerebellum connection.** *Trends Neurosci* 29 (4): 183-5.

- Hundscheid RD, Sistermans EA, Thomas CM, Braat DD, Straatman H, Kiemeny LA, Oostra BA, Smits AP. 2000. **Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations.** *Am J Hum Genet* 66 (2): 413-8.
- Hundscheid RD, Braat DD, Kiemeny LA, Smits AP, Thomas CM. 2001. **Increased serum FSH in female fragile X premutation carriers with either regular menstrual cycles or on oral contraceptives.** *Hum Reprod* 16 (3): 457-62.
- Hundscheid RD, Smits AO, Thomas CM, Kiemeny LA, Braat DD. 2003. **Female carriers of fragile X premutations have no increased risk for additional diseases other than premature ovarian failure.** *Am J Med Genet* 117A (1): 6–9.
- Hunter JE, Epstein MP, Tinker SW, Charen KH, Sherman SL. 2008. **Fragile X associated primary ovarian insufficiency: evidence for additional genetic contributions to severity.** *Genet Epidemiol* 32 (6): 553–9.
- Iwahashi CK, Yasui DH, An HJ, Greco CM, Tassone F, Nannen K, Babineau B, Lebrilla CB, Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2006. **Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS.** *Brain* 129: 256-71.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, Grigsby J, Zhang L, Brunberg JA, Greco CM, Des Portes V, Jardini T, Levine R, Berry-Kravis E, Brown WT, Schaeffer S, Kissel J, Tassone F, Hagerman PJ. 2003. **Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: Molecular, clinical and neuroimaging correlates.** *Am J Hum Genetics* 72 (4): 869-78.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, Levine R, Brunberg JA, Zhang L, Jardini T, Gane LW, Harris SW, Herman K, Grigsby J, Greco CM, Berry-Kravis E, Tassone F, Hagerman PJ. 2004. **Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population.** *JAMA* 291 (4): 460-9.
- Jansen G, Willems P, Coerwinked M, Nillesen W, Smeets H, Vits L, Howeler C, Brunner H, Wieringa B. 1994. **Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm.** *Am J Hum Genet* 54(4): 575-85.
- Jin M, YiQi Y, Hefeng H. 2012. **An update on primary ovarian insufficiency.** *Sci China Life Sci* 55 (8): 677-86.

- Jin P, Duan R, Qurashi A, Qin Y, Tian D, Rosser TC, Liu H, Feng Y, Warren ST. 2007. **Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a *Drosophila* model of fragile X tremor/ataxia syndrome.** *Neuron* 55: 556-64.
- Johnson GE. 1897. **Contribution to the psychology and pedagogy of feeble-minded children.** *J Psycho-Asthen* 2: 26-32.
- Kalkunte R, Macarthur D, Morton R. 2007. **Glioblastoma in a boy with fragile X: An unusual case of neuroprotection.** *Arch Dis Child* 92: 795-6.
- Karimov CB, Moragianni VA, Cronister A, Srouji S, Petrozza J, Racowsky C, Ginsburg E, Thornton KL, Welt CK. 2011. **Increased frequency of occult fragile X-associated primary ovarian insufficiency in infertile women with evidence of impaired ovarian function.** *Hum Reprod* 26 (8): 2077-83.
- Katikala L, Guruju MR, Madireddi S, Vallamkonda O, Vallamkonda N, Persha A, Spurgeon AMPJ. 2011. **Distribution of CGG/GCC repeats at the FMR1 and FMR2 genes in an Indian population with mental retardation of unknown etiology.** *Genet Test Mol Biomarkers* 15 (4): 281-4.
- Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, Pointon J, Middleton-Price HR, Barnicoat A, Pembrey ME, Holland J, Oostra BA, Bobrow M, Davies KE. 1993. **Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAAX mental retardation.** *Cell* 74: 127-34.
- Knight SJL, Voelckel MA, Hirst MC, Flannery AV, Moncla A, Davies KE. 1994. **Triplet repeat expansion at the FRAAX locus and X-linked mild mental handicap.** *Am J Hum Genet* 55: 81-6.
- Klevin P, Serje A, Pezzullo JC. 2001. **Premature ovarian failure in women with epilepsy.** *Epilepsia* 42 (12): 1584-9.
- Kline JK, Kinney AM, Levin B, Brown SA, Hadd AG, Warburton D. 2014. **Intermediate CGG repeat length at the FMR1 locus is not associated with hormonal indicators of ovarian age.** *Menopause* 21 (7): 740-8.
- Kunst CB, Warren ST. 1994. **Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles.** *Cell* 17: 853-61.

- Kunst CB, Zerylnick C, Karickhoff L, Eichler E, Bullard J, Chalifoux M, Holden JJ, Torroni A, Nelson DL, Warren ST. 1996. **FMR1 in global populations.** *Am J Hum Genet* 58 (3): 513-22.
- Larsen LA, Gronskov K, Norgaard-Pedersen B, Brondum-Nielsen K, Hasholt L, Vuust J. 1997. **High-throughput analysis of fragile X (CGG)_n alleles in the normal and premutation range by PCR amplification and automated capillary electrophoresis.** *Hum Genet* 100: 564-8.
- Larsen LA, Armstrong JSM, Gronskov K, Hjalgrim H, Macpherson JN, Brondum-Nielsen K, Hasholt L, Norgaard-Pedersen B, Vuust J. 2000. **Haplotype and AGG interspersion analysis of FMR1 (CGG)_n alleles in the Danish population: implications for multiple mutational pathways towards fragile X alleles.** *Am J Med Genet* 93(2): 99-106.
- Leehey MA, Hagerman RJ, Landau WM, Grigsby J, Tassone F, Hagerman PJ. 2002. **Tremor/Ataxia syndrome in fragile X carrier males.** *Mov Disord* 17 (4): 744-5.
- Leehey MA, Munhoz RP, Lang AE, Brunberg JA, Grigsby J, Greco C, Jacquemont S, Tassone F, Lozano AM, Hagerman PJ, Hagerman RJ. 2003. **The fragile X premutation presenting as essential tremor.** *Arch Neurol* 60 (1): 117-21.
- Lehrke RG. 1974. **X-linked mental retardation and verbal disability.** *Birth Defects Orig Artic Ser* 10 (1): 1-100.
- Lejeune J, Dutrillaux B, Lafourcade J, Berger R, Abonyi D, Rethore MO. 1968. **Selective endoreduplication of the long arm of the 2 chromosome in a woman and her daughter.** *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 266: 24-6.
- Lévesque S, Dombrowski C, Morel ML, Rehel R, Côté JS, Bussièrès J, Morgan K, Rousseau F. 2009. **Screening and instability of FMR1 alleles in a prospective sample of 24,449 mother-newborn pairs from the general population.** *Clin Genet* 76 (6): 511-23.
- Liao WX, Roy AC, Chan C, Arulkumaran S, Ratnam SS. 1998. **A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility.** *Fert Steril* 69: 102-6.
- Liu Y, Winarni T, Zhang L, Tassone F, Hagerman R. 2013. **Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in grey zone carriers.** *Clin Genet* 84: 74-7.
- Llano E, Gómez-H L, García-Tuñón I, Sánchez-Martín M, Caburet S, Barbero JL, Schimenti JC, Veitia RA, Pendas AM. 2014. **STAG3 is a strong candidate gene for male infertility.** *Human Molecular Genetics.* *Hum Mol Genet.* 23 (13): 3421-31.

- Loesch DZ, Bui QM, Huggins R, Mitchell RJ, Hagerman RJ, Tassone F. 2007. **Transcript levels of the intermediate size or grey zone fragile X mental retardation 1 alleles are raised, and correlate with the number of CGG repeats.** *J Med Genet* 44: 200-4.
- Loesch DZ, Godler DE, Khaniani M, Gould E, Gehling F, Dissanayake C, Burgess T, Tassone F, Huggins R, Slater H, Choo KH. 2009. **Linking the FMR1 alleles with small CGG expansions with neurodevelopmental disorders: preliminary data suggest an involvement of epigenetic mechanisms.** *Am J Med Genet A* 149A: 2306–10.
- Loesch DZ, Sherwell S, Kinsella G, Tassone F, Taylor A, Amor D, Sung S, Evans A. 2012. **Fragile X-associated tremor/ataxia phenotype in a male carrier of unmethylated full mutation in the FMR1 gene.** *Clin Genet* 82: 88-92.
- Lozano R, Rosero CA, Hagerman RJ. 2014. **Fragile X spectrum disorders.** *Intractable Rare Dis Res* 3 (4): 134-46.
- Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman SL, Gao F, Jin P, Chen D. 2012. **Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice.** *Hum Mol Genet* 21 (23): 5039-47.
- Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. 2003. **Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition.** *Hum Reprod* 18: 199-206.
- Lubs HA. 1969. **A marker X chromosome.** *Am J Hum Genet* 21 (3): 231-44.
- Lucá R, Averna M, Zalfa F, Vecchi M, Bianchi F, Fata GL, Del Nonno F, Nardacci R, Bianchi M, Nuciforo P, Munck S, Parrella P, Moura R, Signori E, Alston R, Kuchnio A, Farace MG, Fazio VM, Piacentini M, De Strooper B, Achsel T, Neri G, Neven P, Evans DG, Carmeliet P, Mazzone M, Bagni C. 2013. **The Fragile X Protein binds mRNAs involved in cancer progression and modulates metastasis formation.** *EMBO Mol Med* 5(10): 1523-36.
- Ludwig AL, Raske C, Tassone F, García-Arocena D, Hershey JW, Hagerman PJ. 2009. **Translation of the FMR1 mRNA is not influenced by AGG interruptions.** *Nucleic Acids Res* 37: 6896-904.
- Ma C, Staudt LM. 1996. **LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias.** *Blood* 87: 734–45.

- Macpherson JN, Curtis G, Crolla JA, Dennis N, Migeon B, Grewal PK, Hirst MC, Davies KE, Jacobs PA. 1995. **Unusual (CGG)_n expansion and recombination in a family with fragile X and DiGeorge syndrome.** *J Med Genet* 32:236-9.
- Mallolas J, Duran M, Sánchez A, Jimenez D, Castellvi-Bel S, Rife M, Milá M. 2001. **Implications of the FMR1 gene in menopause: study of 147 Spanish women.** *Menopause* 8 (2): 106-10.
- Malter H, Iber JC, Willemsen R, Graaff E, Tarleton JC, Leisti J, Warren ST, Oostra BA. 1997. **Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes.** *Nat Genet* 15: 165-9.
- Marco-Hernández M, Benítez R, Medranda I, Pizarro C, Méndez MJ. 2008. **Variaciones fisiológicas normales del desarrollo puberal: edad del inicio puberal, edad de la menarquía y talla.** *Anales de Pediatría* 69: 147-53.
- Martin J, Bell J. 1943. **A pedigree of mental defect showing sex linkage.** *Arch Neurol Psychiat* 6: 154-7.
- Margulis RE, Hecht F, Lovrien EW. 1970. **Heritable fragile sites on chromosome 16 probable localization of Haptoglobin locus in man.** *Science* 170: 85-7.
- McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG. 1992. **The normal menopause transition.** *Maturitas* 14 (2): 103-15.
- McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MP. 2005. **Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants.** *Reproduction* 129: 481-7.
- Meadows KL, Pettay D, Newman J, Hersey J, Ashley AE, Sherman SL. 1996. **Survey of the fragile X syndrome and the fragile X E syndrome in a special education needs population.** *Am J Med Genet* 64: 428-33.
- Milá M, Castellví-Bel S, Sánchez A, Lázaro C, Villa M, Estivill X. 1996. **Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the FMR1 gene.** *J Med Genet* 33: 338-40.
- Monaghan KG, Lyon E, Spector EB; American College of Medical Genetics and Genomics. 2013. **ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific**

- supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics.** *Genet Med* 15 (7): 575-86.
- Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. 2000. **Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination.** *Fertil Steril* 74: 743-8.
- Morrissey J, Tkachuk DC, Milatovich A, Francke U, Link M, Cleary ML. 1993. **A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias.** *Blood* 81: 1124-31.
- Murray A, Macpherson JN, Pound M, Sharrock A, Youings SA, Dennis NR, McKechnie N, Linehan P, Morton NE, Jacobs PA. 1997. **The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission.** *Hum Mol Genet* 6 (2): 173-84.
- Murray A, Webb J, Grimley S, Conway GS, Jacobs P. 1998. **Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure.** *J Med Genet* 35 (8): 637-40.
- Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N. 1999a. **Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure.** *J Med Genet* 36 (10): 767-70.
- Murray A, Webb J, MacSwiney F, Shipley EL, Morton NE, Conway GS. 1999b. **Serum concentrations of follicle stimulating hormone may predict premature ovarian failure in FRAXA premutation women.** *Hum Reprod* 14: 1217-8.
- Murray A, Ennis S, MacSwiney F, Webb J, Morton NE. 2000a. **Reproductive and menstrual history of females with fragile X expansions.** *Eur J Hum Genet* 8 (4): 247-52.
- Murray A, Ennis S, Morton N. 2000b. **No evidence for parent of origin influencing premature ovarian failure in fragile X premutation carriers.** *Am J Hum Genet* 67 (1): 253-4.
- Murray A, Schoemaker MJ, Bennett CE, Ennis S, Macpherson JN, Jones M, Morris DH, Orr N, Ashworth A, Jacobs PA, Swerdlow AJ. 2014. **Population-based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency.** *Genet Med* 16 (1): 19-24.
- Myrick LK, Nakamoto-Kinoshita M, Lindor NM, Kirmani S, Cheng X, Warren ST. 2014. **Fragile X syndrome due to a missense mutation.** *Eur J Hum Genet* 22: 1185-9.
- Nei M. 1987. **Molecular evolutionary genetics.** *EDK Columbia University Press. New York.*
- Nelson LM. 2009. **Clinical practice. Primary ovarian insufficiency.** *N Engl J Med* 360 (6): 606-14.

- Nolin SL, Lewis FA 3rd, Ye LL, Houck GE Jr, Glicksman AE, Limprasert P, Li SY, Zhong N, Ashley AE, Feingold E, Sherman SL, Brown WT. 1996. **Familial transmission of the FMR1 CGG repeat.** *Am J Hum Genet* 59 (6): 1252-61.
- Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brøndum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Väisänen ML, von Koskull H, Sherman SL. 2003. **Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles.** *Am J Hum Genet* 72 (2): 454-64.
- Nolin SL, Glicksman A, Ding X, Ersalesi N, Brown WT, Sherman SL, Dobkin C. 2011. **Fragile X analysis of 1112 prenatal samples from 1991 to 2010.** *Prenat Diagn* 31: 925-31.
- Nolin SL, Sah S, Glicksman A, Sherman SL, Allen E, Berry-Kravis E, Tassone F, Yrigollen C, Cronister A, Jodah M, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Shroff R, Latham GJ, Hadd AG. 2013. **Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles.** *Am J Med Genet A* 161A (4): 771-8.
- Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Cao R, Blatt E, Sah S, Latham GJ, Hadd AG. 2014. **Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers.** *Genet Med* 17 (5):358-64.
- Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boué J, Bertheas MF, Mandel JL. 1991. **Instability of a 550–base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome.** *Science* 252: 1097-102.
- Oostra BA, Willemsen R. 2003. **A fragile balance: FMR1 expression levels.** *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R249-57.
- Oostra BA, Willemsen R. 2009. **FMR1: a gene with three faces.** *Biochim Biophys Acta* 1790 (6): 467-77.
- Oudet C, Von Koskull H, Nordstrom A, Peippo M, Mandel J. 1993. **Striking founder effect for the fragile X syndrome in Finland.** *Eur J Hum Genet* 1: 181-9.
- Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, Martin NG, Boomsma DI, Duffy DL, Montgomery GW. 2006. **Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins.** *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4713-6.
- Panay N, Kalu E. 2009. **Management of premature ovarian failure.** *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 23 (1): 129-40.

- Parrish JE, Oostra BA, Verkerk AJ, Richards CS, Reynolds J, Spikes AS, Shaffer LG, Nelson DL. 1994. **Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE.** *Nat Genet* 8 (3): 229-35.
- Pastore LM, Young SL, Baker VL, Karns LB, Williams CD, Silverman LM. 2012. **Elevated prevalence of 35-44 FMR1 trinucleotide repeats in women with diminished ovarian reserve.** *Reprod Sci* 19 (11): 1226-31.
- Pastore LM, Johnson J. 2014. **The FMR1 gene, infertility and reproductive decision-making: a review.** *Front Genet* 5: 195.
- Patsalis PC, Sismani C, Hettinger JA, Holden J, Lawson JS, Chalifoux M, Wing M, Walker M, Leggo J. 1999a. **Frequencies of “grey zone” and premutation size FMR1 CGG-repeat alleles in patients with developmental disability in Cyprus and Canada.** *Am J Med Genet* 84: 195-7.
- Patsalis PC, Sismani C, Hettinger JA, Boumba I, Georgiou I, Stylianidou G, Anastasiadou V, Koukoulli R, Pogoulatos G, Syrrou M. 1999b. **Molecular screening of fragile X (FRAXA) and FRAXE mental retardation syndromes in the Hellenic population of Greece and Cyprus: incidence, genetic variation, and stability.** *Am J Hum Genet* 84: 184–90.
- Pearson CE, Edamura KN, Cleary JG. 2005. **Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations.** *Nature Reviews Genetics* 6: 729-42
- Penrose LS. 1938. **A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect.** In: Special Report Series, Medical Research Council 299. *London: Her Majesty’s Stationary Office.*
- Peñagarikano O, Gil A, Téllez M, Ortega B, Flores P, Veiga I, Peixoto A, Criado B, Arrieta I. 2004. **A new insight into fragile X syndrome among Basque population.** *Am J Med Genet A* 128A (3): 250-5.
- Peñagarikano O, Muller JG, Warren ST. 2007. **The pathophysiology of Fragile X Syndrome.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8: 109-29.
- Peñagarikano O, Warren ST. 2007. **FRAXA: The fragile X syndrome site.** In: *Fragile Sites: New Discoveries and Changing Perspectives.* Ed: Arrieta I, Co-Ed: Peñagarikano O and Téllez M. *Nova Science Publishers, Inc., New York*, pp. 283-98.
- Peprah E, He W, Allen E, Oliver T, Boyne A, Sherman SL. 2010. **Examination of FMR1 transcript and protein levels among 74 premutations carriers.** *J Human Genet* 55: 66-8.

- Peprah E. 2012. **Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations.** *Ann Hum Genet* 76 (2): 178–91.
- Persani L, Rossetti R, Cacciatore C, Bonomi M. 2009. **Primary ovarian insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity.** *J Autoimmun* 33 (1): 35–41.
- Pietrobono R, Pomponi MG, Tabolacci E, Oostra B, Chiurazzi P, Neri G. 2002. **Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine.** *Nucleic Acids Res* 30 (14): 3278-85.
- Pietrobono R, Tabolacci E, Zalfa F, Zito I, Terracciano A, Moscato U, Bagni C, Oostra B, Chiurazzi P, Neri G. 2005. **Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 gene.** *Hum Mol Genet* 14 (2): 267-77.
- Poon PM, Chen QL, Zhong N, Lam ST, Lai KY, Wong CK, Pang CP. 2006. **AGG interspersion analysis of the FMR1 CGG repeats in mental retardation of unspecific cause.** *Clin Biochem* 39 (3): 244-8.
- Pouresmaeili F, Fazeli Z. 2014. **Premature ovarian failure: a critical condition in the reproductive potential with various genetic causes.** *Int J Fertil Steril* 8 (1): 1-12.
- Pretto DI, Hunsaker MR, Cunningham CL, Greco CM, Hagerman RJ, Noctor SC, Hall DA, Hagerman PJ, Tassone F. 2013. **Intranuclear inclusions in a fragile X mosaic male.** *Transl Neurodegener* 2 (1): 10.
- Rahat A, Hellman A, Kerem B. 2007. **A common replication pattern underlies the fragility at fragile site regions.** In: Arrieta, I., Penagarikano, O., Téllez, M. (Eds.), *Fragile Sites: New Discoveries and Changing Perspectives.* Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 99-115.
- Rebar RW. 2009. **Premature ovarian failure.** *Obstet Gynecol* 113 (6): 1355-63.
- Rebej I, Jemaa LB, Chaabouni H. 2009. **X linked mental retardation.** *Tunis Med* 87 (5): 311-8.
- Reyniers HE, Vits L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk AJ, Jorens HZ, Darby JK, Oostra B, et al. 1993. **The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm.** *Nat Genet* 4 (2): 143-6.
- Reyniers E, Martin JJ, Cras P, Van Marck E, Handig I, Jorens HZ, Oostra BA, Kooy RF, Willems PJ. 1999. **Postmortem examination of two fragile X brothers with an FMR1 full mutation.** *Am J Med Genet* 84 (3): 245-9.

- Richards BW, Sylvester PE, Brooker C. 1981. **Fragile X linked mental retardation: The Martin Bell syndrome.** *J Ment Defic Res* 25: 253-6.
- Richards RI, Holman K, Kozman H, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Yu S, Mulley J, Sutherland GR. 1991. **Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site.** *J Med Genet* 28 (12): 818-23.
- Richards RI, Holman K, Friend K, Kremer E, Hillen D, Staples A, Brown WT, Goonewardena P, Tarleton J, Schwartz C, Sutherland GR. 1992. **Evidence of founder chromosomes in fragile X syndrome.** *Nat Genet* 1: 257-60.
- Richards RI, Sutherland GR. 1994. **Simple repeat DNA is not replicated simply.** *Nat Genet* 6 (2): 114-6.
- Richards RI, Crawford J, Narahara K, Mangelsdorf M, Friend K, Staples A, Denton M, Easteal S, Hori TA, Kondo I, Jenkins T, Goldman A, Panich V, Ferakova E, Sutherland GR. 1996. **Dynamic mutation loci: allele distributions in different populations.** *Ann Hum Genet* 60 (Pt 5): 391-400.
- Rife M, Nadal A, Mila M, Willemsen R. 2004. **Immunohistochemical FMRP studies in a full mutated female fetus.** *Am J Med Genet* 124A: 129-32.
- Riggins GJ, Sherman SL, Oostra BA, Sutcliffe JS, Feitell D, Nelson DL, van Oost BA, Smits AP, Ramos FJ, Pfendner E, et al. 1992. **Characterization of a highly polymorphic dinucleotide repeat 150 KB proximal to the fragile X site.** *Am J Med Genet* 43 (1-2): 237-43.
- Rizzolio F, Bione S, Sala C, Goegan M, Gentile M, Gregato G, Rossi E, Pramparo T, Zuffardi O, Toniolo D. 2006. **Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature.** *Hum Reprod* 21 (6): 1477-83.
- Roberts JE, Bailey DB, Mankowski J, Ford A, Sideris J, Weisenfeld LA, Heath TM, Golden RN. 2009. **Mood and anxiety disorders in females with the FMR1 premutation.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150: 130-9.
- Rohr J, Allen EG, Charen K, Giles J, He W, Dominguez C, Sherman SL. 2008. **Anti-Mullerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: a preliminary study.** *Hum Reprod* 23 (5): 1220-5.

- Rosales-Reynoso MA, Ochoa-Hernández AB, Aguilar-Lemarroy A, Jave-Suarez LF, Troyo-Sanroman R, Barros-Nunez P. 2010. **Gene expression profiling identifies WNT7A as a possible candidate gene for decreased cancer risk in fragile x syndrome patients.** *Arch Med Res* 41: 110-8 e112.
- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boue J, Tommerup N, Van Der Hagen C, DeLozier-Blanchet C, Croquette MF, Gilgenkrantz S, Jalbert P, Voelckel MA, Oberlé I, Mandel JL. 1991. **Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation.** *N Engl J Med* 325 (24): 1673-81.
- Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. 1995. **Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene and implications for the population genetics of the fragile X syndrome.** *Am J Hum Genet* 57: 1006–18.
- Sahoo T, Theisen A, Marble M, Tervo R, Rosenfeld JA, Torchia BS, Shaffer LG. 2011. **Microdeletion of Xq28 involving the AFF2 (FMR2) gene in two unrelated males with developmental delay.** *Am J Med Genet A* 155A: 3110–5.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sánchez F, Smitz J. 2012. **Molecular control of oogenesis.** *Biochim Biophys Acta* 1822 (12): 1896-912.
- Schneider A, Hagerman RJ, Hessler D. 2009. **Fragile X syndrome: from gene to cognition.** *Dev Disabil Res Rev* 15 (4): 333-42.
- Schuettler J, Peng Z, Zimmer J, Sinn P, von Hagens C, Strowitzki T, Vogt PH. 2011. **Variable expression of the Fragile X Mental Retardation I (FMR1) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent on number of (CGG)_n triplets in exon I.** *Hum Reprod* 26 (5): 1241-51.
- Schultz-Pedersen S, Hasle H, Olsen JH, Friedrich U. 2001. **Evidence of decrease risk of cancer in individuals with fragile X.** *Am J Med Genet* 103: 226-30.
- Schwartz CE, Dean J, Howard-Peebles PN, Bugge M, Mikkelsen M, Tommerup N, Hull C, Hagerman R, Holden JJ, Stevenson RE. 1994. **Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study.** *Am J Med Genet* 51 (4): 400-2.

- Sharma D, Gupta M, Thelma BK. 2001. **Expansion mutation frequency and CGG/GCC repeat polymorphism in FMR1 and FMR2 genes in an Indian population.** *Genet Epidemiol* 20 (1): 129-144.
- Shelling AN. 2010. **Premature ovarian failure.** *Reproduction* 140: 633-41.
- Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G. 1984. **The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis.** *Ann Hum Genet* 48 (Pt. 1): 21-37.
- Sherman SL, Meadows KL, Ashley AE. 1996. **Examination of factors that influence the expansion of the fragile X mutation in a sample of conceptuses from known carrier females.** *Am J Med Genet.* 64 (2): 256-60.
- Sherman SL. 2000a. **Premature ovarian failure in the fragile X syndrome.** *Am J Med Genet* 97: 189-94.
- Sherman SL. 2000b. **Premature ovarian failure among fragile X premutation carriers: parent-of-origin effect?** *Am J Hum Genet* 67: 11-3.
- Sherman SL, Pletcher BA, Driscoll DA. 2005. **Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing.** *Genet Med* 7 (8): 584-7.
- Sherman SL, Taylor K, Allen E. 2007. **FMR1 premutation: a leading cause of inherited ovarian dysfunction.** In: Arrieta, I., Penagarikano, O., Téllez, M. (Eds.), *Fragile Sites: New Discoveries and Changing Perspectives.* Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 299–320.
- Sherman SL, Curnow EC, Easley CA, Jin P, Hukema RK, Tejada MI, Willemsen R, Usdin K. 2014. **Use of model systems to understand the etiology of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI).** *J Neurodev Disord* 6 (1): 26.
- Sidorov MS, Auerbach BD, Bear MF. 2013. **Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity.** *Mol Brain* 6: 15
- Silva CA, Yamakami LY, Aikawa NE, Araujo DB, Carvalho JF, Bonfá E. 2014. **Autoimmune primary ovarian insufficiency.** *Autoimmun Rev* 13 (4-5): 427-30.
- Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. 1993. **The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein.** *Cell* 74 (2): 291-8.
- Snow K, Doud LK, Hagerman R, Pergolizzi RG, Erster SH, Thibideau SN. 1993. **Analysis of a CGG sequence at the FMR1 locus in fragile X families and the general population.** *Am J Hum Genet* 53: 1217-28.

- Sofola OA, Jin P, Qin Y, Duan R, Liu H, De Haro M, Nelson DL, Botas J. 2007. **RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a *Drosophila* model of FXTAS.** *Neuron* 55: 565-71.
- Stettner GM, Shoukier M, Hoger C, Brockmann K, Auber B. 2011. **Familial intellectual disability and autistic behavior caused by a small FMR2 gene deletion.** *Am J Med Genet* 155A: 2003-7.
- Streuli I, Fraise T, Ibecheole V, Moix I, Morris MA, de Ziegler D. 2009. **Intermediate and premutation FMR1 alleles in women with occult primary ovarian insufficiency.** *Fertil Steril* 92 (2): 464-70.
- Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM, Eppig JJ. 2004. **Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop.** *Dev Biol* 276: 64-73.
- Sullivan AK, Crawford DC, Scott EH, Leslie ML, Sherman SL. 2002. **Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range.** *Am J Hum Genet* 70 (6): 1532-44.
- Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, Yadav-ShahM, Sherman SL. 2005. **Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction.** *Hum Reprod* 20 (2): 402-12.
- Sutherland GR. 1977. **Fragile sites on human chromosomes: Demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium.** *Science* 197: 265-6.
- Sutherland GR. 1979. **Heritable fragile sites on human chromosomes.** *Hum Genet* 53: 23-7.
- Sutherland, GR, Baker E. 1992. **Characterization of a new rare fragile site easily confused with the fragile X.** *Hum Molec Genet* 1: 111-3.
- Sutherland GR, Richards RI. 1999. **Fragile sites-cytogenetic similarity with molecular diversity.** *Am J Hum Genet* 64 (2): 354-9.
- Sutherland GR. 2007. **Fragile sites on human chromosomes.** In: Arrieta, I., Penagarikano, O., Téllez, M. (Eds.), *Fragile Sites: New Discoveries and Changing Perspectives.* Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 3-17.

- Tabolacci E, Moscato U, Zalfa F, Bagni C, Chiurazzi P, Neri G. 2008. **Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations.** *Eur J Hum Genet* 16 (12): 1487-98.
- Taki T, Kano H, Taniwaki M, Sako M, Yanagisawa M, Hayashi, Y. 1999. **AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23).** *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14535-40.
- Tang AH, Neufeld TP, Rubin GM, Muller HA. 2001. **Transcriptional regulation of cytoskeletal functions and segmentation by a novel maternal pair-rule gene, lilliputian.** *Development* 128: 801-13.
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. 2000a. **Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome.** *Am J Hum Genet* 66 (1): 6-15.
- Tassone F, Hagerman RJ, Chamberlain WD, Hagerman PJ. 2000b. **Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome.** *Am J Med Genet* 97 (3): 195-203.
- Tassone F, Hagerman PJ. 2003. **Expression of the FMR1 gene.** *Cytogenet Genome Res* 100 (1-4): 124-8.
- Tassone F, Iwahashi C, Hagerman PJ. 2004. **FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS).** *RNA Biology* 1: 103-5.
- Tassone F, Coffey S, Hagerman RJ. 2007a. **New developments in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS).** In: Arrieta, I., Penagarikano, O., Téllez, M. (Eds.), *Fragile Sites: New Discoveries and Changing Perspectives. Nova Science Publishers, Inc., New York*, pp.321-43.
- Tassone F, Adams J, Berry-Kravis EM, Cohen SS, Brusco A, Leehey MA, Li L, Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2007b. **CGG repeat length correlates with age of onset of motor signs of the fragile C-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS).** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr* 144: 566-9.
- Tassone F, Beilina A, Carosi C, Albertosi S, Bagni C, Li L, Glover K, Bentley D, Hagerman PJ. 2007c. **Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription.** *RNA* 13: 555-62.

- Tassone F, De Rubeis S, Carosi C, La Fata G, Serpa G, Raske C, Willemsen R, Hagerman PJ, Bagni C. 2011. **Differential usage of transcriptional start sites and polyadenylation sites in FMR1 premutation alleles.** *Nucleic Acids Res* 39 (14): 6172-85.
- Tassone F. 2014. **Newborn screening for fragile X syndrome.** *JAMA Neurol* 71 (3): 355-9.
- Tassone F, Hagerman PJ, Hagerman RJ. 2014. **Fragile X premutation.** *J Neurodev Disord* 6 (1): 22.
- Tejada MI, García-Alegría E, Bilbao A, Martínez-Bouzas C, Beristain E, Poch M, Ramos-Arroyo MA, López B, Fernandez Carvajal I, Ribate MP, Ramos F. 2008. **Analysis of the molecular parameters that could predict the risk of manifesting premature ovarian failure in female premutation carriers of fragile X syndrome.** *Menopause* 15: 945-9.
- Terracciano A, Pomponi MG, Marino GM, Chiurazzi P, Rinaldi MM, Dobosz M, Neri G. 2004. **Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations.** *Eur J Hum Genet* 12: 333-6.
- Therman E, Laxova R, Susman B. 1990. **The critical region on the human Xq.** *Hum Genet* 85 (5): 455-61.
- Verkerk AJM, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, van Ommen GJB, Blonden LAJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunst CB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson DL, Oostra BA, Warren ST. 1991. **Identification of a gene FMR-1 containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome.** *Cell* 65: 905-14.
- Vianna-Morgante AM, Costa SS, Pavanello RC, Otto PA, Mingroni-Netto RC. 1999. **Premature ovarian failure (POF) in Brazilian fragile X carriers.** *Genet Mol Biol* 22: 471-4.
- Vianna-Morgante AM, Costa SS. 2000. **Premature ovarian failure is associated with maternally and paternally inherited premutation in Brazilian families with fragile X.** *Am J Hum Genet* 67 (1): 254-5.
- Vizmanos-Pérez JL. 2014. **Claves de la genética de poblaciones. Los mecanismos genéticos de la evolución.** *Elsevier España S.L.*
- Voorhuis M, Onland-Moret NC, Janse F, Ploos van Amstel HK, Goverde AJ, Lambalk CB, Laven JS, van der Schouw YT, Broekmans FJ, Fauser BC; Dutch Primary Ovarian Insufficiency Consortium. 2014. **The significance of fragile X mental retardation gene 1 CGG repeat**

- sizes in the normal and intermediate range in women with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 29 (7): 1585-93.
- Wang YC, Li C, Lin ML, Lin WH, Li SY. 2000. **Molecular diagnosis of fragile X syndrome and distribution of CGG repeats in the FMR1 gene in Taiwanese.** *J Formos Med Assoc* 99 (5): 402-7.
- Warren ST. 1997. **Trinucleotide repetition and fragile X syndrome.** *Hos Pract* 32: 73-6.
- Warren ST. 2007. **The Epigenetics of fragile X syndrome.** *Cell Stem Cell*. 1(5): 488-9.
- Weghofer A, Tea MK, Barad DH, Kim A, Singer CF, Wagner N, Gleicher N. 2012. **BRCA1/2 mutations appear embryo-lethal unless rescued by low (CGG n<26) FMR1 sub-genotypes: explanation of the "BRCA paradox"?** *Plos One* 7 (9): 1-7.
- Welt CK, Smith PC, Taylor AE. 2004. **Evidence of early ovarian aging in fragile X premutation carriers.** *J Clin Endocrinol Metab* 89 (9): 4569-74.
- Welt CK. 2008. **Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 68 (4): 499-509.
- Wenzel HJ, Hunsaker MR, Greco CM, Willemsen R, Berman RF. 2010. **Ubiquitin-positive intranuclear inclusions in neuronal and glial cells in a mouse model of the fragile X premutation.** *Brain Res* 1318: 155-66.
- Westmark CJ, Malter JS. 2007. **FMRP mediates mGLUR5-dependent translation of amyloid precursor protein.** *PLoS Biol* 5: e52.
- Wheeler AC, Raspa M, Green A, Bishop E, Bann C, Edwards A, Bailey DB Jr. 2014. **Health and reproductive experiences of women with an FMR1 premutation with and without fragile X premature ovarian insufficiency.** *Front Genet* 5: 300.
- White PJ, Borts RH, Hirst MC. 1999. **Stability of the human fragile X(CGG)(n) triplet repeat array in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in aspects of DNA metabolism.** *Mol Cell Biol* 19 (8): 5675-84.
- Winarni TI, Chonchaiya W, Sumekar TA, Ashwood P, Morales GM, Tassone F, Nguyen DV, Faradz SM, Van de Water J, Cook K, Hamlin A, Mu Y, Hagerman PJ, Hagerman RJ. 2012. **Immune-mediated disorders among women carriers of fragile X premutation alleles.** *Am J Med Genet A* 158A (10): 2473-81.
- Willemsen R, Hoogeveen-Westerveld M, Reis S, Holstege J, Severijnen LA, Nieuwenhuizen IM, Schrier M, van Unen L, Tassone F, Hoogeveen AT, Hagerman PJ, Mientjes EJ, Oostra BA.

2003. **The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome.** *Hum Molec Genet* 12 (9): 949-59.
- Willemsen R, Levenga J, Oostra BA. 2011. **CGG repeat in the FMR1 gene: size matters.** *Clin Genet* 80 (3): 214-25.
- Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, Corrigan EC, Simpson JL, Nelson LM. 2007. **The FMR1 premutation and reproduction.** *Fertil Steril* 87 (3): 456-65.
- Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D, Shelling AN. 2006. **The genetic basis of premature ovarian failure.** *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46: 242-4.
- Yan QJ, Rammal M, Tranfaglia M, Bauchwitz RP. 2005. **Suppression of two major Fragile X syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP.** *Neuropharmacology* 49 (7): 1053-66.
- Yrigollen CM, Tassone F, Durbin-Johnson B, Tassone F. 2011. **The role of AGG interruption in the transcription of FMR1 premutation alleles.** *PLoS One* 6: e21728.
- Yrigollen CM, Durbin-Johnson B, Gane L, Nelson DL, Hagerman R, Hagerman PJ, Tassone F. 2012. **AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with the fragile x syndrome.** *Genet Med* 14: 729-36.
- Yrigollen CM, Mendoza-Morales G, Hagerman R, Tassone F. 2013. **Transmission of an FMR1 premutation allele in a large family identified through newborn screening: the role of AGG interruptions.** *J Hum Genet* 58 (8): 553-9.
- Yrigollen CM, Martorell L, Durbin-Johnson B, Naudo M, Genoves J, Murgia A, Polli R, Zhou L, Barbouth D, Rupchock A, Finucane B, Latham GJ, Hadd A, Berry-Kravis E, Tassone F. 2014a. **AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission.** *J Neurodev Disord* 6 (1): 24.
- Yrigollen CM, Sweha S, Durbin-Johnson B, Zhou L, Berry-Kravis E, Fernandez-Carvajal I, Faradz SM, Amiri K, Shaheen H, Polli R, Murillo-Bonilla L, Silva Arevalo Gde J, Cogram P, Murgia A, Tassone F. 2014b. **Distribution of AGG interruption patterns within nine world populations.** *Intractable Rare Dis Res* 3 (4): 153-61.

- Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI. 1991. **Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA.** *Science* 252: 1179-81.
- Zhong N, Yang W, Dobkin C, Brown WT. 1995. **Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites.** *Am J Hum Genet* 57 (2): 351-61.
- Zhong N, Ju W, Curley D, Wang D, Pietrofesa J, Wu G, Shen Y, Pang C, Poon P, Liu X, Gou S, Kajanoja E, Ryyanen M, Dobkin C, Brown WT. 1996. **A survey of FRAXE allele sizes in three populations.** *Am J Med Genet* 64: 415-9.
- Zhou Y, Tang K, Law HY, Ng IS, Lee CG, Chong SS. 2006. **FMR1 CGG repeat patterns and flanking haplotypes in three Asian populations and their relationship with repeat instability.** *Ann Hum Genet* 70 (Pt 6): 784-96.
- Zuñiga A, Juan J, Milá M, Guerrero A. 2005. **Expansion of an intermediate allele of the FMR1 gene in only two generations.** *Clin Genet* 68: 471-473.

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

AD	Autistic disorder. Desorden del autismo
ADHD	Attention déficit hiperactivity disorder. Transtorno por deficit de atención e hiperactividad
ASD	Autistic spectrum disorder. Desorden del espectro del autismo
AMH	Anti-müllerian hormone. Hormona antimülleriana
bp	Base pairs. Pares de bases
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FMR1	Fragile mental retardation 1
FMR2	Fragile mental retardation 2
FMRP	Fragile mental retardation protein
FS	Fragile site. Sitio frágil
FSH	Follicle stimulating hormone. Hormona folículo estimulante
FXES	Fragile XE syndrome. Síndrome frágil XE
FXS	Fragile X syndrome. Síndrome del X frágil
FXSD	Fragile X spectrum disorder. Desorden del espectro X frágil
FXPOI	Fragile X primary ovarian insufficiency
FXTAS	Fragile X tremor ataxia syndrome
IQ	Intelligence quotient. Cociente intelectual
IU	International unit. Unidad internacional
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KV	Kilovoltios

L	Litro
LH	Luteinizing hormone. Hormona luteinizante
M	Molar
mb	Megabase
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
NES	Nuclear export signal. Señal de exportación nuclear
ng	Nanogramo
NLS	Nuclear localization signal. Señal de localización nuclear
nm	Nanómetro
PCR	Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramo
pmol	Picomoles
POF	Premature ovarian failure. Fallo ovárico prematuro
POD	Premature ovarian dysfunction. Disfunción ovárica prematura
POI	Primary ovarian insufficiency. Insuficiencia ovárica primaria
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoprotein particles. Partículas de ribonucleoproteína
rpm	Revoluciones por minuto
SNP	Single nucleotide polymorphism. Polimorfismo de un solo nucleótido
THS	Tratamiento hormonal sustitutivo

UTR Untranslated region. Región no traducida

xg Fuerza centrífuga

XLMR X linked mental retardation. Retraso mental ligado al X

°C Grados Celsius

µg microgramo

µl microlitro

ANEXO

ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN (PACIENTES)

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Responsable clínico: Dr. Gorka Barrenetxea

Investigador principal: Maria Isabel Arrieta Sáez

OBJETIVOS FINALIDAD DEL ESTUDIO:

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación denominado “Estudio de la correlación entre el fallo ovárico prematuro (POF) y el gen FMR1”. El objetivo de la investigación es doble, por una parte determinar si en los casos de POF analizados existe una correlación positiva entre esta patología y los alelos premutados e intermedios del gen FMR1 y, por otra, conocer la causa de esa correlación.

Para conseguir este objetivo es necesario recoger una muestra biológica de sangre para la posterior extracción y análisis del material genético. Los resultados contribuirán de forma global a conocer el origen del fallo ovárico prematuro o menopausia temprana, mejorar la información a las personas afectadas y a posibilitar una prevención, diagnóstico y tratamiento más rápido y eficaz.

Por su condición de persona con un fallo ovárico prematuro, Vd. es un sujeto idóneo para participar en este proyecto de investigación. Por ello solicitamos su consentimiento para la extracción de una muestra biológica de sangre.

MUESTRA A RECOGER:

De 15 a 20 ml de sangre venosa

La recogida de esta muestra se realiza por el procedimiento habitual de toma de sangre de su brazo. Este procedimiento le puede causar un pequeño hematoma o una leve infección, que desaparecen en pocos días.

DESTINO DE LA MUESTRA:

Se solicita su consentimiento para la utilización de su muestra en el desarrollo del proyecto de investigación antes mencionado. Además de su muestra se recogerán datos personales como edad y salud en relación a la patología objeto de estudio.

La utilización de la muestra biológica para una finalidad distinta a la expresada deberá ser expresamente autorizada por Vd. en un nuevo documento de consentimiento.

En cualquier momento Vd. podrá revocar el consentimiento para utilizar las muestras obtenidas, pudiendo solicitar la destrucción o anonimización de las mismas. En el caso de anonimización, se romperá irreversiblemente todo vínculo que permita relacionar las muestras y los datos almacenados con su persona. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma.

BENEFICIO QUE SE ESPERAN ALCANZAR:

Su participación en este estudio es completamente voluntaria y altruista. La muestra así recogida no podrá ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro.

La información que se produzca podría ser útil para su salud y la de su familia. Nosotros también esperamos que los beneficios obtenidos nos permitan ampliar nuestros conocimientos en las enfermedades de base genética y posiblemente contribuir al beneficio de la sociedad en general.

DERECHOS Y GARANTÍAS:

Usted tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.

Como consecuencia de la investigación puede obtenerse información relativa a su salud derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica. Vd. puede decidir si desea recibir esta información, o si por el contrario renuncia a este derecho.

Asimismo, ha de indicársele que la información que se obtenga puede afectar a sus familiares, siendo únicamente Vd. el responsable de facilitar, en su caso, información a los mismos, o proporcionar a las personas responsables del estudio los datos precisos para su localización y contacto.

CONFIDENCIALIDAD:

Con la firma de este consentimiento, Vd. autoriza a los investigadores, junto con el empleo de la muestra biológica, a recoger y procesar los datos personales agregados a la muestra como son: fecha de nacimiento, sexo y datos sobre su salud, cuando estos fueran relevantes a los fines de la investigación. Estos datos se someterán a un proceso de disociación mediante la asignación de un código, para garantizar la protección de su identidad. Los resultados de los futuros estudios podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos o publicaciones científicas. Siempre se mantendrá una estricta confidencialidad sobre su identidad.

El investigador es responsable del manejo de los Datos del Estudio, conforme el Real Decreto 223/2004 y la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal. Asimismo se dará cumplimiento a los requerimientos de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

COPIA PARA EL PACIENTE

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo.....con DNI..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información al sujeto participante, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características y el objetivo de la donación. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo **DOY MI CONSENTIMIENTO** para que se utilicen mis muestras y los datos de salud asociados como parte del **Proyecto de Investigación: “Estudio de la correlación entre el fallo ovárico prematuro (POF) y el gen FMR1”**. Consiento participar voluntariamente y renuncio a reclamar cualquier beneficio económico por mi participación en el estudio.

Por la presente afirmo haber obtenido información adecuada sobre la finalidad de la recogida y la seguridad y garantías de cumplimiento de la legalidad vigente que me proporciona el centro encargado de conservar la muestra.

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal (si procede)

Nombre representante legal

Constato que he explicado las características de la cesión de muestras y la posible utilización de las mismas, así como las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información:

Fecha Firma

Nombre:

COPIA PARA EL INVESTIGADOR

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo.....con DNI..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información al sujeto participante, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características y el objetivo de la donación. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo **DOY MI CONSENTIMIENTO** para que se utilicen mis muestras y los datos de salud asociados como parte del **Proyecto de Investigación:** “Estudio de la correlación entre el fallo ovárico prematuro (POF) y el gen FMR1: Determinación del tamaño y estructura de la repetición CGG y análisis de factores en cis”. Consiento participar voluntariamente y renuncio a reclamar cualquier beneficio económico por mi participación en el estudio.

Por la presente afirmo haber obtenido información adecuada sobre la finalidad de la recogida y la seguridad y garantías de cumplimiento de la legalidad vigente que me proporciona el centro encargado de conservar la muestra.

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal (si procede)

Nombre representante legal

Constato que he explicado las características de la cesión de muestras y la posible utilización de las mismas, así como las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información:

Fecha Firma

Nombre:

ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN (CONTROLES)

HOJA DE INFORMACIÓN

Investigador principal: Maria Isabel Arrieta Sáez

OBJETIVOS FINALIDAD DEL ESTUDIO:

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación denominado “Estudio de la correlación entre el fallo ovárico prematuro (POF) y el gen FMR1”. El objetivo de la investigación es doble, por una parte determinar si en los casos de POF analizados existe una correlación positiva entre esta patología y los alelos premutados e intermedios del gen FMR1 y, por otra, conocer la causa de esa correlación.

Para conseguir este objetivo es necesario recoger una muestra biológica de sangre para la posterior extracción y análisis del material genético. Los resultados contribuirán de forma global a conocer el origen del fallo ovárico prematuro o menopausia temprana, mejorar la información a las personas afectadas y a posibilitar una prevención, diagnóstico y tratamiento más rápido y eficaz.

Vd. es un sujeto idóneo para participar como control en este proyecto de investigación. Por ello solicitamos su consentimiento para la extracción de una muestra biológica de sangre.

MUESTRA A RECOGER:

De 15 a 20 ml de sangre venosa

La recogida de esta muestra se realiza por el procedimiento habitual de toma de sangre de su brazo. Este procedimiento le puede causar un pequeño hematoma o una leve infección, que desaparecen en pocos días.

DESTINO DE LA MUESTRA:

Se solicita su consentimiento para la utilización de su muestra en el desarrollo del proyecto de investigación antes mencionado. Además de su muestra se recogerán datos personales como edad y salud en relación a la patología objeto de estudio.

La utilización de la muestra biológica para una finalidad distinta a la expresada deberá ser expresamente autorizada por Vd. en un nuevo documento de consentimiento.

En cualquier momento Vd. podrá revocar el consentimiento para utilizar las muestras obtenidas, pudiendo solicitar la destrucción o anonimización de las mismas. En el caso de anonimización, se romperá irreversiblemente todo vínculo que permita relacionar las muestras y los datos almacenados con su persona. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma.

BENEFICIO QUE SE ESPERAN ALCANZAR:

Su participación en este estudio es completamente voluntaria y altruista. La muestra así recogida no podrá ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro.

Nosotros esperamos que los beneficios obtenidos nos permitan ampliar nuestros conocimientos en las enfermedades de base genética y posiblemente contribuir al beneficio de la sociedad en general.

DERECHOS Y GARANTÍAS:

Usted tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.

Como consecuencia de la investigación puede obtenerse información relativa a su salud derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica. Vd. puede decidir si desea recibir esta información, o si por el contrario renuncia a este derecho.

Asimismo, ha de indicársele que la información que se obtenga puede afectar a sus familiares, siendo únicamente Vd. el responsable de facilitar, en su caso, información a los mismos, o proporcionar a las personas responsables del estudio los datos precisos para su localización y contacto.

CONFIDENCIALIDAD:

Con la firma de este consentimiento, Vd. autoriza a los investigadores, junto con el empleo de la muestra biológica, a recoger y procesar los datos personales agregados a la muestra como son: fecha de nacimiento, sexo y datos sobre su salud, cuando estos fueran relevantes a los fines de la investigación. Estos datos se someterán a un proceso de disociación mediante la asignación de un código, para garantizar la protección de su identidad. Los resultados de los futuros estudios podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos o publicaciones científicas. Siempre se mantendrá una estricta confidencialidad sobre su identidad.

El investigador es responsable del manejo de los Datos del Estudio, conforme el Real Decreto 223/2004 y la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal. Asimismo se dará cumplimiento a los requerimientos de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

COPIA PARA EL PACIENTE

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo.....con DNI..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información al sujeto participante, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características y el objetivo de la donación. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo **DOY MI CONSENTIMIENTO** para que se utilicen mis muestras y los datos de salud asociados como parte del **Proyecto de Investigación: “Estudio de la correlación entre el fallo ovárico prematuro (POF) y el gen FMR1”**. Consiento participar voluntariamente y renuncio a reclamar cualquier beneficio económico por mi participación en el estudio.

Por la presente afirmo haber obtenido información adecuada sobre la finalidad de la recogida y la seguridad y garantías de cumplimiento de la legalidad vigente que me proporciona el centro encargado de conservar la muestra.

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal (si procede)

Nombre representante legal

Constato que he explicado las características de la cesión de muestras y la posible utilización de las mismas, así como las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información:

Fecha Firma

Nombre:

COPIA PARA EL INVESTIGADOR

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo.....con DNI..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información al sujeto participante, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características y el objetivo de la donación. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo **DOY MI CONSENTIMIENTO** para que se utilicen mis muestras y los datos de salud asociados como parte del **Proyecto de Investigación:** “Estudio de la correlación entre el fallo ovárico prematuro (POF) y el gen FMR1: Determinación del tamaño y estructura de la repetición CGG y análisis de factores en cis”. Consiento participar voluntariamente y renuncio a reclamar cualquier beneficio económico por mi participación en el estudio.

Por la presente afirmo haber obtenido información adecuada sobre la finalidad de la recogida y la seguridad y garantías de cumplimiento de la legalidad vigente que me proporciona el centro encargado de conservar la muestra.

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal (si procede)

Nombre representante legal

Constato que he explicado las características de la cesión de muestras y la posible utilización de las mismas, así como las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información:

Fecha Firma

Nombre:

ANEXO 3: CONDICIONES DE CARRERA KIT FRAGILE X ABBOTT

Condiciones de carrera para repeticiones cortas

ABI 3130 / 3130-x/

Parameter	POP- 6 Polymer	POP- 7 Polymer
	Data Collection 3.0	Data Collection 3.0
Oven_Temperature	60°C	60°C
Poly_Fill_Vol	6500 Steps	6500 Steps
Current_Stability	5.0 µA	5.0 µA
Pre_Run_Voltage	15.0 kV	15.0 kV
Pre_Run_Time	180 sec.	180 sec.
Injection_Voltage	10.0 kV	8.0 kV
Injection_Time	1 sec.	1 sec.
Voltage_Number_Of_Steps	40 nK	30 nK
Voltage_Step_Interval	15 sec.	15 sec.
Data_Delay_Time	240 sec.	120 sec.
Run_Voltage	15.0 kV	8.5 kV
Run_Time	3000 sec.	3000 sec.

Condiciones de carrera para repeticiones largas

ABI 3130 / 3130-x/

Parameter	POP- 6 Polymer	POP- 7 Polymer
	Data Collection 3.0	Data Collection 3.0
Oven_Temperature	60°C	60°C
Poly_Fill_Vol	6500 Steps	6500 Steps
Current_Stability	5.0 µA	5.0 µA
Pre_Run_Voltage	15.0 kV	15.0 kV
Pre_Run_Time	180 sec.	180 sec.
Injection_Voltage	15.0 kV	10.0 kV
Injection_Time	22 sec.	22 sec.
Voltage_Number_Of_Steps	40 nK	30 nK
Voltage_Step_Interval	15 sec.	15 sec.
Data_Delay_Time	240 sec.	120 sec.
Run_Voltage	15.0 kV	8.5 kV
Run_Time	5600 sec.	5600 sec.

