

M. Durán^a
 J. Mallolas^b
 M. Rifé^b
 S. Castellví^b
 D. Jiménez^b
 A. Sánchez^{b,c}
 M. Milà^{b,c}

^aServicios de Ginecología y ^bGenética. Hospital Clínic.
 Barcelona.

^cInstitut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.
 (IDIBAPS). Barcelona.

Correspondencia:

Dra. Montserrat Milà.
 Servicio de Genética. Hospital Clínic.
 Villarroel, 170. 08036 Barcelona.
 Correo electrónico: mmila@clinic.ub.es

Fecha de recepción: 17/1/01

Aceptado para su publicación: 15/5/01

Elevada incidencia de premutaciones en el gen *FMR1* en mujeres españolas con fallo ovárico prematuro

High incidence of premutations in the FMR1 gene in Spanish women with premature ovarian failure

M. Durán, I. Mallolas, M. Rifé, S. Castellví, D. Jiménez,
 A. Sánchez, M. Milà. *Elevada incidencia de premutaciones en el gen FMR1 en mujeres españolas con fallo ovárico prematuro.*
Prog Obstet Ginecol 2001;44:261-266.

RESUMEN

Objetivo: Valorar la necesidad de incluir el estudio del gen *FMR1* y/o *FMR2*, dos genes responsables de retraso mental, en los protocolos de estudio de las mujeres que presentan fallo ovárico prematuro (FOP) de causa idiopática.

Sujetos y métodos: Se ha estudiado la zona repetitiva CGG de los genes *FMR1* y *FMR2* a 45 mujeres que consultaban al Servicio de Ginecología o Genética del Hospital Clínic de Barcelona por presentar menopausia precoz.

Resultados: En 2 mujeres (4,4%) se ha detectado una expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* correspondiente a una premutación. No se ha detectado ninguna variación del rango de la normalidad en el triplete CGG en el gen *FMR2*. La incidencia de mujeres portadoras de premutación en el gen *FMR1* entre la población de mujeres que presentan menopausia precoz es 11 veces mayor que la de la población general (1/246).

Conclusiones: Un tercio de los casos de FOP son familiares, lo cual indica la necesidad de los estudios genéticos. Dada la elevada incidencia de portadoras de premutación en el gen *FMR1* en la población de mujeres con FOP, el riesgo que esto comporta para su descendencia (un 50% de riesgo de tener un hijo con retraso mental) y la facilidad del estudio molecular, se recomienda incluir el estudio del gen *FMR1* en los protocolos genéticos de FOP.

PALABRAS CLAVE

Fallo ovárico prematuro. Gen *FMR1*. Gen *FMR2*. Retraso mental.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the possible incorporation of the study of *FMR1* and/or *FMR2*, two genes

- 2 responsible for mental retardation, in clinical procedures for women presenting premature ovarian failure (POF) of idiopathic cause.

Patients and methods: The CGG repeat expansion in the *FMR1* and *FMR2* genes was studied in 45 women referred for POF in the Gynecology or Genetics Service of the Hospital Clínic of Barcelona.

Results: A CGG premutation in the *FMR1* gene was detected in 2 women (4.4%). No alterations were detected in the *FMR2* gene. The incidence of *FMR1* premutation carriers among women with POF was 11-fold higher than that of the general population (1/246).

Conclusions: One third of the POF cases are familial emphasizing the importance of genetic studies. Since we detected a high incidence of premutation carriers of the *FMR1* gene among POF women, taking into account the risk for their offspring (50% of having a son with mental retardation), and the simplicity of the molecular test, we recommend including the analysis of the *FMR1* gene in the clinical procedures for POF.

KEY WORDS

Premature ovarian failure. *FMR1* gene. *FMR2* gene. Mental retardation.

INTRODUCCIÓN

La menopausia precoz (fallo ovárico prematuro [FOP]) se debe al agotamiento precoz de la reserva de folículos ováricos dando lugar a un cuadro de menopausia antes de los 40 años¹. Su incidencia en la población general es alrededor del 1%-2³.

A pesar de que la etiología del FOP es muy variada, un tercio de los casos corresponden a formas familiares, lo cual sugiere una base genética. La genética del FOP presenta una gran heterogeneidad de manera que las alteraciones relacionadas con esta enfermedad van desde una alteración cromosómica a una mutación puntual en un gen. No obstante, un factor común es que muchas de ellas afectan al cro-

mosoma X⁴⁻⁶. Uno de los genes relacionados con el FOP y localizado en el cromosoma X (Xq27.3) es el gen *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*, FRAXA) responsable del síndrome del cromosoma X frágil⁷.

Este síndrome es la causa más común de retraso mental familiar⁸. Se trata de un trastorno ligado al cromosoma X que cursa con retraso mental, dismorfias y macroorquidismo en los varones. Las mujeres, que también pueden padecerlo, tienen como rasgo principal el retraso mental. El defecto molecular consiste en una expansión de un triplete CGG en la zona no traducida del primer exón del gen *FMR1*. El número de repeticiones CGG es un rasgo polimórfico en la población general, de manera que varía entre 6 y 52 repeticiones. A partir de 50 repeticiones se considera que el gen se encuentra en un estado de premutación en el que el individuo portador es capaz de transmitir la alteración, tanto si es varón como mujer, a su descendencia. En cada división celular el número de repeticiones en un individuo portador tiende a aumentar, y cuando se superan las 200 CGG se alcanza la mutación completa^{9,10}. El individuo con la mutación completa, si es varón manifiesta el síndrome, y si es mujer lo hace tan sólo en un 30% de los casos debido al fenómeno de inactivación del cromosoma X.

El gen *FMR2* (*fragile X mental retardation 2*, FRAXE) es un gen situado a unos 600 Kb del gen *FMR1* que presenta una genética prácticamente idéntica¹¹, pero con una incidencia unas 15 veces menor¹². Comparte el mecanismo hereditario y mutacional con el *FMR1*, se debe también a la expansión de un triplete GCC y causa un retraso mental inespecífico en los varones, es decir, sin ninguna manifestación clínica característica del síndrome.

Si bien se acepta que las mujeres portadoras de la premutación no manifiestan ningún rasgo clínico para ninguno de los síndromes FRAXA o FRAXE, estudios recientes ponen de manifiesto que la premutación en el gen *FMR1* tiene una incidencia elevada en las mujeres con FOP, entre un 10 y un 20% según los diversos autores¹³⁻¹⁶, y se ha sugerido una incidencia de alelos con un número bajo de repeticiones o delecciones en el gen *FMR2*¹³.

El objetivo del presente estudio es estudiar la incidencia de premutaciones y/o variaciones del número de repeticiones CGG en los genes *FMR1* y *FMR2* entre las mujeres con FOP de la población española.

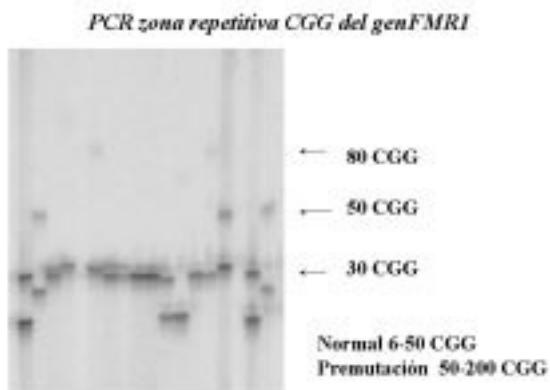


Figura 1. Estudio molecular del gen *FMR1* mediante la amplificación por PCR de la zona repetitiva CGG. En la figura se muestran diversas amplificaciones con diferente número de repeticiones CGG, distinguiéndose entre los rangos normales y de premutación.

SUJETOS Y MÉTODOS

Se han estudiado 45 mujeres sin antecedentes familiares de retraso mental que consultan en el Servicio de Ginecología o de Genética del Hospital Clínic de Barcelona por presentar un FOP idiopático.

A todas ellas se les realizó una analítica hormonal, de manera que los valores de FSH fueron superiores a 40 U/l y el 17-β-estradiol inferior a 20 ng/l.

Igualmente se les realizó un cariotipo, a la vez que se les pasó un cuestionario que incluía: nombre, edad, breve genealogía, edad de la menopausia, historia familiar de FOP e historia familiar de retraso mental. Se les explicó en qué consistía el estudio y se les pidió autorización para llevar a cabo un análisis molecular de los genes *FMR1* y *FMR2*. Se les indicó que si el resultado era negativo no habría más contacto, por el contrario si alguno de los dos resultados era positivo (expansión del triplete CGG superior a las 50 repeticiones en el gen *FMR1* o inferior a 11 repeticiones en el gen *FMR2*) se les informaría y se procedería al estudio familiar.

A las mujeres que aceptaron participar en el estudio se les extrajo 10 ml de sangre en EDTA y se aisló el ADN según los procedimientos habituales¹⁷.

El estudio molecular consistió en la amplificación de la zona repetitiva CGG de los genes *FMR1* y *FMR2* siguiendo la metodología previamente descrita¹⁸ (fig. 1). Cuando ambos alelos se situaban en el rango de la normalidad de 6-52 CGG para *FMR1* y entre 11 y 35 CGG para *FMR2*, el estudio se dio por finalizado. Por el contrario, cuando se amplificaba un solo alelo se procedía al estudio por *Southern* utilizando la sonda StB12.3 tras doble digestión con las enzimas *EcoRI/EagI* para *FMR1*, según la metodología previamente descrita^{10,18} y utilizando la sonda Oxe20 tras doble digestión con *HindIII* y *NotI* para *FMR2*. En los casos en los que se detectó una premutación se procedió a la información de la familia y al posterior estudio familiar.

RESULTADOS

El resultado del interrogatorio familiar proporcionó los datos expuestos en la tabla 1. En 15 casos (1/3) existía un antecedente familiar de FOP en la familia. Tan sólo 10 mujeres (22%) no tenían hijos, el resto tenía al menos un hijo. La incidencia de gemelos fue del 4,4%.

Dos mujeres (4,4%) eran portadoras de una premutación en el gen *FMR1*. El estudio familiar se realizó en ambos casos, detectándose que el padre de la consultante también era portador (fig. 2). Ninguna de las mujeres era portadora de la mutación completa. Un caso corresponde a uno de los que presentaba antecedentes familiares (fig. 2a) y el otro caso por el momento es esporádico, aunque la hermana de la consultante tiene en estos momentos 32 años y se ha detectado que es también portadora de la premutación (fig. 2b). Ninguna mujer era portadora de un alelo fuera del rango normal de 11 a 35 repeticiones en el gen *FMR2*.

Tabla 1 Resultados del estudio de 45 mujeres españolas con fallo ovárico prematuro

Antecedentes familiares					Gen <i>FMR1</i>		Gen <i>FMR2</i>		
	N.º de hijos	Gemelos	dizigotos	Premutación	Normal	Mutación completa	Premutación	Normal	Mutación completa
15 (33,3%)	10 (22%)	35 (78%)	2 (4,4%)	2 (4,4%)	43 (95,6%)	0	0	45 (100%)	0

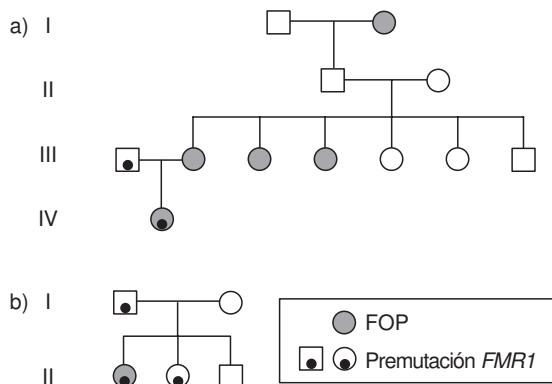


Figura 2. Genealogías de los dos núcleos familiares que presentaron un fallo ovárico prematuro y una premutación en el gen *FMR1*.

DISCUSIÓN

En 1995 aparecieron las primeras publicaciones que relacionaban el FOP con el síndrome del cromosoma X frágil¹⁹. En estos momentos la incidencia de FOP entre las familias X frágil, concretamente en las mujeres portadoras de premutación en el gen *FMR1*, se estima entre el 10 y el 20%. En la población española la incidencia es del 12,2% (12/98)¹⁶. Estos datos sugirieron la necesidad de conocer la incidencia de la premutación en el gen *FMR1* en mujeres con FOP idiopático.

Reynanen et al²⁰ publicaron en 1999 que la incidencia de mujeres portadoras del síndrome del cromosoma X frágil en la población general es de un caso por cada 246 mujeres (0,4%). Nuestros resultados muestran que la incidencia de la premutación en la serie mujeres con POF es del 4,4%, lo cual indica que la incidencia de premutación en el gen *FMR1* es unas 11 veces superior que la estimada en la población general. Si bien nuestra serie no es muy elevada (45 mujeres), los resultados obtenidos concuerdan con otros estudios realizados en poblaciones europeas¹³ que encuentran una incidencia del 4% (6/147). Teniendo en cuenta que el riesgo de tener hijos afectados por el síndrome del cromosoma X frágil en cada embarazo es del 50%, y dado que la prueba no supone gran dificultad ni mayores molestias a la paciente que la de un análisis rutinario, consideramos muy recomendable incluir dicho estudio en los protocolos del FOP.

Uno de los motivos es poder asesorar genéticamente tanto a la consultante como a sus familiares, principalmente a las hermanas de la misma y a su descendencia si la hubiere. En el caso de la paciente hay dos situaciones posibles: las mujeres con FOP que desean tener descendencia y las que ya la tienen; en ambos casos está indicado este estudio. En el primer caso, si se realiza el diagnóstico de portadora y se consigue un embarazo, estaría indicada la realización de un diagnóstico prenatal. Si, por el contrario, se recurre a otras opciones reproductivas, debería tenerse en cuenta la donación de óvulos. En el caso de tener ya descendencia, ésta conllevaría el riesgo de ser portadora, tanto hijos como hijas, y por tanto debería estudiarse.

Por el contrario, en el gen *FMR2*, aunque otros autores han encontrado alelos muy pequeños que sugieren la posibilidad de alteraciones en este gen en mujeres con FOP (en concreto pequeñas delecciones)¹³, nuestros resultados en población española no lo ponen de manifiesto. Cabe tener en cuenta que la incidencia de portadoras de este síndrome se calcula que es unas 15 veces inferior al del gen *FMR1* y el número de mujeres estudiado es muy reducido, por lo que de momento creemos que es necesario ampliar la casuística.

La asociación que existe entre la premutación en el gen *FMR1* y el FOP se desconoce. En principio, todo individuo portador de una premutación en este gen sintetiza la proteína FMRP para la cual codifica y es totalmente asintomática desde el punto de vista clínico; por tanto, no se conoce cómo puede relacionarse con el FOP. En estado de mutación completa sí se sabe que el gen deja de sintetizar la proteína y causa el síndrome del cromosoma X frágil, pero en todas las series estudiadas el FOP siempre se ha asociado a la premutación y no a la mutación completa; por tanto, no es la falta de la proteína FMRP lo que causa el FOP. Algunos autores han intentado relacionarlo con una reducción del número inicial de oocitos, ya que estudios en murinos demuestran cómo el gen *FMR1* se expresa muy intensamente durante la ovogénesis y que cambios inducidos en esta expresión reducen el número de oocitos²¹. Otros autores lo relacionan con ovulaciones múltiples²²⁻²⁴ en las portadoras de la premutación. En nuestra serie la incidencia de gemelos dizi-gotos fue del 4,4% (2/45), mientras que en la población general se calcula alrededor del 1-2%, por

lo que no podemos descartar completamente esta hipótesis.

Como conclusión, creemos que mientras se desconozca la relación existente entre el FOP y la premutación en el gen *FMR1*, está indicado solicitar el estudio de la zona repetitiva CGG del gen *FMR1* a las mujeres que consultan por FOP, tanto si se trata de una forma familiar como si corresponde a un caso esporádico, y tanto si estas mujeres desean descendencia como si ya la tienen.

Por el contrario, aunque hay pocos estudios realizados al respecto, de momento y hasta que no dispongamos de más información, no creemos necesario incluir el estudio del gen *FMR2*.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que en estos momentos, aparte de las anomalías cromosómicas, hay 8 genes descritos relacionados con el FOP⁶, ya sean autosómicos o ligados al cromosoma X, los cuales, por el momento, no pueden ser estudiados de forma tan sencilla como el *FMR1*, pero que han de desempeñar un importante papel en la etiología del FOP, sobre todo en los casos familiares.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la *Marató de TV3* (98TV310 I:P:MMR). S. C. está financiado por un contrato de la Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFÍA

1. Davis RS. Premature ovarian failure. *Maturitas* 1996; 23: 1-8.
2. Coulam CB, Adamson SC, Annergers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 604-606.
3. Tibiletti MG, Testa G, Vegetti W, Alagna F, Taborelli M, Dalpra L et al. The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. *Hum Reprod* 1999; 14: 2731-2734.
4. Davis CJ, Davison RM, Payne NN, Rodeck CH, Conway GS. Female Sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggest an X chromosome defect. *Hum Reprod* 2000; 15: 2418-2422.
5. Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC, Wangsa D, Qian C, Nelson LM et al. Molecular and cytogenetic studies of an X; autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *Am J Med Genet* 1994; 52: 19-26.
6. Sala C, Arrigo G, Torri G, Martinazzi F, Riva P, Larizza L et al. Eleven X chromosome breakpoints associated with premature ovarian failure (POF) map to a 15-Mb YAC contig spanning Xq21. *Genomics* 1997; 40: 123-131.
7. Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C et al. 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* 1999; 83: 322-325.
8. Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 196-197.
9. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-1102.
10. Milà M, Kruyer H, Glover G, Sánchez A, Carbonell P, Castellví-Bel S et al. Molecular analysis of the (CGG)n expansion in the *FMR-1* gene in 59 Spanish fragile X syndrome families. *Hum Genet* 1994; 94: 395-400.
11. Knight SJ, Flannery AV, Hirst MC, Campell L, Christodoulou Z, Phelps SR et al. *Cell* 1993; 74: 127-134.
12. Brown WT. The FRAXE syndrome: is it time for routine screening? *Am J Hum Genet* 1998; 58: 903.
13. Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P. Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet* 1998; 35: 637-640.
14. Giovannucci Uzielli ML, Guarducci S, Lapi E, Cecconi A, Ricci U, Ricotti G et al. Premature ovarian failure (POF) and fragile X premutation females: from POF to fragile X carrier identification, from fragile X carrier to POF association data. *Am J Med Genet* 1999; 84: 300-303.
15. Marozzi A, Vegetti W, Manfredini E, Tibiletti MG, Testa G, Crogniani PG et al. Association between idiopathic premature ovarian failure and fragile X premutation. *Hum Reprod* 2000; 15: 197-202.
16. Mallolas J, Duran M, Sánchez A, Jiménez D, Castellví-Bel S, Rifé M et al. Implications of the *FMR1* gene in menopause: study of 147 Spanish women. *Menopause* 2001; 8: 106-110.

- 6 17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215.
18. Milà M, Sánchez A, Badenas C, Brun C, Jiménez D, Villa et al. X. Screening for FMR1 and FMR2 mutations in 222 individuals from Spanish special schools: identification of a case of FRAXE-associated mental retardation. Hum Genet 1997; 100: 503-507.
19. Conway GS, Hettiarachchi S, Murray A, Jacobs PA. Fragile X premutations in familial premature ovarian failure. Lancet 1995; 346: 309-310.
20. Ryynanen M, Heinonen S, Makkonen M, Kajanoja E, Mannermaa A, Pertti K. Feasibility and acceptance of screening for fragile X mutations in low-risk pregnancies. Eur J Hum Genet 1999; 7: 212-216.
21. Bachner D, Manca A, Steinbach P et al. Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proloferation suggests a special funtion in both male and female gonads. Hum Mol Genet 1993; 2: 2043-2050.
22. Fryns JP. The female and the fragile X. A study of 144 obligate female carriers. Am J Med Genet 1986; 23: 157-169.
23. Turner G, Robinson H, Wake S, Martin N. Dizygous twinning and premature menopause in fragile X syndrome. Lancet 1994; 344: 1500.
24. Martin NG, Healey SC, Pangan TS, Heath AC, Turner G. Do mothers of dizygotic twins have earlier menopause? A role for fragile X? Am J Med Genet 1997; 69: 114-116.