

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**ASPECTOS INMUNOLÓGICOS Y
MOLECULARES DE
LA FALLA OVÁRICA PREMATURA**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.**

Lic. VICTORIA SUNDBLAD

Director de Tesis: Dr. Eduardo H. Charreau

Director Asistente: Dra. Liliana B. Dain

**Instituto de Biología y Medicina Experimental
IBYME – CONICET**

Buenos Aires, Junio 2005

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR
ASPECTS OF PREMATURE OVARIAN
FAILURE**

**Thesis submitted to be awarded a degree of Universidad de
Buenos Aires Ph.D. in Biological Chemistry.**

VICTORIA SUNDBLAD, MSc.

Mentor: Eduardo H. Charreau, PhD.

Assistant Mentor: Liliana B. Dain, PhD.

**Instituto de Biología y Medicina Experimental
IBYME – CONICET**

Buenos Aires, June 2005

A Papá

A José, Josecito y el que viene en camino

A mamá y mis hermanos

Quisiera agradecer a aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo:

A mi Director de Tesis, el Dr. Eduardo H. Charreau (“El Jefe”), por haberme recibido en su laboratorio, y haberme dado un lugar amigable donde desarrollarme libremente. Por enseñarme a hacer Ciencia. Por el respeto y el cariño brindado durante estos años.

A la Dra. Liliana Dain, Lily, quien supo transmitirme sus conocimientos sobre genética y biología molecular. Por enseñarme con paciencia y generosidad. Por las tardes de discusión de resultados, por respetarme y enseñarme a pensar con libertad.

A Viole, por el cariño y el apoyo brindado durante todos estos años, no solo en los temas del laboratorio, si no en lo personal. Por haber compartido conmigo todos los días de trabajo, y haber estado siempre dispuesta a apoyarme. Por cuidarme como a una hija.

A Ana Rosa por su ayuda en el laboratorio. Por su cariño y su preocupación por mi bienestar y el de mis seres queridos. Por todos los momentos compartidos en el trabajo diario.

A mis amigas del laboratorio, Ceci y Marian, sin quienes todo este trabajo no hubiese sido posible. Por su incondicional apoyo, su inmensa paciencia y generosidad. Por estar siempre dispuestas a ayudarme y apoyarme con amor en todos los ámbitos de mi vida.

A la Dra. Patricia Elizalde por sus consejos y buena disposición para orientarme cuando recurría por ayuda. Por su cariño en el trato diario.

A Wendy, Roxana, Romi, Cintia y Martín; a las chicas del primer piso Vani, Loli, Débora, Petu, Juli, Kari, Pato, Fer, Dalia, Marina, Griselda, Caro, Ceci y Soraida, por las charlas, los festejos, los almuerzos compartidos.

A Leo Bussmann, por su ayuda desinteresada en los protocolos de identificación del antígeno ovárico. Por todas las veces que aparecí en su laboratorio en búsqueda de auxilio.

A Merce Goin, por sus buenos consejos y su gran disposición para ayudarme siempre.

A Juan Carlos Calvo, por su trabajo y su ayuda en el estudio de las Ig-FSHR.

Al Dr. Tomás Santa Coloma por sus consejos y su orientación en la identificación molecular del antígeno ovárico.

A todos los grupos de trabajo de IBYME, por prestar, aconsejar y ayudar.

A todos los integrantes del Instituto de Biología y Medicina Experimental, bibliotecarias, personal de maestranza, personal de bioterio y administración.

A todas las voluntarias que generosamente participaron en este trabajo.

Al CONICET, al Ministerio de Salud de la Nación y a la Fundación Roemmers, por el aporte económico que me permitió realizar la tesis.

A la UBA por brindarme una excelente educación.

A la familia Cilley, por su cariño y su apoyo incondicional. Por tratarme como a una hija.

A mis amigas “las centavas”, “las del Scrum” y “las de Mar del Plata”, por estar siempre, porque juntas crecemos y aprendemos a ser mejores personas.

A mis padres, por haberme educado con tanto amor y libertad. Por haberme tenido paciencia en la búsqueda de mi vocación. Por haberme enseñado tantas cosas.

A papá, por su ejemplo de dedicación al trabajo, curiosidad por la investigación y amor por la ciencia. Por su ejemplo de vida. Si bien ya no está con nosotros físicamente, está presente en mi corazón todos los días de mi vida.

A mamá, por su ejemplo de fortaleza y perseverancia. Por su amor, su aliento y su apoyo en todas las cosas que emprendo.

A mis hermanos, Cata, Maru y Marcos, por ayudarme cada día a ser una mejor persona, esposa, madre, hermana, hija. Por el apoyo y el amor mutuo con que nos ayudamos a crecer.

A Josecito (Zezé) por su amor incondicional, por su alegría constante, por sus mimos y demostraciones de cariño. Por hacerme sentir la mamá más feliz del mundo.

Y a José, por su inmesurable amor. Por su apoyo incondicional y su constante aliento y estímulo, sin los cuales, este trabajo no hubiese podido ser realizado. Por su inmensa paciencia en los momentos “críticos”. Por hacerme feliz.

Algunos resultados de esta tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

“Circulating immunoglobulins that inhibit the binding of follicle-stimulating hormone to its receptor: a putative diagnostic role in resistant ovary syndrome?”.

Violeta A. Chiauzzi, Leonardo Bussmann, Juan Carlos Calvo, Victoria Sundblad, Eduardo H. Charreau.

Clinical Endocrinology (2004): 61, 46-54.

“Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF)”.

Victoria Sundblad, Violeta A. Chiauzzi, María Eugenia Escobar, Liliana Dain, Eduardo H. Charreau.

Molecular and Cellular Endocrinology (2004): 222, 53-59.

INDICE

	Página
Resumen	14
Abstract	18
 INTRODUCCIÓN	
1. Ovario	
1.1. Estructura y función.....	22
1.2. Foliculogénesis.....	23
1.3. Ciclo Ovárico.....	25
<i>1.3.1. Fase folicular.....</i>	<i>28</i>
<i>1.3.2. Ovulación.....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.3. Fase Lútea.....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.4. Menstruación.....</i>	<i>29</i>
1.4. Reclutamiento de folículos.....	30
1.5. Selección del folículo dominante	30
1.6. Reservorio ovárico y atresia folicular.....	32
 2. Menopausia.....	 32
2.1. Reservorio Folicular y Menopausia.....	33
2.2. Menopausia Prematura.....	34
<i>2.2.1. Manifestaciones Clínicas de la FOP.....</i>	<i>34</i>
<i>2.2.2. Clasificación de FOP.....</i>	<i>36</i>
<i>2.2.2.1. Síndrome del Ovario Resistente.....</i>	<i>36</i>
<i>2.2.3. Etiología de la FOP.....</i>	<i>37</i>
<i>2.2.4. Aspectos inmunológicos de la FOP.....</i>	<i>41</i>
<i>2.2.4.1. Anticuerpos anti-ovario.....</i>	<i>44</i>
<i>2.2.4.2. Anticuerpos anti-receptor de FSH.....</i>	<i>47</i>
<i>2.2.5. Aspectos moleculares de la FOP.....</i>	<i>49</i>
<i>2.2.5.1. Gen del receptor de FSH.....</i>	<i>51</i>
<i>2.2.5.2. Gen de la subunidad α de las inhibinas.....</i>	<i>54</i>

OBJETIVOS**1. Aspectos Inmunológicos de la Falla Ovárica Prematura**

<i>1.1. Anticuerpos anti-ovario (AOA)</i>	59
<i>1.2. Anticuerpos anti-receptor de FSH</i>	59

2. Aspectos Moleculares de la Falla Ovárica Prematura

<i>2.1. Gen del receptor de FSH</i>	59
<i>2.2. Gen de la subunidad α de las inhibinas</i>	60

MATERIALES Y MÉTODOS

<u>Muestra</u>	62
-----------------------------	----

1. Aspectos Inmunológicos de la Falla Ovárica Prematura***1.1 Anticuerpos anti-ovario (AOA)***

- Preparación del extracto proteico.....	63
- Aislamiento del antígeno ovárico a partir del extracto proteico.....	64
- Tinción con coomasie blue.....	65
- Western-blot utilizando la enolasa α recombinante.....	66
- Sueros.....	66
- Soluciones utilizadas para Western-blot.....	67
- Técnica de revelado con DAB.....	68

1.2. Anticuerpos anti-receptor de FSH

- Individuos estudiados.....	68
- Determinación de inmunoglobulinas circulantes que inhiben la unión de FSH a su receptor	71
- Estudios de “Binding”	72
- Análisis de los datos.....	72

2. Aspectos Moleculares de la Falla Ovárica Prematura

2.1. Gen del receptor de FSH.

- Individuos estudiados	73
- Extracción de ADN.....	73
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	74
- Técnica de Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple del ADN (SSCP).....	77
- Digestión con enzimas de restricción.....	79
- Tinción con Plata.....	81
- Tinción con Bromuro de Etidio.....	82
- Secuenciación.....	82
- Análisis estadístico.....	83

2.2. Gen de la subunidad α de las inhibinas

- Individuos estudiados.....	83
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	85
- Purificación de los productos de PCR.....	86
- Digestión con enzimas de restricción.....	87
- Secuenciación.....	88
- Determinaciones hormonales.....	89
- Análisis estadístico.....	90

RESULTADOS

1. Aspectos Inmunológicos de la Falla Ovárica Prematura

1.1. Anticuerpos anti-ovario (AOA)

- Purificación del antígeno ovárico.....	92
- Análisis mediante espectrometría de masa.....	93
- Western-Blots utilizando la enolsa- α recombinante.....	96

1.2. Anticuerpos anti-receptor de FSH.

- Inmunoglobulinas que inhiben la unión de FSH a su receptor.....	98
---	----

- Mecanismo de inhibición de la unión de FSH a su receptor..... 100
- Asociación con enfermedades autoinmunes..... 101

2. Aspectos Moleculares de la Falla Ovárica Prematura

2.1. Gen del receptor de FSH

- Estudio de la mutación inactivante C566T 102
- Análisis por SSCP de los exones 1 al 9..... 104
- Estudio del exón 10 114
- Estudio de los polimorfismos del exón 10 mediante digestión con enzimas de restricción..... 115
- Estudio de la sustitución T1022C del exón 10..... 119

2.2. Gen de la subunidad α de las inhibinas

- Determinación del genotipo del polimorfismo C129T de 5'UTR..... 120
- Estudio de la posible asociación entre el polimorfismo C129T y los niveles circulantes de inhibinas..... 125
- Determinación del genotipo de la sustitución G769A del exón 2..... 128

DISCUSIÓN

1. Aspectos Inmunológicos de la Falla Ovárica Prematura

- 1.1. Anticuerpos anti-ovario (AOA)***..... 133
- 1.2. Anticuerpos anti-RFSH***..... 138

2. Aspectos Moleculares de la Falla Ovárica Prematura

- 2.1. Gen del receptor de FSH***..... 144
- 2.2. Gen de la subunidad α de las inhibinas***..... 149

CONCLUSIONES FINALES..... 158

CONSIDERACIONES GENERALES 161

BIBLIOGRAFIA..... 165

RESUMEN

RESUMEN

La falla ovárica prematura (FOP), caracterizada por amenorrea hipergonadotrófica antes de los 40 años, afecta al 1% de las mujeres en edad fértil. Por su parte, el síndrome de ovario resistente (SOR) es propuesto como una forma folicular de FOP, caracterizado por la presencia de numerosos folículos primordiales en los ovarios. La FOP puede ser de origen autoinmune, iatrogénico, infeccioso, genético/cromosómico o metabólico, entre otros. Cuando no es posible identificar una causa para su desarrollo, la FOP es clasificada como idiopática.

Nuestro estudio consistió en abordar el análisis de posibles causas inmunológicas y moleculares de la FOP. En trabajos previos detectamos mediante Western-blot la presencia de anticuerpos dirigidos hacia un antígeno ovárico de ~50 kDa en el 19,1% de un total de 110 pacientes FOP. En esta parte del estudio, trabajamos en la purificación e identificación de esta proteína. Mediante espectrometría de masa identificamos a la enolasa- α como el antígeno específico hacia el cual estarían dirigidos estos anticuerpos anti-ovario en pacientes FOP. Estos resultados fueron confirmados mediante Western-blots en los que se utilizó a la proteína recombinante como antígeno. Concluimos que la determinación de anticuerpos anti-enolasa- α podría significar un aporte importante para el diagnóstico de FOP autoinmune, y su utilización como marcador de autoinmunidad ovárica permitiría brindar a las pacientes un tratamiento acorde a la naturaleza autoinmune del síndrome.

Asimismo, realizamos un estudio retrospectivo sobre el análisis de 247 pacientes FOP que habían sido derivadas a nuestro laboratorio para la determinación de la presencia de inmunoglobulinas dirigidas hacia el R-FSH (Ig-R-FSH). Encontramos que sólo las 23 mujeres que habían sido previamente diagnosticadas como SOR presentaban estos anticuerpos. Además, confirmamos que la actividad inhibitoria de las Ig-R-FSH puede ser clasificada en dos grupos: uno con efecto inhibitorio “irreversible”, cuya Ki

aparente es $2,94 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, mil veces mayor que la constante de afinidad de la FSH por su receptor, y el otro con un mecanismo inhibitorio “reversible”, con una K_i aparente similar a la constante de afinidad de la FSH por su receptor. Concluimos que la determinación de estos anticuerpos sería un instrumento importante para el diagnóstico del SOR, permitiendo realizar el diagnóstico principalmente sobre la base de estudios serológicos.

Con respecto a las posibles causas genéticas de la FOP, el gen del R-FSH ha sido uno de los genes candidatos más estudiados. Hasta el presente se han descrito 9 mutaciones inactivantes en este gen. En nuestro laboratorio investigamos la presencia de mutaciones en el gen del R-FSH en 20 pacientes FOP, 5 de las cuales habían sido diagnosticadas como SOR, y 44 mujeres controles. Estudiamos la secuencia codificante completa del gen del R-FSH mediante PCR-SSCP, digestión con enzimas de restricción y/o secuenciación directa. No detectamos mutaciones en los exones 1 al 10 en ninguno de los individuos analizados. Además, observamos que los polimorfismos A919G y A2039G del exón 10 se presentan en dos posibles combinaciones, avalando la existencia de dos isoformas del R-FSH: Ala³⁰⁷-Ser⁶⁸⁰ y Thr³⁰⁷-Asn⁶⁸⁰. Nuestros resultados sugieren que la variante alélica 919G-2039G ($OR_{G \text{ vs } A} = 1,20$; $IC_{95\%} = 0.53-2.71$) o el genotipo homocigota ($OR_{GG \text{ vs } AG} = 1,00$; $IC_{95\%} = 0.22-4.46$; $OR_{GG \text{ vs } AA} = 1,40$; $IC_{95\%} = 0.25-7.87$) no estarían asociados al riesgo de desarrollo de FOP. Además, en dos individuos controles detectamos la presencia de la sustitución C1022T, en heterocigosis. En conclusión, sugerimos que las mutaciones en el gen del R-FSH son poco frecuentes en las pacientes FOP de Argentina. La presencia de una isoforma particular del R-FSH no estaría asociada a la enfermedad.

Por su parte, el gen de la inhibina α (INH α) ha sido propuesto como otro gen candidato para el desarrollo de FOP, debido al rol de las inhibinas en la regulación de la

FSH. En dos trabajos previos se sugiere que el polimorfismo C129T y la sustitución G769A estarían involucrados en la etiología de la FOP. En este trabajo analizamos 52 pacientes FOP; 14 presentaban FOP asociada a enfermedad/es autoinmune/s (FOP-EA) y las 38 restantes fueron consideradas idiopáticas (FOP-I). Además, estudiamos 136 mujeres controles, separadas en dos grupos: a) menores de 40 años (C<40), y b) mayores de 40 años (C>40). No encontramos diferencias significativas en el riesgo de desarrollo de FOP para el alelo T del polimorfismo C129T, cuando comparamos FOP-I con C<40 o con C>40 ($OR_{T \text{ vs } C; I-POF \text{ vs } C<40} = 1.82$; $IC_{95\%} = 0.88-3.75$; $OR_{T \text{ vs } C; I-POF \text{ vs } C>40} = 1.07$; $IC_{95\%} = 0.53-2.16$). Obtuvimos resultados similares al comparar los genotipos ($OR_{CC \text{ vs } (CT+TT); I-POF \text{ vs } C<40} = 2.15$; $IC_{95\%} = 0.87-5.29$; $OR_{CC \text{ vs } (CT+TT); I-POF \text{ vs } C>40} = 1.05$; $IC_{95\%} = 0.43-2.56$). La posible implicancia del polimorfismo C129T en los niveles serológicos de inhibinas fue analizada en un grupo de 42 mujeres controles. No hallamos diferencias significativas ($p>0,05$) entre los grupos CC y CT+TT al comparar los valores de los péptidos de inhibina de la fase folicular media (Pro- α C e Inhibina B), o los valores de la fase lútea media (Pro- α C e Inhibina A). Con respecto a la mutación G769A, hallamos 8/135 controles y 1/52 pacientes FOP (una FOP-EA) heterocigotas para dicha sustitución. La presencia de la variante G769A en un número relevante de individuos controles se describe en este trabajo por primera vez. Nuestros resultados indicarían que las variantes C129T y G769A no estarían asociadas al desarrollo de FOP.

En conclusión: i) la proteína enolasa- α sería el el antígeno específico de ~50 kDa hacia el cual estarían dirigidos los anticuerpos anti-ovario en pacientes FOP; ii) las Ig-R-FSH se encontrarían presentes exclusivamente en las pacientes con diagnóstico de SOR; iii) el gen del R-FSH y las variantes C129T y G769A del gen INH α no estarían involucrados en la etiopatología de la FOP en pacientes argentinas.

ABSTRACT

ABSTRACT

Premature ovarian failure (POF) is characterized by amenorrhea before the age of 40. POF is usually classified as “follicular” or “afollicular” form. Resistant ovary syndrome (SOR) is proposed as a follicular form of POF, with ovaries in which numerous primordial follicles are present. POF involves almost 1% of the western female population. It is a very heterogeneous syndrome, with a multicausal pathogenesis, and any of the following: chromosomal, enzymatic, iatrogenic, autoimmune or infectious aberration, may be the cause of the disease. In our laboratory, we focused our POF research on some immunological and genetic etiological factors.

In previous studies, by Western-blot using ovarian cytosolic fraction antigens, we found that 19.1% of 110 POF patients showed specific reactivity with a ~ 50 kDa antigen. In the present work, we focused on the purification and identification of this protein. NanoLC-ESI-MS/MS identified α -enolase as the specific antigen to which anti-ovarian antibodies are directed in these POF patients. These results were confirmed by Western-blot using recombinant human α -enolase. In conclusion, detection of anti- α -enolase antibodies by Western-blot could be a suitable marker for diagnosis of *autoimmune* POF. Its implementation as marker of ovarian autoimmunity may allow treatment of patients according to the immunological nature of their pathology.

We also evaluated the presence of circulating immunoglobulins that inhibit FSH binding to its receptor (Ig-FSHR) by FSH-binding inhibition assay, in 247 patients with POF and 60 normally menstruating women (controls). We found that only those 23 patients that had been previously diagnosed as ROS presented Ig-FSHR. The remaining 224 POF patients and 60 control subjects proved negative. In addition, our results clearly demonstrated that immunoglobulin fractions can be classified into two groups: one, with an “irreversible” nature of inhibitory effect, which K_i was $2.94 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, a

thousand times higher than the affinity constant for FSH-receptor (FSHR) binding interaction, and the other group with a “reversible” mechanism of inhibition, with an apparent K_i similar to the affinity constant for FSHR binding interaction. We concluded that determination of Ig-FSHR could be instrumental in diagnosing ROS, mainly upon the basis of serological findings.

Regarding genetic factors, the FSHR gene has long been considered a strong candidate gene for POF. Nine mutations have been described in this gene to date. We investigated the presence of mutations and/or polymorphisms in FSHR gene, in 20 patients with POF, 5 of which were diagnosed as ROS, and 44 controls. The complete coding sequence was analyzed by PCR followed by SSCP, direct sequencing or restriction enzyme analysis. No mutations in FSHR gene were identified in the subjects studied. Polymorphisms A919G and A2039G of exon 10, cosegregated in all the homozygous individuals, indicating that FSHR presents two isoforms: Ala³⁰⁷-Ser⁶⁸⁰ and Thr³⁰⁷-Asn⁶⁸⁰. OR results suggested that the 919G-2039G allelic variant (OR_{G vs A} = 1,20; IC_{95%} = 0.53-2.71) or the homozygous genotype (OR_{GG vs AG} = 1,00; IC_{95%} = 0.22-4.46; OR_{GG vs AA} = 1,40; IC_{95%} = 0.25-7.87) is not associated to disease risk. In addition, a heterozygous substitution C1022T (Val341Ala) was found in two control subjects. We suggest that mutations in FSHR gene are rare in women with POF in Argentina. Presence of a particular FSHR isoform does not appear to be associated with this disease.

On the other hand, inhibin- α gene is also proposed as a candidate gene for POF, due to its role in negative feedback control of hypophyseal FSH. In two previous studies, polymorphism C129T and substitution G769A of this gene were suggested to be involved in the etiology of POF. We studied 52 POF patients; 14 presented POF in association with autoimmune/s disease/s (AAD-POF), and the remaining 38 were

considered idiopathic (I-POF). As controls, 136 normal women were also studied, divided into two groups: a) controls below the age of 40 years (C<40), and b) controls above the age of 40 years (C>40). We found no significant differences in risk of POF development for the T allele of polymorphism C129T when we compared I-POF either with C<40 or with C>40 (OR_{T vs C; I-POF vs C<40} = 1.82; IC_{95%} = 0.88-3.75; OR_{T vs C; I-POF vs C>40} = 1.07; IC_{95%} = 0.53-2.16). Similar results were found when genotypes were compared (OR_{CC vs (CT+TT); I-POF vs C<40} = 2.15; IC_{95%} = 0.87-5.29; OR_{CC vs (CT+TT); I-POF vs C>40} = 1.05; IC_{95%} = 0.43-2.56). The implication of this polymorphism in serum inhibin levels was analyzed in 42 control women, and found no significant differences (p>0.05) between CC and CT+TT groups either when we compared mid-follicular phase inhibin peptide values (Pro- α C and Inhibin B) or when we compared mid-luteal phase values (Pro- α C and Inhibin A). Heterozygosity for the substitution G769A was found in 8/135 controls and only in 1/52 POF women (an AAD-POF). Presence of this substitution in a relevant number of control subjects is herein described for the first time. Our results might indicate that C129T and G769A variants in INH- α gene may not be associated to POF disease.

In conclusion: i) α -enolase would be the specific antigen of ~50 kDa to which anti-ovarian antibodies are directed in POF patients; ii) Ig-FSHR would be present only in those patients diagnosed as ROS; c) neither FSHR gene nor C129T and G769A variants in INH α gene would be involved in the etiology of POF.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1. OVARIO

1.1. Estructura y función

Los ovarios, órganos pares ovoides, se hallan situados dorsalmente en la cavidad peritoneal, sostenidos por un ligamento suspensorio. Están compuestos por una zona externa o corteza, que a simple vista se puede diferenciar de la zona interna o médula. La primera comprende el estroma ovárico -formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecaes- y folículos en distintos estadios de maduración, folículos atrésicos y cuerpos lúteos. La segunda es una zona sumamente vascularizada e inervada, y posee células musculares y tejido conectivo laxo. Externamente, un epitelio cúbico simple cubre los ovarios y por debajo se encuentra una capa delgada de tejido conectivo denso (falsa albugínea) (Bloom, 1986).

El tejido ovárico se halla en constante transformación, con múltiples compartimentos foliculares que interactúan de forma altamente integrada para secretar esteroides sexuales y producir un óvulo capaz de ser fertilizado, en respuesta a la secreción cíclica de hormonas gonadotróficas hipofisarias.

El folículo ovárico constituye la unidad funcional fundamental del ovario. Su función es la de proveer el sistema de soporte necesario para que la célula germinal femenina, el ovocito, adquiera la capacidad de unirse a una célula germinal masculina, el espermatozoide, con el fin de producir un embrión. Las células somáticas del folículo sintetizan hormonas sexuales femeninas que contribuyen a la regulación del ciclo sexual femenino. Proveen, por otro lado, los requerimientos nutritivos para el crecimiento del

ovocito. Controlan la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos de folículos seleccionados para la ovulación, y contribuyen a la atresia de los ovocitos de los folículos no seleccionados. Estos efectos directos de las células foliculares sobre el desarrollo y destino de los ovocitos que circundan, son mediados por cambios que producen en el microambiente del folículo, principalmente a través de hormonas y factores de crecimiento que secretan al fluido folicular que rodea al ovocito.

1.2. Foliculogénesis

Un complejo proceso de proliferación y diferenciación celular –foliculogénesis– lleva a los folículos primordiales a transformarse en folículos preovulatorios maduros (folículos de De Graaf). Los *folículos primordiales* están compuestos por un ovocito, arrestado en el estadio de diplotene de la profase meiótica, rodeado por células ahusadas precursoras de las células de la granulosa y por la membrana basal. En la fase de crecimiento preantral, que se repite continuamente durante todo el espectro de vida reproductiva en forma ininterrumpida hasta la menopausia, los folículos primordiales (30 μm de diámetro) se convierten en folículos secundarios (120 μm de diámetro). Los precursores ahusados de las células de granulosa se diferencian en una única capa de células cuboides y el ovocito aumenta de tamaño, conformando un *folículo primario* (Yeh y Adashi, 2001). Simultáneamente, las células de la granulosa sintetizan y secretan mucopolisacáridos con los que originan un halo translúcido que rodea al ovocito, conocido como *zona pelúcida* (Chiquoine, 1960). Con posterioridad, la proliferación de las células de la granulosa dará origen a múltiples capas celulares responsables del agrandamiento folicular y que transforman al folículo primario en un *folículo*

secundario (preantral). Por fuera de la membrana basal que separa a las células de granulosa del estroma, se diferencia una teca incipiente. Las células del estroma precursoras de la teca alcanzan la membrana basal y se disponen en estratos concéntricos, formando una estructura radial de células elongadas que rodean competamente al folículo. Acumulan citoplasma y adquieren organelas características de las células capaces de secretar hormonas esteroideas. Los folículos secundarios constituyen la fuente de folículos preantrales que sufrirán reclutamiento tónico (Yeh y Adashi, 2001).

Durante la fase de crecimiento tónico, los folículos secundarios (preantrales) se transforman en **folículos terciarios** (antrales tempranos y tardíos) de un diámetro de hasta 2 mm. Las células de la teca se diferencian en dos capas, una interior glandular y vascularizada, llamada teca interna, y otra exterior, la teca externa, cuyas células conservan la configuración ahusada y que se forma a medida que el folículo se expande y comprime el estroma circundante. Se produce un gran aumento del tamaño folicular, debido tanto a la proliferación de las células de la granulosa como al crecimiento del antra. Cuando los diámetros foliculares alcanzan 200 a 400 μm , aparece una acumulación de líquido entre las células de la granulosa (cuerpos de Call-Exner) como productos de secreción de dichas células. Estas acumulaciones de líquido aumentan de tamaño y confluyen dando origen a una cavidad central conocida como antra (Yeh y Adashi, 2001; Bloom, 1986)

A esta fase de crecimiento tónico le sigue la fase de crecimiento exponencial gonadotrofino-dependiente, que da por resultado un incremento del tamaño folicular de

5 a 20 mm de diámetro. Si bien las fases anteriores del desarrollo folicular también dependerían de la secreción de gonadotrofinas, son los folículos de mayor tamaño los que necesitan el sustento de estas hormonas para alcanzar el tamaño ovulatorio (Yeh y Adashi, 2001). En esta fase, las células de la granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas; en las células de la teca aparecen vacuolas y aumenta la vascularización. El folículo aumenta de tamaño por proliferación de las células foliculares y por acumulación del fluido folicular, constituyendo un folículo preovulatorio o *folículo de De Graff*. El ovocito ocupa una ubicación excéntrica, rodeado por dos o tres capas de células de la granulosa. Estas células, que agrupadas se conocen como *cúmulus óoforo*, son contiguas a las células de granulosa murales que rodean al antro central (Yeh y Adashi, 2001; Bloom, 1986).

En la figura 1 se muestran los diferentes estadios madurativos por los que transitan los folículos ováricos durante la foliculogénesis.

1.3. Ciclo Ovárico

El ciclo menstrual es el resultado de un complejo sistema de retroalimentación en el que intervienen las hormonas esteróideas sexuales estrógenos y progesterona (P₄), las gonadotrofinas hipofisiarias FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante), la hormona hipotalámica liberadora de gonadotrofinas (GnRH), y otros factores reguladores endócrinos y parácrinos intraováricos, como las inhibinas y activinas.

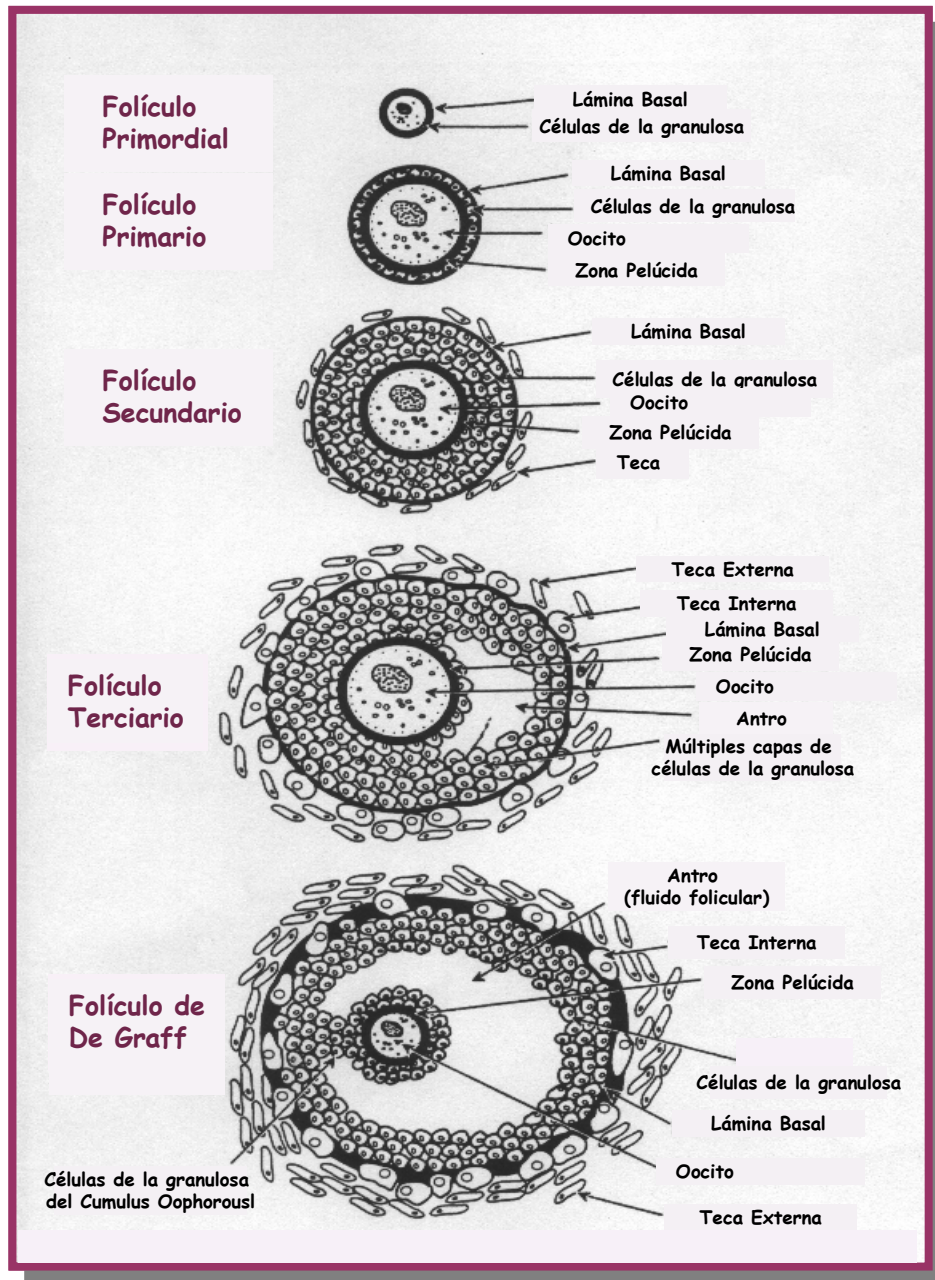


Figura 1. Estructura y clasificación del folículo ovárico durante su desarrollo y crecimiento.

Las gonadotropinas producidas por la hipófisis anterior (FSH y LH) regulan la función ovárica, y los propias hormonas esteróideas ováricas -los estrógenos y la progesterona- así como otros factores peptídicos como las inhibinas, influyen a su vez en la secreción de gonadotropinas. Esta interacción entre la adenohipófisis, el hipotálamo y el ovario se ilustra esquemáticamente en la figura 2.

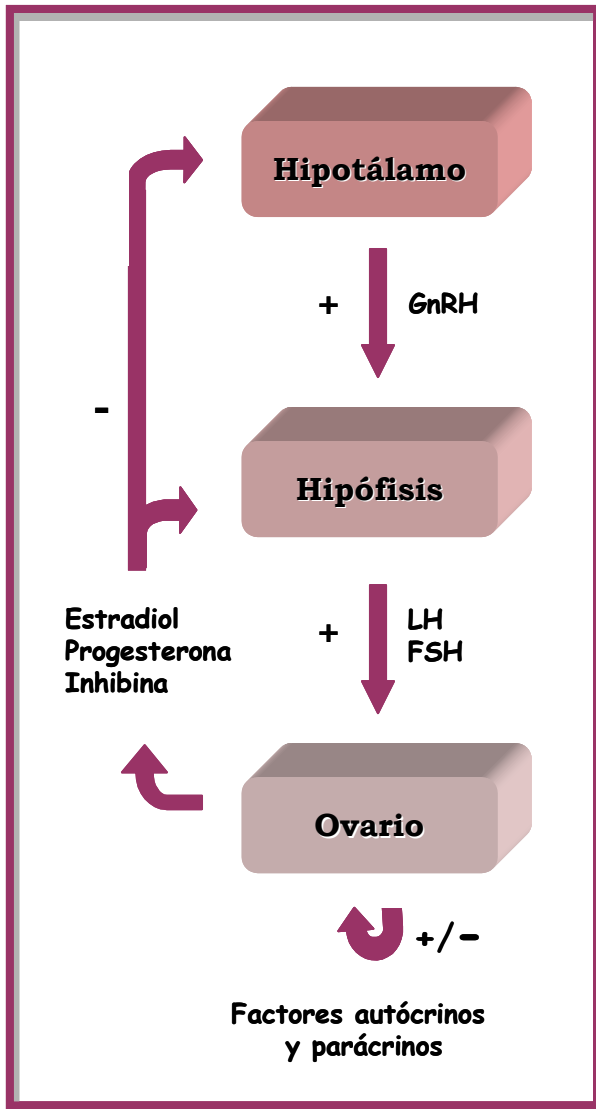


Figura 2. Esquema del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico y su regulación.

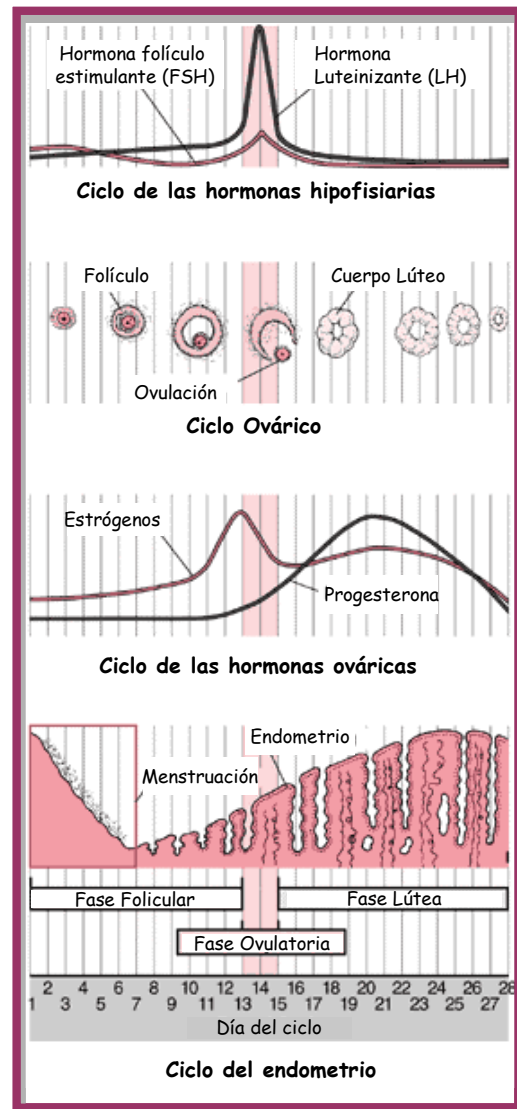


Figura 3. Cambios observados a lo largo del ciclo menstrual en los niveles hormonales, los ovarios y el endometrio.

Los estrógenos ováricos pueden ejercer tanto un control negativo como positivo sobre la secreción de FSH y LH, dependiendo de su concentración y de la duración del estímulo. Así, niveles moderados de estradiol (E_2) ejercen una inhibición de la secreción de FSH y LH, mientras que altas concentraciones de E_2 revierten el efecto, estimulando la secreción de gonadotropinas.

El ciclo menstrual es el período entre dos ovulaciones. En el humano, tiene una duración de aproximadamente 28 días (25-35 días). Por convención, el primer día de la menstruación se considera el día 1 del ciclo. Luego se continúa la fase folicular o proliferativa, y alrededor del día 14 se produce la ovulación. A ésta le sigue la fase lútea o secretoria que dura alrededor de 14 días y, de no producirse la fertilización, el endometrio se desprende en la menstruación, iniciando un nuevo ciclo. En la figura 3 se representan los cambios producidos en el ovario, en el endometrio y en los niveles hormonales a lo largo del ciclo menstrual.

1.3.1 Fase folicular

El ciclo ovárico se inicia el primer día de la menstruación. En la fase lútea tardía anterior, la atresia del cuerpo amarillo y la rápida declinación de los niveles de inhibina A, E₂ y P₄, permiten una elevación de la secreción de FSH. El incremento en los niveles de FSH permite iniciar el reclutamiento de los folículos durante los 4 –5 primeros días de la *fase folicular*, a lo que le seguirá la selección de un único folículo (entre los días quinto y séptimo) y la maduración del folículo dominante (días 8 a 12) (Goodman y Hodgen, 1983). Esta primera mitad del ciclo se caracteriza por un aumento progresivo de las concentraciones circulantes de E₂ e inhibina B producidos principalmente por el folículo de De Graff en desarrollo. Los estrógenos estimulan la proliferación del endometrio en preparación para la posible implantación de un óvulo fecundado, por lo cual esta fase es también conocida como *proliferativa*. A su vez, el E₂ y la inhibina, producidos por el folículo dominante, ejercen una retroalimentación negativa inhibiendo progresivamente la secreción de FSH, permitiendo así la selección del folículo dominante (ver sección 1.5). Sin embargo, durante la fase ovulatoria (días 13 a 15) el folículo preovulatorio secreta grandes cantidades de E₂ que ejercen una

retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisario, induciendo un pico de gonadotrofinas, principalmente LH.

1.3.2. Ovulación

La **ovulación** se produce por altos niveles de LH que estimulan la ruptura del folículo dominante. Mecánicamente, la ovulación consiste en el rápido aumento del tamaño folicular seguido de la protusión del folículo desde la corteza ovárica. Por último, la ruptura folicular da por resultado la extrusión de un complejo cúmulo-ovocito.

1.3.3. Fase Lútea

Luego de la ovulación, el folículo dominante se reorganiza para convertirse en el **cuerpo lúteo**, que constituirá la mayor fuente de hormonas esteroideas sexuales secretadas por el ovario durante la fase post-ovulatoria del ciclo (Yeh y Adashi, 2001). Las células de la teca-granulosa se luteinizan y adquieren capacidad de producir grandes cantidades de P_4 , inhibina A y, en menor grado, E_2 , los cuales inhiben la secreción de gonadotrofinas.

1.3.4. Menstruación

De no ocurrir la fecundación e implantación, seguirá la luteólisis con una declinación lineal rápida de las concentraciones circulantes de P_4 , E_2 e inhibina A. En consecuencia, las capas endometriales uterinas especializadas, privadas del apoyo esteroideo, se descaman durante la **menstruación**. Poco después, los niveles de FSH y LH empiezan a aumentar lentamente, a medida que disminuye el efecto inhibitorio de

los estrógenos sobre la adenohipófisis, y un nuevo ciclo se inicia con el reclutamiento de nuevos folículos preantrales.

1.4. Reclutamiento de folículos

El término reclutamiento se utiliza para describir dos puntos claves en el desarrollo folicular. Por un lado, los folículos primordiales se encuentran *reclutados hacia* una población de folículos en crecimiento (crecimiento inicial y crecimiento tónico) de manera continua, lo que constituye el *reclutamiento inicial*. Por otro lado, el aumento de FSH durante cada ciclo reproductivo recluta a una cohorte de folículos antrales, constituyendo el *reclutamiento cíclico*. Esta etapa comienza con el inicio de la pubertad y, si bien se sabe que el crecimiento folicular temprano es dependiente de gonadotrofinas, los estadios tardíos dependen de forma absoluta de ellas (McGee y Hsueh, 2000) (Figura 4).

1.5 Selección del folículo dominante

Cuando comienzan los ciclos reproductivos, los folículos antrales constituyen la población a partir de la cual se reclutan los folículos destinados a ovular. En la fase folicular temprana, la FSH estimula la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa, lo que produce altas concentraciones intrafoliculares de E₂. Este esteroide, en sinergismo con la FSH, incrementa el número de receptores para dicha hormona, produciéndose una retroalimentación positiva. De este modo, hacia la mitad de la fase folicular, un folículo, probablemente al azar, habrá producido más cantidad de E₂ que el resto de los folículos de la cohorte, y será por ello el *folículo dominante*. El notable

aumento de E_2 e inhibina producidos por el folículo dominante induce una caída de los niveles circulantes de FSH (Fritz y Speroff, 1982). En consecuencia, el resto de los folículos de la cohorte, que poseen menor sensibilidad a la FSH, no alcanzan a desarrollarse. El folículo seleccionado pasa a ser dominante aproximadamente una semana antes de la ovulación.

Aún cuando las causas por las cuales ocurre la selección del folículo dominante no están claras, se ha encontrado que podría deberse a la expresión aumentada de los receptores para FSH y/o LH, o al aumento de factores de crecimiento locales que favorecen la sensibilidad del folículo frente a la FSH (Baker y Spears, 1999). También se ha sugerido que el folículo dominante adoptaría un rol activo para asegurarse un medio propicio (Gougeon y Testart, 1990).

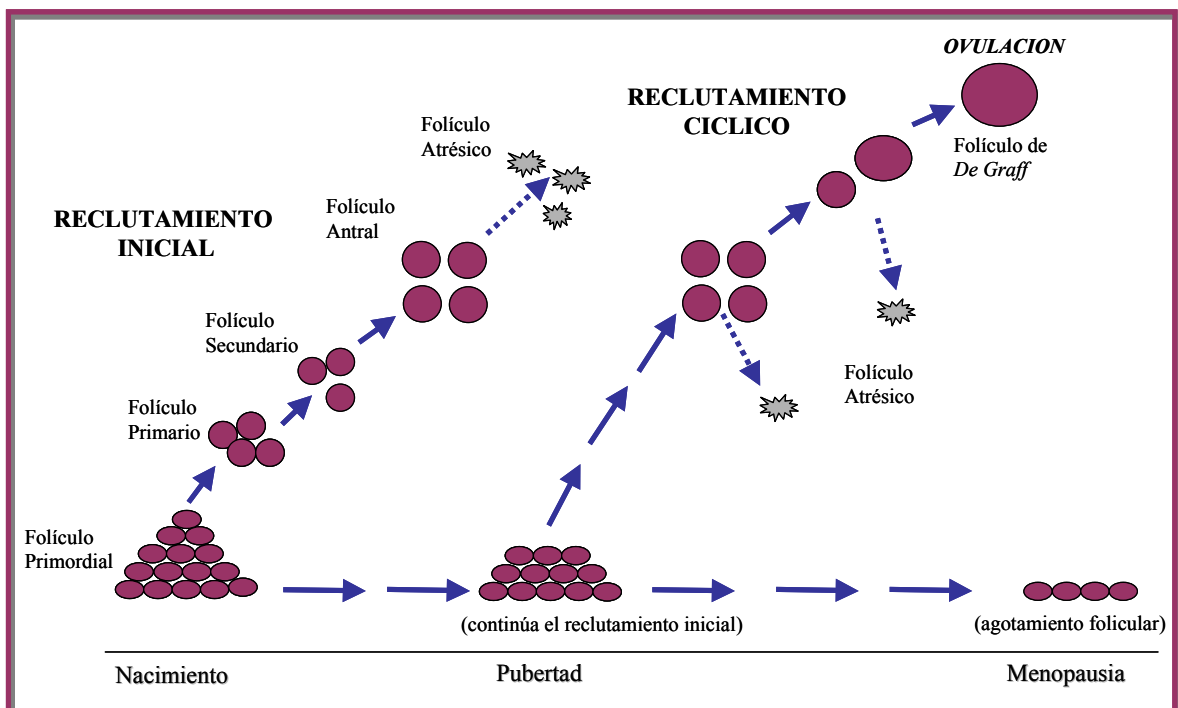


Figura 4. Esquema del reclutamiento folicular en humanos (Modificado de McGee y Hsueh, 2000)

1.6. Reservorio ovárico y atresia folicular.

En el ovario humano, se estima que al nacer se encuentran presentes 2 millones de ovocitos, mientras que alrededor de 400.000 están presentes al momento de la pubertad. Sin embargo, solamente 400 folículos serán ovulados durante la vida fértil de la mujer. Por lo tanto, el 99,9% de los folículos sufren cambios degenerativos (Franchi y col., 1962). Al proceso degenerativo por el cual los folículos son eliminados antes de llegar a la ovulación se lo denomina atresia folicular. El mecanismo involucrado sería la apoptosis (muerte celular programada) (Palumbo y Yeh, 1995). Existiría una atresia independiente de gonadotrofinas y otra dependiente. La primera es un proceso continuo, que comienza ya en la vida fetal y afecta a folículos en la etapa antral temprana, mientras que la segunda es un proceso cíclico que involucra folículos de diferentes tamaños (Yeh y Adashi, 2001).

2. MENOPAUSIA

La menopausia se define como la cesación permanente de los ciclos menstruales debido a una pérdida de la actividad folicular, y sólo se considera instalada luego de un período de alrededor de 12 meses de amenorrea. Cuando la actividad folicular cesa, la producción de progesterona y estrógenos por el ovario también cesa y, como consecuencia, aumenta la liberación de las hormonas hipofisarias, haciéndolo en primer lugar la FSH y luego de un período la LH. Según diversos estudios, la edad promedio de la menopausia natural es aproximadamente 51 años (Gold y col., 2001; McKinlay, 1996). Existen muy pocas evidencias que sugieran que esta edad promedio haya cambiado considerablemente en los últimos 100 años (Flint, 1997).

Los síntomas no deseados que se producen durante la menopausia se deben a la falta de estrógenos ováricos, la cual afecta a los tejidos que son más sensibles a este esteroide: el tracto urogenital, el sistema cardiovascular y el tejido óseo.

2.1 Reservorio Folicular y Menopausia

Tal como se mencionaba más arriba, mientras el número de folículos primordiales alcanza el máximo de 7 millones a los 5 meses de vida fetal, al nacimiento, este número se reducirá a 2 millones y en la pubertad a 400.000. Este descenso es relativamente estable desde la pubertad hasta aproximadamente los 37 años, y luego se acelera hacia la menopausia (Richardson y col., 1987). De este modo, más del 99% de los folículos del reservorio original sufrirán atresia o apoptosis. En la vida de una mujer, solo 400 folículos pasarán por las etapas de reclutamiento, selección final y ovulación.

La edad a la que una mujer experimenta su última menstruación podría considerarse como el resultado final de un complejo proceso, el cual puede sufrir variaciones. El tamaño del reservorio folicular inicial del ovario es determinado por eventos que ocurren antes del nacimiento (Baker, 1963). Por un lado, esta fuente inicial de folículos puede ser influenciada por la genética del organismo. Además, el pool folicular es luego sometido a oleadas continuas de atresia a lo largo del tiempo, que son acompañadas por influencias adversas adicionales, tales como factores autoinmunes, infecciosos, vasculares, quirúrgicos, tóxicos (ambientales o iatrogénicos, como la quimioterapia), o más aún, psicológicos (Harlow y col., 1995). Las condiciones del “huésped” determinarán en qué medida estos factores pueden afectar al reservorio folicular. Así, mujeres con reservorios foliculares de idéntico tamaño podrían transitar la menopausia a edades muy diferentes.

2.2 Menopausia Prematura

Cuando la amenorrea hipergonadotrófica persiste durante por lo menos 6 meses en una mujer menor de 40 años, la menopausia es considerada prematura. Esta condición clínica, comúnmente denominada *falla ovárica prematura* (FOP), afecta aproximadamente al 1% de las mujeres en edad fértil (Coulam y col., 1986). La aparición de amenorrea hipergonadotrófica en mujeres entre 40 y 45 años, denominada *menopausia temprana*, es generalmente considerada una condición clínica diferente. Esta última condición es mucho más común, y ocurre en aproximadamente 4-5% de la población femenina (Cooper y Sandler, 1998; Snowdon y col., 1989). Dado que ambas condiciones comparten factores de riesgo e historias familiares, y podrían representar diferentes grados de severidad de un mismo defecto subyacente, a veces son considerados como un único diagnóstico (Tibiletti y col., 1999). Sin embargo, la distribución de causas específicas -cuando éstas pueden ser determinadas- entre genéticas, inmunológicas, metabólicas, ambientales y otras, difieren ampliamente dependiendo de la edad en la cual se manifiesta. Por ejemplo, se encuentran defectos cromosómicos con mayor frecuencia en mujeres jóvenes menores de 25 años con FOP, que en mujeres que experimentan menopausia temprana entre los 40 y 45 años (McDonough y col., 1977).

1.2.1. Manifestaciones Clínicas de la FOP

La falla ovárica prematura se puede presentar tanto con amenorrea primaria como con secundaria. Las mujeres con defectos cromosómicos en general presentan amenorrea primaria. Sin embargo, si tienen algún grado de mosaiquismo, pueden tener

algo de tejido gonadal funcional que conduciría a distintos grados de desarrollo sexual y a ciclicidad menstrual transitoria. En la mayoría de los casos, la FOP se desencadena luego del establecimiento de los ciclos menstruales, constituyendo una amenorrea secundaria. No es posible definir una historia menstrual característica para estas pacientes. Aproximadamente el 50% de ellas tienen historia de oligomenorrea o sangrado uterino disfuncional desde la menarca; un 25% presenta períodos de eumenorrea alternados con períodos de oligomenorrea, y aproximadamente un 25% presenta amenorrea repentinamente, muchas veces luego de un post-parto ó de discontinuar el uso de anticonceptivos orales (Kalantaridou y col., 1998).

Los casos de amenorrea primaria no están asociados con síntomas de deficiencia de estrógenos. En el caso de amenorrea secundaria, los síntomas incluyen “hot flushes”, transpiración nocturna, fatiga, y cambios de humor. Por otro lado, las mujeres con amenorrea primaria pueden presentar un desarrollo incompleto de las características sexuales secundarias, mientras que este desarrollo suele ser normal en aquellas FOP con amenorrea secundaria. En general, las mujeres con FOP presentan fertilidad normal hasta el momento en que se desencadena el síndrome.

Las mujeres jóvenes que desarrollan FOP mantienen una deficiencia en los esteroides sexuales por un período mayor que el de mujeres con menopausia natural. Esto conduce a un riesgo de osteoporosis significativamente mayor, así como de enfermedad cardiovascular. Dos tercios de las mujeres con FOP espontáneo y cariotipo normal tienen una densidad mineral ósea (DMO) un desvío estandar por debajo de la media de las mujeres de la misma edad, aún habiendo recibido terapia de reemplazo hormonal. Esta disminución en la DMO se ha asociado a un incremento de 2,6 veces en el riesgo de fractura de cadera. Por otro lado, un estudio realizado en 19.000 mujeres

entre 25 y 100 años indicó que la FOP estaría asociada a un incremento significativo en la mortalidad, debido a enfermedad coronaria, apoplejía y cáncer, entre otras causas.

2.2.2 Clasificación de FOP

Desde el punto de vista anatomopatológico y funcional, se han descrito dos formas de FOP: afolicular y folicular (Kinch y col., 1965; Hoek y col., 1997). En la primera, propia de las disgenesias gonadales, gonadoblastomas y hermafroditismos, existe una depleción total de los folículos y, por lo tanto, una pérdida total y permanente de la función ovárica (Coulam, 1982). En la forma folicular, en cambio, se detecta la presencia de estructuras foliculares, por lo cual existiría la posibilidad de una recuperación, espontánea o inducida, de la función ovárica. Dentro de la forma folicular de FOP se distinguen: a) la ooforitis (inflamación de los folículos), b) ovarios con escasos folículos, y c) ovarios con numerosos folículos (el poco frecuente síndrome del ovario resistente, SOR) (Jones y Moraes-Ruehsen, 1969). A pesar de que esta clasificación podría sugerir una clara división entre dos formas de FOP, diversas evidencias muestran que algunas formas foliculares progresan a formas afoliculares, como en el caso de la blefarofimosis (Fraser y col., 1988) y la galactosemia (Fraser y col., 1986).

2.2.2.1 Síndrome del Ovario Resistente

El síndrome de ovario resistente (SOR) fue descrito por Jones y Moraes-Ruehsen (1969), quienes lo llamaron “Savage Syndrome”. Actualmente, es propuesto como una forma folicular de FOP, caracterizado por la presencia de

numerosos folículos primordiales morfológicamente normales en los ovarios (Hoek y col., 1997; Jones y Moraes-Ruehsen, 1969; Fox, 1992). En la histología ovárica de estas pacientes, la mayoría de los folículos no muestran evidencias de desarrollo alguno, mientras que unos pocos alcanzan el estadio pre-antral, y ocasionalmente algún folículo alcanza, pero no supera, el estadio antral. En los casos de amenorrea secundaria, se pueden observar signos de ovulaciones previas (Fox, 1992).

Dado que en este síndrome las estructuras foliculares se encuentran conservadas, una recuperación de la función ovárica, espontánea o inducida, sería teóricamente posible.

En trabajos previos del laboratorio, se demostró la presencia de inmunoglobulinas que inhiben la unión de FSH a su receptor en dos pacientes con SOR y miastenia grave, lo cual explicaría la resistencia de sus ovarios al tratamiento con gonadotrofinas (Chiauzzi y col., 1982; Escobar y col., 1982).

2.2.3. Etiología de la FOP

Se podría hipotetizar que la falla ovárica prematura puede ocurrir como consecuencia de: a) una reducción del tamaño del reservorio folicular inicial; b) un aceleramiento o aumento de la atresia folicular; c) una alteración en el reclutamiento del folículo dominante; d) una interrupción en la maduración de los folículos.

Numerosas causas han sido propuestas como potenciales candidatas para el desarrollo de la falla ovárica prematura. Sin embargo, los mecanismos celulares involucrados en la mayoría de los casos de falla ovárica aún no han sido identificados. Dentro de las posibles etiologías de la falla ovárica prematura, se han descripto:

- *Idiopática.* En la mayoría de los casos no es posible identificar una causa para el desarrollo de este síndrome.
- *Autoinmunidad.* Numerosas evidencias sugieren que la autoinmunidad sería en algunos casos el mecanismo involucrado en la etiología de la FOP. Este factor como posible causa de la FOP será tratado en más detalle en la sección 2.2.4.
- *Causas Iatrogénicas.* La falla ovárica prematura puede desarrollarse como consecuencia de la exposición a quimioterapia o radioterapia. El riesgo de desarrollo de FOP depende de la edad de la paciente, la/s droga/s utilizada/s, la dosis, la duración del tratamiento, y la posición del ovario con respecto al área irradiada en el caso de la radioterapia (Howell y Shalet, 1998).
- *Agentes Infecciosos.* La parotiditis ha sido implicada como una causa poco frecuente de falla ovárica prematura (Morrison y col., 1975). También se han descrito casos de desarrollo de FOP luego de infecciones con *Shigella*, malaria y varicela, si bien aún no se ha podido establecer una relación causa-efecto clara. (Rebar y Connolly, 1990).
- *Alteraciones genéticas y cromosómicas*
 - *Anormalidades en las gonadotropinas y en sus receptores.* En dos pacientes con amenorrea primaria se han descrito mutaciones en el gen de la subunidad β de la FSH (Matthews y col., 1993; Layman y col., 1997). Por otro lado, mutaciones en el gen del receptor de FSH también conducirían a una amenorrea hipergonadotrófica (ver sección 2.2.5.1). Finalmente, se han descrito pacientes con amenorrea y características

sexuales secundarias normales, portadoras de mutaciones en el gen del receptor de LH (Latronico y col., 1996; Toledo y col., 1996).

- *Anormalidades relacionadas con el cromosoma X*. Las anomalías del cromosoma X son una de las causas de amenorrea más preponderantes. En el 40 al 50% de las mujeres con amenorrea primaria se detectan anomalías cromosómicas (Rebar y Connolly, 1990; Sarto, 1974). Los mosaicismos del cromosoma X (45,X/46,XX; 46,XX/47,XXX) son las anomalías cromosómicas más comúnmente encontradas en mujeres con falla ovárica prematura (Sarto, 1974). Asimismo, aproximadamente el 84% de las mujeres con síndrome de Turner (ST, monosomía total o parcial del cromosoma X), presentan disgenesia gonadal (Pasquino y col., 1997). Un alto porcentaje de estas mujeres desarrollan ovarios normales durante la vida intrauterina, pero una atresia folicular acelerada las conduciría a una falla ovárica (Singh y Carr, 1966).

Por otro lado, numerosos estudios sugieren la localización de dos regiones críticas o “supergenes” en el cromosoma X: el denominado POF1, localizado en Xq21.1-q27, y el POF2 en Xq13.3-q21.1. La integridad de estas dos regiones debe mantenerse conservada para obtener un desarrollo ovárico y un mantenimiento de la función ovárica normales (Therman y col., 1990; Krauss y col., 1987; Davies y col., 1990; Tharapel y col., 1993; Powell y col., 1994). Estudios citogenéticos detallados permitieron identificar la región q21 del cromosoma X como un sitio crítico (Sala y col., 1997): el gen Diaphanous (DIA) que mapea en Xq21.3 fue propuesto como un gen candidato para la FOP (Bione y

col., 1998). Sin embargo, el posible rol de este gen en la etiología de la FOP permanece aún desconocido.

Otro gen potencial localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq 27.3) es el gen FMR que codifica para la proteína FMR1 (fragile mental retardation). Mutaciones en este gen están involucradas en el síndrome del X frágil (FRAXA). Un número cada vez más creciente de trabajos dan cuenta de la asociación entre el estado de premutación (amplificación de tripletes CGG entre 55 y 200 repeticiones) en el gen FMR y FOP. Entre un 10 y un 20% de las mujeres portadoras de la premutación desarrollan FOP (Allingham-Hawkins y col., 1996), mientras que alrededor de un 4% de las mujeres afectadas de FOP son portadoras de la premutación en el gen FMR (Uzielli y col., 1999; Gersak y col., 2003). Hasta el momento, el mecanismo por el cual las mujeres portadoras de premutaciones desarrollan FOP permanece desconocido.

- *Deficiencias enzimáticas.* La síntesis normal de estrógenos puede ser afectada por deficiencias en las enzimas esteroideogénicas colesterol-desmolasa, 17 α -hidroxilasa y 17-20 desmolasa. Estas pacientes presentan amenorrea y ausencia de desarrollo de las características sexuales secundarias, a pesar de la presencia de folículos en desarrollo (Kater y Biglieri, 1994; Zachmann, 1995).

- *Galactosemia.* Este raro desorden autosómico recesivo ocurre como consecuencia de una deficiencia en la enzima galactosa-1-fosfato uridil transferasa (GALT). Produce retardo mental, cataratas daño

hepatocelular y renal. La mayoría de estas pacientes desarrollan falla ovárica prematura (Guerrero y col., 2000).

- *Otras alteraciones genéticas.* A lo largo de los últimos años se han identificado nuevos cromosomas, *loci* y genes como potenciales candidatos para la falla ovárica prematura. Entre los genes propuestos que cosegregan con la falla ovárica se encuentran, además de los mencionados anteriormente, aquellos localizados en el cromosoma 21 (el gen AIRE, autoimmune Regulator), el gen ATM (Ataxia Telangiectasia) en el cromosoma 11, y el FOXL 2 ligado a BPES (blepharophimosis-ptosis syndrome) en el cromosoma 3 (Christin-Maitre y col., 1998).

En nuestro laboratorio abordamos el estudio de dos posibles factores etiológicos de la FOP: autoinmunidad y alteraciones genético-moleculares, tomando como punto de partida dos posibles autoantígenos y dos genes candidatos, respectivamente.

2.2.4. Aspectos inmunológicos de la FOP

Diversas observaciones avalan la hipótesis de que un mecanismo autoinmune sería la causa de la falla ovárica prematura: (a) la frecuente asociación de un fenómeno autoinmune con la FOP en un alto porcentaje de estas pacientes; (b) la presencia de anticuerpos circulantes dirigidos hacia antígenos del ovario, en suero de mujeres con este síndrome; (c) la presencia de infiltrado linfocitario en tejido ovárico de algunas de estas pacientes (Coulam y col., 1981; Coulam, 1983; Fenichel y col., 1997).

De hecho, la falla ovárica prematura se presenta, en muchos casos, asociada a diversas enfermedades autoinmunes órgano-específicas, así como también a algunos desórdenes autoinmunes sistémicos. La más conocida, si bien no la más frecuente, es la asociación con autoinmunidad adrenal. En ocasiones, la FOP precede 8 a 14 años el inicio de la enfermedad de Addison (Turkington y Lebovitz, 1967). Esta es una endocrinopatía poco frecuente con una clara predisposición por el sexo femenino (2,5:1). En la mayoría de los pacientes de países desarrollados, la enfermedad de Addison es de etiología autoinmune, y con frecuencia se asocia con una falla endócrina múltiple (Hoek y col., 1997). Clásicamente se han distinguido dos formas, SPA I (síndrome poliglandular autoinmune tipo I: hipoparatiroidismo, enfermedad de Addison y candidiasis mucocutánea) con inicio en la juventud, en la cual más del 60% de las mujeres presentan FOP, y SPA II (síndrome poliglandular autoinmune tipo II: hipotiroidismo y Addison) de inicio alrededor de los 40 años, en la cual menos del 10% desarrollan FOP. El SPA I, también llamado APECED, es una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente causada por mutaciones en el gen AIRE (Nagamine y col., 1997; Ruan y She, 2004).

La tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, miastenia grave, artritis reumatoidea, anemia perniciosa, vitiligo, enfermedad de Chron, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico y trombocitopenia idiopática son, entre otras, algunas de las enfermedades autoinmunes que también se encuentran asociadas a FOP (de Moraes y col., 1972; Rebar y col., 1982; Coulam, 1983; LaBarbera y col., 1988; Betterle y col., 1993; Dal Pra y col., 2003).

La prevalencia de enfermedades autoinmunes asociadas en pacientes FOP fue ampliamente estudiada: 10-20% en algunos estudios (Coulam, 1983; Conway y col., 1996), cerca del 40% en otros (Alper y Garner, 1985; Betterle y col., 1993) y hasta un

55% (de Moraes y col., 1972). Entre todas las enfermedades autoinmunes asociadas a FOP, los desórdenes tiroideos son definitivamente los más preponderantes, y pueden ser detectados en un 12-33% de los pacientes (de Moraes y col., 1972; Alper y Garner 1985; Betterle y col., 1993). Le siguen el SPA I y el SPAII (Kim y col., 1995).

Dada la particular asociación con la enfermedad de Addison, y las otras asociaciones descritas previamente, tres situaciones diferentes pueden ser identificadas: FOP asociada con autoinmunidad adrenal, FOP asociada con autoinmunidad no-adrenal, y FOP idiopática aislada. Evidentemente, en la última situación la ausencia de enfermedades autoinmunes asociadas, no excluye la posibilidad de una etiología autoinmune, como será discutido posteriormente.

La histología ovárica de las pacientes FOP con SPA asociado, en general muestra signos característicos de ooforitis autoinmune, cuyo patrón de infiltración linfocitaria de los folículos indicaría que las células productoras de esteroides serían el blanco del ataque autoinmune. En contraste, sólo en unos pocos pacientes FOP sin autoinmunidad adrenal asociada, se observa la presencia de infiltrado linfocitario (Hoek y col., 1997; Forges y col., 2004) Sin embargo, un mecanismo autoinmune no podría ser descartado en estos casos. Si bien el agotamiento folicular podría ser consecuencia de etiologías no autoinmunes, también podría representar el estadio final de un proceso autoinmune luego de que la inflamación ha cesado.

Por otro lado, se han descrito alteraciones en la inmunidad celular en pacientes con FOP, en las que se observa un aumento en el número total y en el porcentaje de linfocitos T en sangre periférica. Incrementos similares en el número de linfocitos T activados han sido descritos en otras patologías de origen autoinmune, como en la

enfermedad de Graves, en la diabetes mellitus insulino resistente y en la enfermedad de Addison. Sin embargo, en mujeres con menopausia natural también se observa un aumento de estas células. Los estrógenos podrían modular la cantidad de células T activadas, por lo que podría sugerirse que el estado hipoestrogénico observado en las pacientes FOP y en las mujeres post-menopáusicas sería responsable de la activación de las células T. Al igual que en otras endocrinopatías autoinmunes, también se ha sugerido un aumento en el número de linfocitos B en sangre periférica de pacientes FOP. Considerando que el reemplazo de estrógenos en pacientes FOP no contrarresta el aumento de células B periféricas, este incremento podría interpretarse como una señal de activación del sistema de inmunidad humoral, crucial para la formación de anticuerpos. Por otro lado, se ha descrito una disminución en el número y la actividad de los linfocitos “natural killer” y de los monocitos en estas pacientes (Hoek y col., 1997; Hoek y col., 1995; Hoek y col., 1993).

2.2.4.1. Anticuerpos anti-ovario

La detección de anticuerpos circulantes dirigidos hacia antígenos del ovario, constituye uno de los principales elementos en la identificación de la etiología autoinmune de la FOP. Los primeros trabajos sobre estos anticuerpos incluían mayoritariamente pacientes FOP con autoinmunidad adrenal asociada. Estas mujeres presentaban anticuerpos que reconocen diferentes tipos de células productoras de esteroides de la corteza adrenal, testículo, ovario y placenta, los cuales fueron denominados “steroid cell antibodies” (SCA) (Irvine y col., 1968). Prácticamente todas las pacientes con Addison y amenorrea primaria, y aproximadamente un 60 % de las mujeres con Addison y amenorrea secundaria, presentan títulos detectables de estos

anticuerpos. En ausencia de FOP clínico, estos anticuerpos se han descrito en un 15% a 20% de pacientes addisonianas. Además, se ha observado que, en el seguimiento de estas pacientes, más de un 40% desarrollará FOP en los siguientes 10 a 15 años (Hoek y col., 1997).

Numerosos trabajos describen una importante correlación entre SCA y anticuerpos anti- p450-scc y/o anti- 17- α -hidroxilasa (17- α -OH), lo que sugiere que estas enzimas esteroidogénicas serían los blancos moleculares de los SCA (Uibo y col., 1994; Winqvist y col., 1995; Chen y col., 1996; Hoek y col., 1997; Falorni y col., 2002). La enzima esteroidogénica 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa fue también sugerida como probable blanco autoinmune de los SCA, si bien existen resultados contradictorios en cuanto a su especificidad y su prevalencia (Arif y col., 1996; Peterson y col., 1997; Arif y col., 2001; Reimand y col., 2000). Sin embargo, la prevalencia de anticuerpos SCA en pacientes con FOP asociado a otras patologías autoinmunes diferentes al Addison (Betterle y col., 1993; Falorni y col., 2002; Dal Pra y col., 2003), así como en pacientes con FOP aislado (de Moraes y col., 1972; Betterle y col., 1993; Falorni y col., 2002; Dal Pra y col., 2003) se reduce notablemente a valores indetectables en pacientes sin indicadores de autoinmunidad adrenal (Dal Pra y col., 2003). En consecuencia, si bien las enzimas esteroidogénicas representarían blancos autoinmunes del ovario, su significación fisiopatológica parecería estar restringida a aquellas pacientes con falla ovárica prematura asociada a autoinmunidad adrenal. La identidad de el/los antígeno/s ovárico/s permanecería desconocida en los casos de FOP de etiología autoinmune sin compromiso adrenal.

En las tres últimas décadas se realizaron numerosos trabajos en esta área, en los cuales se detectaron anticuerpos dirigidos hacia diversos antígenos del ovario (Forges y

col., 2004; Hoek y col., 1997). Sin embargo, a pesar de este esfuerzo científico, la detección de anticuerpos antiovario aún produce resultados conflictivos, y hasta el presente, no se ha logrado establecer unánimemente su especificidad y su utilidad diagnóstica.

En estudios previos de nuestro laboratorio (Bussmann y col., 1998), mediante la técnica de Western-blot utilizando como antígenos proteínas de la fracción soluble de homogenatos de ovarios humanos (Figura 5), se detectó la presencia de anticuerpos dirigidos hacia un antígeno específico de peso molecular aproximado de 50 kDa, en el 19,1% de un grupo de 110 pacientes FOP. Por su parte, ninguno de los 60 individuos controles estudiados –mujeres con ciclos regulares y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes- presentaron anticuerpos contra esta proteína.

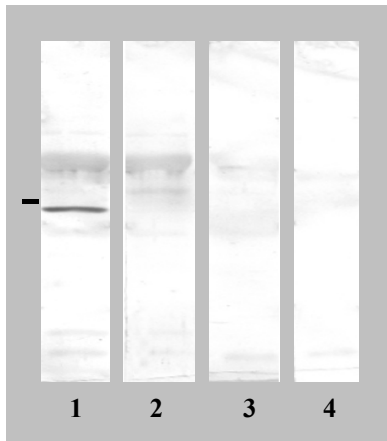


Figura 5. *Western-Blot para la determinación de anticuerpos anti-vario (AOA).* Homogenatos de ovarios humanos se centrifugaron a 105.000 x g durante 60 minutos. Las proteínas del sobrenadante se separaron en geles de poliacrilamida 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, cada membrana se cortó en 16 tiritas y cada una de ellas se incubó con diluciones 1:100 de diferentes sueros como primer anticuerpo. Como segundo anticuerpo se utilizó una dilución 1:1000 de anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. Finalmente, se reveló con DAB y se cuantificó la intensidad utilizando un LKB Ultrosan XL. En cada

experimento, se utilizaron seis sueros provenientes de mujeres controles en paralelo con cada suero de una paciente FOP. Aquellas muestras que evidenciaron una absorbancia mayor que la media más 3 DS de los sueros controles, fueron considerados positivos. En la figura se muestran, como ejemplos representativos, tiritas reveladas con sueros provenientes de: una paciente FOP que posee AOA (calle 1), una paciente FOP que no posee AOA (calle 2), y un individuo control (calle 3). Se realizó una incubación en ausencia de suero, pero con segundo anticuerpo (calle 4). La marca sobre el margen izquierdo corresponde al marcador de peso molecular de 50 kDa.

Con el objeto de completar estos estudios, resulta necesario identificar al antígeno ovárico de aproximadamente 50 kDa hacia el cual están dirigidos estos anticuerpos anti-ovario (AOA) en estas pacientes FOP.

2.2.4.2. Anticuerpos anti-RFSH

Otros antígenos ováricos han sido propuestos como los blancos moleculares de los anticuerpos anti-ovario. Entre ellos se destacan los receptores de gonadotrofinas, las propias gonadotrofinas, el cuerpo lúteo, la zona pelúcida, y proteínas del ovocito (Hoek y col., 1997; Forges y col., 2004).

Se ha demostrado que la presencia de anticuerpos dirigidos hacia receptores celulares estaría implicada en la patogénesis de diversos desórdenes autoinmunes, como miastenia grave, enfermedad de Graves y diabetes mellitus insulino resistente (Patrick y Lindstrom, 1973; Manley y col., 1974; Flier y col., 1975).

En estudios previos del laboratorio se demostró la presencia de inmunoglobulinas circulantes que inhiben la unión de la hormona FSH a su receptor (Ig-R-FSH), en dos pacientes con SOR y miastenia grave (Chiauzzi y col., 1982; Escobar y col., 1982). Como se explicó anteriormente, el SOR es una forma folicular de FOP –de muy baja frecuencia- caracterizada por la presencia de numerosos folículos primordiales morfológicamente normales en los ovarios (Hoek y col., 1997; Jones y Moraes-Ruehsen, 1969; Fox 1992). Dado que la presencia de estos anticuerpos explicaría en estas pacientes la resistencia del ovario al estímulo con gonadotrofinas, se realizó un

estudio detallado con el fin de caracterizar el comportamiento de estas inmunoglobulinas.

En las dos pacientes SOR se estudió la variación del título de inmunoglobulinas a lo largo del curso de la enfermedad. Se determinaron los niveles de Ig-R-FSH en muestras seriadas de sueros de las 2 pacientes, tomadas una vez por mes durante dos años. Se observó que, si bien las muestras de sueros mantuvieron en todo momento su actividad inhibitoria, el título de Ig-R-FSH oscilaba en el tiempo, mostrando un curso fluctuante (Figura 6).

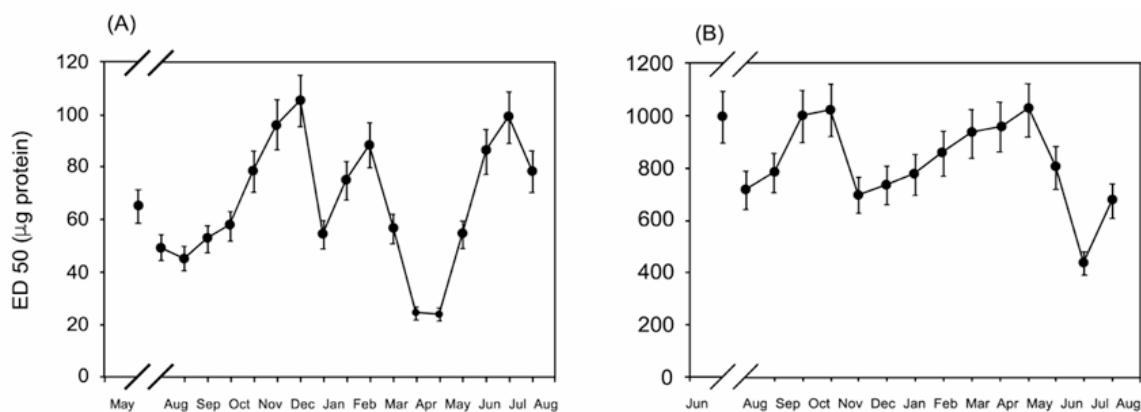


Figura 6. Perfil mensual de los niveles de IgG correspondientes a las pacientes SOR 1 (A) y SOR 2 (B). Los valores fueron determinados en las muestras de sangre tomadas mensualmente. Los datos se expresan como la media del ED50 \pm ES (error estándar).

Por otro lado, al estudiar la cinética de inhibición de las inmunoglobulinas de estas dos pacientes, se observaron dos tipos de actividad inhibitoria. Se realizaron “Scatchard plots” a partir de los datos obtenidos en los experimentos “binding”, realizados con las fracciones de IgG purificadas a partir de los sueros de las 2 pacientes.

Los resultados sugirieron la existencia de dos tipos de actividad inhibitoria: una, de naturaleza *irreversible*, con una K_i aparente mil veces mayor que la constante de afinidad de la FSH por su receptor, y otra con un mecanismo de inhibición *reversible* con una K_i aparente similar a la constante de afinidad de la FSH por su receptor.

De acuerdo con estos antecedentes, planteamos como hipótesis que la presencia de Ig-R-FSH circulantes estaría asociada al desarrollo del SOR. Por lo tanto, en esta parte del trabajo realizamos un estudio retrospectivo sobre el análisis de 247 pacientes FOP -que fueron derivadas a nuestro laboratorio entre 1982 y 2002 para la determinación de Ig-R- FSH- con el objetivo de confirmar dicha asociación, y en ese caso, evaluar su valor como herramienta para el diagnóstico del SOR.

2.2.5. Aspectos moleculares de la FOP

Si bien la mayor parte de los casos de FOP son esporádicos, con la realización de cuidadosos análisis de historias familiares se ha observado la presencia de varios casos en una misma familia. Así, se ha descrito que la prevalencia de FOP familiar asciende hasta casi un 30% (Tibiletti y col., 1999; Vegetti y col., 2000; Vegetti y col., 1998; van Kasteren y col., 1999; Davis y col., 2000). La hipótesis de que un factor genético podría determinar la ocurrencia de FOP, fue sugerida en la literatura por diversos autores (Coulam y col., 1983; Mattison y col., 1984; Snieder y col., 1998). Vegetti y col. (Vegetti y col., 1998), observaron que en un tercio de las pacientes con FOP idiopática estudiadas, esta condición era una entidad heredable. Los autores proponen que la herencia es del tipo autosómica dominante con penetrancia incompleta.

En un trabajo posterior los mismos autores confirman sus observaciones estudiando un número mayor de pacientes (Vegetti y col., 2000).

En los últimos años se han propuesto diferentes cromosomas, *loci* y genes como involucrados en la etiología de la falla ovárica prematura con cariotipo normal. Entre los genes propuestos se encuentran el gen de la subunidad β de la FSH (Matthews y col., 1993; Layman y col., 1997), el gen del receptor de LH (Latronico y col., 1996; Toledo y col., 1996), el gen AIRE (Autoimmune Regulator) (Christin-Maitre y col., 1998) (Laml y col., 2002), el gen ATM (Ataxia Telangiectasia) (Christin-Maitre y col., 1998), y el FOXL 2 ligado a BPES (Christin-Maitre y col., 1998), entre otros. Un hallazgo importante en esta área ha sido la demostración –a través de estudios de ligamiento genético- de que el cromosoma 2p estaría involucrado en algunos casos de falla ovárica (Aittomaki, 1994). Más precisamente, el gen del receptor de FSH, que mapea en esta región, ha sido identificado como responsable de esta patología en un trabajo realizado en familias de Finlandia (Aittomaki y col., 1995).

Con la utilización de modelos animales de falla ovárica, surgieron nuevos genes candidatos para el desarrollo de FOP. Entre estos modelos, se ha descrito que ratones Cx37^{-/-} (nulos para conexina 37) poseen alteraciones en la maduración folicular con ausencia de ovulación (Simon y col., 1997). Si bien se ha hallado Cx37 en las uniones del tipo “gap-junction” que existen entre las células de granulosa y el ovocito, no se conoce aún el rol de ésta ni de otras conexinas en desarrollo de la falla ovárica humana. Por otro lado, la proteína GDF-9 se expresa específicamente en el ovario del ratón adulto, exclusivamente en el ovocito (McGrath y col., 1995). Se ha observado que

ratones GDF-9 $-/-$ presentan un bloqueo en la maduración folicular que previene el desarrollo del folículo más allá del estadio de folículo primario (Dong y col., 1996). Sin embargo, en un trabajo realizado en 15 pacientes FOP y 38 SOP (síndrome de ovario poliquístico) de Japón, no se hallaron mutaciones en los genes GDF-9 y GDF-9B/BMP-15 (Takebayashi y col., 2000). Por otro lado, se ha observado que ratones R-FSH $-/-$ (nulos para el R-FSH) presentan infertilidad por ausencia de ciclos ovulatorios, deprivación de estrógenos y alteraciones estructurales en útero y vagina. En ausencia de activación de las vías de transducción de señales mediadas por el R-FSH, los folículos ováricos no progresan más allá del estadio de folículo secundario. Asimismo, en los ratones heterocigotas (R-FSH $+/-$) se observa una importante reducción en la fertilidad, acompañada de un acortamiento de la vida reproductiva, lo que podría sugerir la existencia de un agotamiento prematuro de los folículos ováricos (Danilovich y col., 2000).

2.2.5.1. Gen del receptor de FSH

La función ovárica y su diferenciación son controladas por la acción de las hormonas hipofisarias FSH y LH. La FSH es necesaria para el desarrollo normal del ovario y la maduración folicular. Se une a sus receptores específicos en la membrana plasmática de las células de granulosa ováricas, estimulando el crecimiento de estas células y activando la producción de estrógenos, iniciando así el ciclo menstrual (Tapanainen y col., 1998).

El gen del receptor de la hormona FSH (R-FSH) ha sido considerado uno de los genes candidatos involucrados en el desarrollo de la falla ovárica más prometedores, ya

que alteraciones en el R-FSH podrían disminuir la habilidad de este receptor de unirse a su ligando -la hormona FSH- ó podrían afectar su capacidad de activar las vías de transducción de señales, transformándose así en una posible causa de la disfunción ovárica.

El gen del R-FSH es un gen de copia única que ocupa una región de 54 kpb. Está constituido por 10 exones y 9 intrones (Figura 7 A). El dominio extracelular está codificado por 9 exones que se extienden desde la base 69 a la 251. El extremo C-terminal del dominio extracelular y los dominios transmembrana e intracelular son codificados por el exón 10 que posee más de 1234 pb (Gromoll y col., 1996a). Este gen codifica una proteína de 695 aminoácidos (aa), incluyendo un péptido señal de 17 aa cuyo clivaje da lugar a un péptido maduro de 678 aa. El dominio extracelular del receptor está compuesto por 349 aa, seguidos por 264 aa del dominio transmembrana, mientras que el dominio intracelular es relativamente corto y está constituido por 65 aa. En la figura 7 B se muestra un esquema de la estructura protéica del R-FSH.

La expresión del R-FSH es tejido específica, encontrándose exclusivamente en las células de la granulosa, y depende de los diferentes estímulos hormonales (Camp y col., 1991; Tilly y col., 1992; Zheng y col., 1996). El R-FSH pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G, caracterizados por 7 dominios hidrofóbicos transmembrana (Gudermann y col., 1995). El dominio intracelular del R-FSH se encuentra acoplado a una proteína Gs y, luego de la activación por la interacción de la hormona FSH con el dominio extracelular, se inicia una cascada de eventos que conduce finalmente a los efectos biológicos específicos de las gonadotropinas.

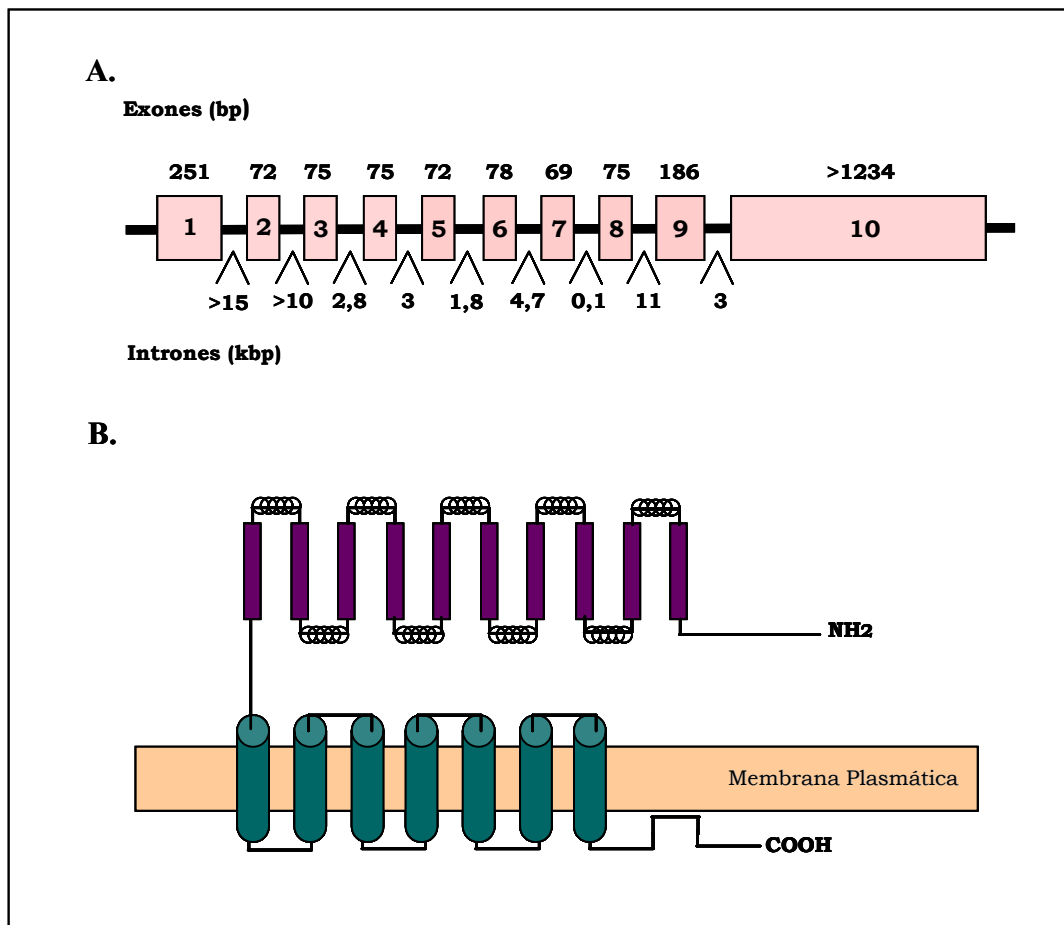


Figura 7. Receptor de FSH. A) Organización estructural del gen del R-FSH. Los rectángulos 1 al 10 indican los exones. El número de pares de bases está indicado encima de cada exón, mientras que la longitud de los intrones está indicada por debajo. B) Esquema de la estructura proteica del R-FSH. El dominio extracelular está formado por láminas beta (indicadas por los rectángulos verticales) alternadas con alfa hélices (indicadas con α). El dominio transmembrana consiste en siete segmentos hidrofóbicos (cilindros) que atraviesan la membrana plasmática, conectados por "loops" intra y extra celulares.

Numerosas mutaciones se han descrito en el gen del R-FSH. La primera mutación, la C566T en el exón 7, fue descrita por Aittomäki y col. (1995) en mujeres pertenecientes a 6 familias de Finlandia con disgenesia ovárica hipergonadotrófica. Hasta el presente, se han encontrado otras 8 mutaciones inactivantes en este gen: Asn191Ile (en heterocigosis en una mujer sana) (Gromoll y col., 1996c), Ile160Thr y Arg573Cys (en una paciente con amenorrea secundaria) (Beau y col., 1998), Asp224Val y Leu601Val (en una paciente con falla ovárica primaria hipergonadotrófica) (Touraine y col., 1999), Ala419Thr (en una mujer finlandesa con amenorrea primaria que poseía

además la mutación C566T) (Doherty y col., 2002), Pro348Arg (en una paciente con amenorrea primaria) (Allen y col., 2003), y Pro519Thr (en una paciente con retraso en la pubertad y amenorrea primaria) (Meduri y col., 2003).

Por otro lado, una mutación activante de este receptor fue identificada en un hombre hipofisectomizado (Gromoll y col., 1996b). Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado mutaciones activantes en mujeres (Gromoll y col., 1996c; Batista y col., 2000). Por otra parte, se describió la presencia de una sustitución, C1022T, que cambia Val en el codón 341 por Ala, en un hombre infértil (Simoni y col., 1999). Finalmente, el gen del R-FSH posee sitios polimórficos que fueron inicialmente descritos por Whitney y col. (1995), y posteriormente identificados como A919G y A2039G, ambos en el exón 10 (Aittomaki y col., 1995; Simoni y col., 1997). Hasta el presente no hay datos disponibles sobre la frecuencia y distribución de estas variantes alélicas en la población general.

Considerando la importancia de la FSH en el desarrollo normal del ovario y la maduración folicular, se podría hipotetizar que alteraciones en la secuencia codificante del gen del R-FSH podrían explicar el desarrollo de la falla ovárica prematura en pacientes argentinas.

2.2.5.2. Gen de la subunidad α de las inhibinas

La glicoproteína inhibina es también un “candidato potencial” para el desarrollo de FOP, debido a su rol en la regulación negativa de la secreción de la FSH hipofisiaria. Las inhibinas, sintetizadas principalmente en las gónadas (Burger, 1992),

son heterodímeros de 32 kDa formados por una subunidad α común (18 kDa), y una subunidad β (14kDa) (A ó B) que confiere especificidad de acción, unidas por puentes disulfuro. De este modo, existen dos formas de inhibina: la inhibina A (α - β A) y la inhibina B (α - β B). Los dímeros formados por dos subunidades β son las activinas (Ying, 1988). Tanto las inhibinas como las activinas son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante tipo β (TGF β). Si bien ambas inhibinas parecen tener propiedades biológicas similares, su síntesis es regulada en forma diferencial durante la fases folicular y lútea del ciclo menstrual. La inhibina A es principalmente secretada por los folículos maduros y el cuerpo lúteo, teniendo su pico máximo en la fase lútea del ciclo menstrual, mientras que la inhibina B es producida por los folículos preovulatorios pequeños durante la fase folicular (Roberts y col., 1993; Groome y col., 1994; Groome y col., 1995; Groome y col., 1996; Sehested y col., 2000) (Figura 8).

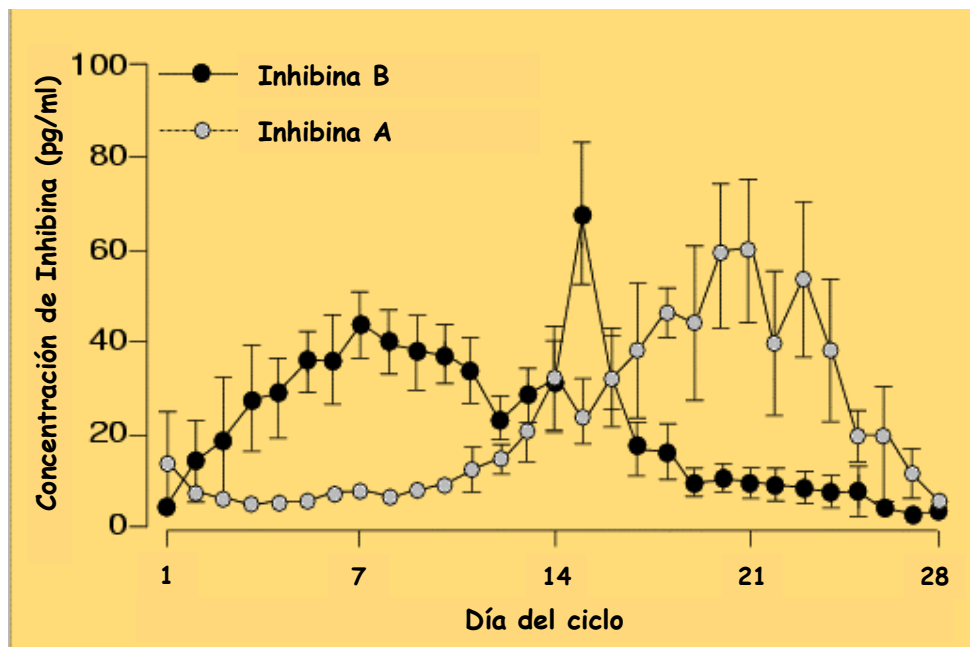


Figura 8. Variación de los niveles de Inhibina A e Inhibina B a lo largo del ciclo menstrual.

Se ha observado que la forma monomérica Pro- α C, precursora de la subunidad α , se encuentra en circulación en una concentración mayor que la de las formas dimericas inhibina A e inhibina B (Groome y col., 1995; Bergada y col., 1999). Sin embargo, aún no se ha podido establecer si este péptido posee un rol fisiológico, ya que no se le conoce acción biológica relacionada con la regulación de la síntesis de FSH hipofisiaria. Por su parte, las formas dimericas inhibina A e inhibina B actúan como factores endócrinos (de Jong, 1988; de Kretser y McFarlane, 1996; Burger y Robertson, 1997) así como también como factores parácrinos intraováricos (Ying, 1988; Mather y col., 1992; Weiss y col., 1993). Como factores endócrinos, ambas inhibinas contribuirían a la regulación de los niveles de FSH durante el ciclo menstrual normal, suprimiendo su biosíntesis y secreción por la hipófisis (Weiss y col., 1993). De forma antagónica, las activinas serían capaces de estimular la secreción de FSH hipofisiaria (Ying, 1988)

En numerosos trabajos se propone que la disminución de los niveles de inhibina A e inhibina B y el aumento del nivel de activina A observados durante la perimenopausia, serían responsables de los altos niveles de FSH característicos de esta etapa reproductiva (Danforth y col., 1998; Santoro y col., 1999; Klein y col., 1996; Reame y col., 1998). Asimismo, se ha sugerido que la reducción en la relación inhibina:activina observada durante este período podría deberse a un déficit en la producción de la subunidad α , el cual permitiría la formación preferencial de los homodímeros de activina (Santoro y col., 1999). De este modo, el desarrollo de FOP podría ser consecuencia de alteraciones en el gen de la subunidad α (INH α), las cuales conducirían a una disminución en la cantidad de inhibina bioactiva. El aumento en la

concentración de FSH resultante, provocaría un agotamiento prematuro de los folículos ováricos (Marozzi y col., 2002; Shelling y col., 2000).

El gen $INH\alpha$ mapea en 2q33-qter, y está constituido por dos exones. Hasta el presente, se han identificado dos polimorfismos en este gen: C129T en la región 5' no codificante (5' UTR), y C675T en el exón 2, este último en completo desequilibrio de ligamiento con el primero (Montgomery y col., 2000). Marozzi y col. (2002), estudiando el polimorfismo C129T de 5'UTR, encontraron una disminución significativa en la frecuencia del alelo T en el grupo de pacientes FOP con respecto al grupo control. Por otro lado, Shelling y col. (2000) identificaron la mutación G769A (G913A de acuerdo a la numeración considerada para el polimorfismo C129T de 5'UTR) en el exón 2 de este gen, en 3 de 43 pacientes FOP, en heterocigosis. Posteriormente, esta sustitución fue descrita por Marozzi y col. (2002) en 7 de 157 mujeres italianas con FOP, también en heterocigosis, sugiriendo la existencia de una asociación entre la variante G769A y el desarrollo de esta patología.

Si bien estos antecedentes podrían estar indicando que mutaciones en el gen $INH\alpha$ estarían asociadas a FOP, es necesaria la realización de estudios en diferentes poblaciones que permitan validar estos resultados preliminares. Por lo tanto, proponemos que la presencia de mutaciones y/o sitios polimórficos en el gen $INH\alpha$ podría estar asociada al desarrollo de la FOP en pacientes argentinas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA

1.1. Anticuerpos anti-ovario (AOA)

Identificar al antígeno ovárico de aproximadamente 50 kDa hacia el cual están dirigidos los anticuerpos anti-ovario en un subgrupo de pacientes FOP.

1.2. Anticuerpos anti-receptor de FSH.

Determinar la presencia de Ig-R-FSH circulantes en pacientes FOP, y evaluar la existencia de una asociación entre la presencia de estos anticuerpos y el desarrollo del SOR.

2. ASPECTOS MOLECULARES DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA

2.1. Gen del receptor de FSH

Determinar la presencia de mutaciones y/o sitios polimórficos en el gen del R-FSH en pacientes argentinas con falla ovárica prematura.

2.2. Gen de la subunidad α de las inhibinas

- a) Determinar si la mutación G769A estaría involucrada en la etiopatología de FOP idiopático en pacientes argentinas.

- b) Determinar si existe una asociación entre el polimorfismo C129T y la ocurrencia de FOP idiopático.

- c) Determinar si existe asociación entre el polimorfismo C129T y los niveles circulantes de inhibina.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS



MUESTRA

Los criterios diagnósticos de FOP fueron:

- presencia de amenorrea antes de los 40 años, con una duración mayor a 6 meses;
- niveles serológicos de FSH > 40 mIU/ml (valores normales de fase folicular: 2-9 mIU/ml) en dos determinaciones sucesivas. Además, todas las pacientes presentaban niveles de 17β -estradiol menores a 15 pg/ml (valores normales de fase folicular: 20-120 pg/ml).

Para el diagnóstico de SOR, a los anteriores criterios diagnósticos se sumaron:

- resistencia del ovario a la estimulación exógena con gonadotrofinas;
- presencia de numerosos folículos primordiales al examen histológico/ultrasonográfico del ovario (Jones y Moraes-Ruehsen, 1969; Van Weissenbruch y col., 1991; Mehta y col., 1992).

Todas las pacientes FOP fueron derivadas al laboratorio desde diferentes hospitales. Para los estudios inmunológicos, también se incluyeron pacientes FOP cuyos sueros fueron derivados de laboratorios de análisis clínicos. En todos los casos, el diagnóstico de FOP fue realizado por el médico competente.

Sólo se incluyeron pacientes FOP con cariotipo normal 46,XX.

Además, se estudiaron mujeres controles con historia menstrual normal, cuya participación fue voluntaria. El número de individuos y los criterios de inclusión

específicos de los distintos subgrupos de controles estudiados en las diferentes etapas, se detallan en cada sección.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET. Se obtuvieron los consentimientos informados de todos los pacientes y controles.

1. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA

1.1. Anticuerpos anti-ovario (AOA)

- Preparación del extracto proteico

Se obtuvieron ovarios humanos de operaciones terapéuticas o post-mortem, los cuales fueron rápidamente congelados. El tejido congelado fue pulverizado en nitrógeno líquido y homogeneizado en buffer Tris 50 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM, pH 7,4 en presencia de los inhibidores de proteasas PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) 0,5 mM, ZPCK (N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona) 0,025 mM, TLCK (N'-p-tosil-lisina clorometil cetona) 0,025 mM y TPCK (L-1-tosilamida-2-fenil-etilclorometil cetona) 0,025 mM. El homogenato fue centrifugado a 1.000g durante 10 min. y el sobrenadante resultante fue centrifugado a 7.000g durante 10 min. Se separó el precipitado (fracción mitocondrial) y el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 105.000 g durante 60 min. El nuevo precipitado y el sobrenadante fueron separados y rotulados "fracción microsomal" y "fracción soluble", respectivamente. Todas las centrifugaciones se realizaron en centrífuga refrigerada (4°C). Se utilizó una columna

de proteína-A sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) para eliminar las IgG endógenas de la fracción soluble.

- Aislamiento del antígeno ovárico a partir del extracto proteico

Quinientos microlitros de la fracción soluble del homogenato de ovarios se trataron con PMSF 1 mM, leupeptina 10 mg/ml, pepstatina 5 mg/ml, aprotinina 5 mg/ml, ortovanadato de sodio 1mM, fluoruro de sodio 5mM, molibdato de sodio 20 mM, espermina 0,15 mM, espermidina 0,50 mM y β -glicerofosfato 10 mM, y se sembraron en una columna de agarosa con CM (carboxi-metil) y Cibacrom-blue F3GA (CM Affi-Gel Blue gel, Bio-Rad, USA) de 1 ml de volumen de matriz. Luego de sembrar la muestra, la columna se lavó con 2 volúmenes de buffer de corrida (K_2HPO_4 10 mM; NaCl 0,15M; NaN_3 0,02%; pH 7,25). Las proteínas fueron eluidas con soluciones de molaridad creciente de NaCl en buffer de corrida, de la siguiente forma: 2 volúmenes de NaCl 0,3M; 2 volúmenes de NaCl 0,6M; 2 volúmenes de NaCl 1M y 3 volúmenes de NaCl 1,4M. Se consideró un volumen muerto de la columna de aproximadamente 0,5 ml. De este modo, se recolectaron 12 fracciones de aproximadamente 1 ml cada una, incluyendo el percolado. La cuantificación del contenido proteico de cada fracción se realizó mediante el método de Lowry (1951).

El seguimiento de la presencia del antígeno ovárico en las fracciones de la columna se realizó mediante Western-blot. Treinta microlitros de cada una de las fracciones de la columna, se diluyeron en buffer de siembra 3X y se hirvieron durante 3 min. Las proteínas de cada fracción se separaron en un gel de poliacrilamida 10%-SDS, y posteriormente se transfirieron –durante 90 min. a 100 volts- a una membrana de nitrocelulosa (0,45 μ m, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO., USA). Como control

positivo, se sembraron en otra calle 4,5 μ l (25 μ g de proteína) de la fracción soluble del homogenato de ovarios sin procesar. Luego de la transferencia, la membrana fue bloqueada durante 16 hs. en PBS, 0.05% Tween 20 (PBS-T) con 3% de leche descremada (PBS-T-L), e incubada durante 2 hs. en 2 ml de una dilución 1:100 de un suero con alto título de AOA en PBS-T-L. La membrana fue lavada durante 20 min. con 4 cambios de PBS-T, y posteriormente incubada con una dilución 1:1000 en PBS-T-L de anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Vector, CA, USA), durante 60 min. Luego de 20 min. de lavado con 4 cambios de PBS-T, se reveló con diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO., USA).

Para la concentración y enriquecimiento de la fracción en la que se detectó la presencia del antígeno ovárico, se utilizaron ultrafiltros (Centricon-30, Amicon, Inc. Beverly, MA., USA), que concentran la muestra y eliminan las proteínas de peso molecular menor a 30 kDa. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 35 min., y las proteínas (65 μ g) del producto concentrado se separaron en un gel de poliacrilamida 10%-SDS de 15 cm de largo. Luego de la electroforesis, el gel se tiñó con coomasie-blue y la banda correspondiente al antígeno ovárico fue cortada y enviada a analizar mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tandem (nanoLC-ESI-MS/MS) a Proteome Factory AG (Berlin, Alemania).

- Tinción con coomasie blue

El gel se incubó durante 60 min., en agitación y a temperatura ambiente, en una solución de coomasie blue (100 mg de coomasie blue G-250 -Bio-Rad- en 100 ml de la solución: metanol 40% y acético 10%, en agua hexadestilada). Luego se destiñó hasta

que el fondo quedó transparente, con una solución de etanol 50% y ácido acético 10%, en agua hexadestilada.

- Western-blot utilizando la enolasa α recombinante

La enolasa- α recombinante humana fue producida por el Doctor Vijay Pancholi (Fontan y col., 2000), del Public Health Research Institute ubicado en el International Center for Public Health, Newark, USA. Aproximadamente 300 microgramos de la proteína recombinante, diluída en Tris HCl pH 8, glicerol 10%, fueron provistos a nuestro laboratorio para los experimentos de Western-blot. La enolasa- α recombinante (0,5 μ g de proteína por calle), luego de ser diluída en buffer de siembra 3X y hervida durante 3 min., se corrió en geles de 10% poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE), y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (0,45 μ m, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO., USA). La membrana se cortó en las diferentes calles, y las mismas se incubaron durante 2 hs. en 2 ml de diluciones 1:200 de los diferentes sueros en PBS-T-L, a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, se lavaron durante 20 min. con 4 cambios de PBS-T, y se incubaron durante 60 min. con una dilución 1:1000 de anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Vector, CA, USA) en PBS-T-L, a temperatura ambiente y con agitación. Nuevamente se lavaron durante 20 min. con 4 cambios de PBS-T. Finalmente se reveló con DAB.

- Sueros

Del total de 170 sueros provenientes de pacientes FOP y de individuos controles -mujeres con ciclos regulares y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes- que fueron estudiados en nuestro laboratorio para la determinación de anticuerpos antiovario (AOA), 60 sueros fueron utilizados para la identificación y confirmación de la identidad

del antígeno ovárico de aproximadamente 50 kDa. Los sueros que perdieron reactividad, debido al paso del tiempo y a los ciclos de congelamiento-descongelamiento a los que fueron sometidos, no fueron utilizados para el desarrollo del presente objetivo. Además, se eligieron preferencialmente aquellos sueros de pacientes derivadas de hospitales, por sobre los derivados de laboratorios, de modo de garantizar la unidad de criterios para el diagnóstico de FOP de las pacientes de las que fueron extraídos.

- Soluciones utilizadas para Western-blot

Buffer de siembra (3X)

- Tris-HCl 60mM, pH: 6,8
- SDS 2% p/v
- Glicerol 10% v/v
- 2-Mercaptoetanol 0,7 M
- Azul de bromofenol 0,1% p/v

Buffer de corrida

- Tris 0,3% p/v
- Glicina 1,44% p/v
- SDS 0,1%

Buffer de transferencia

- Tris 0,3% p/v
- Glicina 1,44% p/v
- Metanol 20%

PBS

- NaCl 0,8 % p/v
- KCl 0,02 % p/v
- Na₂HPO₄ 0,1437 % p/v
- KH₂PO₄ 0,024 % p/v
- pH 7,2

- Técnica de revelado con DAB

- Se disolvieron 4 mg de DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO., USA) en 200 µl de HCl 0,5N.
- La membrana a revelar se incubó en 10ml de Tris 100mM pH 7,4, en agitación.
- Luego de unos segundos, se agregó la solución de DAB al medio, y se continuó con la agitación.
- Se agregaron 3µl de H₂O₂, y se continuó con la agitación.
- Cuando aparecieron las bandas, se detuvo la reacción con agua destilada.

1.2. Anticuerpos anti-receptor de FSH.

- Individuos estudiados

Se realizó un estudio retrospectivo sobre el análisis de 247 pacientes FOP, que fueron derivadas a nuestro laboratorio entre 1982 y 2002 para la determinación de la presencia de inmunoglobulinas dirigidas hacia el receptor de FSH (Ig-R-FSH).

Las pacientes tenían entre 14 y 38 años. Además de las manifestaciones clínicas por las cuales fueron diagnosticadas como FOP (amenorrea por una duración mayor a 6 meses con FSH<40mIU/ml), todas las pacientes presentaban concentraciones serológicas de LH superiores a 20 mIU/ml (niveles normales de fase folicular: 2-10 mIU/ml), y niveles de 17 β-estradiol por debajo de 15 pg/ml (rango normal en fase folicular: 20-120 pg/ml). Otras características clínicas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas de las pacientes estudiadas.

Pacientes (n)	Diagnóstico	n	Amenorrea		Edad última menstruación (amenorrea secundaria)	Historia Menstrual (amenorrea secundaria)		Embarazos previos (amenorrea secundaria) n (%)	Enfermedades autoinmunes asociadas
			Primaria n (%)	Secundaria n (%)		A	B		
247 FOP	SOR	23	8 (35%)	15 (65%)	14-30 años	A 9 (60%) B 6 (40%)	2 (9%)	10 miastenia grave 2 artritis reumatoidea 3 tiroiditis autoinmune	
	No SOR	224	40 (18%)	184 (82%)	20-36 años	A 110 (60%) C 55 (30%) D 15 (8%) E 4 (2%)	52 (23%)	52 tiroiditis autoinmune 5 artritis reumatoidea 2 vitiligo 2 LES 1 enfermedad de Addison 1 diabetes mellitus	

- A. eumenorrea hasta la aparición de FOP
 B. ciclos irregulares con episodios de oligomenorrea y/o amenoreia hasta la aparición de FOP
 C. episodios de eumenorrea/oligomenorrea hasta la aparición de FOP.
 D. oligomenorrea desde la menarca
 E. ciclos irregulares con polimenorrea hasta la aparición de FOP
 LES: Lupus eritematoso sistémico.

Los ovarios de sesenta y ocho pacientes, que fueron diagnosticadas antes de 1992, habían sido examinados mediante biopsia ovárica (la indicación de biopsia ovárica en las pacientes FOP era de aceptación general hasta ese año (Fox, 1992)). En el 71% de estas pacientes ($n = 48$) la biopsia ovárica había mostrado un estroma con folículos atrésicos, o con ausencia total de folículos. En las restantes 20 biopsias, la presencia de numerosos folículos primordiales corticales condujo al diagnóstico de SOR. Por otro lado, ciento setenta y nueve pacientes no habían sido sometidas a biopsia ovárica. En la mayoría de estas mujeres la ultrasonografía mostró la presencia de ovarios pequeños (promedio: $2,4 \pm 2,1 \text{ cm}^3$), en los casos en que se visualizaban. Algunos de estos ovarios presentaban escasa actividad folicular. Tres pacientes habían sido diagnosticadas como SOR debido a una ultrasonografía ovárica que mostró ovarios de $14,2 \pm 3,6 \text{ cm}^3$ (rango normal: $6 \pm 3 \text{ cm}^3$) con estroma hiperecogénico y numerosas imágenes foliculares pequeñas ($< 3 \text{ cm}^3$) en la periferia.

El diagnóstico de miastenia grave fue realizado por los médicos de acuerdo con la sintomatología clínica y con la determinación de anticuerpos dirigidos hacia el receptor de acetilcolina (AChR) según lo descrito por Vincent y col. (1985). Diez de las 247 pacientes FOP presentaban un título de anticuerpos anti-AChR que variaba entre 40 y 280 nm/l (rango normal: $< 0.3 \text{ nm/l}$). Además, 55 pacientes FOP presentaban tiroiditis autoinmune con sueros altamente positivos para anticuerpos anti-tiroglobulina y/o anti-peroxidasa tiroidea.

Todas las pacientes incluidas en este trabajo eran fenotípicamente normales en cuanto al examen físico de peso y altura, y hábitos de vida. Se evaluó también la asociación con otros desórdenes autoinmunes, como se muestra en la tabla 1.

Como controles se utilizaron sueros provenientes de 60 mujeres con ciclos menstruales regulares y sin evidencias de enfermedades autoinmunes, en el mismo

rango de edad que las pacientes bajo estudio (promedio 28 años). Al momento de la extracción de la muestra de sangre, ningún paciente ni individuo control estaba recibiendo un tratamiento con esteroides.

- Determinación de inmunoglobulinas circulantes que inhiben la unión de FSH a su receptor

A partir de los sueros en estudio, se precipitaron las fracciones de inmunoglobulinas mediante saturación con sulfato de sodio 0-50%. Los precipitados se purificaron utilizando una columna de proteína A-Sefarosa (Chiauzzi y col., 1982).

Posteriormente, se evaluó la actividad inhibitoria de estas fracciones en un ensayo de radioligando-receptor de FSH, según fue descrito (Chiauzzi y col., 1982; Escobar y col., 1982). Brevemente, homogenatos de testículos de ratas de 15 días de edad diluidos 1:4 p/v, en buffer Dulbecco conteniendo BSA (seroalbúmina bovina) 0.1% (DPBS-BSA), se centrifugaron a 27.000 x g, y el precipitado se resuspendió en DPBS-BSA de modo de obtener 100 mg de proteína por ml de suspensión. Esta fracción fue utilizada como fuente de receptores de FSH. Cien microlitros (10 mg) de la preparación de membranas, 50 μ l de DPBS-BSA con 20.000 a 100.000 cpm [¹²⁵I]-hFSH y 100 μ l de DPBS-BSA con o sin un exceso de hormona no marcada, se incubaron durante 16 hs. a 24°C. Luego, cada muestra se diluyó con 2 ml de DPBS-BSA enfriado en hielo y se centrifugó a 6.000 x g durante 30 min. La cantidad de hormona marcada unida a su sitio receptor, se determinó removiendo el sobrenadante y contando la radioactividad de los precipitados -previamente lavados- en un espectrómetro- γ automático, con una eficiencia de conteo del 70%.

Con el objetivo de evaluar la presencia de actividad inhibitoria de la unión de FSH, las fracciones de inmunoglobulinas purificadas (hasta 400 μ g de proteína) se

incubaron con 100 μ l (10 mg) de las preparaciones de membranas durante 10 hs. a 4°C. Luego del agregado de [125 I]-hFSH y DPBS-BSA con o sin un exceso de hormona no marcada, se continuó con el ensayo como se describió anteriormente.

- Estudios de “Binding”

Cantidades crecientes de IgGs purificadas obtenidas de sueros de pacientes se agregaron a una cantidad constante, cercana a saturación, de hFSH iodinado, y se calculó el porcentaje de inhibición del *binding*. A partir de los datos experimentales, se construyó un gráfico de logit-log, a partir del cual se calculó la cantidad de IgG necesaria para reducir la unión de FSH en un 50% (ED_{50}).

En otro set de experimentos, se calculó la constante de afinidad de las IgG purificadas de 10 sueros con diferentes ED_{50} , seleccionados entre los 23 que presentaban Ig-R-FSH. Concentraciones crecientes de hFSH iodinado (10^{-11} a 10^{-9} M) se agregaron a los tubos de incubación que contenían una cantidad constante de IgG purificadas (400 μ g), en presencia o en ausencia de un exceso de 100 veces FSH fría, para la determinación del pegado específico. Los datos de estos ensayos fueron transformados y volcados en un gráfico de Scatchard (1949). A partir de los datos de este gráfico, se calculó la constante de disociación de las fracciones de IgG, utilizando el método descrito por Best-Belpomme y Dessen (1973).

-Análisis de los datos

Se realizó un análisis minucioso de los datos clínicos, hormonales, histológicos y ecográficos derivados del diagnóstico de las 247 pacientes FOP que fueron estudiadas a lo largo de 21 años. Los resultados de los ensayos de radioligando-receptor de estas

pacientes se correlacionaron con estos datos, principalmente en lo referente al examen ovárico mediante biopsia y/o ultrasonografía.

2. ASPECTOS MOLECULARES DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA

2.1. Gen del receptor de FSH (R-FSH)

- Individuos estudiados

Se estudiaron 20 pacientes FOP, 5 de las cuales habían sido diagnosticadas como SOR. Del total de las pacientes, 5 tenían antecedentes familiares de FOP.

El grupo control estuvo integrado por 44 mujeres con ciclos regulares y fertilidad comprobada.

- Extracción de ADN

El ADN se aisló de leucocitos de sangre periférica. Se recolectaron 5 ml de sangre en 0,5% de EDTA (concentración final). El protocolo utilizado para la extracción fue el siguiente:

- 1- La sangre se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 min.
- 2- Se separó la capa superior de células blancas y se pasó a otro tubo.
- 3- Se agregaron 10 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM). Se agitó suavemente y se centrifugó 1000 r.p.m., 10 min. Se descartó el sobrenadante.
- 4- El paso 3 se repitió hasta que el sobrenadante quedó libre de hemoglobina.

- 5- El precipitado de glóbulos blancos se resuspendió en 3 ml de TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8.3, EDTA 25 mM, NaCl 150 mM), SDS 0,1%, 100 µg/ml de proteinasa K.
- 6- Se incubó durante 16 hs a 37 °C (alternativa: 2 hs. a 55 °C).
- 7- Se agregó 1 ml de NaCl 5N. Se agitó vigorosamente. Se centrifugó 15 min. a 2500 r.p.m. El sobrenadante se pasó a otro tubo.
- 8- Se precipitó el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente (alternativa: 1 volumen de isopropanol). El ADN apareció en forma de hebras.
- 9- Se tomó el ADN con una pipeta Pasteur de vidrio a la que se le había sellado la punta al fuego.
- 10- La pipeta con el ADN se sumergió en alcohol 70%.
- 11- Se dejó secar al aire.
- 12- El ADN se resuspendió sumergiendo unos minutos la pipeta en solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).
- 13- Se incubó unas horas a 37 °C, preferentemente en agitación circular para favorecer la resuspensión.
- 14- Se midió la concentración de ADN y la pureza del mismo por absorción a 260 y 280 nm. La relación 260/280 debía ser mayor a 1,7.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los exones 1 al 10 del gen del R-FSH fueron amplificados a partir del ADN genómico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores específicos (Tabla 2), que fueron sintetizados por DNA Agency, Malvern, PA, USA. Para cada fragmento en particular, aproximadamente entre 100 y 300 ng de ADN genómico se amplificaron en un volumen final de reacción de 50 µl conteniendo buffer de PCR 1X (Invitrogen, USA), 0,2 µM de cada uno de los dNTPs (Promega, USA), 0,5

μM de cada uno de los iniciadores específicos de acuerdo al fragmento a amplificar, y 1U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, USA). Las cantidades de MgCl_2 (Invitrogen, USA), DMSO (Merck KgaA, Alemania) y ADN genómico agregadas al medio de reacción se ajustaron específicamente para cada exón, según puede observarse en la tabla 3. En los casos en los que los productos de PCR se utilizaran para secuenciación, el volumen final de incubación fue de 100 μl . Se utilizó un ciclador térmico Perkin Elmer (The Perkin-Elmer Corporation, USA) y en todos los casos, se realizó una desnaturalización inicial de 60 seg. a 94°C , seguida por 35 ciclos de: 1) 40 seg. de desnaturalización a 94°C , 2) 30 seg. de “annealing”, o pegado de los iniciadores al molde de ADN, cuya temperatura se ajustó específicamente para cada fragmento (Tabla 3), y 3), 1 min. de polimerización a 72°C , seguida de un único ciclo final de 7 min. a 72°C . Todos los productos de PCR se chequearon y semi-cuantificaron en geles de agarosa 1,5%, tomando 5 μl del producto amplificado que se diluyeron en 2 μl de buffer de siembra 6X (Azul de bromofenol 0,25%; Xylene cyanol 0,25%; glicerol 30%). Se utilizó TBE 0,5X (TBE 1X: Tris base 8.9 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) con 0,05% p/v de bromuro de etidio como buffer de corrida.

El exón 10 se dividió para su estudio en 3 fragmentos: 10A, 10B y 10C. Dado que, a pesar de haber probado diferentes condiciones, los productos de PCR de los fragmentos 10B y 10C no contenían masa suficiente, se realizó una PCR semi-anidada, amplificando en la primera ronda un fragmento de 840 pb, utilizando los iniciadores 10BF-10CR. De este modo, los fragmentos 10B y 10C se obtuvieron a partir de una segunda PCR, utilizando el producto de la primera PCR como molde, y los iniciadores 10BF-10BR y 10CF-10CR respectivamente. Por su parte, el fragmento 10A se amplificó en una única ronda de PCR.

Tabla 2. *Iniciadores utilizados para la amplificación mediante PCR de los exones 1 al 10 del gen del R-FSH*

Inicia- dores	Secuencia de los iniciadores	Fragmento	Tamaño del producto	Localización de iniciadores	Análisis del producto de PCR
566^a	F: 5'-GTTATTTTCAGATGGCTGAATAAG-3' R: 5'-GCTCATCTAGTTGGGTTTC-3'	Exon 7 Parcial	78 pb	Intrónica-592	Digestión BsmI
1^a	F: 5'-AATTATGGCCTGCTCCTG-3' R: 5'-ATAGTACGCAATGCACAAATGC-3'	Exón 1	215 pb	4-intrónica	SSCP
2^a	F: 5'- TCTTTGCAGGAGGTTTGTCC-3' R: 5'-TTGAGGCATTCACTCACAGC-3'	Exón 2	118 pb	Intrónica	SSCP
3^a	F: 5'-TCAAGGAGGTAACCTGAACTGGC-3' R: 5'-ATCCCCCAATCTTCTTGCTT-3'	Exón 3	146 pb	Intrónica	SSCP
4^a	F: 5'-GCATTCCTTACCATCAAGATGA-3' R: 5'-GTGGGGGTACCAAACACTACATG-3'	Exón 4	153 pb	Intrónica	SSCP
5^b	F: 5'-GTTTCATGCTCTAACAACCTGTTT-3' R: 5'-CCTCCCTATCTTTGCTAAC-3'	Exón 5	277 pb	Intrónica	SSCP
6^b	F: 5'-GCTGAAGACCGCATCATGCC-3' R: 5'-GGAGAAATGCCAAAGTTACC-3'	Exón 6	282 pb	Intrónica	SSCP
7^b	F: 5'-CCCGTGTATTGTTTGCATCTG-3' R: 5'-GGAAAACACAAAGCCACATAA-3'	Exón 7	209 pb	Intrónica	SSCP
8^b	F: 5'- GGGAAATGGCTCTTACAACA-3' R: 5'-GCAGAGAGTTGACTTCTAACTT-3'	Exón 8	217 pb	Intrónica	SSCP
9^b	F: 5'-CTGCTATTTTGCCTGCTAACCC-3' R: 5'-TTGGGGAAATGCCTGAGC-3'	Exón 9	306 pb	Intrónica	SSCP
10A^b	F: 5'-CCTGCACAAAGACAGTGATG-3' R: 5'-TGGCAAAGACAGTGAAAAAG-3'	10A	577 pb	Intrónica- 1357	Secuenciación Digestión AhdI
10B^b	F: 5'-TATCACAACCTATGCCATTGA-3' R: 5'-GGTTGGCACAGGAGTTGATG-3'	10B	583 pb	1285-1867	Secuenciación
10C^b	F: 5'-CAAAGATTCTGCTGGTTCTG-3' R: 5'-ATCATTCAATACTCAGATACATT-3'	10C	305 pb	1820-2124	Secuenciación Digestión BsrI
1022^{b,c}	F: 5'-GTTTGACTATGACTTATCCAATGAA-3' R: 5'-CTATGATGTTCCAGTGATG-3'	10D	152 pb	996-1147	Digestión BstXI

^a Iniciadores descritos por Aittomäki y col., 1995.^b Iniciadores diseñados en el laboratorio.^c La base subrayada corresponde a la base "mismatched".

Tabla 3. Condiciones de PCR elegidas para la amplificación de cada uno de los fragmentos estudiados.

Fragmento	MgCl ₂	DMSO	ADN	¹ Ta
C566T	3 mM	2,5 %	0,2 µg	55 °C
Exón 1	1,5 mM	2,5 %	0,2 µg	55 °C
Exón 2	1,5 mM	2,5 %	0,2 µg	55 °C
Exón 3	2 mM	2,5 %	0,2 µg	55 °C
Exón 4	2 mM	2,5 %	0,2 µg	55 °C
Exón 5	2 mM	2 %	0,3 µg	53 °C
Exón 6	2 mM	2 %	0,2 µg	55 °C
Exón 7	3 mM	2 %	0,3 µg	54 °C
Exón 8	2 mM	2 %	0,2 µg	55 °C
Exón 9	2,5 mM	-	0,2 µg	55 °C
10 ^a	2 mM	2 %	0,3 µg	57 °C
10B-10C	3 mM	2 %	0,3 µg	52 °C
10B	3 mM	2 %	0,2 µg	59 °C
10C	3 mM	-	0,1 µg	57 °C

¹Temperatura de “annealing”

- Técnica de Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple del ADN (SSCP).

Entre dos y cuatro microlitros del producto de PCR (dependiendo de la semi-cuantificación de este producto) se diluyeron en 6 µl de solución Stop (formamida desionizada 97,5%, EDTA 10 mM, xylene-cyanol 0,3% (p/v), azul de bromofenol 0,3% (p/v)). Las muestras se incubaron 3 min. a 80°C y se transfirieron inmediatamente a hielo, para ser sembradas posteriormente en los geles de acrilamida correspondientes (Tabla 4). Las electroforesis a 20°C se realizaron a 150V, mientras que para las corridas

Tabla 4. Condiciones de SSCP elegidas para el análisis de secuencias de cada exón.

		Exón 1	Exón 2	Exón 3	Exón 4	Exón 5	Exón 6	Exón 7	Exón 8	Exón 9
Condición 1	Acrilamida - bis acrilamida	12%	12%	15%	12%	8%	8%	12%	8%	12%
	Glicerol 5%	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	Temperatura de corrida	4°C	20°C	20°C	20°C	4°C	20°C	20°C	20°C	4°C
Condición 2	Acrilamida - bis acrilamida	12%	12%	15%	12%	12%	12%	8°	12%	12%
	Glicerol 5%	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	Temperatura de corrida	4°C	4°C	4°C	20°C	4°C	4°C	4°C	20°C	20°C
Condición 3	Acrilamida - bis acrilamida	8%	15%	8%	15%	10%	12%	12%	15%	15%
	Glicerol 5%	+	-	-	+	-	+	-	-	-
	Temperatura de corrida	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	4°C	4°C	20°C

a 4°C se utilizaron 250V; todas ellas en buffer TBE 1X. Los geles se desmontaron y se tiñeron con plata, como se explica más adelante. A los efectos de la puesta a punto de la electroforesis, para cada exón se testearon entre 8 y 10 condiciones de corrida variando el porcentaje de acrilamida (entre el 8 y el 15 %), la presencia o ausencia de glicerol 5% y la temperatura de corrida (4°C ó 20°C). De acuerdo con su poder de resolución, se eligieron 3 condiciones diferentes para cada exón, en las cuales se analizaron todas las muestras (Tabla 4).

- Digestión con enzimas de restricción

La mutación inactivante C566T se estudió mediante digestión con la enzima BsmI (New England Biolabs), como fue descrito por Aittomäki y col. (1995). Brevemente, un fragmento de 78 pb, conteniendo la base 566 del exón 7, fue amplificado mediante PCR, y 10 µl de este producto se incubaron con 5 U de BsmI (New England Biolabs) a 37°C durante 16 hs. Los productos de la digestión se separaron en geles de acrilamida 10% utilizando TBE 1X como buffer de corrida, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron. El sitio de restricción que rinde dos fragmentos de 51 y 27 pb, desaparece en el alelo mutado (Tabla 5).

El polimorfismo A919G del exón 10 fue analizado en las muestras controles no secuenciadas mediante digestión con la enzima AhdI (New England Biolabs). El fragmento 10A se amplificó mediante PCR y 10 µl del producto amplificado se incubaron con 5U de la enzima de restricción durante 16 hs. a 37°C. Los productos de la digestión se separaron en geles de acrilamida 8% utilizando TBE 1X como buffer de corrida, se tiñeron con bromuro de etidio, y se fotografiaron. El producto de 577 pb

luego de la digestión rinde 3 fragmentos de 403 pb, 143 pb y 31 pb en las muestras homocigotas para el alelo A, y 2 fragmentos de 403 pb y 174 pb en las homocigotas GG (Tabla 5).

Tabla 5. Enzimas de restricción utilizadas para el análisis de secuencias del gen del R-FSH

Enzima	Mutación / Polimorfismo	Fragmento	Secuencia de reconocimiento	Productos de la digestión	
BsmI	C566T	Exón 7	GAATGC	C	51 pb 27 pb
				T	78 pb
AhdI	A919G	Fragmento 10A Exón 10	GACNNNNNGTC	A	403 pb 143 pb 31 pb
				G	403 pb 174 pb
BsrI	A2039G	Fragmento 10C Exón 10	ACTGG	A	305 pb
				G	217 pb 88 pb
BstXI	T1022C	Fragmento 10D Exón 10	CCANNNNNNTGG	T	127 pb 25 pb
				C	152 pb

Para el análisis del polimorfismo A2039G, el fragmento 10C de 305 pb fue amplificado mediante PCR, y 5 µl del producto amplificado se incubaron con 5U de la enzima BsrI durante 16 hs. a 37°C. Los productos de la digestión se separaron en geles

de acrilamida 8% utilizando TBE 1X como buffer de corrida, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron. La presencia del fragmento de 305 bp indica la variante homocigota para A, mientras que dos fragmentos de 217 y 88 pb corresponden a la variante homocigota para G (Tabla 5).

La sustitución T por C en el nucleótido 1022, identificado en un sujeto control mediante secuenciación, fue estudiada en las muestras no secuenciadas mediante “mismatch-PCR”. El fragmento 10D de 152 pb –contenido dentro del fragmento 10A– fue amplificado mediante PCR utilizando el iniciador 1022F, el cual posee una base mismatch en la posición 1013 que crea un sitio de restricción para la enzima BstXI en el alelo nativo, y el iniciador 1022R (Tabla 2). Cinco microlitros del producto amplificado se incubaron durante 16 hs con 5U de enzima, a 37°C. Los productos de la digestión se separaron en geles de acrilamida 10% utilizando TBE 1X como buffer de corrida, se tiñeron con bromuro de etidio, y se fotografiaron. El producto de PCR rinde 2 fragmentos de 127 y 25 pb en presencia del alelo nativo (T), mientras que permanece sin cortar en el alelo mutado (Tabla 5).

- Tinción con Plata

Luego de desmontar los geles, éstos fueron fijados en una solución de etanol 10% en agitación durante 10 min. Posteriormente, se incubaron 3 min. en HNO₃ 1% en agitación, y se realizaron 2 lavados de 30 seg. cada uno, con agua hexadestilada. Los geles se incubaron 20 min. en una solución de AgNO₃ (2,02 g/l) en agitación, y se realizaron otros 2 lavados de 30 seg. cada uno, con agua hexadestilada. Para el revelado, 54 µl de formaldehído 37% se diluyeron en 100 ml de Na₂CO₃ (29,6 g/l), y los geles se

incubaron con esta mezcla hasta la aparición de bandas nítidas. Una vez obtenida la coloración deseada se detuvo la reacción con ácido acético 10%. Los geles teñidos se montaron sobre papel Whatmann 3MM y se secaron 2 horas a 80°C.

- Tinción con Bromuro de Etidio

Luego de desmontar los geles, éstos se incubaron 10 min. en una solución de 5µl de Bromuro de Etidio (solución stock de BrEt: 10 mg/ml) en 100 ml de agua hexadestilada, durante 10 min. Posteriormente, se lavaron 10 min. en agua hexadestilada.

- Secuenciación

Los productos de PCR correspondientes a los tres fragmentos del exón 10 (10A, 10B y 10C) de todas las pacientes y de 5 controles se purificaron a través de columnas “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En los casos en los que el producto de PCR presentaba inespecíficos de otros pesos moleculares (fragmentos 10B y 10C), el volumen total de este producto se corrió en geles de agarosa, y la banda correspondiente al fragmento de interés se cortó y se purificó a partir del fragmento de agarosa. Los productos de PCR correspondientes al fragmento 10A se purificaron a partir de solución. Todos los productos purificados fueron secuenciados mediante el método de Sanger utilizando terminadores fluorescentes (Applied Biosystem) y posterior electroforesis e interpretación en un secuenciador ABI, en el Cancer Research Center, Chicago University, Chicago, Illinois, USA.

- Análisis estadístico

Como estimador del Riesgo Relativo para las distintas variantes alélicas y genotípicas se utilizó el cálculo del Riesgo Asociado (OR) con un intervalo de confianza del 95%.

2.2. Gen de la subunidad α de las inhibinas**- Individuos estudiados**

Estudiamos 52 mujeres con FOP las cuales fueron derivadas de diferentes hospitales, todas ellas con cariotipo normal 46,XX. Del total de las pacientes, 14 presentaban FOP asociada a enfermedad/es autoinmune/s (FOP-EA). Las restantes 38 fueron consideradas idiopáticas (FOP-I), debido a que no presentaban ninguna otra condición asociada a la FOP (cirugía ovárica previa, quimioterapia o radioterapia previa, desórdenes metabólicos como galactosemia). Aquellas pacientes en las que se detectó la presencia de anticuerpos anti-R-FSH (Chiauzzi y col., 2004) (apartado 1.2.), fueron excluidas del estudio. Catorce pacientes tenían antecedentes familiares de FOP, mientras que las 38 restantes fueron clasificados como casos esporádicos. Nueve pacientes presentaban amenorrea primaria, y las restantes 43 amenorrea secundaria.

Además, se incluyeron 136 mujeres controles, las cuales fueron estudiadas en dos grupos de acuerdo con diferentes criterios de inclusión: a) controles menores de 40 años (n=73): mujeres con ciclos regulares, sin antecedentes familiares de menopausia temprana o precoz, y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes; 33 de las cuales

tenían fertilidad comprobada; b) controles mayores de 40 años: 63 mujeres con historia menstrual normal, sin menopausia prematura y con fertilidad comprobada.

Se extrajo una muestra de sangre periférica de cada una de las pacientes y controles.

Para el estudio de la posible asociación entre el polimorfismo C129T y los niveles serológicos de inhibina, del total de 136 controles se seleccionó un grupo formado por 42 mujeres, que cumplían con los siguientes criterios de inclusión:

- edad menor de 40 años
- con ciclos menstruales regulares (con una duración de entre 25 y 35 días)
- sin antecedentes de menopausia temprana o precoz
- sin antecedentes de enfermedades autoinmunes
- que no estuviesen tomando anticonceptivos orales o algún otro medicamento hormonal, al momento de ser incluidas en el estudio.

Además, se registró la altura y el peso de cada una de las voluntarias y se calculó el índice de masa corporal (IMC) utilizando la fórmula: $\text{peso}/(\text{altura})^2$. Se incluyeron en el estudio únicamente aquellas mujeres con un valor de IMC entre 17 y 27. El 29 % (n=12) de estas mujeres tenían fertilidad comprobada.

En el caso de estas 42 mujeres, se obtuvieron dos muestras de sangre, una de ellas entre los días 7 y 10 (fase folicular media), y la segunda entre los días 21 y 24 (fase lútea media) del ciclo menstrual (Figura 9); modificando los días de extracción dentro de los rangos referidos de acuerdo con la duración de cada ciclo en particular. En cada

extracción se obtuvieron aproximadamente 12 ml de sangre, 7 de los cuales se recolectaron en 0.5% de EDTA (concentración final) para la extracción del ADN genómico. Los 5 ml restantes se incubaron sin anticoagulante a temperatura ambiente o a 37°C, y el suero exudado se separó mediante centrifugación para ser utilizado para las mediciones hormonales.

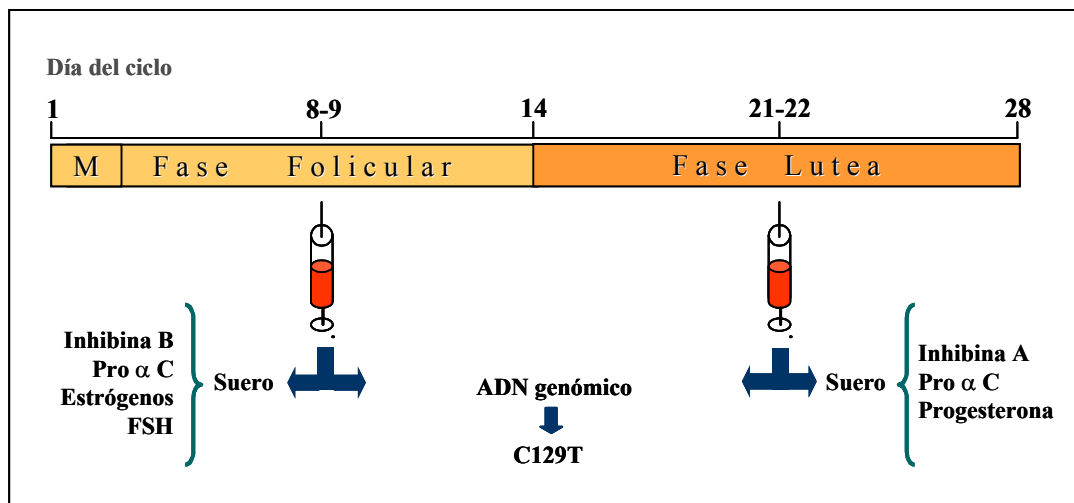


Figura 9. Esquema de las extracciones de sangre para el estudio de la posible asociación entre el polimorfismo C129T del gen *INHα* y los niveles serológicos de inhibinas. De cada voluntaria se obtuvieron dos muestras de sangre, una de ellas en la fase folicular media y la segunda en la fase lútea media del ciclo menstrual.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN se aisló de leucocitos de sangre periférica, según lo descrito en 2.1. A partir del ADN genómico, se amplificaron dos regiones del gen de inhibina α (*INHα*) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores específicos sintetizados por QIAGEN Inc., USA. La primera región de 240 pb (fragmento A), que abarca 140 pb de la región 5' no codificante (5'UTR) y 100 pb del exón 1, se amplificó utilizando los iniciadores AF (5'-GACTGGGGAAGACTGGATGA-3') y AR (5'-TCACCTTGGCCAGAACAAGT-3'). Para la amplificación del fragmento B, que

comprende 396 pb del exón 2, se utilizaron los iniciadores BF (5'-AGCAGCCTCCAATAGCTCTG-3') y BR (5'-AGCTCCTGGAAGGAGATGTTC-3'). Doscientos nanogramos de ADN genómico se amplificaron en un volumen final de reacción de 50 μ l, conteniendo buffer de PCR 1X (Invitrogen, USA), $MgCl_2$ (Invitrogen, USA) 2 mM, DMSO (Merck KgaA, Alemania) 2,5%, 0,2 μ M de cada uno de los dNTPs (Promega, USA), 0,5 μ M de cada uno de los iniciadores específicos de acuerdo al fragmento a amplificar, y 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, USA). Se utilizó un ciclador térmico Perkin Elmer para 48 tubos (The Perkin-Elmer Corporation, USA), y se realizó una desnaturalización inicial de 60 seg. a 90°C, seguida por 35 ciclos de: 1) 40 seg. de desnaturalización a 94°C, 2) 30 seg. de “annealing”, o pegado de los iniciadores al molde de ADN, a 57°C, y 3) 1 min. de polimerización a 72 °C, seguida de un único ciclo final de 7 min. a 72 °C. Todos los productos de PCR, se chequearon en geles de agarosa 1,5%, según fue descrito en 2.1.

- Purificación de los productos de PCR

Cuarenta y cinco microlitros de cada producto de PCR se diluyeron en 2 volúmenes de etanol 100%. Luego de mezclar, se incubó durante 16 horas a -70°C. Los tubos se centrifugaron a 12.000g durante 15 min. en centrífuga refrigerada (4°C), y se realizó un lavado con etanol 70%. Finalmente, se volcó el sobrenadante, se secó el pellet a 37°C durante 15 min., y el ADN se resuspendió en 30 μ l de agua hexadestilada. Los productos de la purificación se chequearon en geles de agarosa 1,5% (según fuera descrito previamente).

- Digestión con enzimas de restricción

El polimorfismo C129T de 5'UTR se estudió en toda las muestras mediante digestión con la enzima de restricción SpeI (New England Biolabs). Tres microlitros del producto de PCR purificado, correspondiente al fragmento A de 240 pb, se incubaron con 5 U de la enzima durante 16 hs a 37°C. Los productos de la digestión se separaron en geles de poliacrilamida 8%, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron. La presencia de un solo fragmento de 240 pb indica un genotipo homocigota CC, mientras que la presencia de dos fragmentos de 120 pb corresponde a un genotipo homocigota TT (Tabla 6).

La sustitución G769A del exón 2, se estudió mediante digestión del fragmento B de 396 pb con dos enzimas de restricción diferentes. Dos microlitros del producto de PCR purificado se incubaron durante 16 hs. a 37°C con 5 U de la enzima de restricción BsrFI, y los productos de la digestión se analizaron como se explicó anteriormente. El sitio de restricción, que rinde dos fragmentos de 340 y 56 pb, desaparece en el alelo mutado (A) (Tabla 6). Por otro lado, tres microlitros del producto de PCR purificado se incubaron 16 hs. a 37°C con 3U de la enzima Fnu4HI. Los productos de la digestión se separaron en geles de poliacrilamida 15% y se tiñeron con plata. El fragmento de 396 pb rinde cuatro fragmentos de 153, 107, 51 y 25 pb –entre otros de menor peso molecular- en el alelo nativo, mientras que el alelo con la sustitución G769A rinde cuatro fragmentos de 153, 107, 76 y 51 pb, entre otros de menor peso molecular (Tabla 6).

Tabla 6. Enzimas de restricción utilizadas para el análisis de secuencias del gen *INH-a*

Enzima	Mutación / Polimorfismo	Fragmento	Secuencia de reconocimiento	Productos de la digestión	
SpeI	C129T	Fragmento A 5'UTR – Exón 1	ACTAGT	C	240 pb
				T	120 pb 120 pb
BsrFI	G769A	Fragmento B Exón 2	RCCGGY	G	340 pb 56 pb
				A	396 pb
Fnu4HI	G769A	Fragmento B Exón 2	GCNGC	G	153 pb 107 pb 51 pb 51 pb 25 pb 4 pb 3 pb 2 pb
				A	153 pb 107 pb 76 pb 51 pb 4 pb 3 pb 2 pb

R: A ó G
Y: C ó T
N: A ó G ó T ó C

- Secuenciación

Las muestras que resultaron heterocigotas para la sustitución G769A fueron posteriormente analizadas mediante secuenciación directa. A partir del ADN genómico de todos los individuos heterocigotas y de dos controles, se amplificó el fragmento B mediante una nueva PCR. Los productos de PCR se purificaron a través de columnas “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech Inc.,

USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó mediante el método de Sanger utilizando terminadores fluorescentes (Applied Biosystem) y posterior electroforesis e interpretación en un secuenciador ABI 3700 (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

- Determinaciones hormonales.

Los valores de inhibina A, inhibina B y Pro- α C fueron determinados en las muestras de suero por enzimoimmunoensayo (ELISA) (Oxford Bio-Innovation Ltd, Oxon, England), según fuera descrito (Groome y col., 1994; Groome y col., 1995; Groome y col., 1996). Como estándares, se utilizaron inhibina A e inhibina B recombinantes (Genentech, San Francisco, CA) y una preparación de Pro- α C parcialmente purificada (pureza >75%). La sensibilidad del ensayo fue 7 pg/ml para inhibina A, 15 pg/ml para inhibina B y 2 pg/ml para Pro- α C. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron menores al 10% en los tres ensayos. Todas las muestras se analizaron por duplicado en un mismo ensayo. Los niveles serológicos de Inhibina B se determinaron en las muestras tomadas en el día 7-10 (fase folicular media), mientras que en las muestras tomadas en el día 21-24 (fase lútea media) se midieron los niveles de Inhibina A. Los valores serológicos de Pro- α C se determinaron en ambas muestras (Figura 9).

Los niveles serológicos de FSH de fase folicular, se midieron mediante enzimoimmunoensayo utilizando el kit comercial FSH EIA (Immunometrics Ltd, Londres, UK). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron 5.3 y 19.4, 3.9 y 11.1, y 3.6 y 12.6%, para valores de FSH bajos, medios y altos respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 0.5 IUI/l (2° IRP 78/549).

Los valores serológicos de E₂ en las muestras del día 7-10 se determinaron mediante radioinmunoensayo (RIA), utilizando el kit comercial COAT-A-COUNT Estradiol (DPC, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron 7.0 y 8.1, 4.3 y 6.8, y 4.0 y 4.2% para valores de E₂ bajos, medios y altos respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 8 pg/ml.

Los niveles de P₄ circulante en las muestras del día 21-24 se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA), utilizando el kit comercial COAT-A-COUNT Progesterona (DPC, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron 8.8 y 9.7, 4.0 y 5.7, y 2.7 y 3.9% para valores de P₄ bajos, medios y altos respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 0.02 ng/ml.

- Análisis estadístico

Como estimador del Riesgo Relativo para las distintas variantes alélicas se utilizó el el cálculo del Riesgo Asociado (OR) con un intervalo de confianza del 95%. Los valores hormonales de los grupos de controles con diferente genotipo C129T se compararon mediante el test de Student no apareado.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA

1.1. Anticuerpos anti-ovario (AOA)

En estudios previos del laboratorio, mediante la técnica de Western-blot utilizando como antígenos proteínas de la fracción soluble de homogenatos de ovarios humanos, el 19,1% de un grupo de 110 pacientes FOP evidenciaron la presencia de anticuerpos dirigidos hacia un antígeno específico de peso molecular aproximado de 50 kDa. Por su parte, ninguno de los 60 individuos controles presentaron anticuerpos contra esta proteína.

De acuerdo con estos antecedentes, el objetivo de esta parte del trabajo fue la identificación del antígeno ovárico de aproximadamente 50 kDa hacia el cual están dirigidos los anticuerpos anti-ovario (AOA) en pacientes FOP.

- Purificación del antígeno ovárico

Quinientos microlitros de la fracción soluble del homogenato de ovarios se sembraron en una columna de intercambio catiónico con Cibacrom-blue, cuyas propiedades permitirían eliminar -entre otras proteínas- a la albúmina, principal contaminante de la muestra. Las proteínas fueron eluidas con soluciones de NaCl de molaridad creciente, y se recolectaron 12 fracciones de aproximadamente 1 ml cada una: 1. percolado; 2-3. lavados con buffer de corrida; 4-5. eluido con NaCl 0,3M; 6-7 eluido con NaCl 0,6M; 8-9 eluido con NaCl 1M; y 10-12 eluido con NaCl 1,4M. De acuerdo con la cuantificación del contenido proteico de cada fracción, los volúmenes de las fracciones 4 y 5, 6 y 7, 8 y 9, y 10 y 11 se juntaron de a pares, totalizando -con las

fracciones 1, 2, 3 y 12 originales- 8 fracciones. El seguimiento del antígeno ovárico en estas ocho fracciones se realizó mediante Western-blot. Como puede observarse en la figura 10, la proteína de interés fue detectada en el percolado.

Posteriormente, se utilizaron ultrafiltros cuyas propiedades permitieron concentrar el percolado y eliminar de la muestra las proteínas de peso molecular menor a 30 kDa. A partir de 1,1ml de percolado -que contenía 470 ug de proteína- se obtuvieron, luego de la centrifugación, 120 μ l de producto con una concentración de 3,72 μ g/ μ l (considerando una eficiencia del 95% para el ultrafiltro).

Cincuenta y seis microgramos de proteína (15 μ l del producto concentrado) se separaron en un gel de poliacrilamida 10%-SDS de 15 cm de largo. En la figura 10 se muestra cómo, habiendo partido de un extracto proteico con un patrón indefinido con numerosas bandas en un gel de acrilamida se obtuvo, luego del pasaje por la columna de intercambio catiónico con cibacrom-blue y de la concentración con ultrafiltros, un patrón mucho más definido con menor cantidad de bandas. Esto permitió identificar y aislar sin dificultad, a partir del gel de poliacrilamida, la banda de aproximadamente 50 kDa correspondiente al antígeno ovárico, la cual se envió a analizar mediante espectrometría de masa.

-Análisis mediante espectrometría de masa.

El análisis reveló la presencia de la proteína citoqueratina 10, tipo I (score = 414), y de la proteína enolasa 1 (α) (score = 368), siendo el score = $-10 \times \log (P)$, donde P es la probabilidad de que la coincidencia del espectro obtenido con un péptido dado sea un evento al azar. Un valor mayor a 74 es estadísticamente significativo ($P < 0.05$) (Figura 11).

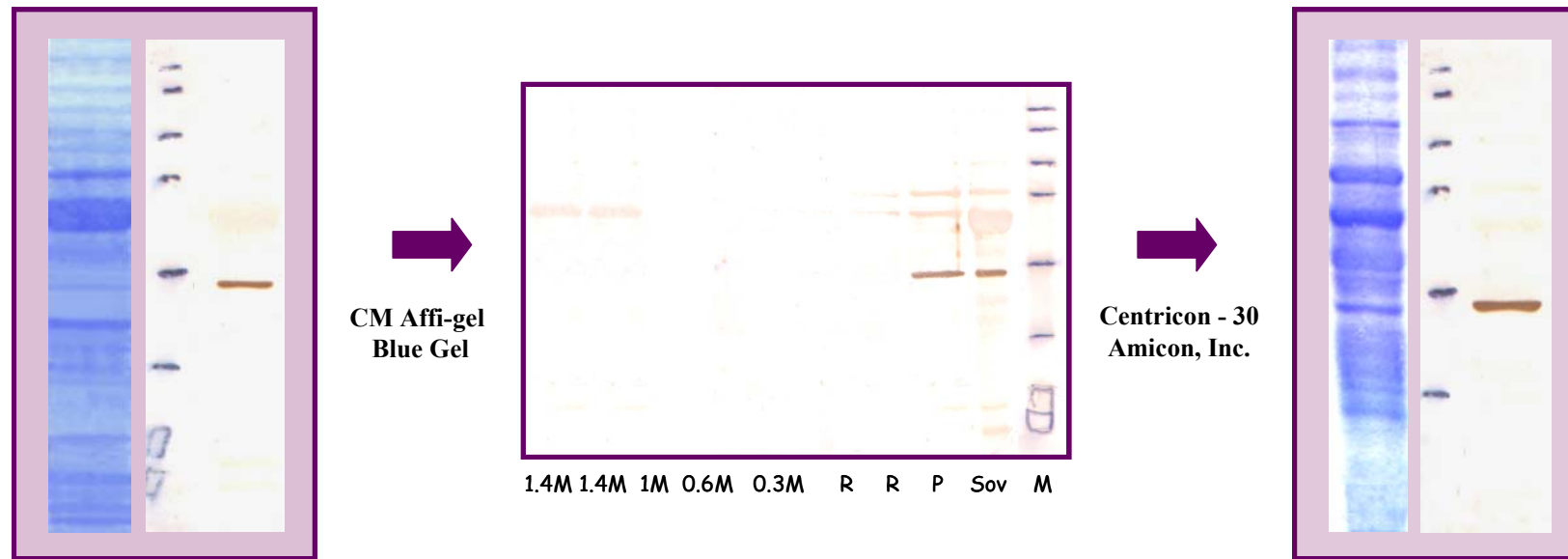


Figura 10. *Aislamiento y purificación del antígeno ovárico.* La fracción soluble del homogenato de ovarios fue sembrada en una columna de intercambio catiónico con CM y Cibacrom-blue y las proteínas fueron eluidas con soluciones de NaCl de molaridad creciente. El seguimiento de las fracciones de la columna se realizó mediante Western-blot, evidenciándose la presencia del antígeno ovárico en el percolado. Luego de la concentración de esta fracción mediante la utilización de ultrafiltros (Centricon-30, Amicon), las proteínas del producto concentrado se separaron en un gel de poliacrilamida 10%-SDS, permitiendo de este modo el aislamiento de la banda correspondiente al antígeno ovárico, la cual fue enviada a analizar mediante espectrometría de masa (nanoLC-ESI-MS/MS). *Panel izquierdo:* patrón de bandas obtenido por la separación de las proteínas de la fracción soluble del homogenato de ovarios en gel de poliacrilamida 10%, antes de los pasos de purificación. *Panel central:* Western-blot para el seguimiento de las fracciones de la columna. M: marcador de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham Biosciences UK Limited, UK); Sov: fracción soluble del homogenato de ovarios; P: percolado; R: lavados con buffer de corrida; 0,3M, 0,6M, 1M y 1,4 M: eluidos con soluciones de NaCl de la molaridad indicada. *Panel derecho:* patrón de bandas obtenido en gel de poliacrilamida 10%, luego de los pasos de purificación y concentración

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 21961605	58792	414	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis almaris et plantaris) [Homo sapiens]
2. gi 547749	59483	414	Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10) (K10) (CK 10)
3. gi 71528	59492	414	keratin 10, type I, cytoskeletal - human
4. gi 4503571	47139	368	enolase 1; phosphopyruvate hydratase; MYC promoter-binding protein 1; non-neural enolase; 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase; tau-crystallin [Homo sapiens]
5. gi 30583767	47252	368	Homo sapiens enolase 1, (alpha) [synthetic construct]
6. gi 693933	47079	367	2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase; carbonate dehydratase [Homo sapiens]
7. gi 88041	57213	357	keratin 10, type I, epidermal - human
8. gi 1346343	65978	353	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1) (K1) (CK1) (67 kDa cytokeratin) (Hair alpha protein)
9. gi 17318569	66027	352	keratin 1; Keratin-1; cytokeratin 1; hair alpha protein [Homo sapiens]
10. gi 31873302	47063	347	hypothetical protein [Homo sapiens]

Probability Based Mowse Score
Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).

Figura 11. Resultado del análisis del antígeno ovárico de aproximadamente 50 kDa mediante nano-LC-ESI-MS/MS.

La citoqueratina 10, presente en piel y cabello, es una frecuente fuente de contaminación en este tipo de análisis de alta sensibilidad (Ding y col., 2003; Parker y col., 1998). Por otro lado, la presencia de anticuerpos dirigidos hacia la enzima glicolítica enolasa- α ha sido descrita en diversas enfermedades autoinmunes (Pratesi y col., 2000; Gitlits y col., 2001). Es por ello, que se decidió estudiar a la proteína enolasa- α como posible antígeno hacia el cual estarían dirigidos estos AOA en las pacientes FOP.

-Western-Blots utilizando la enolasa- α recombinante

Se realizaron Western-blot utilizando enolasa- α recombinante humana como antígeno proteico, y diluciones de los diferentes sueros como primer anticuerpo (Figura 12).

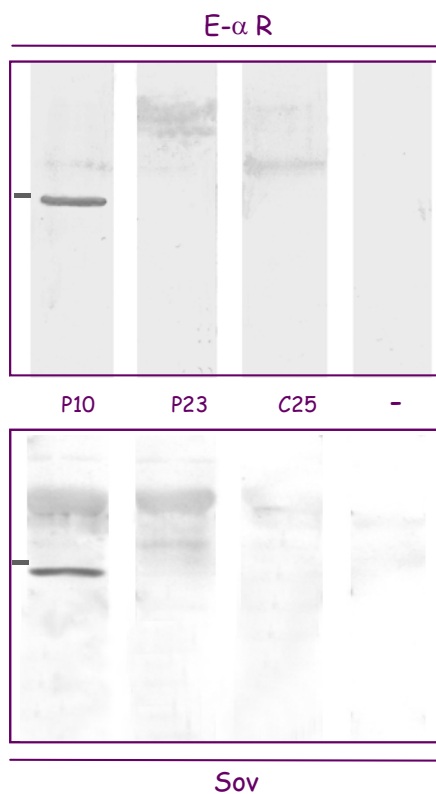


Figura 12. *Western-Blot para la determinación de anticuerpos anti-enolasa- α recombinante.* La enolasa- α recombinante fue corrida en geles de 10% poliacrilamida-SDS y transferida a membranas de nitrocelulosa. Cada membrana fue cortada en 10 calles, las cuales fueron incubadas con diluciones 1:200 de los diferentes sueros como primer anticuerpo. Como segundo anticuerpo se utilizó una dilución 1:1000 de anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. Finalmente, se reveló con DAB. En la figura se muestran, como ejemplos representativos, los resultados obtenidos con sueros provenientes de: una paciente FOP que posee AOA (P10), una paciente FOP que no posee AOA (P23), y un individuo control (C25). Como control, se realizó una incubación en ausencia de suero, pero con segundo anticuerpo (-). Panel superior: Western-blot utilizando enolasa- α recombinante (E - α R) como antígeno. Panel inferior: Se muestran los resultados obtenidos con los mismos sueros en los Western-blot para la determinación de AOA, en los que se utiliza como antígeno la fracción soluble del homogenato de ovarios (Sov). La marca sobre el margen izquierdo corresponde al marcador de peso molecular de 50 kDa.

De acuerdo con la disponibilidad y actividad de los sueros, 60 de los 170 sueros que habían sido previamente analizados para la determinación de AOA fueron estudiados para la determinación de la presencia de anticuerpos anti-enolasa- α . En total, 14 de los 21 sueros provenientes de pacientes FOP que poseían anticuerpos anti-ovario (sueros AOA +), 22 de los 89 sueros de pacientes FOP que no poseían anticuerpos anti-ovario (sueros AOA -) y 24 de los 60 sueros provenientes de controles (sueros AOA -) fueron utilizados para la determinación de anticuerpos anti-enolasa.

En el 100 % de los sueros estudiados observamos concordancia entre los resultados de anticuerpos anti-ovario y anticuerpos anti-enolasa - α (Tabla 7).

AOA				E α -R			
Sueros testeados		Resultado		Sueros testeados		Resultado	
FOP	110	+	21	AOA +	14/21	+	14/14
						-	0/14
FOP	89	-	89	AOA -	22/89	+	0/22
						-	22/22
Controles	60	+	0	AOA +	-	+	-
						-	-
Controles	60	-	60	AOA -	24/60	+	0/24
						-	24/24

Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos al analizar los mismos sueros mediante las dos técnicas: Western-blot para la determinación de AOA y Western-blot con enolasa- α recombinante humana. El 35,3% de los 170 sueros que habían sido previamente analizados para la determinación AOA fueron estudiados para la determinación de la presencia de anticuerpos anti-enolasa- α . En total, 14 de los 21 sueros provenientes de pacientes FOP con AOA , 22 de los 89 sueros de pacientes FOP sin AOA y 24 de los 60 sueros controles (sin AOA) fueron utilizados para la determinación de anticuerpos anti-enolasa. En el 100 % de los sueros estudiados observamos concordancia entre los resultados de AOA y anticuerpos anti-enolasa - α .

1.2. Anticuerpos anti-R-FSH.

- Inmunoglobulinas que inhiben la unión de FSH a su receptor

En trabajos previos del laboratorio, detectamos la presencia de inmunoglobulinas circulantes que inhiben la unión de FSH a su receptor (Ig-R-FSH) en dos pacientes con amenorrea hipergonadotrófica y miastenia grave (Chiauzzi y col., 1982; Escobar y col., 1982).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, realizamos un análisis retrospectivo sobre 247 pacientes FOP que fueron derivadas a nuestro laboratorio entre 1982 y 2002, para la determinación de Ig-R-FSH. Encontramos que, de las 247 pacientes FOP, sólo aquellas 23 que habían sido previamente diagnosticadas como SOR presentaban Ig-R-FSH circulantes (Figura 13). En estas pacientes, el diagnóstico de SOR fue realizado de acuerdo con los criterios antes presentados (Materiales y Métodos), teniendo en cuenta principalmente la histología observada en la biopsia ovárica (en 20 de los casos), o las imágenes de la ultrasonografía (en las 3 restantes).

Por otro lado, en ninguno de los 60 sueros provenientes de mujeres con ciclos menstruales regulares y sin evidencias de enfermedades autoinmunes, se detectó la presencia de estos anticuerpos (Figura 13).

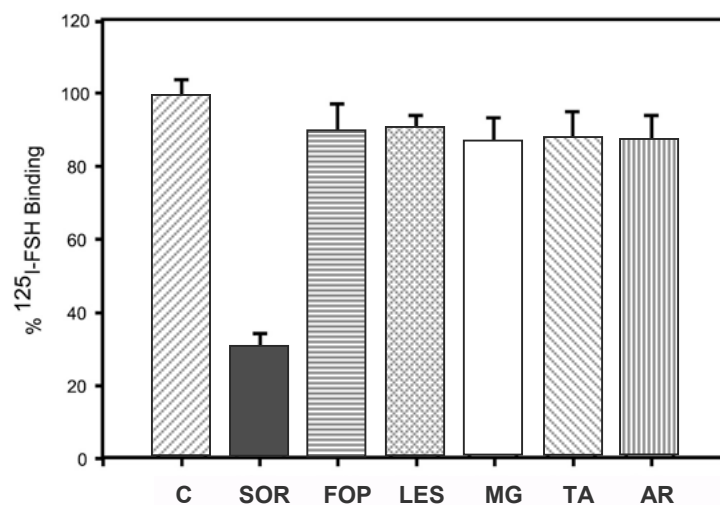


Figura 13: Unión específica de FSH a membranas preincubadas con diferentes fracciones de inmunoglobulinas. Las fracciones de inmunoglobulinas purificadas se incubaron con las preparaciones de membranas de testículos de ratas. Luego del agregado de $[^{125}\text{I}]$ -hFSH y DPBS-BSA con o sin un exceso de hormona no marcada, se determinó la cantidad de hormona marcada unida a su sitio receptor, según se explica en “Materiales y Métodos”. C: fracciones de IgG provenientes de los 60 individuos controles; SOR: fracciones de IgG de sueros de las 23 pacientes SOR; FOP: fracciones de IgG de sueros de los 224 casos de FOP no clasificables. En la figura también se muestra el pegado específico de FSH en presencia de fracciones de inmunoglobulinas purificadas de sueros de mujeres con enfermedades autoinmunes y ciclos menstruales regulares: LES, dos mujeres con lupus eritematoso sistémico; MG, 28 mujeres con miastenia grave; TA, 5 mujeres con tiroiditis autoinmune; y AR, 5 mujeres con artritis reumatoidea. Los resultados se expresan como el porcentaje de la unión específica de FSH a membranas preincubadas con buffer. Los datos se expresan como la media \pm ES.

En la Figura 14 se muestran los ED_{50} de las Ig-R-FSH correspondientes a 20 de las 23 pacientes positivas, calculados a partir de los ensayos de *binding*. Como se observa en la figura, el título de estos anticuerpos varía considerablemente entre las distintas pacientes.

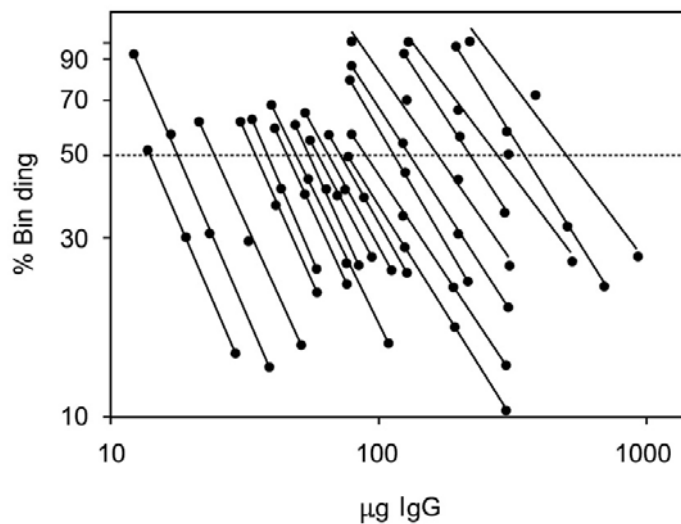


Figura 14: Porcentaje de FSH unido a su receptor en presencia de diferentes cantidades de fracciones de inmunoglobulinas purificadas de sueros de las pacientes con Ig-R-FSH. Se utilizaron membranas de testículo de ratas como fuente de receptores de FSH. Cantidades crecientes de IgGs purificadas obtenidas de sueros de pacientes se agregaron a una cantidad constante, cercana a saturación, de hFSH iodinado, y se calculó el porcentaje de inhibición del binding, según se describe en “Materiales y Métodos”. El ED50 correspondiente a la fracción de inmunoglobulinas de cada paciente (línea punteada) se calculó como la cantidad de inmunoglobulinas necesaria para reducir el pegado total de FSH en un 50%.

- Mecanismo de inhibición de la unión de FSH a su receptor

En la figura 15 se ilustran los “Scatchard plots” correspondientes a 10 de las 23 pacientes que presentaban Ig-R-FSH. Los resultados confirman claramente que la actividad inhibitoria de las fracciones de inmunoglobulinas puede ser clasificada en dos grupos. Un grupo en el que se observa una marcada reducción en el número total de sitios libres de unión cuando los receptores se enfrentan a las fracciones de inmunoglobulinas. En este caso, la K_i aparente es $2,94 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, mil veces mayor que la constante de afinidad de la FSH por su receptor ($K_a = 3,86 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), lo cual sugiere que el efecto inhibitorio sería de naturaleza *irreversible*. El otro grupo de pacientes,

presentó un mecanismo de inhibición *reversible* con una K_i aparente similar a la constante de afinidad de la FSH por su receptor.

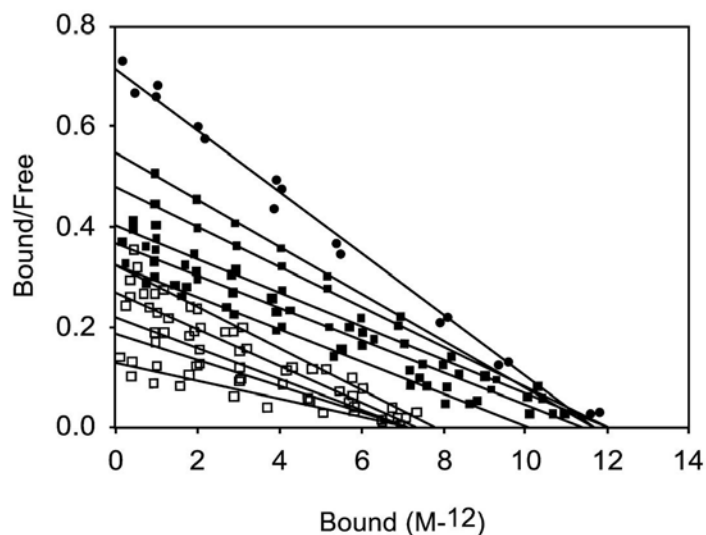


Figura 15: Gráficos de “Scatchard” derivados de las curvas de saturación del pegado de FSH a membranas de testículos de ratas. Cuatrocientos microgramos de IgG obtenidas de sueros de 10 de las pacientes con Ig-FSHR se agregaron a cada tubo de incubación conteniendo las membranas de testículo de rata. Posteriormente, se agregaron concentraciones crecientes de hFSH iodinada (10^{-11} a 10^{-9} M), según se explicó en “Materiales y Métodos”. Se observaron dos tipos de fracciones de inmunoglobulinas, uno con una constante de unión similar a la constante de afinidad de la hormona por su receptor, y otro grupo con una constante de afinidad 1000 veces mayor, resultando en una unión irreversible. ● Control, incubación en ausencia de fracciones de inmunoglobulinas; ■ sueros de pacientes con anticuerpos de baja afinidad; □ sueros de pacientes con anticuerpos de alta afinidad.

- Asociación con enfermedades autoinmunes

En concordancia con lo descrito en la literatura, observamos una fuerte asociación entre la FOP y la presencia de desórdenes autoinmunes, principalmente tiroiditis autoinmune (22.7 %), artritis reumatoidea (2.8%), lupus eritematoso sistémico (0.8%) y vitiligo (0.8%). Sin embargo, cuando se estudiaron sueros provenientes de mujeres con algún desorden autoinmune, como lupus eritematoso sistémico, artritis

reumatoidea y tiroiditis autoinmune, pero con ciclos regulares, no se detectó la presencia de Ig-R-FSH (Figura 13).

Además, 10 de las 23 pacientes que presentaban Ig-R-FSH circulantes y que habían sido diagnosticadas como ROS, tenían miastenia grave asociada a la falla ovárica. No obstante, las fracciones de inmunoglobulinas provenientes de 28 sueros de mujeres con miastenia grave pero con ciclos regulares no presentaban estos anticuerpos circulantes (Figura 13).

2. ASPECTOS MOLECULARES DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA

2.1. Gen del receptor de FSH (R-FSH)

En este apartado, estudiamos la presencia de mutaciones y/o polimorfismos en los exones 1 al 10 del gen del receptor de FSH (R-FSH) en 20 pacientes FOP de nuestra población, y en 44 controles con fertilidad comprobada.

-Estudio de la mutación inactivante C566T

La mutación inactivante C566T, descrita por Aittomäki y col. (1995), fue estudiada mediante digestión con la enzima de restricción BsmI. En todos los pacientes y controles, el producto de PCR de 78 bp que comprende al nucleótido 566 del exón 7, rindió dos fragmentos de 51 pb y 27 pb. Por lo tanto, demostramos en la población estudiada, la ausencia de alelos mutados. (Figura 16, panel A).

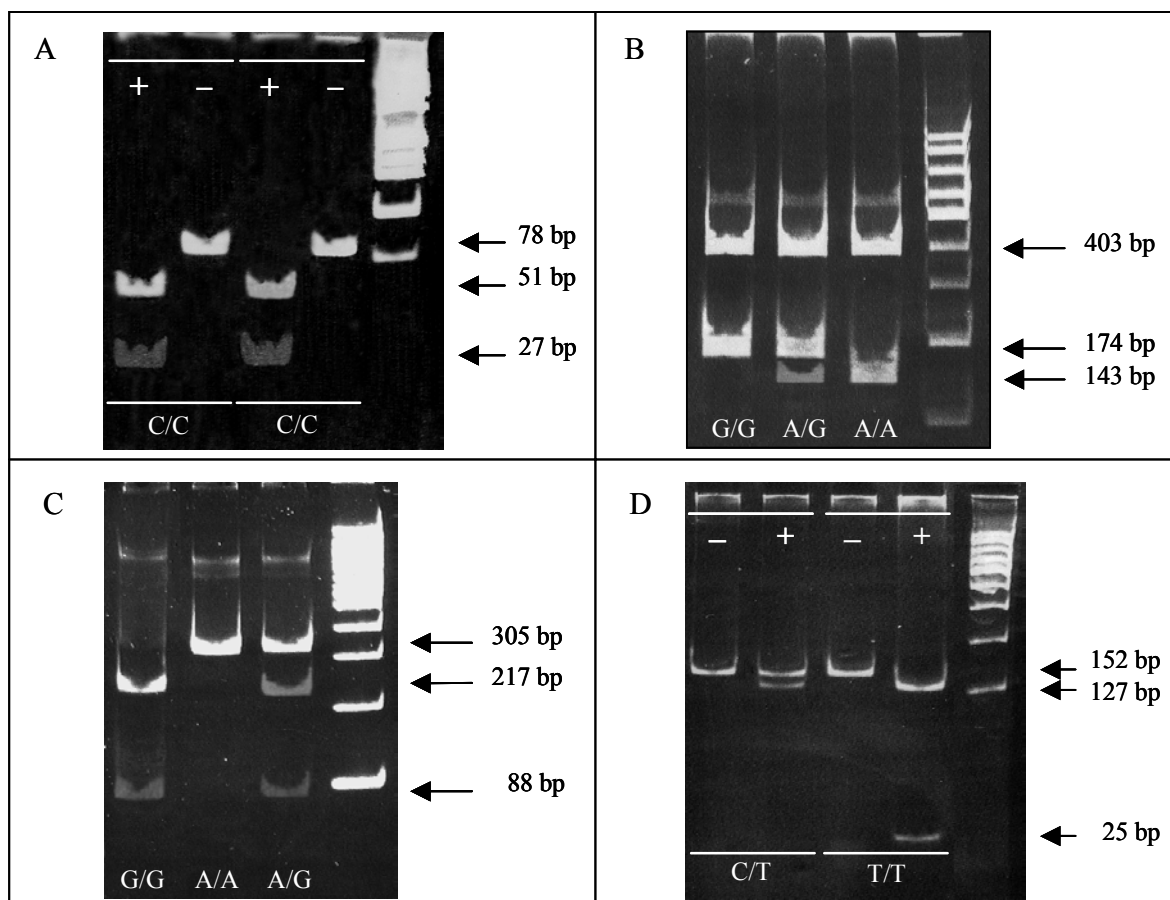


Figura 16. Análisis de la secuencia del gen del R-FSH mediante digestión con enzimas de restricción.

A. Con el fin de estudiar la presencia de la mutación inactivante C566T, el producto de PCR de 78 pb que comprende dicho nucleótido fue digerido con la enzima de restricción BsmI. Todos los productos de PCR rindieron dos fragmentos de 51 y 27 pb, indicando la ausencia de alelos mutados (T). **B.** El polimorfismo A919G fue estudiado mediante digestión con la enzima de restricción AhdI. En la figura se muestran, como ejemplos representativos, una muestra homocigota G/G, que rinde dos fragmentos de 403 pb y 174 pb, una muestra homocigota A/A que rinde tres fragmentos de 403 pb, 143 pb y 31 pb, y una muestra heterocigota. **C.** El polimorfismo A2039G fue analizado mediante digestión con la enzima de restricción BsrI. En la figura se muestran, como ejemplos representativos, una muestra homocigota G/G, que rinde dos fragmentos de 217 pb y 88 pb, una muestra homocigota A/A, indicada por la presencia de un único fragmento de 305 pb, y una muestra heterocigota. **D.** La sustitución T1022C fue estudiada mediante “mismatch-PCR” que crea un sitio de restricción para la enzima BstXI en el alelo nativo (T). El producto de PCR de 152 pb permanece sin digerir en el alelo mutado (C), mientras que rinde dos fragmentos de 127 y 25 pb en el alelo T. Se muestran, como ejemplos representativos, una muestra heterocigota T/C y una muestra homocigota para la secuencia nativa. **A y D:** (-): producto de PCR incubado 16 hs en ausencia de enzima de restricción. (+): producto de PCR incubado 16 hs en presencia de enzima de restricción.

- Análisis por SSCP de los exones 1 al 9

Los productos de PCR de los exones 1 al 9 se evaluaron por medio de la técnica de SSCP (“single stranded conformation polymorphysm”: polimorfismo conformacional de cadena simple) para el estudio de posibles mutaciones. La técnica se basa en la presencia de un patrón de migración diferente de la/s muestra/s con mutación respecto a la migración observada para la secuencia salvaje. En las figuras 17 a 25 se muestran geles representativos de las tres condiciones de electroforesis elegidas para el estudio de cada exón.

No observamos patrones de migración anormales en las SSCP de los exones 1 al 9 en ninguna de las pacientes y controles analizados. En algunos casos, sin embargo, observamos un patrón de migración que resultaba dudoso, por lo que nuevos productos de PCR se estudiaron por secuenciación directa. No se encontraron mutaciones en ninguno de ellos.

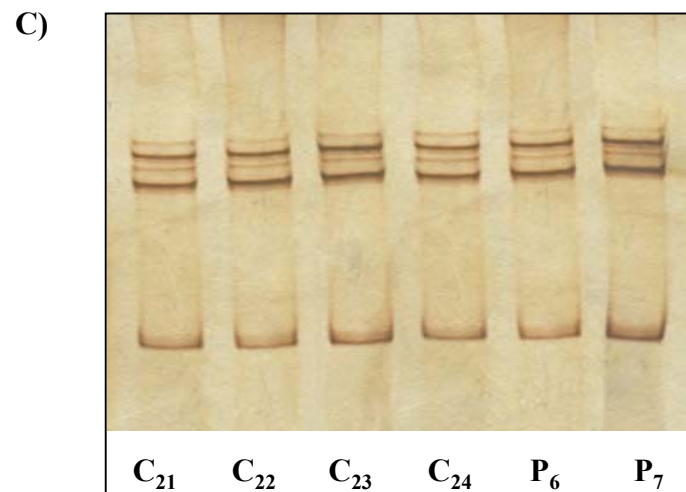
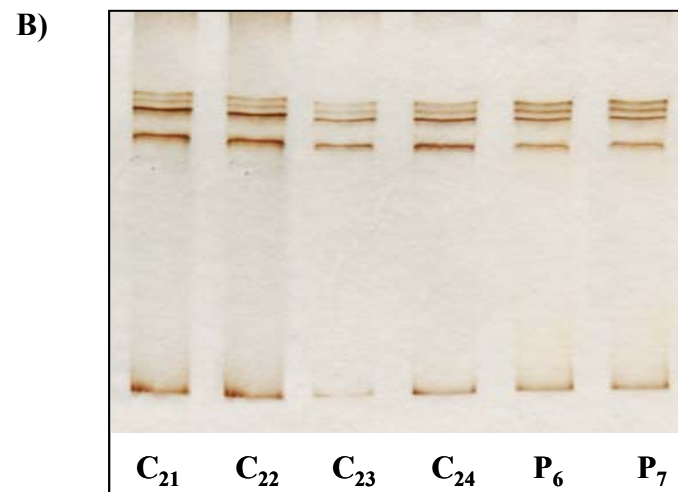
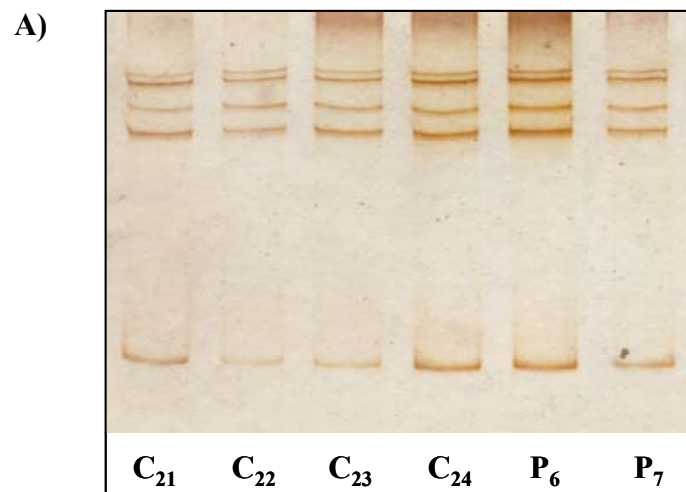


Figura 17. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 1 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida-bisacrilamida 12% - 4°C; B) Acrilamida-bisacrilamida 12% + Glicerol 5% - 4°C; C) Acrilamida-bisacrilamida 8% + Glicerol 5% - 20°C.

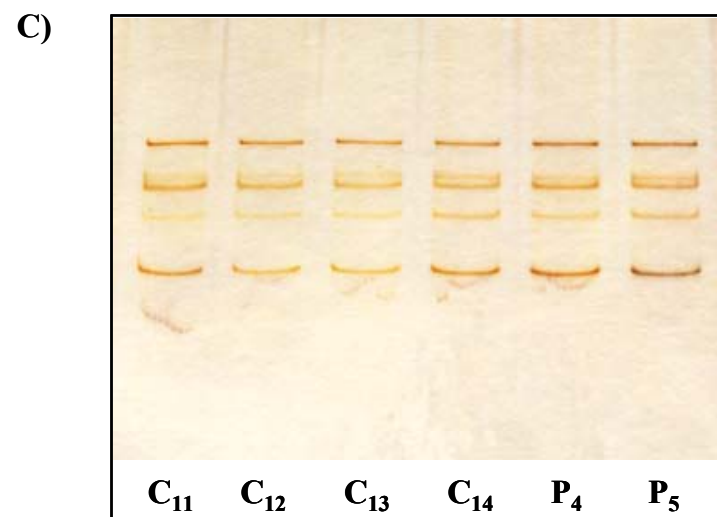
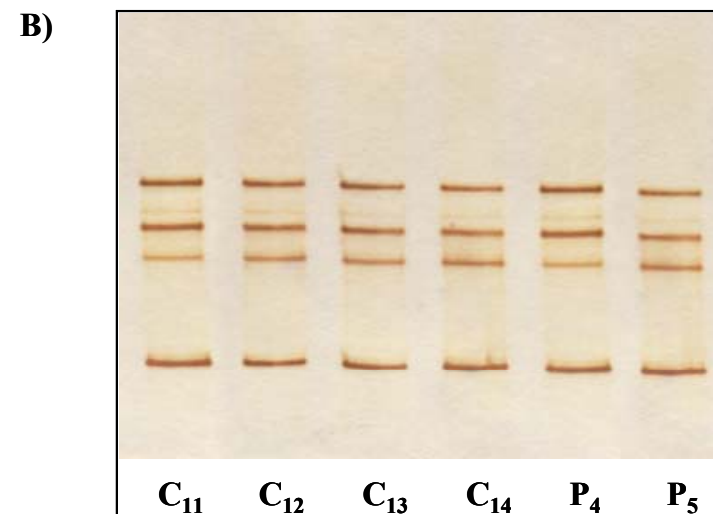
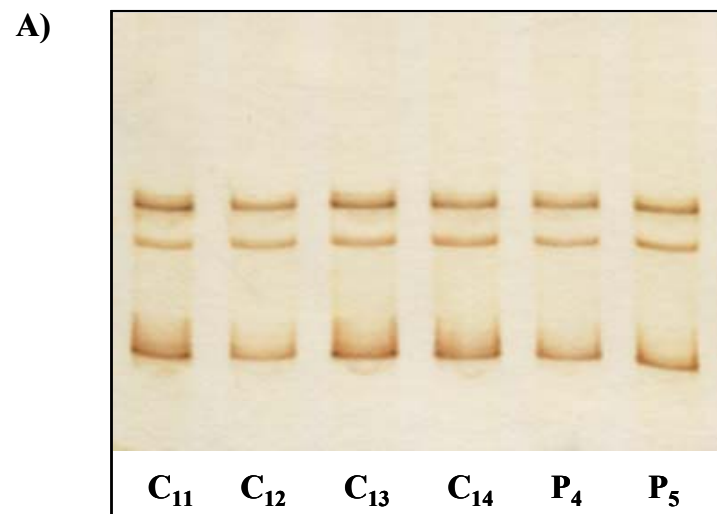


Figura 18. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 2 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida-bisacrilamida 12% - 20°C; B) Acrilamida-bisacrilamida 12% + Glicerol 5% - 4°C; C) Acrilamida-bisacrilamida 15% - 4°C.

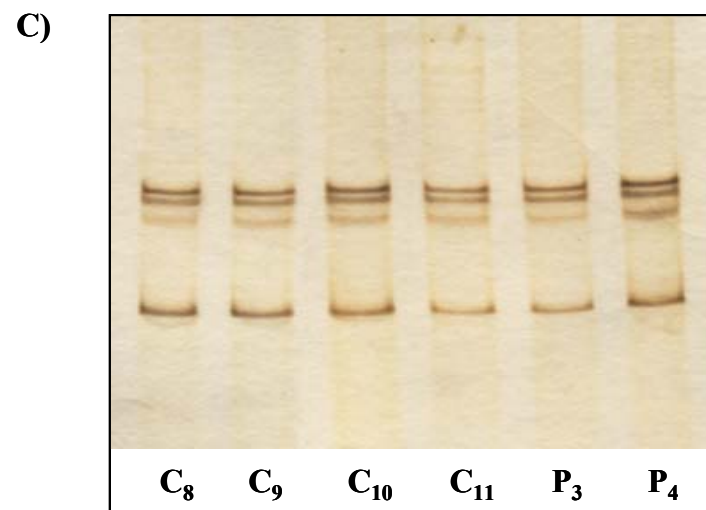
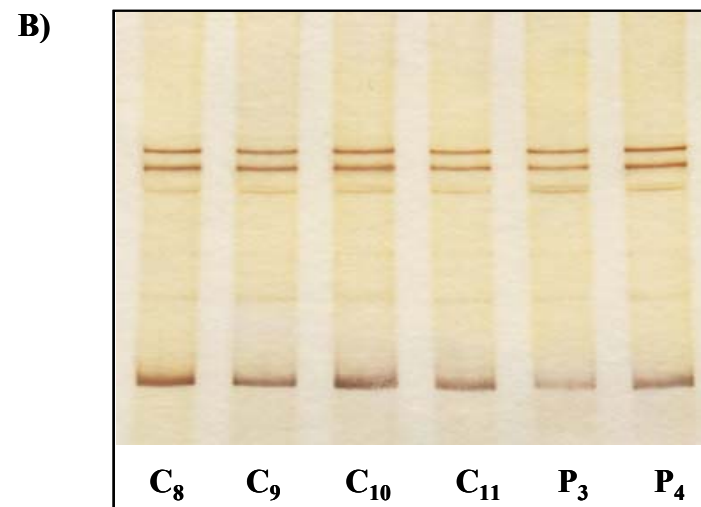
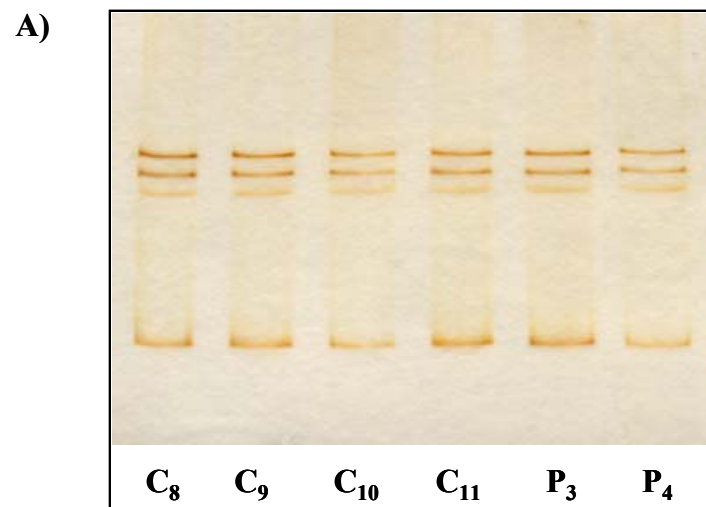


Figura 19. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 3 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida-bisacrilamida 15% + Glicerol 5% - 20°C; B) Acrilamida-bisacrilamida 15% + Glicerol 5% - 4°C; C) Acrilamida-bisacrilamida 8% - 20°C;

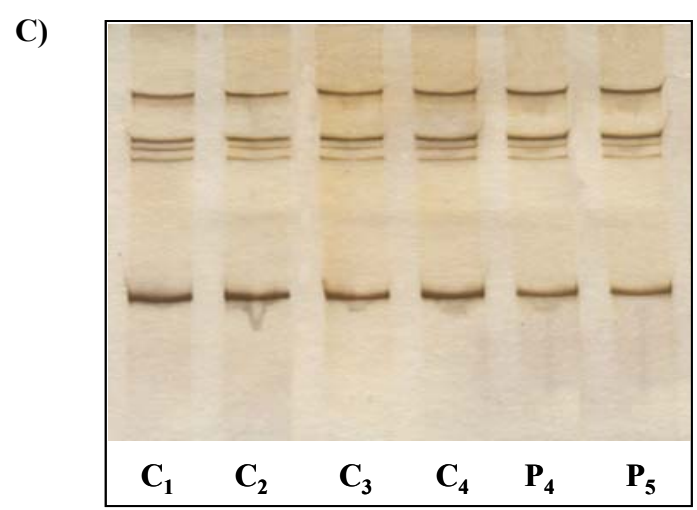
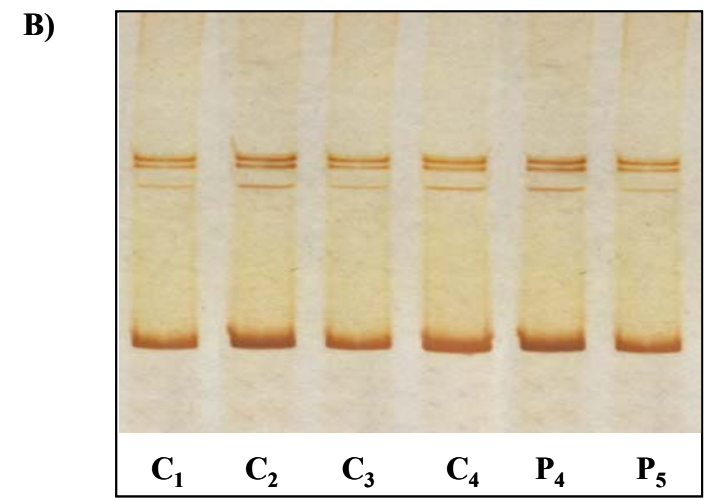
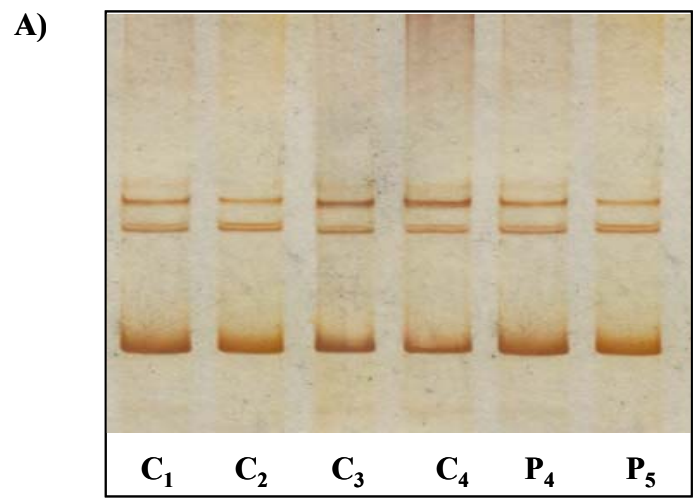


Figura 20. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 4 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida-bisacrilamida 12% - 20°C; B) Acrilamida-bisacrilamida 12% + Glicerol 5% - 20°C; C) Acrilamida-bisacrilamida 15% + Glicerol - 4°C.

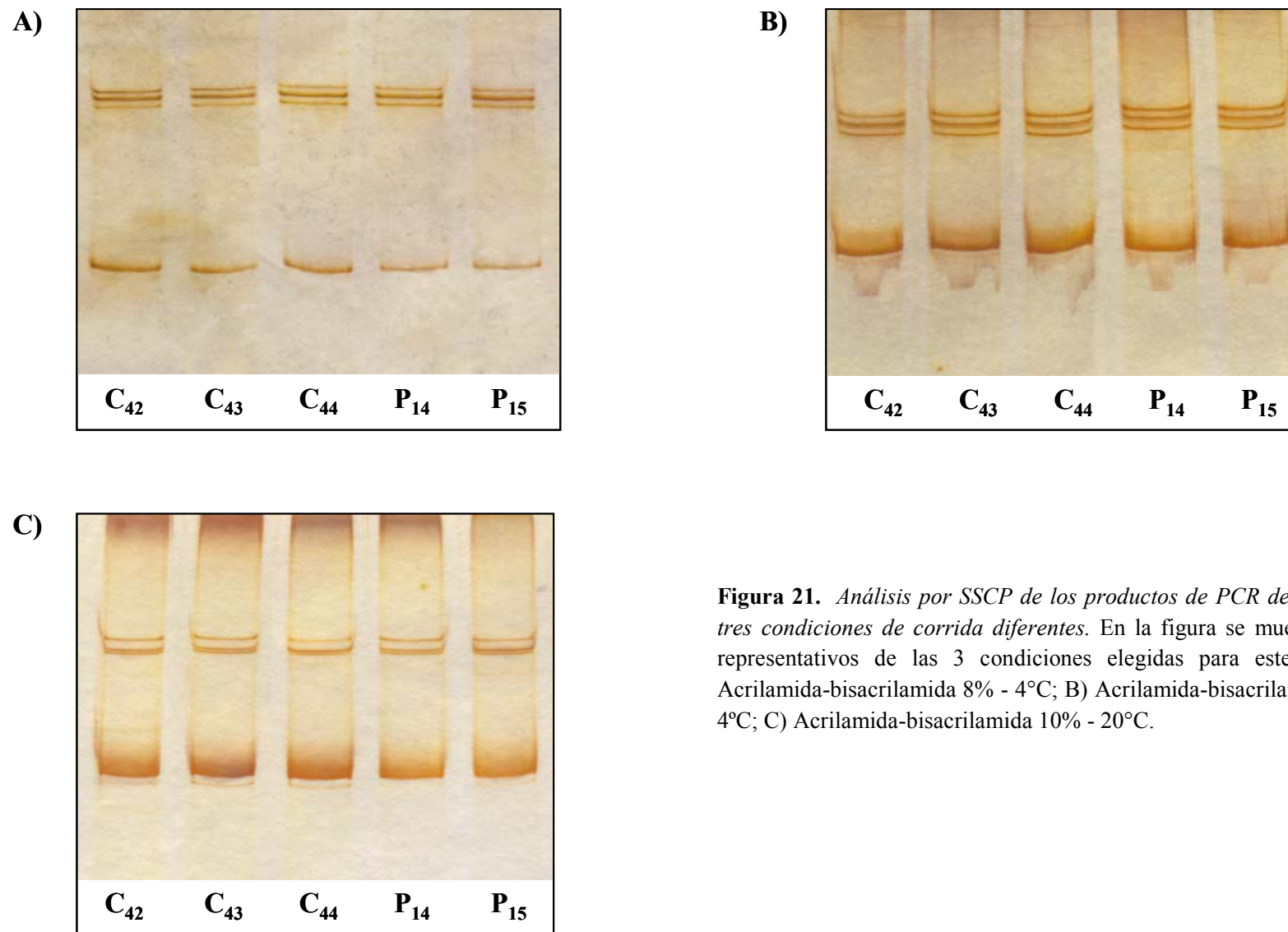


Figura 21. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 5 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida-bisacrilamida 8% - 4°C; B) Acrilamida-bisacrilamida 12% - 4°C; C) Acrilamida-bisacrilamida 10% - 20°C.

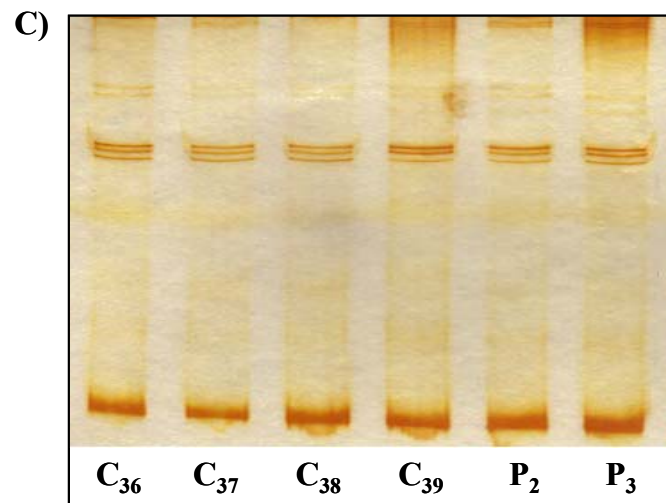
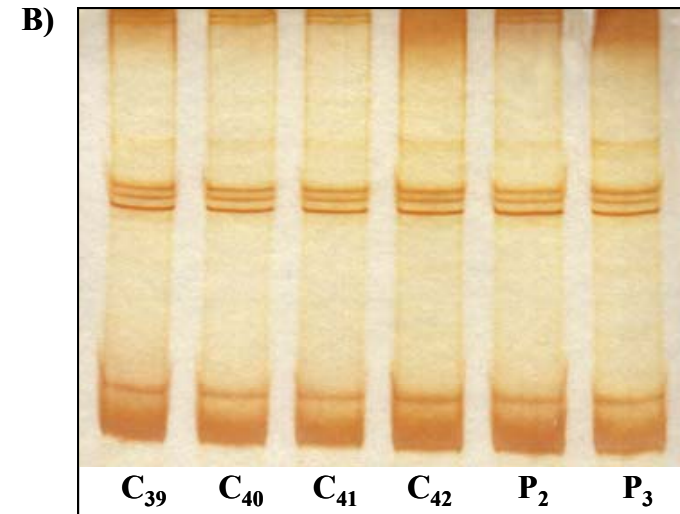
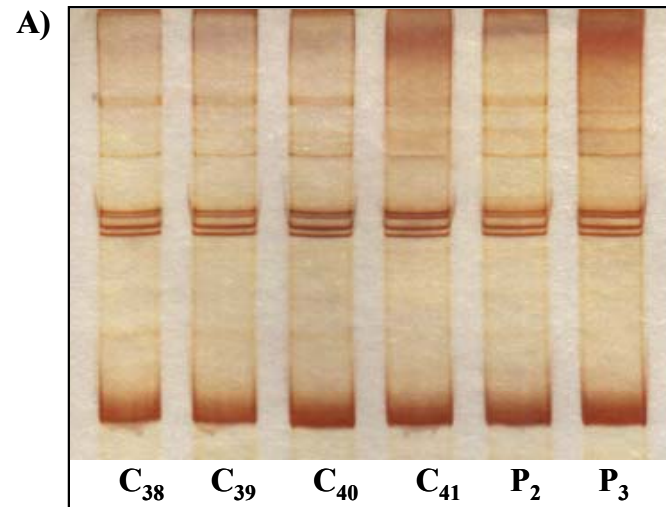


Figura 22. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 6 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida - bis acrilamida 8% - 20°C; B) Acrilamida - bis acrilamida 12% - 4°C; C) Acrilamida - bis acrilamida 12% + 5% Glicerol - 4°C.

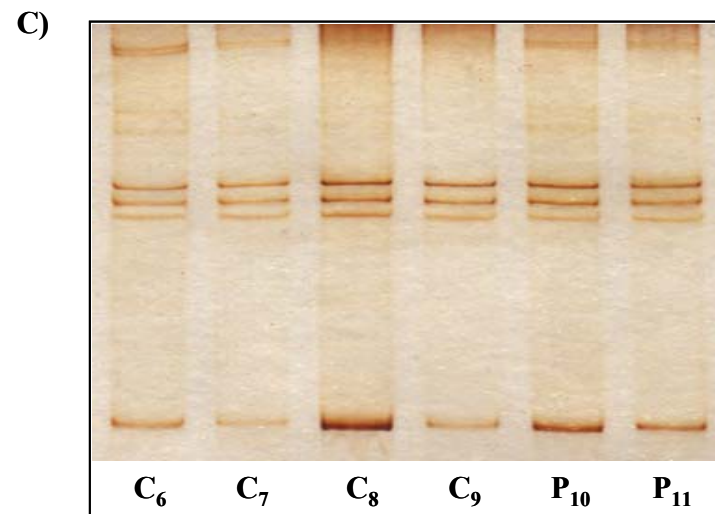
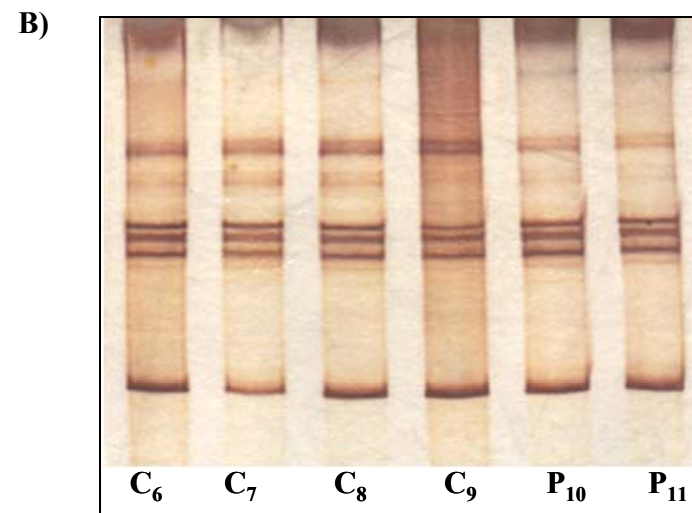
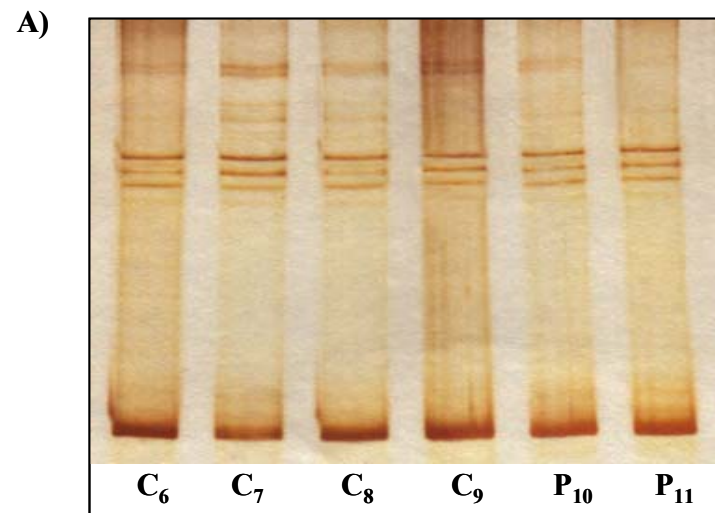


Figura 23. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 7 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida – bis acrilamida 12% + 5% Glicerol - 20°C; B) Acrilamida – bis acrilamida 8% - 4°C; C) Acrilamida – bis acrilamida 12% - 4°C.

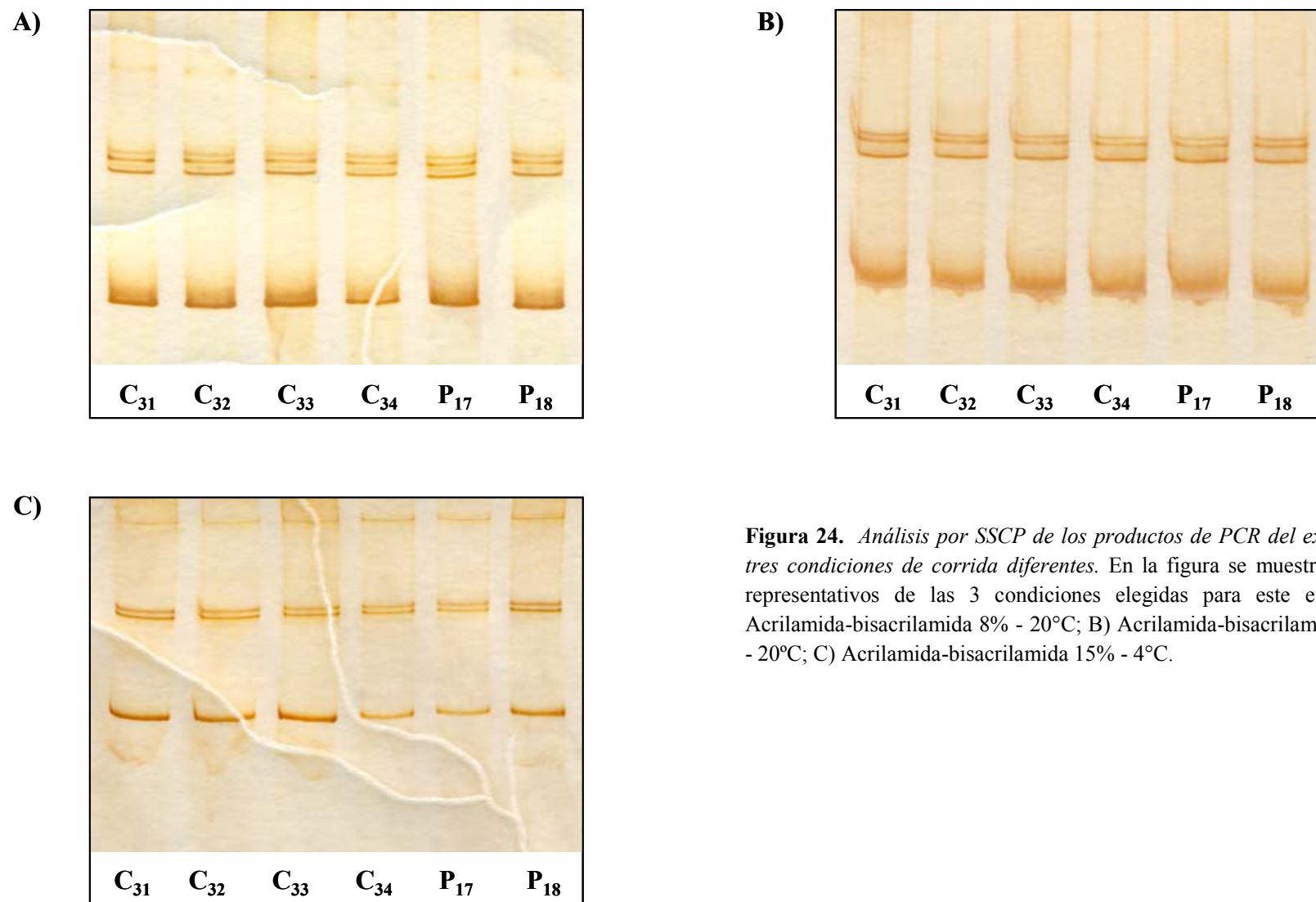


Figura 24. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 8 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida-bisacrilamida 8% - 20°C; B) Acrilamida-bisacrilamida 12% - 20°C; C) Acrilamida-bisacrilamida 15% - 4°C.

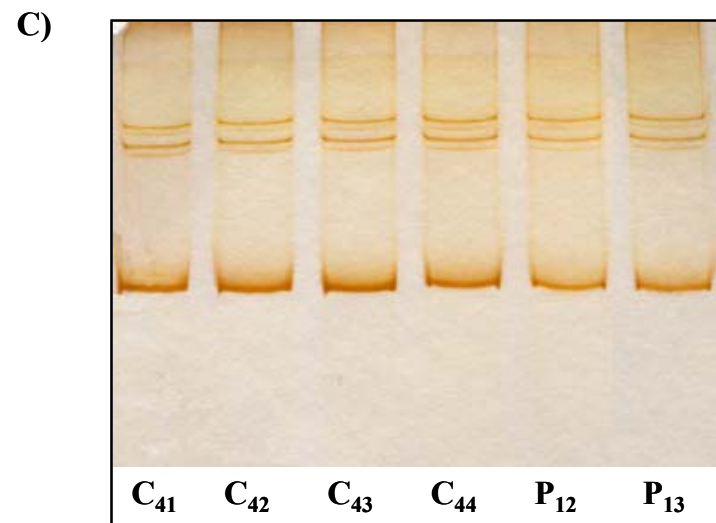
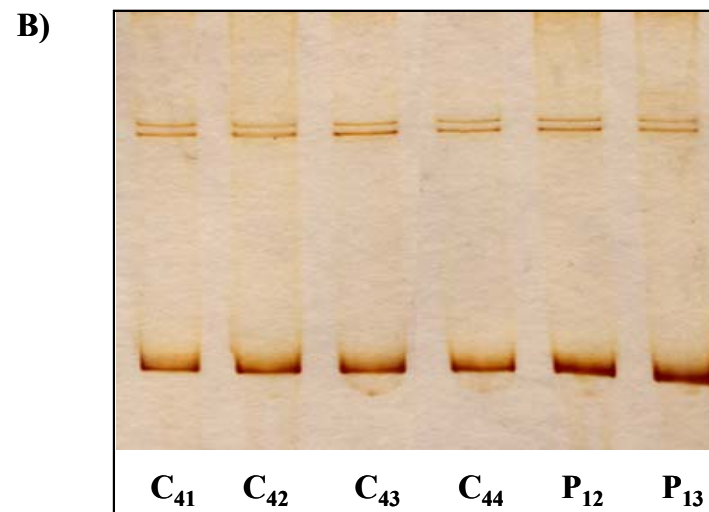
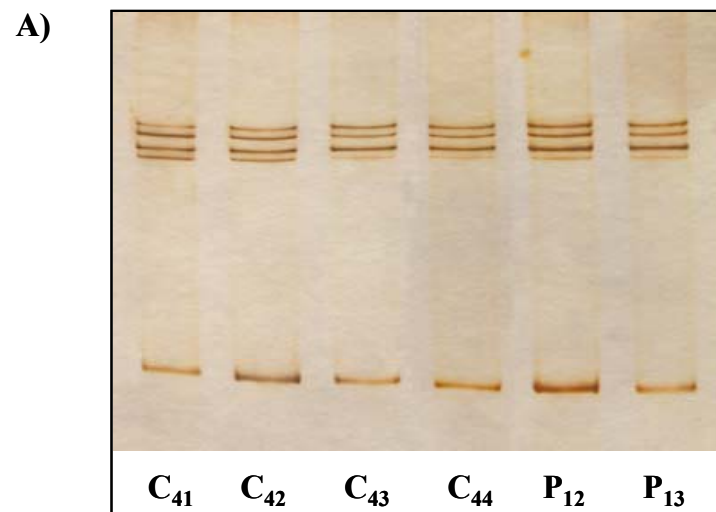


Figura 25. Análisis por SSCP de los productos de PCR del exón 9 en tres condiciones de corrida diferentes. En la figura se muestran geles representativos de las 3 condiciones elegidas para este exón. A) Acrilamida-bisacrilamida 12% - 4°C; B) Acrilamida-bisacrilamida 12% + 5% glicerol - 20°C; C) Acrilamida-bisacrilamida 15% - 20°C.

- Estudio del exón 10

Teniendo en cuenta que el exón 10 posee alta homología de secuencia con otros receptores -sugiriendo la presencia de dominios funcionales importantes- y que se han descrito mutaciones en el dominio transmembrana de otros receptores acoplados a proteína G como causantes de diferentes enfermedades (Themmen y Huhtaniemi, 2000), el mismo fue estudiado mediante secuenciación directa. Nuestro análisis, reveló la presencia de dos polimorfismos ya descritos: A919G (aminoácido 307) y A2039G (aminoácido 680) (Aittomaki y col., 1995; Simoni y col., 1997). En el codón 307 las secuencias alternativas encontradas fueron ACT ó GCT, correspondientes a la sustitución aminoacídica Thr³⁰⁷Ala, mientras que en el codón 680 la sustitución alternativa fue AAT ó AGT, correspondiente al cambio aminoacídico Asn⁶⁸⁰Ser.

En las figuras 26 y 27 se muestran, como ejemplos representativos, los electroferogramas correspondientes a los tres genotipos encontrados en cada sitio polimórfico.

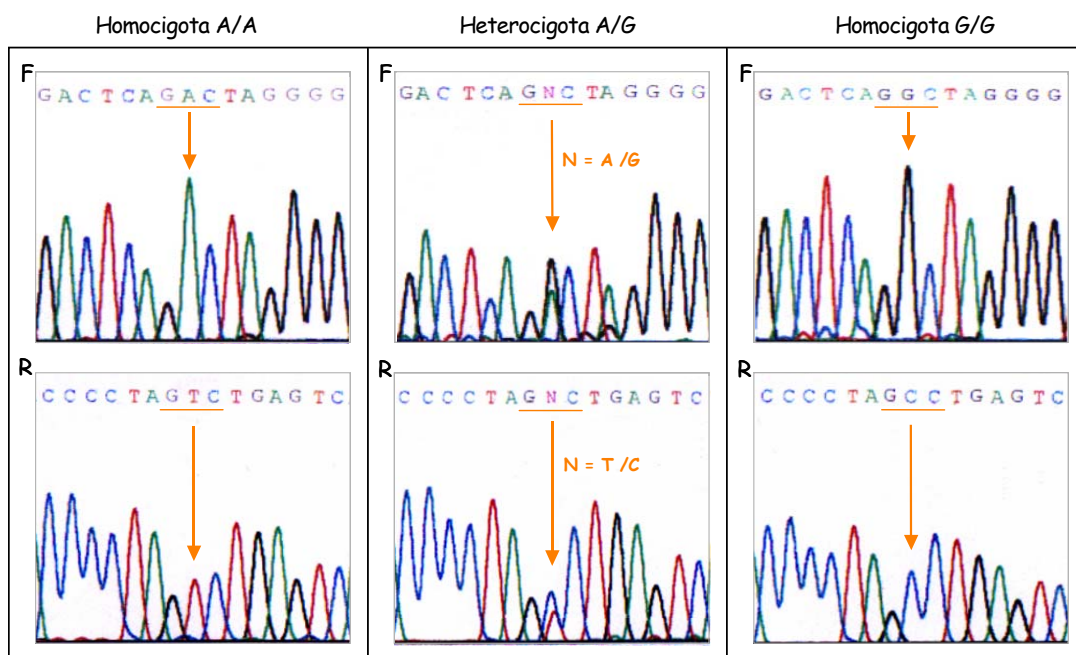


Figura 26. Polimorfismo A919G. El análisis del exón 10 mediante secuenciación directa reveló la presencia del polimorfismo A919G (aminoácido 307). En la figura se muestran, los electroferogramas correspondientes a una muestra homocigota A/A, una muestra heterocigota, y una homocigota G/G. F: secuenciado con el iniciador 10AF; R: secuenciado con el iniciador 10AR.

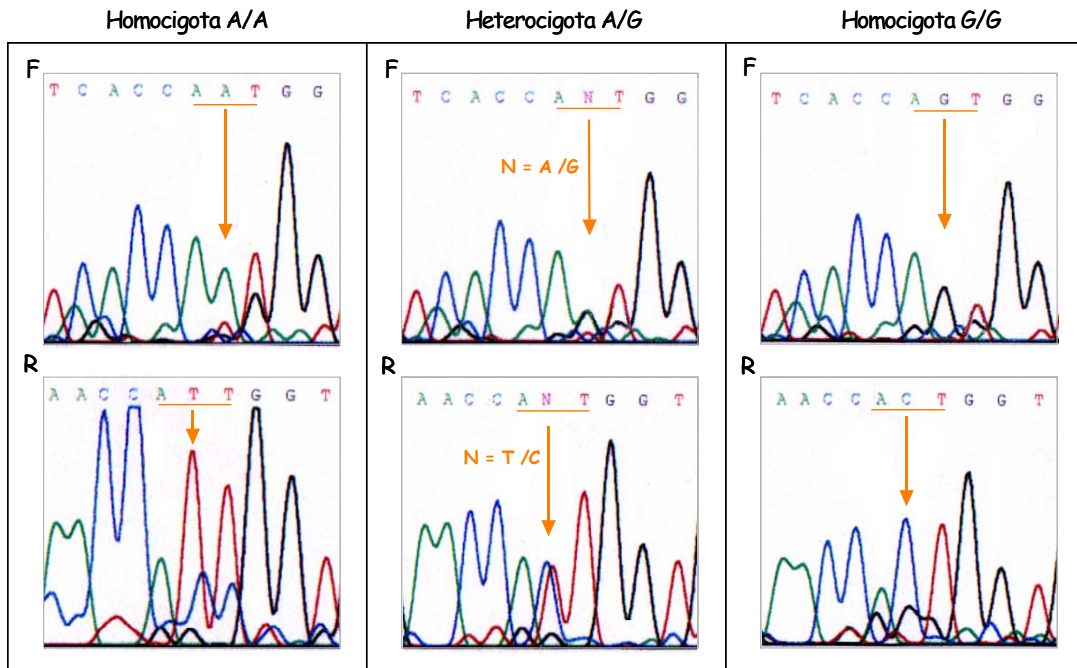


Figura 27. Polimorfismo A2039G. El análisis del exón 10 mediante secuenciación directa reveló la presencia del polimorfismo A2039G (aminoácido 680). En la figura se muestran los electroferogramas correspondientes a una muestra homocigota A/A, una muestra heterocigota, y una homocigota G/G. F: secuenciado con el iniciador 10CF; R: secuenciado con el iniciador 10CR.

- Estudio de los polimorfismos del exón 10 mediante digestión con enzimas de restricción.

Posteriormente, ambos polimorfismos se estudiaron en los 39 controles que no fueron secuenciados mediante digestión con enzimas de restricción. El producto de PCR de 577 bp que comprende al nucleótido 919, fragmento 10A, fue digerido con la enzima AhdI (Figura 16, panel B). Por otro lado, el producto de PCR de 305 pb que comprende al nucleótido 2039, fragmento 10C, fue digerido con la enzima BsrI. (Figura 16, panel C). Los genotipos hallados en todos los controles y pacientes estudiados, se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Genotipos de los polimorfismos A919G y A2039G del exón 10 del gen del receptor de FSH.

Control	A919G	A2039G
C1	A/G	A/G
C2	A/A	A/A
C3	A/A	A/A
C4	G/G	G/G
C5	A/G	A/G
C6	A/G	A/G
C7	A/A	A/A
C8	A/A	A/A
C9	A/G	A/G
C10	A/A	A/A
C11	A/G	A/G
C12	A/G	A/G
C13	A/G	A/G
C14	G/G	G/G
C15	A/G	A/G
C16	A/A	A/A
C17	A/G	A/G
C18	A/G	A/G
C19	G/G	G/G
C20	A/A	A/A
C21	A/A	A/A
C22	A/G	A/G

Control	A919G	A2039G
C23	A/A	A/A
C24	G/G	G/G
C25	A/G	A/G
C26	A/A	A/A
C27	G/G	G/G
C28	A/G	A/G
C29	A/G	A/G
C30	A/G	A/G
C31	A/G	A/G
C32	G/G	G/G
C33	A/A	A/A
C34	A/A	A/A
C35	A/A	A/A
C36	A/G	A/G
C37	A/G	A/G
C38	A/A	A/A
C39	G/G	G/G
C40	G/G	G/G
C41	A/G	A/G
C42	G/G	G/G
C43	G/G	G/G
C44	A/G	A/G

Paciente	A919G	A2039G
FOP 1	A/G	A/G
FOP 2	A/G	A/G
FOP 3	A/G	A/G
FOP 4	G/G	G/G
FOP 5	A/G	A/G
FOP 6	A/G	A/G
FOP 7	A/G	A/G
FOP 8	A/G	A/G
FOP 9	A/G	A/G
FOP 10	A/G	A/G
FOP 11	G/G	G/G
FOP 12	A/A	A/A
FOP 13	A/A	A/A
FOP 14	A/G	A/G
FOP 15	G/G	G/G
FOP 16	A/A	A/A
FOP 17	G/G	G/G
FOP 18	A/A	A/A
FOP 19	A/A	A/A
FOP 20	G/G	G/G

Nota: FOP 1 a FOP 5: pacientes con diagnóstico de SOR.

Tabla 9. Genotipos y frecuencias alélicas de los polimorfismos del exón 10 del gen del receptor de FSH, observados en individuos controles y en pacientes FOP.**A.**

	Genotipo	CONTROL n/total	FOP n/total	FOP-SOR n/total	SOR n/total
919-2039	A-A/A-A	14/44	5/20	5/15	0/5
919-2039	A-A/G-G	20/44	10/20	6/15	4/5
919-2039	G-G/G-G	10/44	5/20	4/15	1/5

OR_{GG vs. AG} = 1,00 ; IC_{95%} = 0.22-4.46

OR_{GG vs. AA} = 1,40 ; IC_{95%} = 0.25-7.87

B.

	Alelo	CONTROL (n/total)	FOP (n/total)	FOP – SOR (n/total)	SOR (n/total)
919-2039	A-A	0.545 (48/88)	0.500 (20/40)	0.533 (16/30)	0.400 (4/10)
919-2039	G-G	0.454 (40/88)	0.500 (20/40)	0.466 (14/30)	0.600 (6/10)

OR = 1,20; IC_{95%} = 0.53-2.71

A. Genotipos. **B.** Frecuencias Alélicas. En ambos casos, el riesgo asociado (OR) y el intervalo de confianza del 95% (CI 95%) fueron calculados comparando pacientes (FOP totales) con controles.

- Estudio de la sustitución T1022C del exón 10 .

Por otro lado, el análisis de las secuencias del fragmento 10A del exón 10 reveló la presencia de la sustitución T1022C (Val341Ala), en heterocigosis, en un sujeto control (Figura 29).

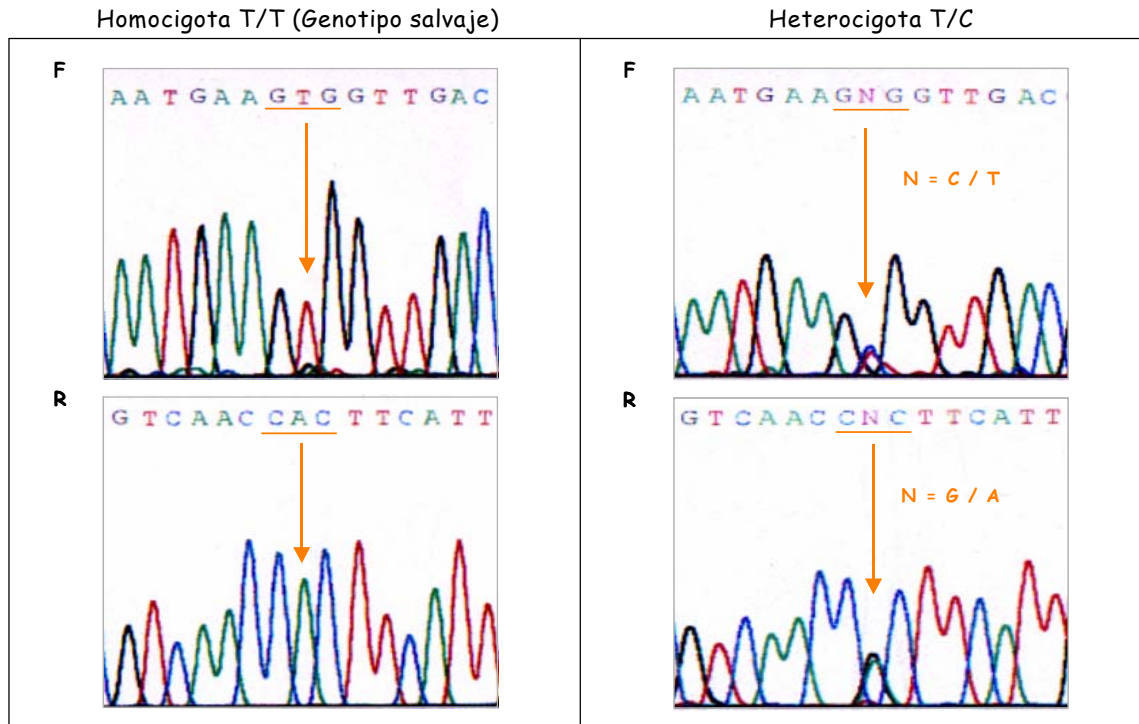


Figura 29. Sustitución T1022C (Val341Ala) del exón 10. En la figura se muestran, como ejemplos representativos, los electroferogramas correspondientes a una muestra con genotipo salvaje T/T y una muestra heterocigota T/C. F: secuenciado con el iniciador 1022F; R: secuenciado con el iniciador 1022R.

Posteriormente, estudiamos esta sustitución en los controles que no habían sido secuenciados, mediante “mismatch-PCR” seguida de digestión con la enzima de restricción BstXI (Figura 16, panel D). Del estudio realizado surgió otro individuo con la misma sustitución, también en heterocigosis.

2.2. Gen de la subunidad α de la inhibina

En el presente apartado, realizamos un análisis del gen de inhibina α (INH α) en 52 pacientes FOP y 136 individuos controles de nuestra población.

- Determinación del genotipo del polimorfismo C129T de 5'UTR

Nuestro estudio reveló la presencia del polimorfismo C129T (en 5'UTR) previamente descrito por Montgomery y col. (2000). El producto de PCR de 240 pb (fragmento A), que comprende al nucleótido 129, fue digerido con la enzima de restricción SpeI (Figura 30).

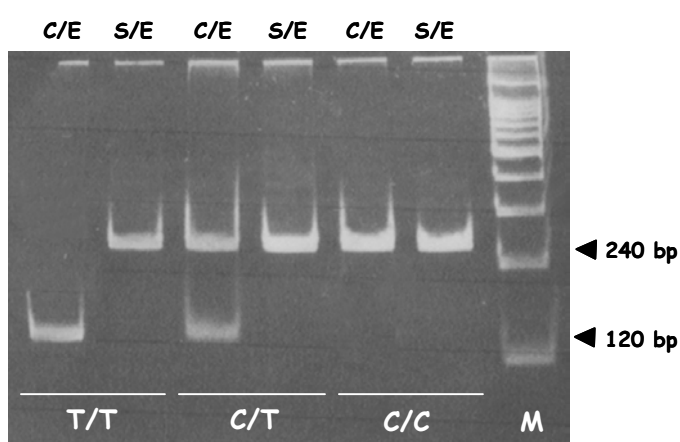


Figura 30. Digestión con la enzima de restricción Spe I, para el estudio del polimorfismo C129T. En la figura se muestran, como ejemplos representativos, una muestra homocigota para la variante T, una muestra heterocigota y una muestra homocigota para la variante C. C/E: producto de PCR incubado 16 horas a 37°C con enzima de restricción; S/E producto de PCR incubado sin enzima de restricción. M: marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, Promega, USA).

En las tablas 10, 11 y 12 se muestran los genotipos encontrados en cada uno de los controles menores de 40 años, controles mayores de 40 años y pacientes FOP, respectivamente. A partir de los mismos se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas, las que se grafican en la Figura 31.

Tabla 10. Genotipos del polimorfismo C129T y la sustitución G769A hallados en cada una de las controles menores de 40 años.

Control	C129T	G769A
C1	C/C	G/G
C2	C/C	G/G
C3	C/C	G/G
C4	T/T	G/G
C5	C/T	G/G
C6	C/T	G/G
C7	C/C	G/G
C8	C/C	G/G
C9	C/C	G/G
C10	C/C	G/G
C11	C/C	G/G
C12	C/C	G/G
C13	C/C	G/G
C14	C/T	G/G
C15	C/C	A/G
C16	C/C	A/G
C17	C/C	G/G
C18	C/C	G/G
C19	C/C	G/G
C20	C/C	G/G
C21	C/C	G/G
C22	C/C	G/G
C23	C/T	G/G
C24	C/C	G/G
C25	C/T	G/G
C26	C/C	G/G
C27	C/C	A/G
C28	T/T	G/G
C29	C/C	G/G
C30	C/C	G/G
C31	C/C	G/G
C32	C/C	A/G
C33	C/C	G/G
C34	C/C	G/G
C35	C/T	G/G
C36	C/C	A/G
C37	C/C	G/G

Control	C129T	G769A
C38	C/T	G/G
C39	C/C	G/G
C40	C/C	G/G
C41	C/C	G/G
C42	C/C	G/G
C43	C/C	G/G
C44	C/C	G/G
C45	C/T	G/G
C46	C/C	G/G
C47	C/C	G/G
C48	T/T	G/G
C49	C/C	A/G
C50	C/C	G/G
C51	C/C	G/G
C52	C/T	G/G
C53	C/T	G/G
C54	C/T	G/G
C55	C/T	G/G
C56	C/C	G/G
C57	C/C	G/G
C58	C/C	G/G
C59	C/T	G/G
C60	C/C	G/G
C61	C/T	G/G
C62	C/C	G/G
C63	C/C	G/G
C64	C/T	G/G
C65	C/C	G/G
C66	C/C	G/G
C67	C/C	G/G
C68	T/T	G/G
C69	C/C	G/G
C70	C/C	G/G
C71	C/C	G/G
C72	C/T	G/G
C73	C/C	G/G

Tabla 11. Genotipos del polimorfismo C129T y la sustitución G769A hallados en cada una de las controles mayores de 40 años.

Control	C129T	G769A
C74	C/C	G/G
C75	C/T	G/G
C76	C/T	G/G
C77	C/C	G/G
C78	C/C	G/G
C79	C/T	G/G
C80	T/T	G/G
C81	C/T	G/G
C82	C/C	G/G
C83	C/T	G/G
C84	C/C	G/G
C85	C/T	G/G
C86	C/T	G/G
C87	C/C	G/G
C88	C/C	G/G
C89	C/T	G/G
C90	C/T	G/G
C91	C/C	G/G
C92	C/T	G/G
C93	T/T	G/G
C94	C/T	G/G
C95	C/C	G/G
C96	C/C	G/G
C97	C/T	G/G
C98	C/T	G/G
C99	C/T	G/G
C100	C/T	G/G
C101	C/C	G/G
C102	C/T	A/G
C103	C/C	G/G
C104	C/T	G/G
C105	C/C	G/G

Control	C129T	G769A
C106	C/C	G/G
C107	C/C	G/G
C108	C/C	G/G
C109	C/T	G/G
C110	T/T	G/G
C111	C/C	ND
C112	C/C	G/G
C113	C/C	G/G
C114	C/C	G/G
C115	C/C	G/G
C116	C/T	G/G
C117	C/T	G/G
C118	C/C	A/G
C119	C/T	G/G
C120	C/T	G/G
C121	C/C	G/G
C122	C/C	G/G
C123	T/T	G/G
C124	ND	G/G
C125	C/C	G/G
C126	C/C	G/G
C127	C/C	G/G
C128	C/C	G/G
C129	C/C	G/G
C130	C/C	G/G
C131	C/C	G/G
C132	C/C	G/G
C133	C/C	G/G
C134	C/T	G/G
C135	C/C	G/G
C136	C/C	G/G

Tabla 12. Genotipos del polimorfismo C129T y la sustitución G769A hallados en cada una de las pacientes FOP. **A.** Pacientes FOP-I. **B.** Pacientes FOP-EA.

A.

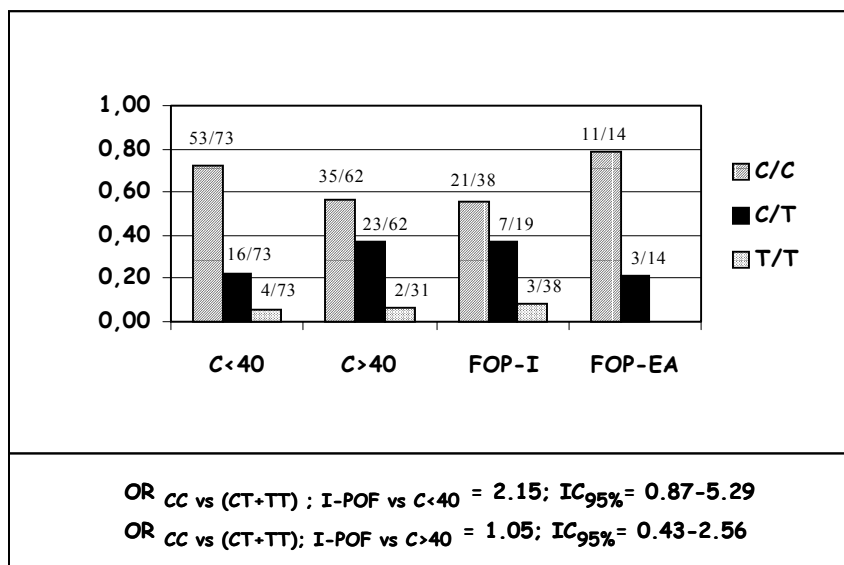
Paciente	C129T	G769A
FOP 1	C/C	G/G
FOP 2	C/C	G/G
FOP 3	C/C	G/G
FOP 4	C/T	G/G
FOP 5	C/T	G/G
FOP 6	C/C	G/G
FOP 7	C/T	G/G
FOP 8	C/T	G/G
FOP 9	C/C	G/G
FOP 10	C/T	G/G
FOP 11	C/C	G/G
FOP 12	C/T	G/G
FOP 13	C/C	G/G
FOP 14	C/C	G/G
FOP 15	C/T	G/G
FOP 16	C/T	G/G
FOP 17	C/T	G/G
FOP 18	C/T	G/G
FOP 19	C/C	G/G
FOP 20	C/C	G/G
FOP 21	C/T	G/G
FOP 22	C/T	G/G
FOP 23	C/C	G/G
FOP 24	C/C	G/G
FOP 25	C/T	G/G
FOP 26	C/C	G/G
FOP 27	T/T	G/G
FOP 28	C/C	G/G
FOP 29	T/T	G/G
FOP 30	C/T	G/G
FOP 31	C/C	G/G
FOP 32	C/C	G/G
FOP 33	C/C	G/G
FOP 34	T/T	G/G
FOP 35	C/C	G/G
FOP 36	C/C	G/G
FOP 37	C/C	G/G
FOP 38	C/C	G/G

B.

Paciente	C129T	G769A
FOP 39	C/C	A/G
FOP 40	C/C	G/G
FOP 41	C/T	G/G
FOP 42	C/C	G/G
FOP 43	C/C	G/G
FOP 44	C/C	G/G
FOP 45	C/C	G/G
FOP 46	C/C	G/G
FOP 47	C/C	G/G
FOP 48	C/T	G/G
FOP 49	C/C	G/G
FOP 50	C/T	G/G
FOP 51	C/C	G/G
FOP 52	C/C	G/G

Para el cálculo del riesgo asociado (OR), el alelo T fue considerado el posible factor de riesgo. Los resultados obtenidos al comparar FOP-I vs C<40 y FOP-I vs C>40 sugieren que esta variante alélica no estaría asociada al riesgo de desarrollo de FOP (Figura 31).

A.



B.

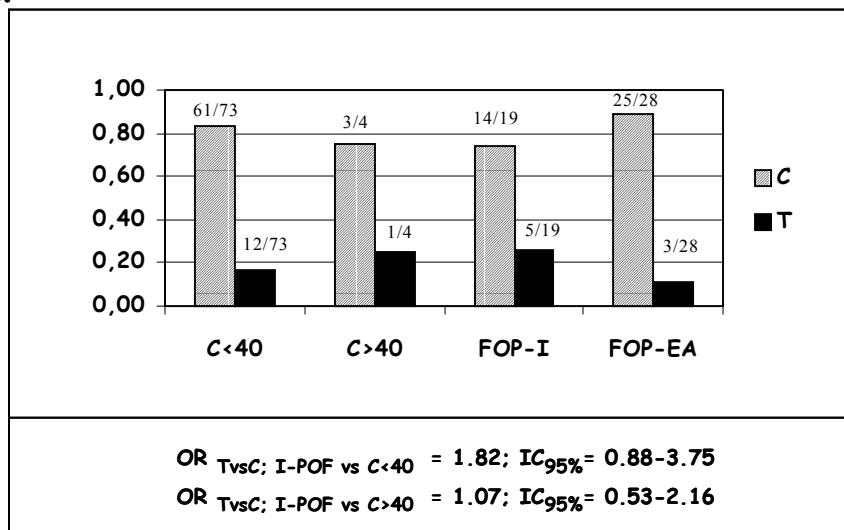


Figura 31. Polimorfismo C129T del gen *INHa* en pacientes y controles. A) Frecuencias genotípicas; B) Frecuencias alélicas. C<40: controles menores de 40 años; C>40: controles mayores de 40 años; FOP-I: pacientes con FOP idiopática; FOP-EA: pacientes con FOP asociada a enfermedad/es autoinmune/s. Para el cálculo del riesgo asociado (OR), el alelo T fue considerado el posible factor de riesgo.

- Estudio de la posible asociación entre el polimorfismo C129T y los niveles circulantes de inhibinas.

La posible implicancia del polimorfismo C129T en los niveles serológicos de inhibinas, fue analizada en individuos no afectados por la enfermedad. En un grupo de 42 mujeres controles, se determinaron los niveles de inhibina A, inhibina B y Pro- α C, y estos datos se correlacionaron con el genotipo del polimorfismo. Dado que la variante alélica T fue considerada el posible factor de riesgo, las muestras fueron separadas en dos grupos: 1) genotipo CC (n=30), y 2) genotipos CT + TT (n=12). En la tabla 13 se presentan las características clínicas y el perfil hormonal de los individuos pertenecientes a cada grupo.

CC (n=30)

	Edad (años)	Longitud de los ciclos (días)	IMC	FSH (mUI/ml)	E₂ (pg/ml)	P₄ (ng/ml)
Media \pm ES	29,72 \pm 0,75	28,13 \pm 0,32	21,17 \pm 0,60	4,52 \pm 0,25	72,67 \pm 7,33	11,46 \pm 0,61
Rango	25 – 39	25 - 32	17,13 – 27,02	1,6 – 7,4	27 – 176	5,2 – 18,6

CT+TT (n=12)

	Edad (años)	Longitud de los ciclos (días)	IMC	FSH (mUI/ml)	E₂ (pg/ml)	P₄ (ng/ml)
Media \pm ES	29,27 \pm 0,57	27,86 \pm 0,55	20,35 \pm 0,53	4,43 \pm 0,35	91,83 \pm 18,53	11,23 \pm 1,36
Rango	27 - 32	26 - 30	17,01 – 23,24	2,9 – 6,7	32 – 235	4,5 – 20,0

Tabla 13. *Características clínicas y perfil hormonal de las mujeres estudiadas para el análisis de la posible asociación entre el polimorfismo C129T y los niveles circulantes de inhibina.* Los niveles séricos de inhibina A, inhibina B y Pro- α C se determinaron en 42 individuos controles, los cuales fueron separados en dos grupos de acuerdo al genotipo del polimorfismo C129T. Panel superior: controles con genotipo CC (n=30); panel inferior: controles con genotipo CT o TT (n=12). Los valores de FSH y E₂ se midieron en las muestras que fueron extraídas en el día 7-10 (fase folicular media), mientras que los niveles de P₄ se determinaron en las muestras extraídas en el día 21-24 (fase lutea media). IMC: índice de masa corporal.

Los valores de los péptidos de inhibina de la fase folicular media (expresados como: media \pm ES (rango), en pg/ml) hallados fueron:

- Pro- α C: 145,65 \pm 20,59 (26,80-566,50), para el genotipo CC,
210,55 \pm 44,63 (75,70-599,90), para los genotipos CT+TT;
- Inhibina B: 128,09 \pm 12,31 (<16,00 – 287,40), para el genotipo CC,
130,44 \pm 20,85 (<16,00-253,60), para los genotipos CT+TT.

Los valores de la fase lutea media fueron:

- Pro- α C: 662,58 \pm 55,51 (47,10 - 1244,40), para el genotipo CC,
768,06 \pm 86,44 (378,30-1313,30), para los genotipos CT+TT;
- Inhibina A: 35,80 \pm 4,28 (7,80-101,10), para el genotipo CC,
42,73 \pm 7,86 (16,30 – 104,50), para los genotipos CT+TT.

Los valores arriba mencionados se grafican en la figura 32. No hallamos diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos control cuando comparamos los valores de los péptidos de inhibina de la fase folicular media (Pro- α C e Inhibina B), así como tampoco cuando comparamos los valores correspondientes a los péptidos de la fase lutea media (Pro- α C e Inhibina A).

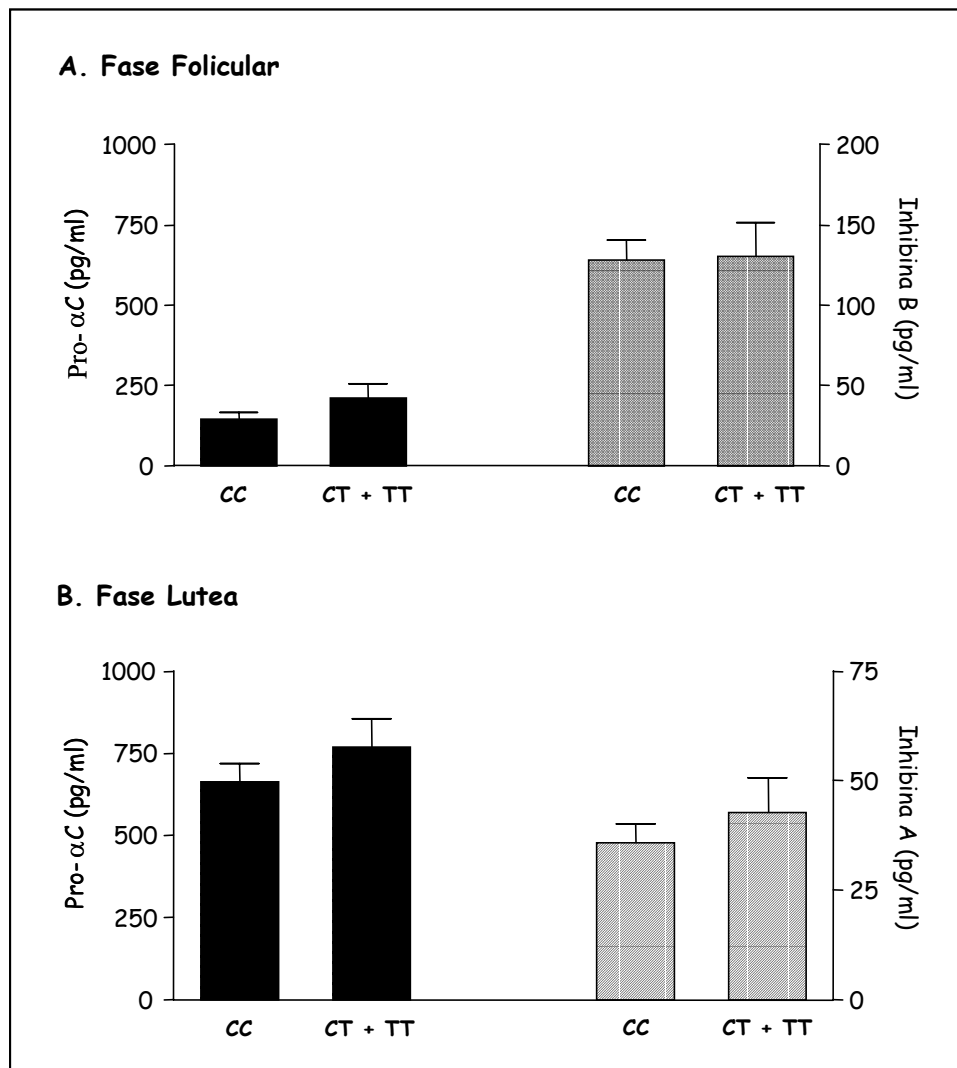


Figura 32. Análisis de la posible asociación entre el polimorfismo C129T y los niveles séricos de inhibina. Los niveles séricos de inhibina A, inhibina B y Pro- α C fueron evaluados en 42 mujeres controles. Para el análisis estadístico, la variante T fue considerada el posible factor de riesgo, y las muestra fueron separadas en dos grupos de acuerdo al genotipo presentado: CC y CT + TT. No se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$) al comparar los niveles de los péptidos de inhibina correspondientes a la fase folicular media (Pro- α C e Inhibina B) (panel superior), así como tampoco al comparar los niveles de los péptidos de la fase lutea media (Pro- α C e Inhibina A) (panel inferior). Los datos se expresan como media \pm ES.

- Determinación del genotipo de la sustitución G769A del exón 2

La presencia de la sustitución G769A del exón 2 fue analizada en todos los pacientes y controles mediante digestión con enzimas de restricción. El producto de PCR de 396 pb que comprende al nucleótido 769, fragmento B, fue digerido con las enzimas BsrFI (Figura 33, panel A) y/o Fnu4HI (Figura 33, panel B).

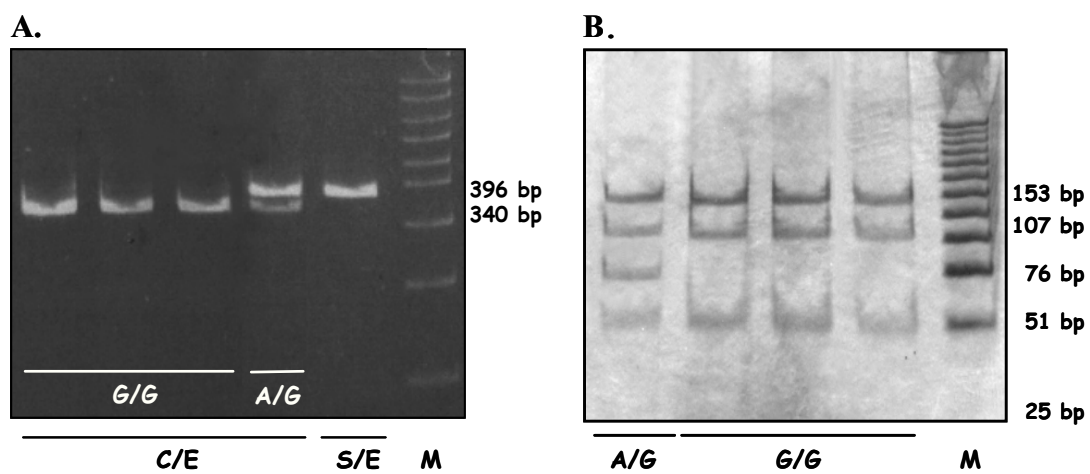


Figura 33. Digestión con enzimas de restricción, para el estudio de la sustitución G769A del exón 2.

A) Digestión con la enzima BsrF I. Se muestran, como ejemplos representativos, tres muestras homocigotas G/G y una muestra heterocigota A/G. C/E: producto de PCR incubado 16 horas a 37°C con enzima de restricción; S/E producto de PCR incubado sin enzima de restricción. M: marcador de peso molecular (50bp DNA Step Ladder, Promega, USA). **B)** Digestión con la enzima Fnu4H I. Se muestran, como ejemplos representativos, una muestra heterocigota A/G y tres muestras homocigotas G/G. M: marcador de peso molecular (25bp DNA Step Ladder, Promega, USA).

En las tablas 10, 11 y 12 se muestran los genotipos hallados en cada uno de los controles menores de 40 años, controles mayores de 40 años y pacientes FOP, respectivamente. En total, 8 de 135 controles y 1 de 52 pacientes FOP, una mujer perteneciente al grupo FOP-EA, resultaron heterocigotas para esta sustitución.

Con el fin de confirmar el genotipo heterocigota de los 9 individuos portadores la variante G769A, en todos los casos se realizaron nuevas PCRs, y los productos fueron digeridos con ambas enzimas de restricción. Asimismo, el ADN proveniente de las 9 muestras heterocigotas y de 2 individuos controles con genotipo salvaje fue amplificado nuevamente mediante PCR, y el producto purificado fue analizado mediante secuenciación directa. En la figura 34 se muestran, como ejemplos representativos, los electroferogramas correspondientes a una muestra con genotipo homocigota salvaje y a una muestra con genotipo heterocigota.

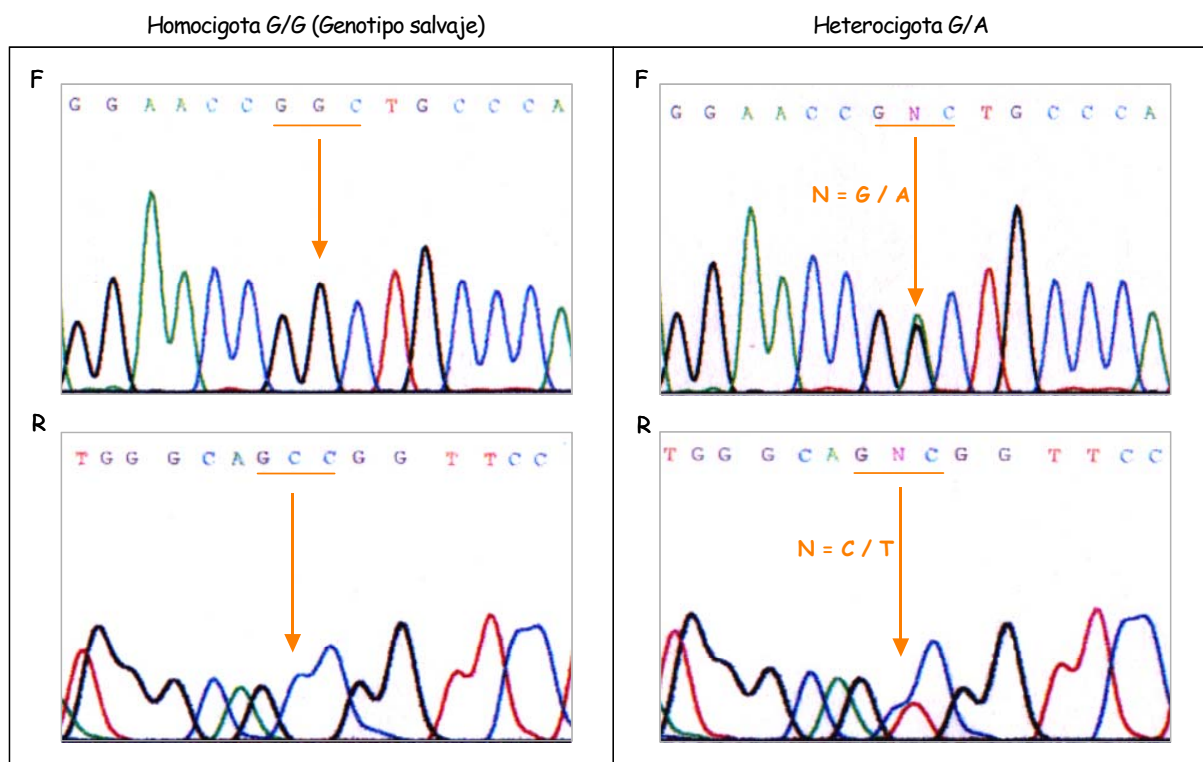


Figura 34. Sustitución G769A de exón 2 del gen de *INHa*. El análisis mediante secuenciación directa confirmó la presencia de la sustitución G769A en 8 individuos controles y en una paciente FOP. En la figura se muestran, como ejemplos representativos, los electroferogramas correspondientes a una muestra con genotipo salvaje G/G, y una muestra con la sustitución G769A en heterocigosis. F: secuenciado con el iniciador BF; R: secuenciado con el iniciador BR.

De este modo, confirmamos que 6/73 mujeres controles menores de 40 años, 2/62 mujeres controles mayores de 40 años y 1/14 pacientes FOP-EA son portadoras de la sustitución G769A (Tabla 14).

Tabla 14. Genotipos de la sustitución G769A observados en pacientes y controles.

Genotipo	C < 40 n/total	C > 40 n/total*	C_{total} n/total*	FOP-I	FOP-EA
G/G	67/73	60/62	127/135	38/38	13/14
G/A	6/73	2/62	8/135	0/38	1/14
A/A	0/73	0/62	0/135	0/38	0/14

* El genotipo de la C111 no pudo ser determinado

En la tabla 15 se presentan algunas de las características clínicas de estos individuos heterocigotas. Los valores serológicos de FSH fueron medidos en 4 de las 6 mujeres menores de 40 años heterocigotas G769A, y todos ellos resultaron normales (rango 3.0 a 10.0 UI/l).

Tabla 15. Características clínicas de los individuos heterocigotas para la sustitución G769A del exón 2.

Individuo	Clasificación	Edad	Fenotipo	Niveles de FSH (IU/l)
FOP-39	FOP-EA	30	amenorrea 1°	77
C15	C<40	29	Ciclos regulares 1 hijo / embarazada	NDt
C16	C<40	30	Ciclos regulares 2 hijos / embarazada	NDt
C27	C<40	27	Ciclos regulares	6*
C32	C<40	27	Ciclos regulares	4*
C36	C<40	34	Ciclos regulares 1 hijo	5.3*
C49	C<40	28	Ciclos regulares	4.3*
C102	C>40	43	Ciclos regulares 2 hijos	NDp
C118	C>40	54	Menopausia a los 48 5 hijos	NDt

* Medición hormonal en fase folicular temprana

NDp= datos no disponibles

NDt= niveles de FSH no determinados, debido a la situación hormonal del individuo

DISCUSSION

1. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA

1.1. Anticuerpos anti-ovario (AOA)

Numerosos trabajos describen la existencia de una fuerte asociación entre la FOP y la presencia de enfermedades autoinmunes, tanto órgano-específicas como sistémicas. (de Moraes y col., 1972; Coulam, 1983; LaBarbera y col., 1988; Betterle y col., 1993; Hoek y col., 1997; Forges y col., 2004). La frecuente asociación entre FOP, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison y otras enfermedades autoinmunes podría sugerir que todas ellas son diferentes manifestaciones de un desorden inmunológico generalizado (LaBarbera y col., 1988; Coulam, 1983).

Uno de los principales elementos en la identificación de la etiología autoinmune de la FOP es la detección de anticuerpos circulantes dirigidos hacia proteínas del ovario. En este sentido, en los últimos 30 años se realizaron numerosos trabajos en los que se describe una importante correlación entre la presencia de anticuerpos dirigidos hacia diferentes antígenos ováricos y el desarrollo de FOP (Forges y col., 2004; Hoek y col., 1997). Sin embargo, debido a la diversidad de los métodos de detección utilizados y a la heterogeneidad de los grupos de pacientes y controles estudiados, existen discrepancias en cuanto a la interpretación de los resultados, por lo que aún no se ha logrado establecer unánimemente la especificidad y utilidad diagnóstica de estos anticuerpos.

En trabajos previos de nuestro laboratorio mediante la técnica de Western-blot, utilizando como antígenos proteínas de la fracción soluble de homogenatos de ovarios

humanos, se detectó la presencia de anticuerpos dirigidos hacia un antígeno ovárico de peso molecular aproximado de 50 kDa en el suero de un subgrupo de pacientes FOP. En esta parte del estudio, trabajamos en el aislamiento e identificación de este antígeno ovárico. Mediante cromatografía de afinidad y de intercambio catiónico, y posterior concentración de la fracción de interés, realizamos una purificación del antígeno ovárico, el cual fue finalmente analizado mediante espectrometría de masa. De este modo, identificamos a la proteína enolasa- α como el antígeno específico hacia el cual estarían dirigidos los anticuerpos anti-ovario (AOA) en estas pacientes FOP. Mas aún, la identificación de la proteína enolasa- α fue confirmada mediante ensayos de Western-blot en los que se utilizó proteína recombinante humana como antígeno.

La enzima enolasa- α (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa) es una metaloenzima que cataliza la deshidratación del 2-fosfo-D-glicerato (PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP) en dirección catabólica en la segunda mitad de la vía glicolítica de Emden Mayerhoff-Parnas. En la dirección inversa, que ocurre durante la gluconeogénesis, la misma enzima cataliza la hidratación del PEP a PGA. La enolasa- α es una de las proteínas citosólicas más abundantemente expresadas en muchos organismos. Recientemente, fue hallada también en la superficie celular de una gran variedad de células eucariotas donde actuaría como receptor de plasminógeno, promoviendo la activación del mismo (Pancholi, 2001; Lopez-Aleman y col., 2003). Asimismo, se ha descrito la presencia de enolasa- α en la superficie de *Streptococci* patógenos (Pancholi y Fischetti, 1998) y de *Candida sp.*; su presencia se propone como un antígeno inmunodominante y posiblemente un buen marcador de infección sistémica (Walsh y col., 1991; Sundstrom y Aliaga, 1992). En vertebrados, existen tres isoformas de enolasa: la enolasa- α que se

expresa en gran cantidad de tejidos, la enolasa- β que es exclusiva de músculo y finalmente la enolasa- γ que se encuentra en neuronas y tejidos neuroendócrinos. Estas subunidades se disponen de a pares formando heterodímeros u homodímeros con un peso molecular de 82.000 a 100.000 Da (Pancholi, 2001).

La presencia de anticuerpos dirigidos hacia la proteína enolasa- α ha sido descrita en diversos desórdenes inflamatorios y autoinmunes, como artritis reumatoidea (Pratesi y col., 2000; Saulot y col., 2002), encefalopatía de Hashimoto (Ochi y col., 2002), lupus eritematoso sistémico (Pratesi y col., 2000), lupus eritematoso discoide (Gitlits y col., 1997), enfermedades autoinmunes hepáticas (cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune y colangitis esclerosante primaria) (Rozenaal y col., 2000; Akisawa y col., 1997; Orth y col., 1998), crioglobulinemia mixta (Sabbatini y col., 1997; Pratesi y col., 2000), nefropatía membranosa primaria (Wakui y col., 1999), esclerosis sistémica (Pratesi y col., 2000), enfermedad de Behcet (Lee y col., 2003), vasculitis (Moodie y col., 1993) y síndrome de retinopatía asociado al cáncer (Adamus y col., 1998). Asimismo, se ha descrito la presencia de anticuerpos anti-enolasa- α en pacientes con endometriosis (Walter y col., 1995), una de las causas más frecuente de infertilidad femenina. Sin embargo, en ninguno de los casos mencionados anteriormente se conoce el rol patológico que tendrían los anticuerpos anti-enolasa- α , así como tampoco si el desarrollo de estos auto-anticuerpos es *causa* o *consecuencia* de cada desorden en particular. El hecho de que los anticuerpos anti-enolasa- α sean detectados en un amplio espectro de patologías, podría ser considerado un indicio de que los mismos serían *consecuencia* o *marcadores*, y no *causa* específica de la enfermedad.

Una de las principales características de “la respuesta autoinmune” es la producción de auto-anticuerpos circulantes dirigidos hacia diferentes blancos moleculares o celulares. La detección de estos anticuerpos generalmente refleja la presencia, naturaleza e intensidad de la respuesta autoinmune. Los auto-anticuerpos pueden ser considerados marcadores de enfermedad y, en diferentes circunstancias, pueden tener *valor pronóstico* y/o *valor diagnóstico*. En algunas enfermedades que poseen un largo prodromo, es posible detectar la presencia de anticuerpos en circulación años antes de que la destrucción de los tejidos se vea reflejada en síntomas clínicos. Así, los anticuerpos pueden predecir el desarrollo de la enfermedad (*valor pronóstico*). Tal es el caso de la diabetes tipo 1, en la que se observa que el 90% de los individuos asintomáticos que presentan anticuerpos, desarrollan dependencia a la insulina dentro de los siguientes 6 años (Turner y col., 1997). Por otro lado, en pacientes con patología ya establecida, la determinación de anticuerpos puede contribuir a definir la naturaleza de la enfermedad y proveer marcadores para su clasificación (*valor diagnóstico*). Por ejemplo, la diabetes tipo 1, la tiroiditis y la adrenalitis son clasificadas como “autoinmunes” o “no autoinmunes”, sobre la base de la presencia o ausencia de anticuerpos asociados a cada una de ellas (Leslie y col., 2001). Las enfermedades reumáticas representan otro claro ejemplo en el cual la determinación de anticuerpos es generalmente utilizada para confirmar un diagnóstico (*valor diagnóstico*). La mayoría de los anticuerpos presentes en estas enfermedades, como el factor reumatoideo y los anticuerpos anti-núcleo, no son altamente específicos para una patología en particular, e incluso son encontrados en inflamaciones crónicas así como en un bajo porcentaje de individuos aparentemente normales (Shmerling y Delbanco, 1991; Tan y col., 1997). Es por ello, que su principal utilidad es la confirmación del diagnóstico en pacientes con manifestaciones clínicas propias de una enfermedad reumática determinada.

En general, a pesar de la asociación encontrada entre la presencia de auto-anticuerpos y el desarrollo de enfermedades autoinmunes, el mecanismo exacto por el cual éstos son generados y su rol en la patogénesis de la enfermedad, permanecen desconocidos.

En el presente trabajo identificamos a la proteína enolasa- α como el antígeno hacia el cual estarían dirigidos los AOA en un subgrupo de pacientes FOP. La determinación de anticuerpos anti-enolasa- α podría significar un aporte importante -al igual que en el caso de diabetes tipo 1, tiroiditis y adrenalitis- para el diagnóstico de la falla ovárica prematura de origen *autoinmune*. El resultado de la determinación de estos anticuerpos se sumaría a las otras herramientas diagnósticas, como las determinaciones hormonales y la sintomatología clínica, permitiendo así clasificar a la patología con mayor precisión. La correcta clasificación del tipo de FOP adquiere mayor importancia si se tiene en cuenta que una disminución en los títulos de anticuerpos dirigidos a antígenos ováricos se asociaría a una recuperación de la función ovárica (Luborsky y col., 1999). En este sentido, la utilización de anticuerpos anti-enolasa- α como un *marcador de autoinmunidad ovárica* permitiría brindar a las pacientes, un tratamiento acorde con la naturaleza autoinmune del síndrome.

Aún quedaría por estudiar el mecanismo que gatilla la formación de anticuerpos anti-enolasa- α , con el fin de dilucidar si los mismos están involucrados en la etiología de la FOP o si se forman en respuesta a la exposición de antígenos celulares, ocasionada por un daño tisular que pueda haberse originado por causas diferentes. Por otro lado, considerando que, al menos bajo determinadas circunstancias, los auto-anticuerpos

serían capaces de predecir la enfermedad, sería interesante realizar un estudio más amplio y un seguimiento a lo largo del tiempo con el fin de evaluar la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo positivo de estos anticuerpos.

Finalmente, concluimos que la determinación de anticuerpos anti-enolasa- α sería un marcador importante para el diagnóstico de FOP *autoinmune*. La presencia de estos anticuerpos permitiría diferenciar los casos de FOP *autoinmune* de los de otras etiologías, y así brindar a las pacientes un tratamiento adecuado. Asimismo, la identificación de la proteína enolasa- α permitiría reemplazar el uso de tejido ovárico humano por la proteína recombinante en la técnica de detección de anticuerpos anti-ovario, obteniéndose así un método sencillo para ser utilizado en el ámbito asistencial.

1.2. Anticuerpos anti-R-FSH.

Los anticuerpos dirigidos hacia receptores pueden actuar imitando la acción de la hormona, como los anticuerpos anti-receptor de TSH en el hipertiroidismo de Graves, o bien pueden bloquear la acción de la hormona, como los anticuerpos dirigidos hacia el receptor de acetil-colina en la miastenia grave.

Así, es posible hipotetizar que receptores como los de FSH y LH podrían ser blanco de anticuerpos bloqueantes, y que esos hipotéticos anticuerpos podrían causar una refractariedad del ovario al estímulo hormonal.

En trabajos previos del laboratorio se describió la presencia de un inhibidor de la unión de FSH a su receptor en el suero de dos pacientes con miastenia grave y amenorrea hipergonadotrófica. Además, se probó inequívocamente que en estas pacientes las responsables del bloqueo de la unión de la FSH a su receptor eran inmunoglobulinas G circulantes (las que se denominaron Ig-R-FSH), las cuales estarían dirigidas al receptor propiamente dicho, o a un dominio de membrana relacionado con el mismo (Chiauzzi y col., 1982; Escobar y col., 1982).

En esta oportunidad, realizamos un estudio retrospectivo sobre el análisis de 247 pacientes FOP. Encontramos que sólo aquellas 23 que habían sido previamente diagnosticadas como SOR, presentaban Ig-R-FSH circulantes. En 20 de ellas, el diagnóstico de SOR se realizó a partir de la presencia de numerosos folículos primordiales en la biopsia ovárica. Las restantes tres pacientes habían sido diagnosticadas como SOR, debido a una ultrasonografía ovárica que mostró ovarios con un volumen por encima de la media normal, estroma hiperecogénico y numerosas imágenes foliculares pequeñas en la periferia.

El 91% (n = 224) de las pacientes estudiadas resultaron negativas en la determinación de Ig-R-FSH. El diagnóstico de SOR fue descartado en 48 de estas pacientes debido a una biopsia ovárica que mostró un estroma con folículos atrésicos en algunos casos, o con ausencia de folículos, en otros. Las restantes 176 pacientes habían sido estudiadas mediante ultrasonografía, la cual reveló la presencia de ovarios de pequeño tamaño (promedio: $2,4 \pm 2,1 \text{ cm}^3$) con escasa actividad folicular en algunos de ellos. Teniendo en cuenta la sensibilidad de la ultrasonografía y las limitaciones de la biopsia en cuanto a la “representatividad” del fragmento analizado, advertimos que, la

posibilidad de que alguna de estas pacientes haya tenido algún/os folículo/s primordial/es, no puede ser absolutamente descartada.

De acuerdo con estos resultados, sugerimos que las Ig-R-FSH estarían presentes en las pacientes SOR. La presencia de anticuerpos dirigidos hacia el R-FSH propiamente dicho -o hacia un dominio de membrana asociado al mismo- es congruente con las manifestaciones clínicas e histopatológicas de estas pacientes, y podría explicar la incapacidad de los folículos de responder al estímulo de FSH. Más aún, el desarrollo de anticuerpos dirigidos hacia el R-FSH o la presencia de mutaciones en el gen que codifica para esta proteína, fueron propuestos por Arici y col. (2002) como posibles etiologías del SOR.

El SOR es un síndrome muy poco frecuente, y considerando que la existencia de numerosos folículos primordiales en los ovarios de estas mujeres permitiría un tratamiento de su infertilidad, la posibilidad de diferenciar este tipo de pacientes entre todos los casos de FOP resulta de vital importancia.

Es importante destacar que durante los 10 primeros años del período estudiado la búsqueda de pacientes estuvo dirigida específicamente a casos de SOR, ya que este síndrome era, para ese entonces, el tema puntual de investigación en el laboratorio. Posteriormente, ampliamos nuestras líneas de investigación, por lo cual un espectro mucho más amplio de pacientes FOP fue derivado a nuestro laboratorio desde diversos hospitales. Así, nuestro enfoque estrechamente acotado a la búsqueda de pacientes SOR durante los primeros 10 años de trabajo, introdujo eventualmente un sesgo en el grupo estudiado. El porcentaje de pacientes SOR en el grupo incorporado más tardíamente es el que realmente se aproxima a la incidencia de este síndrome en la población general.

Ya en 1991 un trabajo desarrollado por van Weissenbruch y col. (1991) mostró evidencias de la existencia de auto-anticuerpos que bloquean los efectos de la FSH en pacientes SOR. En dicho trabajo, se analizaron los sueros provenientes de 26 pacientes FOP con el fin de detectar la presencia de IgGs que bloquean la síntesis de ADN inducida por FSH, en células de la granulosa cultivadas *in vitro*. Los autores detectaron la presencia de IgGs bloqueantes en 21 de las 26 pacientes FOP. De los 21 casos positivos, 14 eran pacientes con diagnóstico de SOR; los otros 7 casos no pudieron ser clasificados como SOR debido a la falta de datos específicos para el diagnóstico. Además, se describió la presencia de anticuerpos circulantes dirigidos específicamente hacia el R-FSH en una paciente con SOR asociado a lupus eritematoso sistémico (Anónimo, 1986). Por otro lado, en un paciente masculino con falla gonadal primaria se detectaron anticuerpos dirigidos al receptor de FSH testicular, utilizando membranas de testículo bovino (Dias y col., 1982).

Anasti y col. (1995) utilizaron receptores recombinantes con el fin de detectar la presencia de inmunoglobulinas dirigidas hacia los receptores de gonadotrofinas en sueros de pacientes FOP. Sin embargo, los autores no pudieron demostrar la presencia de anticuerpos bloqueantes de los receptores de LH o FSH en ninguna de las pacientes analizadas.

En el presente trabajo, utilizamos homogenatos de testículos de ratas inmaduras como fuente de R-FSH. La utilización de tejidos animales como sustrato de receptores ya ha sido descrita en trabajos previos de diversos grupos de investigación, quienes observaron una interacción entre anticuerpos de pacientes con falla ovárica y los receptores de FSH y/o LH (Dias y col., 1982; Tang y Faiman, 1983; Moncayo y col., 1989). Es por ello que, si bien las diferencias entre nuestros resultados y los de Anasti y

col. (1995) podrían surgir del uso de diferentes fuentes de receptores, es más probable que procedan de las diferencias en las pacientes analizadas. Anasti estudió 38 pacientes FOP y no detectó la presencia de anticuerpos anti-R-FSH en ninguna de ellas. En nuestro trabajo, encontramos que sólo 23 de 247 pacientes FOP presentaban estos anticuerpos; más aún, estas 23 pacientes mostraban características diagnósticas que sugerían que se trataba de un subgrupo diferente de FOP.

Por su parte, Lambert y col. (1996), con el objeto de evaluar la posibilidad de que la presencia de anticuerpos circulantes dirigidos hacia el R-FSH pudiese ser la causa de la FOP, midieron la producción de E₂ estimulada por FSH en células de Sertoli de ratas inmaduras. Sus resultados sugieren que la presencia de estos anticuerpos no sería una causa frecuente de FOP. Sin embargo, los autores reconocen que debido al tamaño reducido de la muestra (n=10) una baja prevalencia de estos anticuerpos bloqueantes podría no haberse evidenciado. Mas aún, considerando la baja incidencia del SOR en la población de pacientes FOP, es altamente probable que no haya habido ninguna paciente SOR entre las mujeres estudiadas.

Por todo lo anterior, consideramos que las diferencias encontradas entre nuestros resultados y los de otros autores, quienes no han podido demostrar la presencia de anticuerpos bloqueantes del R-FSH en pacientes FOP (Tang y Faiman, 1983; Anasti y col., 1995; Lambert y col., 1996) serían explicadas principalmente por las diferencias en los grupos de pacientes estudiadas. En nuestro trabajo estudiamos un gran número de pacientes FOP (n=247), teniendo de este modo mayores posibilidades de encontrar entre ellas pacientes SOR, que es un síndrome muy poco frecuente. Más aún, como se explicó anteriormente, el porcentaje de pacientes SOR en el grupo estudiado por nosotros no es representativo de la incidencia real de este síndrome en la población general. Un grupo

de pacientes comparable al nuestro, con un alto porcentaje de mujeres con SOR, fue estudiado por van Weissenbruch y col. (1991), quienes sí encontraron inmunoglobulinas que bloqueaban el crecimiento de células de granulosa inducido por FSH, *in vitro*.

Es importante destacar la relación encontrada entre el SOR y la miastenia grave en la población estudiada. Diez de las 23 pacientes SOR eran mujeres afectadas por este desorden autoinmune. Si bien existen numerosos trabajos en los que se describe una alta prevalencia de diferentes endocrinopatías autoinmunes en pacientes FOP (Hoek y col., 1997), no hay datos en bibliografía en cuanto a la asociación de desórdenes autoinmunes con el SOR, específicamente.

Por otro lado, si bien en nuestro trabajo confirmamos la existencia de una fuerte asociación entre la FOP y la presencia de desórdenes autoinmunes, no detectamos la presencia de Ig-R-FSH en sueros de mujeres con alguna patología autoinmune y con ciclos regulares. Estos resultados confirmarían la especificidad de las Ig-R-FSH en las pacientes SOR.

Al analizar el comportamiento inhibitorio de las Ig-R-FSH, nuestros resultados confirmaron claramente que la actividad inhibitoria de las fracciones de inmunoglobulinas puede ser clasificada en dos grupos. En uno de ellos se observa un efecto inhibitorio “irreversible”, que explicaría la resistencia del ovario, tanto frente a la aumentada secreción de gonadotrofinas bioactivas endógenas como frente a la administración exógena. Otro grupo de pacientes, presentaba un mecanismo inhibitorio “reversible”, sugiriendo que la administración exógena de altas dosis de gonadotrofinas podría revertir, al menos temporariamente, la resistencia del ovario. La caracterización del tipo de comportamiento inhibitorio de las Ig-R-FSH sería de gran importancia para

predecir la respuesta a la administración exógena de gonadotrofinas, considerando que la existencia de numerosos folículos en los ovarios de estas pacientes sería indicio de un buen pronóstico para un posterior tratamiento de su infertilidad. Asimismo, el estudio detallado de las fluctuaciones del título de anticuerpos a lo largo del tiempo permitiría determinar el mejor momento para iniciar un tratamiento.

En conclusión, el presente trabajo sugiere que las Ig-R-FSH estarían presentes en las pacientes SOR. Con el fin de determinar si la asociación encontrada entre el SOR y la presencia de Ig-R-FSH se evidencia definitivamente en el 100% de los casos, será necesario realizar un mayor trabajo de investigación en este campo, aumentando el número de pacientes FOP estudiadas. De confirmarse esta asociación, la determinación de la presencia de Ig-R-FSH sería un instrumento importante en el diagnóstico del síndrome de ovario resistente, permitiendo de este modo, realizar el diagnóstico principalmente sobre la base de estudios serológicos.

2. ASPECTOS MOLECULARES DE LA FALLA OVÁRICA PREMATURA

2.1. Gen del receptor de FSH (R-FSH)

Dentro de la función ovárica normal la FSH, que actúa sobre los receptores de las células de la granulosa, es la principal promotora de la maduración folicular. Se ha propuesto que alteraciones en el R-FSH podrían disminuir la habilidad de éste de unirse a su ligando o afectar su capacidad de activar las vías de transducción de señales, transformándose así en una posible causa de la disfunción ovárica. Es así que, entre los

diferentes genes que han sido propuestos como involucrados en la etiología de la falla ovárica prematura con cariotipo 46,XX, se destaca el gen del R-FSH. El hallazgo del ligamiento de la falla ovárica con el cromosoma 2p, y más precisamente con el gen del R-FSH, en familias de Finlandia (Aittomaki, 1994; Aittomaki y col., 1995) ha sido el punto de partida para una serie de trabajos en los que se propone al gen del R-FSH, como el principal candidato para el desarrollo de la FOP. Hasta el presente se han descrito nueve mutaciones inactivantes en el gen del R-FSH (Aittomaki y col., 1995; Gromoll y col., 1996c; Beau y col., 1998; Touraine y col., 1999; Doherty y col., 2002; Allen y col., 2003; Meduri y col., 2003).

En el presente trabajo investigamos la presencia de mutaciones en el gen del R-FSH que pudiesen contribuir a explicar la patofisiología de 20 pacientes FOP de nuestra población, 5 de las cuales habían sido diagnosticadas como SOR.

Considerando que las mujeres finlandesas portadoras de la mutación inactivante C566T comparten una característica fenotípica destacable con las pacientes SOR -la presencia de folículos en sus ovarios- se ha propuesto la realización de una búsqueda de posibles mutaciones en el gen del R-FSH en las pacientes diagnosticadas como SOR (Aittomaki y col., 1996). Sin embargo, si bien existen hasta el momento numerosos estudios sobre búsqueda de mutaciones en pacientes FOP, la inclusión de pacientes estrictamente diagnosticadas como SOR es muy poco frecuente. Conway y col. (1999) incluyeron 5 pacientes SOR en su estudio; sin embargo, los criterios diagnósticos utilizados fueron diferentes. En nuestro trabajo incluimos 5 pacientes en los cuales la presencia de amenorrea hipergonadotrófica, la resistencia del ovario a la estimulación exógena con gonadotrofinas, y la evidencia de una morfología ovárica normal con presencia de numerosas imágenes foliculares en el examen ovárico, condujeron al

diagnóstico de SOR (Jones y Moraes-Ruehsen, 1969; Pache y col., 1990; Van Weissenbruch y col., 1991; Mehta y col., 1992; Arici y col., 2002).

Es importante destacar que nuestro trabajo es uno de los pocos en el tema (Conway y col., 1999; Tong y col., 2001) que abarcan en su estudio la región codificante del gen del R-FSH en su totalidad, en un número representativo de pacientes FOP. Más aún, en lo que respecta a las poblaciones de Sudamérica, existe un solo trabajo realizado en pacientes FOP de Brasil (Fonte Kohek y col., 1998), en el cual la búsqueda de mutaciones estuvo restringida a los exones 7 y 10 de este gen.

En concordancia con otros estudios realizados en diferentes poblaciones (Fonte Kohek y col., 1998; Jiang y col., 1998; Layman y col., 1998; Conway y col., 1999; Takakura y col., 2001), no detectamos la presencia de la mutación inactivante C566T del exón 7 en ninguno de los sujetos estudiados. Más aún, en un estudio a gran escala sobre 1162 muestras provenientes de Suiza, se identificó sólo un individuo portador de dicha sustitución (Jiang y col., 1998). De este modo, nuestros resultados avalan aún más la hipótesis de que la mutación C566T se encuentra restringida a Finlandia, y representaría un efecto fundador en dicho país.

Por otro lado, con respecto a los exones 1 al 9 estudiados mediante SSCP, no observamos diferencias en los patrones de migración del ADN comparando pacientes y controles. Se ha propuesto que, utilizando dos condiciones diferentes de electroforesis en geles de poliacrilamida, la técnica de SSCP permitiría la identificación de un cambio (mutación/polimorfismo) en la secuencia de ADN con una alta sensibilidad (cercana al 100%) (Forrest y col., 1995). En nuestro caso, con el fin de asegurar aún más una sensibilidad cercana al 100%, utilizamos tres condiciones de corrida diferentes. Nuestros resultados indicarían la ausencia de alteraciones en las secuencias

nucleotídicas estudiadas, en todas las pacientes y controles. Sin embargo, no se puede descartar que por limitaciones de sensibilidad de la técnica, en algún caso, las mismas no hayan podido ser identificadas. No obstante, nuestros resultados son coincidentes con los de varios grupos de investigación quienes no han identificado mutaciones en este gen en pacientes con desórdenes ováricos (Whitney y col., 1995; Liu y col., 1998; Conway y col., 1999; de la Chesnaye y col., 2001; Takakura y col., 2001; Tong y col., 2001).

El análisis por secuenciación directa del exón 10 reveló la presencia de dos polimorfismos previamente descritos, A919G y A2039G (Aittomaki y col., 1995; Simoni y col., 1997) con frecuencias alélicas similares en los grupos estudiados. En concordancia con Simoni y col. (1999), nuestros resultados sugieren que ambos polimorfismos se presentan en dos posibles combinaciones, avalando la existencia de dos variantes alélicas discretas, y por lo tanto, dos isoformas del R-FSH: Thr³⁰⁷-Asn⁶⁸⁰ y Ala³⁰⁷-Ser⁶⁸⁰. Contrariamente a nuestros hallazgos, las dos variantes polimórficas fueron descritas en desequilibrio de ligamiento en individuos del Reino Unido y de Brasil (Fonte Kohek y col., 1998; Conway y col., 1999). No se puede descartar, sin embargo, que las discrepancias encontradas se deban a la existencia de diferencias étnicas entre las poblaciones estudiadas y/o a la diferencia en el número de pacientes analizados en los distintos trabajos. Por otro lado, en la población estudiada no hemos podido demostrar la existencia de una asociación entre una isoforma en particular del receptor y el riesgo de ser afectado por FOP. Si bien el número de pacientes analizados en este trabajo probablemente no sea suficientemente alto como para detectar dicha asociación, si ésta existiera, nuestros resultados actuales concuerdan con los obtenidos por Conway y col. (1999), quienes estudiaron un grupo de 49 pacientes FOP y 93 pacientes SOP de Inglaterra. Más aún, Simoni y col. (1999) encontraron una distribución similar de estas

dos isoformas del R-FSH en 86 hombres con fertilidad comprobada y 75 hombres infértiles. Asimismo, estos autores mostraron, por estudios de “binding” en células COS-7 transfectadas en forma transitoria con el gen del R-FSH, que las dos variantes del receptor poseen constantes de afinidad similares, y producen niveles de AMPc comparables en respuesta al estímulo con FSH recombinante humana, sugiriendo la existencia de dos isoformas del R-FSH con propiedades funcionales similares. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que en condiciones patológicas se pongan en evidencia actividades diferentes de las dos isoformas del receptor.

Por otro lado, en dos individuos controles detectamos la presencia de la sustitución C1022T, en heterocigosis, que cambia GTG (Val) en el codon 341 por GCG (Ala). Esta sustitución había sido identificada previamente en un único caso, un hombre infértil (Simoni y col., 1999). En ese mismo trabajo, los autores mostraron mediante estudios *in-vitro* en células COS-7 transfectadas transitoriamente, que el receptor mutado responde normalmente a la estimulación por FSH. En vista de estos resultados previos, y considerando el hecho de que en el presente trabajo la sustitución fue encontrada en dos individuos controles, sugerimos que esta variante no tendría implicancia funcional alguna.

En conclusión, sugerimos que las mutaciones en el gen del R-FSH son poco frecuentes en las pacientes FOP en la población argentina. La presencia de una isoforma particular del R-FSH no parecería estar asociada a la enfermedad, y los polimorfismos del gen del R-FSH no estarían involucrados en la función ovárica anormal. Si bien reconocemos que en nuestro trabajo no hemos hallado una nueva mutación en el gen estudiado, creemos que los resultados de la presente investigación constituyen una contribución importante al esclarecimiento del concepto del gen del R-FSH como

posible causa de la falla ovárica prematura en pacientes de Argentina, cuya población no había sido estudiada hasta el presente.

Otras posibilidades, como defectos en las regiones regulatorias del promotor del gen del R-FSH, en las regiones no codificantes de los exones 1 y 10, y en los intrones deberían también ser consideradas para su estudio. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados y los obtenidos por otros grupos, y considerando el hecho de que la mutación C566T estaría restringida a Finlandia y que las otras ocho mutaciones descritas hasta el momento representan casos aislados de FOP, sugerimos que el gen del R-FSH no debiera ser considerado el candidato más importante para la falla ovárica prematura. Con el objeto de elucidar la patofisiología de este síndrome, deberían estudiarse además otros genes posiblemente relevantes para la función ovárica normal que han sido propuestos como candidatos alternativos para la falla ovárica (Christin-Maitre y col., 1998; Shelling y col., 2000; Takebayashi y col., 2000).

2.2. Gen de la subunidad α de la inhibina

Durante la peri-menopausia, el incremento en los niveles de FSH coincide con un aumento en la tasa de agotamiento folicular (Richardson y col., 1987). Asimismo, se ha observado que la concentración serológica de inhibinas desciende a medida que el reservorio folicular ovárico comienza a disminuir (MacNaughton y col., 1992), siendo casi indetectable en mujeres post-menopáusicas (Buckler y col., 1991). Mas aún, se ha sugerido que este descenso en los niveles de inhibina A e inhibina B, y el ascenso en el tono de activina A, serían en parte los responsables de los valores elevados de FSH,

característicos del envejecimiento reproductivo (Santoro y col., 1999; Reame y col., 1998; Klein y col., 1996). Por otro lado, estudios hormonales realizados en pacientes FOP sugieren que, análogamente a lo que sucedería en la menopausia fisiológica, un defecto en la secreción de inhibinas podría estar involucrado en la fisiopatología de esta enfermedad (Pampfer y Thomas, 1989). Más aún, Petraglia y col. (1998) hallaron que los niveles serológicos de inhibina A y B en pacientes FOP son similares a los de mujeres post-menopáusicas.

Considerando que la reducción de la relación inhibina:activina observada durante la menopausia podría deberse a un déficit en la producción de subunidad α (Santoro y col., 1999), el desarrollo de la FOP podría ser consecuencia de la presencia de mutaciones en el gen $INH\alpha$, las cuales ocasionarían una disminución en la cantidad de inhibina bioactiva y, por lo tanto, un aumento en la concentración de FSH circulante. En este sentido, dos trabajos previos sugieren que el gen $INH\alpha$ estaría involucrado en la etiología de la falla ovárica prematura (Shelling y col., 2000; Marozzi y col., 2002).

Hasta el presente, se han descrito dos sitios polimórficos en el gen $INH\alpha$: C129T en la región 5' no codificante (5' UTR) y C675T en el exón 2, este último en completo desequilibrio de ligamiento con el primero (Montgomery y col., 2000). Marozzi y col. (2002), estudiaron el polimorfismo C129T en pacientes FOP y en individuos controles, y hallaron que la frecuencia del alelo T era significativamente menor en la población FOP.

Sin embargo, en la población estudiada en nuestro trabajo no encontramos asociación entre la variante T y el riesgo de desarrollo de FOP. Más aún, los niveles serológicos de inhibinas en las mujeres controles estudiadas -todos ellos dentro del

rango normal (Sehested y col., 2000; Groome y col., 1995)- fueron semejantes independientemente del genotipo que presentan.

Las gónadas representan el principal sitio de producción de dímeros de inhibina. Se ha propuesto que en los ovarios sería necesario un gran reservorio de subunidades α con el fin asegurar la formación de estos dímeros de inhibina, a expensas de la dimerización de subunidades β necesaria para la producción de activinas. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, indicarían que la producción ovárica de inhibinas -tanto de la forma monomérica Pro- α C como de las formas diméricas- no se ve afectada por las variantes alélicas del polimorfismo C129T. Si bien el número de pacientes analizados podría no ser lo suficientemente grande como para detectar una posible asociación, los resultados genéticos y hormonales analizados en conjunto, sugieren que el polimorfismo de 5'UTR del gen $INH\alpha$ no estaría involucrado en el desarrollo de una función ovárica anormal.

La presencia de la sustitución G769A en el exón 2 del gen $INH\alpha$ fue descrita por primera vez por Shelling y col. (2000) en 3/43 mujeres con FOP, y en 1/150 controles. Posteriormente, Marozzi y col. (2002) hallaron que esta sustitución era significativamente más frecuente en pacientes FOP (7/157) que en mujeres controles (0/100). Asimismo, la sustitución G769A fue hallada en 9/80 pacientes FOP y en 0/100 controles de India (Dixit y col., 2004). Sin embargo, ninguna de las 84 pacientes FOP estudiadas, ni los 100 individuos controles analizados en Corea, presentaron esta variante (Jeong y col., 2004). Si bien se ha propuesto que la sustitución G769A podría afectar la unión de la inhibina a su receptor putativo (Shelling y col., 2000), hasta la

fecha no se han realizado estudios que pudieran arrojar resultados sobre las implicancias funcionales de esta sustitución.

En nuestro laboratorio investigamos la presencia de la sustitución G769A del exón 2 del gen $INH\alpha$ con el fin de determinar si la misma podría contribuir a explicar la fisiopatología de la FOP en pacientes de nuestra población. En concordancia con los resultados obtenidos en mujeres con FOP de Corea (Jeong y col., 2004), no hallamos que dicha sustitución esté relacionada al desarrollo de FOP. Sólo una paciente, una mujer perteneciente al grupo FOP-EA, resultó ser portadora de la sustitución G769A. Más aún, en el presente trabajo, se describe por primera vez la presencia de la variante G769A en un número relevante de individuos controles. Si bien la mayor parte de estas mujeres controles son menores de 40 años, en las cuales no se puede descartar la posibilidad de que desarrollen FOP, las siguientes consideraciones deben ser tomadas en cuenta: a) la frecuencia de la sustitución G769A observada en este grupo de controles es superior a la incidencia de la FOP, estimada en 1% de las mujeres en edad fértil; b) si las mujeres controles portadoras de la sustitución fuesen a desarrollar FOP, se esperaría encontrar una frecuencia de G769A similar en el grupo de pacientes FOP; c) la frecuencia de la sustitución G769A en el grupo de pacientes FOP es comparable a la observada en el grupo de mujeres controles mayores de 40 años. Si se considera además que tanto Shelling y col. (2000) como Dixit y col. (2004) sugieren que la sustitución estaría asociada a un fenotipo severo de FOP (dado que todas las pacientes portadoras de la variante G769A habían desarrollado FOP antes de los 25 años), las posibilidades de desarrollar FOP en estas mujeres controles portadoras que tienen entre 27 y 34 años (Tabla 15), se verían aún más reducidas. De todos modos, y teniendo en cuenta que las 7 pacientes portadoras de la sustitución G769A descriptas por Marozzi y col. (2002)

tenían un promedio de edad al momento del desarrollo de FOP de $35,6 \pm 3,7$ años, sería apropiado realizar un seguimiento de estas mujeres controles menores de 40 años.

Es importante destacar que se han descrito en la literatura casos aislados de mujeres controles heterocigotas para la variante G769A. En un estudio realizado en 150 muestras de la población general, hombres y mujeres de todas las edades, Shelling y col. (2000) hallaron una mujer de 26 años con ciclos regulares portadora de dicha sustitución. En el mismo trabajo, los autores describen a una mujer -madre de una paciente FOP- de 55 años heterocigota G769A, con menopausia fisiológica. Marozzi y col (2002), por su parte, describen una mujer de 26 años portadora de la sustitución, con ciclos menstruales regulares. Si bien los autores de ambos trabajos sugieren que la ocurrencia de la sustitución en ausencia de manifestaciones de FOP puede ser explicada por una penetrancia incompleta de la enfermedad, estos hallazgos podrían estar indicando -en concordancia con nuestros resultados- que la sustitución estaría presente en individuos controles. En este caso, la variante G769A podría considerarse un posible polimorfismo sin consecuencias clínicas aparentes.

Se ha propuesto que la sustitución G769A podría afectar la unión de la inhibina a su receptor putativo obstaculizando, de esta manera, la regulación de los niveles de FSH por retroalimentación negativa (Shelling y col., 2000). En consecuencia, sería plausible que las mujeres controles heterocigotas G769A presentaran niveles de FSH aumentados en relación con los de individuos controles con genotipo salvaje. En nuestro estudio, sin embargo, las mujeres menores de 40 años portadoras de la sustitución, presentan valores de FSH normales y comparables a los observados en las otras controles. Más aún, la única paciente homocigota para la sustitución G769A descrita hasta el presente en la literatura, no presentaba un fenotipo FOP particularmente severo,

con niveles de FSH similares a los de otras pacientes FOP con genotipo salvaje (Dixit y col., 2004). Estas dos observaciones, sumadas al hecho de que en nuestro trabajo la frecuencia de la sustitución G769A en pacientes FOP es similar –o incluso menor- a la encontrada en mujeres controles, avalan la hipótesis de que dicha variante no estaría involucrada en la etiología de la falla ovárica prematura.

Numerosas evidencias muestran que la FOP puede presentarse asociada a prácticamente todas las enfermedades autoinmunes órgano-específicas conocidas, así como también a algunos de los desórdenes autoinmunes sistémicos (de Moraes y col., 1972; Coulam, 1983; LaBarbera y col., 1988; Betterle y col., 1993; Hoek y col., 1997; Forges y col., 2004). El hecho de encontrar que la FOP se asocia frecuentemente a tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison y otras patologías autoinmunes, sugiere que todas ellas podrían ser manifestaciones diferentes de un desorden inmunológico generalizado, indicando que un mecanismo autoinmune sería el agente etiológico en esas pacientes FOP (LaBarbera y col., 1988; Coulam, 1983). Más aún, en los trabajos de investigación en los que la FOP idiopática es el blanco de estudio, se excluye de la muestra a las pacientes con antecedentes de enfermedades autoinmunes asociadas. De acuerdo con este consenso general, en nuestro trabajo las pacientes FOP con enfermedad/es autoinmune/s asociada/s fueron analizadas como un grupo independiente (EA-POF). Inesperadamente, la única paciente FOP que resultó portadora de la sustitución G769A pertenece a este grupo. Estos hallazgos podrían cuestionar el rol del gen $INH\alpha$ en la etiología de la FOP, reforzando más aún nuestros hallazgos en controles. Alternativamente, si el rol del gen $INH\alpha$ en la etiopatología de la FOP fuera

confirmado en estudios futuros, nuestros hallazgos podrían sumar evidencias a favor del concepto de la naturaleza multifactorial de este desorden.

Según se ha propuesto, los altos niveles de FSH en las pacientes FOP podrían deberse a una disminución de la secreción de inhibinas debida a alteraciones en el gen $INH\alpha$ (Shelling y col., 2000; Marozzi y col., 2002). De este modo, el descenso en los niveles de inhibinas sería *causa* de la enfermedad. Alternativamente, esta reducción en el tono de inhibinas podría ser una *consecuencia* natural de la disminución del número de folículos ováricos de estas pacientes, como en el caso de la menopausia fisiológica. Nuestros resultados podrían indicar que los bajos niveles de inhibinas en las pacientes FOP no serían *causa* sino *consecuencia* del agotamiento folicular prematuro. Alternativamente, esta reducción en el tono de inhibinas podría sí ser responsable *per se* de los niveles de FSH elevados –siendo por lo tanto la *causa* de la FOP- pero como resultado de alteracione/s en los mecanismos de regulación de la biosíntesis y/o secreción de inhibinas, en lugar de deberse a defectos en el gen $INH\alpha$ propiamente dicho.

En conclusión, en contraposición con lo descrito en trabajos previos de otros autores (Shelling y col., 2000; Marozzi y col., 2002; Dixit y col., 2004) y en concordancia con Jeong y col. (2004), nuestros resultados indicarían que las variantes C129T y G769A del gen $INH\alpha$ no estarían asociadas al desarrollo de la FOP. Con el fin de definir el rol que cumple el gen $INH\alpha$ en la etiología de este síndrome, es necesaria la realización de nuevas investigaciones en un mayor número de pacientes FOP de diferentes poblaciones. Asimismo, es necesario llevar a cabo estudios en población

general, así como también estudios funcionales detallados con el objetivo de dilucidar si la sustitución G769A constituye una variante “normal” del gen $INH\alpha$.

CONCLUSIONES FINALES

Los resultados de esta tesis representan un importante aporte al conocimiento de los mecanismos involucrados en la FOP en pacientes argentinas, ya que:

- identificamos a la proteína enolasa- α como el antígeno hacia el cual estarían dirigidos los AOA en un subgrupo de pacientes FOP. La determinación de anticuerpos anti-enolasa- α significaría un aporte importante para el diagnóstico de la FOP de origen *autoinmune*. La utilización de anticuerpos anti-enolasa- α como un *marcador de autoinmunidad ovárica* permitiría clasificar a la patología con mayor precisión, y así brindar a las pacientes un tratamiento acorde con la naturaleza autoinmune del síndrome.
- encontramos que las Ig-R-FSH estarían presentes en las pacientes SOR. Considerando que la existencia de numerosos folículos primordiales en los ovarios de las pacientes SOR permitiría un tratamiento de su infertilidad, la posibilidad de diferenciar este tipo de pacientes entre todos los casos de FOP resulta de vital importancia. La determinación de la presencia de Ig-R-FSH sería un instrumento importante para el diagnóstico del SOR, permitiendo de este modo, realizar el diagnóstico principalmente sobre la base de estudios serológicos.
- considerando que: a) no encontramos mutaciones en el gen del R-FSH en la población estudiada, b) no hallamos asociación entre la presencia de una isoforma particular del R-FSH y el desarrollo de la enfermedad, y c) observamos que los polimorfismos del gen del R-FSH no estarían

involucrados en la función ovárica anormal, concluimos que el gen del R-FSH no estaría involucrado en la etiopatología de la FOP en pacientes argentinas.

- contrariamente a lo descripto en literatura, encontramos que la sustitución G769A del gen $INH\alpha$ no estaría involucrada en la etiología de la FOP. Asimismo, encontramos que el polimorfismo C129T de 5'UTR del gen $INH\alpha$ no estaría involucrado en el desarrollo de una función ovárica anormal, y que las variantes alélicas de este polimorfismo no afectarían la producción ovárica de inhibinas.

CONSIDERACIONES GENERALES

CONSIDERACIONES GENERALES

La falla ovárica prematura posee criterios diagnósticos claros (amenorrea antes de los 40 años por un período mayor de 6 meses, con niveles de FSH superiores a 40 mUI/ml) que permiten identificar sin dificultad a las pacientes afectadas por la patología. Sin embargo, por debajo de esta aparente claridad, encontramos una gran diversidad de manifestaciones clínicas. Las pacientes pueden presentar amenorrea primaria ó secundaria, desarrollo normal o incompleto de las características sexuales secundarias, reversibilidad o irreversibilidad de la patología. Además, no es posible definir una historia menstrual característica para estas pacientes y existe un amplio rango de edad en la cual el síndrome se manifiesta. El exámen histológico/ecográfico de las gónadas de estas mujeres muestra una gran variedad de condiciones ováricas, que van desde formas foliculares hasta formas afoliculares, con un espectro continuo entre ambos extremos. Cuando es posible realizar un estudio detallado de los estadios foliculares presentes en el ovario, se observa que en las distintas pacientes, la interrupción del desarrollo folicular se presenta en diferentes estadios. Esta gran **heterogeneidad** en las pacientes podría ser el reflejo de la gran **diversidad de causas** - genéticas, inmunológicas, metabólicas, iatrogénicas, infecciosas, ambientales y psicológicas- que pueden conducir al síndrome. Más aún, salvo en contadas excepciones –como en los casos aislados de mutaciones puntuales del R-FSH o en el síndrome de Turner, por ejemplo- el desarrollo de la enfermedad no puede ser explicado por un solo factor, resultando un **síndrome “multicausal”**. Es por ello que resulta imperioso realizar un amplio abordaje del estudio de la patología, considerando la mayor cantidad de factores etiológicos posibles.

Teniendo en cuenta esta necesidad, en el laboratorio abordamos el estudio de la FOP desde dos puntos de vista diferentes, inmunológico y molecular, tomando como punto de partida dos posibles autoantígenos y dos genes candidatos, respectivamente. Aún habiendo tratado de suprimir la mayor cantidad de “variables”, como factores cromosómicos (sólo incluimos pacientes 46,XX), iatrogénicos, metabólicos e infecciosos, las causas de la patología permanecen desconocidas en la mayoría de los casos estudiados. Esto demuestra que es necesario realizar un estudio multifactorial a gran escala, apuntando a conocer los factores de riesgo y las interrelaciones entre los diferentes factores etiológicos.

Los trabajos realizados en el laboratorio representan el escalón inicial de este estudio a gran escala. La sumatoria de nuestros resultados con los arrojados por nuevos trabajos, proveerán los datos necesarios para la obtención de conclusiones a partir del análisis de múltiples factores. Por ejemplo, en un futuro el establecimiento de relaciones entre los polimorfismos del gen del R-FSH y los del gen de $INH\alpha$, en conjunto con los de otros genes, permitirá determinar si estas variables, en presencia de otros factores, representan factores de riesgo para la enfermedad. Asimismo, la integración de datos genéticos con el estudio de marcadores de autoinmunidad, podría permitir identificar a aquellos individuos que poseen una predisposición genética a desarrollar desórdenes autoinmunes, en los que la convergencia de varios factores sería el desencadenante de la patología.

Aún queda mucho por investigar en esta extensa área. Un mejor conocimiento de los procesos y componentes celulares y moleculares involucrados en la

foliculogénesis y la apoptosis, así como de las interacciones entre el ovario y el sistema inmune, permitirá elucidar los posibles mecanismos de la FOP. El conocimiento de los procesos que conducen a la falla ovárica permitiría desarrollar terapias nuevas con el fin de asistir a las mujeres portadoras de este síndrome. Así, se podrían brindar herramientas para optimizar la función ovárica en estas pacientes FOP, en búsqueda de una extensión de su período reproductivo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

(1986) Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 46-1986. A 26-year-old woman with secondary amenorrhea. *N.Engl.J.Med.*, **315**, 1336-1343.

Adamus,G., Amundson,D., Seigel,G.M. y col. (1998) Anti-enolase-alpha autoantibodies in cancer-associated retinopathy: epitope mapping and cytotoxicity on retinal cells. *J.Autoimmun.*, **11**, 671-677.

Aittomaki,K. (1994) The genetics of XX gonadal dysgenesis. *Am.J.Hum.Genet.*, **54**, 844-851.

Aittomaki,K., Herva,R., Stenman,U.H. y col. (1996) Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **81**, 3722-3726.

Aittomaki,K., Lucena,J.L., Pakarinen,P. y col. (1995) Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, **82**, 959-968.

Akisawa,N., Maeda,T., Iwasaki,S. y col. (1997) Identification of an autoantibody against alpha-enolase in primary biliary cirrhosis. *J.Hepatol.*, **26**, 845-851.

Allen,L.A., Achermann,J.C., Pakarinen,P. y col. (2003) A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotropic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum.Reprod.*, **18**, 251-256.

Allingham-Hawkins,D.J., Brown,C.A., Babul,R. y col. (1996) Tissue-specific methylation differences and cognitive function in fragile X premutation females. *Am.J.Med Genet.*, **64**, 329-333.

Alper,M.M. y Garner,P.R. (1985) Premature ovarian failure: its relationship to autoimmune disease. *Obstet.Gynecol.*, **66**, 27-30.

Anasti,J.N., Flack,M.R., Froehlich,J. y col. (1995) The use of human recombinant gonadotropin receptors to search for immunoglobulin G-mediated premature ovarian failure. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **80**, 824-828.

Arici,A., Matalliotakis,I.M., Koumantakis,G.E. y col. (2002) Diagnostic role of inhibin B in resistant ovary syndrome associated with secondary amenorrhea. *Fertil.Steril.*, **78**, 1324-1326.

Arif,S., Vallian,S., Farzaneh,F. y col. (1996) Identification of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase as a novel target of steroid cell autoantibodies: association of autoantibodies with endocrine autoimmune disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **81**, 4439-4445.

Arif,S., Varela-Calvino,R., Conway,G.S. y col. (2001) 3 beta hydroxysteroid dehydrogenase autoantibodies in patients with idiopathic premature ovarian failure target N- and C-terminal epitopes. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **86**, 5892-5897.

Baker,S.J. y Spears,N. (1999) The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Hum.Reprod.Update.*, **5**, 153-165.

Baker, T.G. (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, **158**, 417-433.

Batista, M.C., Kohek, M.B., Frazzatto, E.S. y col. (2000) Mutation analysis of the follicle-stimulating hormone receptor gene in girls with gonadotropin-independent precocious puberty resulting from autonomous cystic ovaries. *Fertil.Steril.*, **73**, 280-283.

Beau, I., Touraine, P., Meduri, G. y col. (1998) A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J.Clin.Invest*, **102**, 1352-1359.

Bergada, I., Rojas, G., Ropelato, G. y col. (1999) Sexual dimorphism in circulating monomeric and dimeric inhibins in normal boys and girls from birth to puberty. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, **51**, 455-460.

Best-Belpomme, M. y Dessen, P. (1973) [Competitive inhibition. General and new linear relations]. *Biochimie*, **55**, 11-16.

Betterle, C., Rossi, A., Dalla, P.S. y col. (1993) Premature ovarian failure: autoimmunity and natural history. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, **39**, 35-43.

Bione, S., Sala, C., Manzini, C. y col. (1998) A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am.J.Hum.Genet.*, **62**, 533-541.

Bloom, F. Tratado de Histología. Editorial Interamericana Mc Graw Hill 1° Edición, Capítulo 32, 859-907. 1986.

Buckler,H.M., Evans,C.A., Mamtora,H. y col. (1991) Gonadotropin, steroid, and inhibin levels in women with incipient ovarian failure during anovulatory and ovulatory rebound cycles. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **72**, 116-124.

Burger,H.G. (1992) Inhibin. *Reprod Med Rev*, **1**, 1-20.

Burger,H.G. y Robertson,D.M. (1997) Editorial: inhibin in the male--progress at last. *Endocrinology*, **138**, 1361-1362.

Bussmann,L., Chiauzzi,V.A., y Charreau,E.H. (1998) Anticuerpos antiovario y falla ovárica prematura. *Medicina*, **58**, 608.

Camp,T.A., Rahal,J.O., y Mayo,K.E. (1991) Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol.Endocrinol.*, **5**, 1405-1417.

Chen,S., Sawicka,J., Betterle,C. y col. (1996) Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **81**, 1871-1876.

Chiauzzi,V., Cigorruga,S., Escobar,M.E. y col. (1982) Inhibition of follicle-stimulating hormone receptor binding by circulating immunoglobulins. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **54**, 1221-1228.

Chiauzzi,V.A., Bussmann,L., Calvo,J.C. y col. (2004) Circulating immunoglobulins that inhibit the binding of follicle-stimulating hormone to its receptor: a putative diagnostic role in resistant ovary syndrome? *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, **61**, 46-54.

Chiquoine,A.D. (1960) The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. *Am.J.Anat.*, **106**, 149-169.

Christin-Maitre,S., Vasseur,C., Portnoi,M.F. y col. (1998) Genes and premature ovarian failure. *Mol.Cell Endocrinol.*, **145**, 75-80.

Conway,G.S., Conway,E., Walker,C. y col. (1999) Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, **51**, 97-99.

Conway,G.S., Kaltsas,G., Patel,A. y col. (1996) Characterization of idiopathic premature ovarian failure. *Fertil.Steril.*, **65**, 337-341.

Cooper,G.S. y Sandler,D.P. (1998) Age at natural menopause and mortality. *Ann.Epidemiol.*, **8**, 229-235.

Coulam,C.B. (1982) Premature gonadal failure. *Fertil.Steril.*, **38**, 645-655.

Coulam,C.B. (1983) The prevalence of autoimmune disorders among patients with primary ovarian failure. *Am.J.Reprod.Immunol.*, **4**, 63-66.

Coulam,C.B., Adamson,S.C., y Annegers,J.F. (1986) Incidence of premature ovarian failure. *Obstet.Gynecol.*, **67**, 604-606.

Coulam,C.B., Kempers,R.D., y Randall,R.V. (1981) Premature ovarian failure: evidence for the autoimmune mechanism. *Fertil.Steril.*, **36**, 238-240.

Coulam,C.B., Stringfellow,S., y Hoefnagel,D. (1983) Evidence for a genetic factor in the etiology of premature ovarian failure. *Fertil.Steril.*, **40**, 693-695.

Dal Pra,C., Chen,S., Furmaniak,J. y col. (2003) Autoantibodies to steroidogenic enzymes in patients with premature ovarian failure with and without Addison's disease. *Eur.J.Endocrinol.*, **148**, 565-570.

Danforth,D.R., Arbogast,L.K., Mroueh,J. y col. (1998) Dimeric inhibin: a direct marker of ovarian aging. *Fertil.Steril.*, **70**, 119-123.

Danilovich,N., Babu,P.S., Xing,W. y col. (2000) Estrogen deficiency, obesity, and skeletal abnormalities in follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) female mice. *Endocrinology*, **141**, 4295-4308.

Davies,K.E., Mandel,J.L., Monaco,A.P. y col. (1990) Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. *Cytogenet.Cell Genet.*, **55**, 254-313.

Davis,C.J., Davison,R.M., Payne,N.N. y col. (2000) Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: opinion. *Hum.Reprod.*, **15**, 2418-2422.

de Jong,F.H. (1988) Inhibin. *Physiol Rev.*, **68**, 555-607.

de Kretser,D.M. y McFarlane,J.R. (1996) Inhibin in the male. *J.Androl*, **17**, 179-182.

de la Chesnaye,E., Canto,P., Ulloa-Aguirre,A. y col. (2001) No evidence of mutations in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Mexican women with 46,XX pure gonadal dysgenesis. *Am.J.Med.Genet.*, **98**, 125-128.

de Moraes,R.M., Blizzard,R.M., Garcia-Bunuel,R. y col. (1972) Autoimmunity and ovarian failure. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **112**, 693-703.

Dias,J.A., Gates,S.A., y Reichert,L.E., Jr. (1982) Evidence for the presence of follicle-stimulating hormone receptor antibody in human serum. *Fertil.Steril.*, **38**, 330-338.

Ding,Q., Xiao,L., Xiong,S. y col. (2003) Unmatched masses in peptide mass fingerprints caused by cross-contamination: an updated statistical result. *Proteomics.*, **3**, 1313-1317.

Dixit,H., Deendayal,M., y Singh,L. (2004) Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure. *Hum.Reprod.*.

Doherty,E., Pakarinen,P., Tiitinen,A. y col. (2002) A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **87**, 1151-1155.

Dong,J., Albertini,D.F., Nishimori,K. y col. (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, **383**, 531-535.

Escobar,M.E., Cigorraga,S.B., Chiauzzi,V.A. y col. (1982) Development of the gonadotrophic resistant ovary syndrome in myasthenia gravis: suggestion of similar autoimmune mechanisms. *Acta Endocrinol.(Copenh)*, **99**, 431-436.

Falorni,A., Laureti,S., Candeloro,P. y col. (2002) Steroid-cell autoantibodies are preferentially expressed in women with premature ovarian failure who have adrenal autoimmunity. *Fertil.Steril.*, **78**, 270-279.

Fenichel,P., Sosset,C., Barbarino-Monnier,P. y col. (1997) Prevalence, specificity and significance of ovarian antibodies during spontaneous premature ovarian failure. *Hum.Reprod.*, **12**, 2623-2628.

Flier,J.S., Kahn,C.R., Roth,J. y col. (1975) Antibodies that impair insulin receptor binding in an unusual diabetic syndrome with severe insulin resistance. *Science*, **190**, 63-65.

Flint,M.P. (1997) Secular trends in menopause age. *J.Psychosom.Obstet.Gynaecol.*, **18**, 65-72.

Fontan,P.A., Pancholi,V., Nociari,M.M. y col. (2000) Antibodies to streptococcal surface enolase react with human alpha-enolase: implications in poststreptococcal sequelae. *J.Infect.Dis.*, **182**, 1712-1721.

Fonte Kohek,M.B., Batista,M.C., Russell,A.J. y col. (1998) No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. *Fertil.Steril.*, **70**, 565-567.

Forges,T., Monnier-Barbarino,P., Faure,G.C. y col. (2004) Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology. *Hum.Reprod.Update.*, **10**, 163-175.

Forrest,S., Cotton,R., Landegren,U. y col. (1995) How to find all those mutations. *Nat.Genet.*, **10**, 375-376.

Fox,H. (1992) The pathology of premature ovarian failure. *J.Pathol.*, **167**, 357-363.

Franchi, L; Mandl, A; y Zuckerman, S. The development of the ovary and the process of oogenesis. The Ovary Academic Press, London., 1-88. 1962.

Fraser,I.S., Russell,P., Greco,S. y col. (1986) Resistant ovary syndrome and premature ovarian failure in young women with galactosaemia. *Clin.Reprod.Fertil.*, **4**, 133-138.

Fraser,I.S., Shearman,R.P., Smith,A. y col. (1988) An association among blepharophimosis, resistant ovary syndrome, and true premature menopause. *Fertil.Steril.*, **50**, 747-751.

Fritz,M.A. y Speroff,L. (1982) The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil.Steril.*, **38**, 509-529.

Gersak,K., Meden-Vrtovec,H., y Peterlin,B. (2003) Fragile X premutation in women with sporadic premature ovarian failure in Slovenia. *Hum.Reprod*, **18**, 1637-1640.

Gitlits,V.M., Sentry,J.W., Matthew,M.L. y col. (1997) Autoantibodies to evolutionarily conserved epitopes of enolase in a patient with discoid lupus erythematosus. *Immunology*, **92**, 362-368.

Gitlits,V.M., Toh,B.H., y Sentry,J.W. (2001) Disease association, origin, and clinical relevance of autoantibodies to the glycolytic enzyme enolase. *J.Investig.Med.*, **49**, 138-145.

Gold,E.B., Bromberger,J., Crawford,S. y col. (2001) Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women. *Am.J.Epidemiol.*, **153**, 865-874.

Goodman,A.L. y Hodgen,G.D. (1983) The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog.Horm.Res.*, **39**, 1-73.

Gougeon,A. y Testart,J. (1990) Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil.Steril.*, **54**, 848-852.

Gromoll,J., Pekel,E., y Nieschlag,E. (1996a) The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene. *Genomics*, **35**, 308-311.

Gromoll,J., Simoni,M., y Nieschlag,E. (1996b) An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **81**, 1367-1370.

Gromoll,J., Simoni,M., Nordhoff,V. y col. (1996c) Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. *Mol.Cell Endocrinol.*, **125**, 177-182.

Groome,N.P., Illingworth,P.J., O'Brien,M. y col. (1994) Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, **40**, 717-723.

Groome,N.P., Illingworth,P.J., O'Brien,M. y col. (1996) Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **81**, 1401-1405.

Groome,N.P., Illingworth,P.J., O'Brien,M. y col. (1995) Quantification of inhibin pro-alpha C-containing forms in human serum by a new ultrasensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **80**, 2926-2932.

Gudermann,T., Nurnberg,B., y Schultz,G. (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J.Mol.Med.*, **73**, 51-63.

Guerrero,N.V., Singh,R.H., Manatunga,A. y col. (2000) Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia. *J.Pediatr.*, **137**, 833-841.

Harlow,B.L., Cramer,D.W., y Annis,K.M. (1995) Association of medically treated depression and age at natural menopause. *Am.J.Epidemiol.*, **141**, 1170-1176.

Hoek,A., Schoemaker,J., y Drexhage,H.A. (1997) Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr.Rev.*, **18**, 107-134.

Hoek,A., van Kasteren,Y., Haan-Meulman,M. y col. (1995) Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets, NK cells, and delayed type hypersensitivity skin test in patients with premature ovarian failure. *Am.J.Reprod.Immunol.*, **33**, 495-502.

Hoek,A., van Kasteren,Y., Haan-Meulman,M. y col. (1993) Dysfunction of monocytes and dendritic cells in patients with premature ovarian failure. *Am.J.Reprod.Immunol.*, **30**, 207-217.

Howell,S. y Shalet,S. (1998) Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.*, **27**, 927-943.

Irvine,W.J., Chan,M.M., Scarth,L. y col. (1968) Immunological aspects of premature ovarian failure associated with idiopathic Addison's disease. *Lancet*, **2**, 883-887.

Jeong,H.J., Cho,S.W., Kim,H.A. y col. (2004) G769A Variation of Inhibin alpha-gene in Korean Women with Premature Ovarian Failure. *Yonsei Med.J.*, **45**, 479-482.

Jiang,M., Aittomaki,K., Nilsson,C. y col. (1998) The frequency of an inactivating point mutation (566C-->T) of the human follicle-stimulating hormone receptor gene in four

populations using allele-specific hybridization and time-resolved fluorometry. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **83**, 4338-4343.

Jones,G.S. y Moraes-Ruehsen,M. (1969) A new syndrome of amenorrhoe in association with hypergonadotropism and apparently normal ovarian follicular apparatus. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **104**, 597-600.

Kalantaridou,S.N., Davis,S.R., y Nelson,L.M. (1998) Premature ovarian failure. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.*, **27**, 989-1006.

Kater,C.E. y Biglieri,E.G. (1994) Disorders of steroid 17 alpha-hydroxylase deficiency. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.*, **23**, 341-357.

Kim,J.G., Moon,S.Y., Chang,Y.S. y col. (1995) Autoimmune premature ovarian failure. *J.Obstet.Gynaecol.*, **21**, 59-66.

Kinch,R.A., Plunkett,E.R., Smout,M.S. y col. (1965) Primary ovarian failure; a clinicopathological and cytogenetic study. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **91**, 630-644.

Klein,N.A., Illingworth,P.J., Groome,N.P. y col. (1996) Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **81**, 2742-2745.

Krauss,C.M., Turksoy,R.N., Atkins,L. y col. (1987) Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome. *N.Engl.J.Med.*, **317**, 125-131.

LaBarbera,A.R., Miller,M.M., Ober,C. y col. (1988) Autoimmune etiology in premature ovarian failure. *Am.J.Reprod.Immunol.Microbiol.*, **16**, 115-122.

Lambert,A., Weetman,A.P., McLoughlin,J. y col. (1996) A search for immunoglobulins inhibiting gonadal cell steroidogenesis in premature ovarian failure. *Hum.Reprod.*, **11**, 1871-1876.

Laml,T., Preyer,O., Umek,W. y col. (2002) Genetic disorders in premature ovarian failure. *Hum.Reprod.Update.*, **8**, 483-491.

Latronico,A.C., Anasti,J., Arnhold,I.J. y col. (1996) Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N.Engl.J.Med.*, **334**, 507-512.

Layman,L.C., Amde,S., Cohen,D.P. y col. (1998) The Finnish follicle-stimulating hormone receptor gene mutation is rare in North American women with 46,XX ovarian failure. *Fertil.Steril.*, **69**, 300-302.

Layman,L.C., Lee,E.J., Peak,D.B. y col. (1997) Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. *N.Engl.J.Med.*, **337**, 607-611.

Lee,K.H., Chung,H.S., Kim,H.S. y col. (2003) Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behcet's disease. *Arthritis Rheum.*, **48**, 2025-2035.

Leslie,D., Lipsky,P., y Notkins,A.L. (2001) Autoantibodies as predictors of disease. *J.Clin.Invest*, **108**, 1417-1422.

Liu,J.Y., Gromoll,J., Cedars,M.I. y col. (1998) Identification of allelic variants in the follicle-stimulating hormone receptor genes of females with or without hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil.Steril.*, **70**, 326-331.

Lopez-Aleman,y,R., Longstaff,C., Hawley,S. y col. (2003) Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-Enolase. *Am.J.Hematol.*, **72**, 234-242.

Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. y col. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275.

Luborsky,J., Llanes,B., Davies,S. y col. (1999) Ovarian autoimmunity: greater frequency of autoantibodies in premature menopause and unexplained infertility than in the general population. *Clin.Immunol.*, **90**, 368-374.

MacNaughton,J., Banah,M., McCloud,P. y col. (1992) Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, **36**, 339-345.

Manley,S.W., Bourke,J.R., y Hawker,R.W. (1974) The thyrotrophin receptor in guinea-pig thyroid homogenate: interaction with the long-acting thyroid stimulator. *J.Endocrinol.*, **61**, 437-445.

Marozzi,A., Porta,C., Vegetti,W. y col. (2002) Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Hum.Reprod.*, **17**, 1741-1745.

Mather,J.P., Woodruff,T.K., y Krummen,L.A. (1992) Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **201**, 1-15.

Matthews,C.H., Borgato,S., Beck-Peccoz,P. y col. (1993) Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat.Genet.*, **5**, 83-86.

Mattison,D.R., Evans,M.I., Schwimmer,W.B. y col. (1984) Familial premature ovarian failure. *Am.J.Hum.Genet.*, **36**, 1341-1348.

McDonough,P.G., Byrd,J.R., Tho,P.T. y col. (1977) Phenotypic and cytogenetic findings in eighty-two patients with ovarian failure--changing trends. *Fertil.Steril.*, **28**, 638-641.

McGee,E.A. y Hsueh,A.J. (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr.Rev.*, **21**, 200-214.

McGrath,S.A., Esquela,A.F., y Lee,S.J. (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol.Endocrinol.*, **9**, 131-136.

McKinlay,S.M. (1996) The normal menopause transition: an overview. *Maturitas*, **23**, 137-145.

Meduri,G., Touraine,P., Beau,I. y col. (2003) Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **88**, 3491-3498.

Mehta,A.E., Matwijiw,I., Lyons,E.A. y col. (1992) Noninvasive diagnosis of resistant ovary syndrome by ultrasonography. *Fertil.Steril.*, **57**, 56-61.

Moncayo,H., Moncayo,R., Benz,R. y col. (1989) Ovarian failure and autoimmunity. Detection of autoantibodies directed against both the unoccupied luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor and the hormone-receptor complex of bovine corpus luteum. *J.Clin.Invest*, **84**, 1857-1865.

Montgomery,G.W., Duffy,D.L., Hall,J. y col. (2000) Dizygotic twinning is not linked to variation at the alpha-inhibin locus on human chromosome 2. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **85**, 3391-3395.

Moodie,F.D., Leaker,B., Cambridge,G. y col. (1993) Alpha-enolase: a novel cytosolic autoantigen in ANCA positive vasculitis. *Kidney Int.*, **43**, 675-681.

Morrison,J.C., Givens,J.R., Wiser,W.L. y col. (1975) Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil.Steril.*, **26**, 655-659.

Nagamine,K., Peterson,P., Scott,H.S. y col. (1997) Positional cloning of the APECED gene. *Nat.Genet.*, **17**, 393-398.

Ochi,H., Horiuchi,I., Araki,N. y col. (2002) Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. *FEBS Lett.*, **528**, 197-202.

Orth,T., Kellner,R., Diekmann,O. y col. (1998) Identification and characterization of autoantibodies against catalase and alpha-enolase in patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin.Exp.Immunol.*, **112**, 507-515.

Pache,T.D., Wladimiroff,J.W., de Jong,F.H. y col. (1990) Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil.Steril.*, **54**, 638-642.

Palumbo,A. y Yeh,J. (1995) Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. *J.Soc.Gynecol.Investig.*, **2**, 565-573.

Pampfer,S. y Thomas,K. (1989) [Clinical value of inhibin in women]. *J.Gynecol.Obstet.Biol.Reprod.(Paris)*, **18**, 279-287.

Pancholi,V. (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol.Life Sci.*, **58**, 902-920.

Pancholi,V. y Fischetti,V.A. (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J.Biol.Chem.*, **273**, 14503-14515.

Parker,K.C., Garrels,J.I., Hines,W. y col. (1998) Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination. *Electrophoresis*, **19**, 1920-1932.

Pasquino,A.M., Passeri,F., Pucarelli,I. y col. (1997) Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner's Syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **82**, 1810-1813.

Patrick,J. y Lindstrom,J. (1973) Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science*, **180**, 871-872.

Peterson,P., Uibo,R., Peranen,J. y col. (1997) Immunoprecipitation of steroidogenic enzyme autoantigens with autoimmune polyglandular syndrome type I (APS I) sera; further evidence for independent humoral immunity to P450c17 and P450c21. *Clin.Exp.Immunol.*, **107**, 335-340.

Petraglia,F., Hartmann,B., Luisi,S. y col. (1998) Low levels of serum inhibin A and inhibin B in women with hypergonadotropic amenorrhea and evidence of high levels of activin A in women with hypothalamic amenorrhea. *Fertil.Steril.*, **70**, 907-912.

Powell,C.M., Taggart,R.T., Drumheller,T.C. y col. (1994) 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.*, **52**, 19-26.

Pratesi,F., Moscato,S., Sabbatini,A. y col. (2000) Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J.Rheumatol.*, **27**, 109-115.

Reame,N.E., Wyman,T.L., Phillips,D.J. y col. (1998) Net increase in stimulatory input resulting from a decrease in inhibin B and an increase in activin A may contribute in part to the rise in follicular phase follicle-stimulating hormone of aging cycling women. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **83**, 3302-3307.

Rebar,R.W. y Connolly,H.V. (1990) Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil.Steril.*, **53**, 804-810.

Rebar,R.W., Erickson,G.F., y Yen,S.S. (1982) Idiopathic premature ovarian failure: clinical and endocrine characteristics. *Fertil.Steril.*, **37**, 35-41.

Reimand,K., Peterson,P., Hyoty,H. y col. (2000) 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase autoantibodies are rare in premature ovarian failure. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **85**, 2324-2326.

Richardson,S.J., Senikas,V., y Nelson,J.F. (1987) Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **65**, 1231-1237.

Roberts,V.J., Barth,S., el Roeiy,A. y col. (1993) Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **77**, 1402-1410.

Roosendaal,C., de Jong,M.A., van den Berg,A.P. y col. (2000) Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J.Hepatol.*, **32**, 734-741.

Ruan,Q.G. y She,J.X. (2004) Autoimmune polyglandular syndrome type 1 and the autoimmune regulator. *Clin.Lab Med.*, **24**, 305-317.

Sabbatini,A., Dolcher,M.P., Marchini,B. y col. (1997) Alpha-enolase is a renal-specific antigen associated with kidney involvement in mixed cryoglobulinemia. *Clin.Exp.Rheumatol.*, **15**, 655-658.

Sala,C., Arrigo,G., Torri,G. y col. (1997) Eleven X chromosome breakpoints associated with premature ovarian failure (POF) map to a 15-Mb YAC contig spanning Xq21. *Genomics*, **40**, 123-131.

Santoro,N., Adel,T., y Skurnick,J.H. (1999) Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil.Steril.*, **71**, 658-662.

Sarto,G.E. (1974) Cytogenetics of fifty patients with primary amenorrhea. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **119**, 14-23.

Saulot,V., Vittecoq,O., Charlionet,R. y col. (2002) Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **46**, 1196-1201.

Sehested,A., Juul,A.A., Andersson,A.M. y col. (2000) Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **85**, 1634-1640.

Shelling,A.N., Burton,K.A., Chand,A.L. y col. (2000) Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Hum.Reprod.*, **15**, 2644-2649.

Shmerling,R.H. y Delbanco,T.L. (1991) The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *Am.J.Med.*, **91**, 528-534.

Simon,A.M., Goodenough,D.A., Li,E. y col. (1997) Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, **385**, 525-529.

Simoni,M., Gromoll,J., Hoppner,W. y col. (1999) Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **84**, 751-755.

Simoni,M., Gromoll,J., y Nieschlag,E. (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr.Rev.*, **18**, 739-773.

Singh,R.P. y Carr,D.H. (1966) The anatomy and histology of XO human embryos and fetuses. *Anat.Rec.*, **155**, 369-383.

Snieder,H., MacGregor,A.J., y Spector,T.D. (1998) Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **83**, 1875-1880.

Snowdon,D.A., Kane,R.L., Beeson,W.L. y col. (1989) Is early natural menopause a biologic marker of health and aging? *Am.J.Public Health*, **79**, 709-714.

Sundstrom,P. y Aliaga,G.R. (1992) Molecular cloning of cDNA and analysis of protein secondary structure of *Candida albicans* enolase, an abundant, immunodominant glycolytic enzyme. *J.Bacteriol.*, **174**, 6789-6799.

Takakura,K., Takebayashi,K., Wang,H.Q. y col. (2001) Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are rare in Japanese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil.Steril.*, **75**, 207-209.

Takebayashi,K., Takakura,K., Wang,H. y col. (2000) Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil.Steril.*, **74**, 976-979.

Tan,E.M., Feltkamp,T.E., Smolen,J.S. y col. (1997) Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.*, **40**, 1601-1611.

Tang,V.W. y Faiman,C. (1983) Premature ovarian failure: a search for circulating factors against gonadotropin receptors. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **146**, 816-821.

Tapanainen,J.S., Vaskivuo,T., Aittomaki,K. y col. (1998) Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. *Mol.Cell Endocrinol.*, **145**, 129-135.

Tharapel,A.T., Anderson,K.P., Simpson,J.L. y col. (1993) Deletion (X)(q26.1-->q28) in a proband and her mother: molecular characterization and phenotypic-karyotypic deductions. *Am.J.Hum.Genet.*, **52**, 463-471.

Themmen,A.P.N. y Huhtaniemi,I.T. (2000) Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr.Rev.*, **21**, 551-583.

Therman,E., Laxova,R., y Susman,B. (1990) The critical region on the human Xq. *Hum.Genet.*, **85**, 455-461.

Tibiletti,M.G., Testa,G., Vegetti,W. y col. (1999) The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. *Hum.Reprod.*, **14**, 2731-2734.

Tilly,J.L., LaPolt,P.S., y Hsueh,A.J. (1992) Hormonal regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, **130**, 1296-1302.

Toledo,S.P., Brunner,H.G., Kraaij,R. y col. (1996) An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **81**, 3850-3854.

Tong,Y., Liao,W.X., Roy,A.C. y col. (2001) Absence of mutations in the coding regions of follicle-stimulating hormone receptor gene in Singapore Chinese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Horm.Metab Res.*, **33**, 221-226.

Touraine,P., Beau,I., Gougeon,A. y col. (1999) New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol.Endocrinol.*, **13**, 1844-1854.

Turkington,R.W. y Lebovitz,H.E. (1967) Extra-adrenal endocrine deficiencies in Addison's disease. *Am.J.Med.*, **43**, 499-507.

Turner,R., Stratton,I., Horton,V. y col. (1997) UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet*, **350**, 1288-1293.

Uibo,R., Aavik,E., Peterson,P. y col. (1994) Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450scc, P450c17, and P450c21 in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **78**, 323-328.

Uzielli,M.L., Guarducci,S., Lapi,E. y col. (1999) Premature ovarian failure (POF) and fragile X premutation females: from POF to to fragile X carrier identification, from fragile X carrier diagnosis to POF association data. *Am.J.Med Genet.*, **84**, 300-303.

van Kasteren,Y.M., Hundscheid,R.D., Smits,A.P. y col. (1999) Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum.Reprod.*, **14**, 2455-2459.

Van Weissenbruch,M.M., Hoek,A., Vliet-Bleeker,I. y col. (1991) Evidence for existence of immunoglobulins that block ovarian granulosa cell growth in vitro. A putative role in resistant ovary syndrome? *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **73**, 360-367.

Vegetti,W., Grazia,T.M., Testa,G. y col. (1998) Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases. *Hum.Reprod.*, **13**, 1796-1800.

Vegetti,W., Marozzi,A., Manfredini,E. y col. (2000) Premature ovarian failure. *Mol.Cell Endocrinol.*, **161**, 53-57.

Vincent,A. y Newsom-Davis,J. (1985) Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, **48**, 1246-1252.

Wakui,H., Imai,H., Komatsuda,A. y col. (1999) Circulating antibodies against alpha-enolase in patients with primary membranous nephropathy (MN). *Clin.Exp.Immunol.*, **118**, 445-450.

Walsh,T.J., Hathorn,J.W., Sobel,J.D. y col. (1991) Detection of circulating candida enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N.Engl.J.Med.*, **324**, 1026-1031.

Walter,M., Berg,H., Leidenberger,F.A. y col. (1995) Autoreactive epitopes within the human alpha-enolase and their recognition by sera from patients with endometriosis. *J.Autoimmun.*, **8**, 931-945.

Weiss,J., Crowley,W.F., Jr., Halvorson,L.M. y col. (1993) Perifusion of rat pituitary cells with gonadotropin-releasing hormone, activin, and inhibin reveals distinct effects on gonadotropin gene expression and secretion. *Endocrinology*, **132**, 2307-2311.

Whitney,E.A., Layman,L.C., Chan,P.J. y col. (1995) The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls. *Fertil.Steril.*, **64**, 518-524.

Winqvist,O., Gebre-Medhin,G., Gustafsson,J. y col. (1995) Identification of the main gonadal autoantigens in patients with adrenal insufficiency and associated ovarian failure. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **80**, 1717-1723.

Yeh,J. y Adashi,E (2001) El ciclo ovárico. *Endocrinología de la Reproducción*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Pág: 164-202.

Ying,S.Y. (1988) Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr.Rev.*, **9**, 267-293.

Zachmann,M. (1995) Defects in steroidogenic enzymes. Discrepancies between clinical steroid research and molecular biology results. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, **53**, 159-164.

Zheng,W., Magid,M.S., Kramer,E.E. y col. (1996) Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am.J.Pathol.*, **148**, 47-53.