

---

## TRABAJO ORIGINAL

---

# Estudios de la región 5'UTR del gen FMR-1 en pacientes con falla ovárica prematura

## Studies of the 5' - UTR region in the FMR-1 gene in patients with Premature Ovarian Failure

Chiauzzi V.A.<sup>1</sup>, Ferder I.<sup>1</sup>, Alba L.<sup>2</sup>, Belli S.<sup>3</sup>, Escobar M.E.<sup>4</sup>, Charreau E.H.<sup>1</sup>, Dain L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET, <sup>2</sup>Centro Nacional de Genética Médica- ANLIS,

<sup>3</sup>División Endocrinología - Hospital Durand, <sup>4</sup>Centro de Investigaciones Endocrinológicas - CONICET

---

### RESUMEN

La falla ovárica prematura (FOP) es un síndrome de patogénesis multicausal que afecta aproximadamente al 1% de las mujeres en edad reproductiva. Numerosos estudios asocian el estado de premutación (amplificación del número de tripletes CGG entre 50/55 y 200 repeticiones) en el gen FMR-1 y FOP. Alrededor de un 4% de las pacientes FOP presentan alelos con premutación. La amplificación del número de tripletes por encima de 200 repeticiones causa el Síndrome de Fragilidad del X (SFX).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la región 5' no codificante del gen en un grupo de pacientes FOP de Argentina. La región de interés se amplificó por PCR a partir de muestras de ADN de 100 pacientes FOP y 145 mujeres controles. Los alelos de las pacientes y controles fueron agrupados en 7 categorías de acuerdo al número de tripletes obtenidos. Se observó que el número de repeticiones más frecuente se encuentra en el rango de 26 a 30 tripletes, tanto en pacientes como en controles. En el grupo de pacientes FOP, 5/197 (2.6%) alelos no relacionados estudiados presentaron un número de tripletes CGG mayor a 50, mientras que sólo 1 de 290 (0.34%) para el grupo control. Todas las pacientes FOP con valores de tripletes CGG mayor a 50 presentaron amenorrea secundaria.

Estos resultados están en concordancia con lo comunicado para otras poblaciones acerca de la existencia de una asociación entre la premutación del gen FMR-1 y el desarrollo de FOP. Asimismo, los resultados obtenidos refuerzan la importancia de la genotipificación del gen FMR-1 en las pacientes FOP, a los efectos de estimar el riesgo de su descendencia para el SFX. **Rev Argent Endocrinol Metab 47: 3-10, 2010**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés

**Palabras clave:** Falla Ovárica Prematura, FMR-1, premutación

### ABSTRACT

Premature ovarian failure (POF) is a syndrome of multicausal pathogenesis that affects 1% of women before the age of 40. Several studies associate the premutation state (CGG repeats increased in number between 50/55 and 200) in the FMR-1 gene and POF. About 4% of POF women have alleles in the FMR-1 gene in the premutation range. An increase above 200 in the number of triplets in this gene causes the Fragile X Syndrome (FXS).

The purpose of the present study was to analyze the 5' untranslated region of the FMR-1 gene in a group of patients from Argentina.

The region of interest was amplified by PCR from DNA samples of 100 POF patients and 145 control women. Alleles from controls and patients were grouped in 7 categories according to the number of triplets obtained. We observed that the most frequent number of repeats ranged from 26 to 30 triplets, in both patient and control groups. In the POF group, 5 out of 197 (2.6%) not related alleles presented a number of CGG triplets higher than 50, while only 1 out of 290 (0.34%) was present in controls. All POF patients with a number of CGG repeats higher than 50 presented secondary amenorrhea.

These results are in accordance with previous reports from other populations showing an association between the premutation state in the FMR-1 gene and POF development. In addition, these results reinforce the importance of genotyping POF patients to estimate the risk of their offspring for Fragile X Syndrome. **Rev Argent Endocrinol Metab 47: 3-10, 2010**

No financial conflicts of interest exist.

**Key words:** Premature Ovarian Failure, FMR-1 gene, premutation

## INTRODUCCIÓN

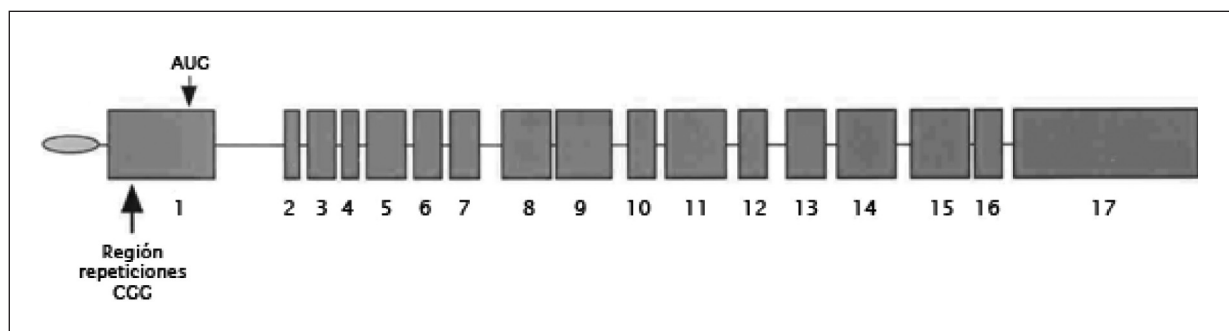
La falla ovárica prematura (FOP) se caracteriza por amenorrea primaria o secundaria antes de los 40 años, hipoestrogenismo e hipergonadotropismo con distintos grados de atresia folicular<sup>(1)</sup>, afectando al 1% de las mujeres en edad fértil<sup>(2)</sup>. Un amplio espectro de mecanismos patogénicos conducen al desarrollo de FOP, tales como alteraciones cromosómicas, génicas, autoinmunes, metabólicas, procesos infecciosos, iatrogenia o falta de etiología demostrable en muchos casos (idiopáticos), caracterizándola como un síndrome muy heterogéneo de patogénesis multicausal<sup>(3)</sup>.

Debido a la presencia de varios casos dentro de una misma familia, se ha propuesto que la patología podría tener origen genético<sup>(4,5)</sup> y se han estudiado genes relacionados con proteínas involucradas en la función ovárica, como por ejemplo el receptor de FSH (R-FSH), entre otros. Hasta el presente se han descrito 9 mutaciones inactivantes del gen, una de ellas sólo en Finlandia, y las otras 8 halladas en casos aislados de FOP<sup>(6,7)</sup>. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio hemos analizado el gen del R-FSH en 20 pacientes FOP. Sin embargo, no hemos evidenciado la presencia de mutaciones en el mismo<sup>(8)</sup>. Los datos obtenidos además, en otras poblaciones analizadas<sup>(9-13)</sup> sugerirían que las mutaciones en este gen son poco frecuentes como causales de la patología. Asimismo, una mutación y un polimorfismo en el gen de la Inhibina-alfa<sup>(14,15)</sup> se han asociado a FOP. Resultados de nuestro laboratorio, analizando 50 pacientes FOP y 135 mujeres controles, pondrían en duda la existencia de tal asociación<sup>(16)</sup>.

Se ha postulado al gen FMR-1 como otro gen candidato asociado al desarrollo de FOP. Este gen

se localiza en el cromosoma X y es responsable del Síndrome de Fragilidad del X (SFX), la causa más común de retardo mental luego del Síndrome de Down. Este gen se caracteriza por poseer, en su región 5' no codificante, repeticiones de tripletes CGG. En la población normal, el número de tripletes CGG puede variar hasta 50 repeticiones (Figura 1). En individuos con SFX el número de tripletes es mayor a 200 repeticiones (mutación completa). Si el número de tripletes CGG se repiten entre 50/55 y 200 veces, el individuo es considerado premutado. La premutación puede mantenerse durante varias generaciones, o bien expandir a mutación completa en una generación. Esta expansión ocurre durante la meiosis materna<sup>(17)</sup>. Por lo tanto una mujer portadora de un alelo premutado, tiene riesgo de descendencia de un niño con SFX.

Un número cada vez más creciente de trabajos dan cuenta de la asociación entre el estado de premutación en el gen FMR-1 y la aparición de FOP<sup>(18-20)</sup>. Aproximadamente entre el 10 y el 20% de las madres premutadas de niños con SFX desarrollan FOP<sup>(21)</sup>. Por otro lado, la premutación en el gen se ha identificado entre el 0.8% y el 7.5% de mujeres con FOP esporádicas y hasta un 13% en el caso de mujeres con antecedentes familiares de la patología<sup>(21-25)</sup>. La prevalencia de la premutación en controles ha sido estimada entre 1/100 y 1/300<sup>(26-29)</sup>. El hecho que sólo un porcentaje de mujeres con premutación desarrolla FOP, sugiere la participación de otros factores genéticos y/o ambientales en la expresión de la patología. Si bien el mecanismo molecular de la patogenia no está dilucidado, el *status* de premutación *per se* parecería estar influyendo en la expresión de la enfermedad, ya que no se ha descrito que mujeres que poseen expansión completa de tripletes desarrollen FOP<sup>(30)</sup>. Se ha



**Figura 1.** esquema representativo del gen FMR-1 con sus 17 exones. Las repeticiones CGG en la región 5' no codificante del gen se presentan en un número variable. Los individuos normales presentan entre 5 y 50/55 tripletes CGG, mientras que valores entre 50/55 y 200 tripletes corresponden a la premutación del gen. Valores por encima de 200 repeticiones, se observan en individuos con mutación completa.

observado que el número de tripletes que más se asocia con el desarrollo de FOP oscila entre 80-99 repeticiones y que cuando los valores son mayores o iguales a 100, el riesgo disminuye<sup>(31,32)</sup>. Asimismo, se ha descrito un adelanto en la edad de la menopausia de aproximadamente 5 años en las mujeres portadoras de la premutación del gen FMR-1<sup>(31,33)</sup>.

Teniendo en cuenta que hasta el presente no se han realizado estudios de asociación entre el número de tripletes expandidos del gen FMR-1 y el desarrollo de FOP en nuestra población, el objetivo del presente trabajo es estudiar la región 5' no codificante del gen en un grupo de pacientes con FOP de Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio comprendió 100 pacientes FOP y 145 mujeres controles. 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.

## MUESTRAS

**1. Pacientes FOP:** los criterios diagnósticos de FOP fueron la presencia de amenorrea antes de los 40 años con una duración mayor a 6 meses, niveles serológicos de FSH > 40 mUI/ml (valores normales en fase folicular: 2-9 mUI/ml) en dos determinaciones sucesivas y niveles de 17 $\beta$ -estradiol menores a 15 pg/ml (valores normales de fase folicular: 20-120 pg/ml). Sólo se incluyeron pacientes FOP con cariotipo normal 46, XX. Veintidós pacientes (n=22) presentaron amenorrea primaria y setenta y ocho (n=78) amenorrea secundaria. Veinticinco pacientes (n=25) presentaron FOP asociado a otras enfermedades autoinmunes (FOP-AEA); las restantes setenta y cinco (n=75) fueron consideradas FOP idiopático (FOP-I) ya que no mostraron otra condición relacionada con la patología. Del total de pacientes FOP, veintiséis (n=26) presentaron otros casos de FOP entre sus familiares de primer y segundo grado y el resto corresponden a casos esporádicos. En ningún caso se incluyeron pacientes con FOP debido a cirugía ovárica, quimioterapia o radioterapia previas, o enfermedades metabólicas como galactosemia.

Las muestras fueron derivadas al laboratorio desde diferentes hospitales y en todos los casos el diagnóstico de FOP fue realizado por el médico competente.

**2. Controles:** se incluyeron 145 mujeres control, las cuales se diferenciaron en 2 grupos de acuerdo a los criterios de inclusión: a) controles menores de 40 años (n=82): mujeres con ciclos regulares, sin antecedentes familiares de menopausia temprana o precoz, y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes; 35 de ellas tenían fertilidad comprobada; b) controles mayores de 40 años (n=63): mujeres con historia menstrual normal, sin menopausia prematura y con fertilidad comprobada.

## Estudio de la presencia de tripletes expandidos del gen FMR-1

Se aisló el ADN de las muestras a partir de linfocitos de sangre periférica por métodos standard. La región genómica de interés se estudió mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores específicos que comprenden la región de interés<sup>(34)</sup> en presencia de la enzima Taq polimerasa Platinun Pfx (Invitrogen). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa-Metaphor 2% (agarosa de alta resolución, Lonza, USA) teñidos con bromuro de etidio. Una banda de amplificación por encima de 374 bp corresponde a un alelo con más de 50 tripletes. Como controles se utilizaron muestras de ADN correspondientes a un hombre premutado y cuatro mujeres premutadas, madres de niños con SFX.

## Cálculo del número de tripletes

La estimación del número de tripletes se realizó mediante la interpolación con una curva patrón de marcadores de peso molecular. La variabilidad interensayo fue estimada en un 7.5%.

## Análisis estadístico

Los valores obtenidos para el número de tripletes de pacientes y controles fueron comparados mediante el test de Chi<sup>2</sup> o test de Fisher, según corresponda.

## RESULTADOS

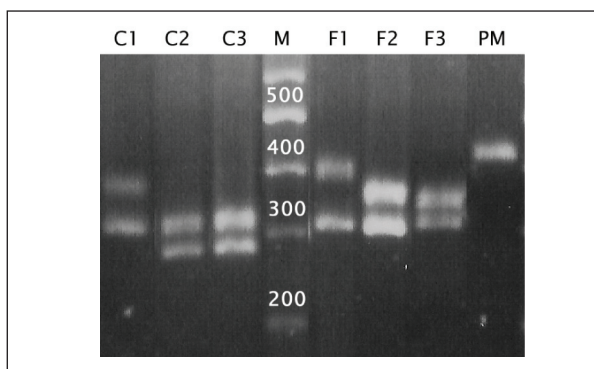
### Geles de agarosa- Metaphor 2%

La Figura 2 muestra una electroforesis representativa de muestras controles, pacientes FOP

y un hombre premutado usado como control. Las bandas de amplificación por encima de 374 bp corresponden a aquellos alelos que poseen un número mayor a 50 tripletes CGG. Las muestras que presentaron sólo una banda de amplificación (homocigotas, aproximadamente un 25%) fueron repetidas para su confirmación, dado que no se puede descartar la presencia de un alelo de alto peso molecular que no se visualice debido a que la PCR es refractaria a la amplificación de alelos de un número elevado de tripletes. La eficiencia de la reacción de PCR se relaciona inversamente con el número de repeticiones CGG permitiendo detectar alelos de tamaño normal, intermedios y premutados. El análisis mediante Southern blot es necesario para alelos expandidos a mutación completa<sup>(35)</sup>.

### Clasificación de los pacientes

De acuerdo al número de tripletes, los alelos presentes en los pacientes y controles se agruparon en 7 categorías como se muestra en la Tabla I. Se observa que el número de repeticiones más frecuente se encuentra en el rango de 26 a 30 tripletes, tanto en pacientes como en controles. No se observaron diferencias significativas en la distribución del número de tripletes entre controles mayores y menores de 40 años (datos no mostrados). Si bien en este trabajo consideramos el límite entre alelos normales y premutados en 50 tripletes CGG, datos de bibliografía estarían sugiriendo una clasificación adicional de una "zona gris o intermedia" entre 45 y 55 tripletes CGG<sup>(36,37)</sup>.



**Figura 2.** gel de agarosa-Metaphor 2% correspondiente a muestras controles (C), pacientes FOP (F) y un hombre premutado (PM) utilizado como control. El marcador de peso molecular se identifica con M. Las bandas de amplificación que se encuentran por encima de 374 bp corresponden a aquellos alelos que poseen un número mayor a 50 tripletes CGG.

**TABLA I.** Número de tripletes en alelos no relacionados de pacientes y controles

Tripletes	Pacientes (%)	Controles (%)
≤20	20 (10,1)	23 (7,9)
21-25	32 (16,2)	52 (17,9)
26-30	63 (32)	89 (30,8)
31-35	36 (18,3)	76 (26,2)
36-40	20 (10,2)	25 (8,6)
41-50	21 (10,6)	24 (8,3)
>50	5* (2,6)	1 (0,34)
Total alelos	197 (100)	290 (100)

\* 2 pacientes con alelos ≤ 55; Test Chi<sup>2</sup>: p = 0,137; Test de Fisher >50 vs. <50: p= 0,042.

Los diferentes alelos hallados en pacientes y controles fueron agrupados en siete categorías de acuerdo al número de tripletes, excluyendo a los alelos compartidos en individuos de una misma familia.

En el grupo de pacientes FOP, de los ciento noventa y siete (197) alelos no relacionados estudiados, cinco de ellos presentaron un número de tripletes CGG mayor a 50, dos de los cuales fueron menores a 55 (zona gris). Estos valores corresponden al 2,6% de alelos premutados dentro de la población de FOP.

En el grupo de individuos controles, de los doscientos noventa (290) alelos estudiados sólo uno de ellos presentó valores de tripletes CGG mayor a 50 y representa el 0,34% de alelos premutados dentro de la población control.

En la Tabla II se observa que todas las pacientes FOP con valores de tripletes CGG mayor a 50 presentan amenorrea secundaria, mientras que no se observan diferencias entre los dos grupos de pacientes con respecto a los antecedentes familiares y a la asociación con enfermedades autoinmunes.

La distribución de los diferentes grupos de tripletes no resultó ser estadísticamente significativa (Test de Chi<sup>2</sup>; p= 0,137). Sin embargo, cuando los datos fueron agrupados como mayores o menores de 50 tripletes, se observa que las diferencias encontradas entre pacientes y controles sí lo son (Test de Fisher; p= 0.042).

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Numerosos trabajos en la bibliografía mencionan una asociación entre el estado de premutación (amplificación de tripletes CGG entre 50/55 y 200 repeticiones) en el gen FMR-1 y la aparición de FOP<sup>(18,19,20)</sup>. La premutación en este gen se ha

**TABLA II.** Características clínicas de las pacientes FOP estudiadas y análisis del número de tripletes CGG del gen FMR-1

Nº tripletes CGG	Pacientes N	Amenorrea		Asociación a enfermedades autoinmunes (AEA)		Antecedentes familiares	
		1ria	2ria	Sí (FOP-AEA)	No (FOP-I)	Sí (FOP-Familiar)	No (FOP-Esporádico)
<50	93	22	71	22	71	23	70
>50	7	0	7	3	4	3	4

FOP-AEA: FOP asociado a enfermedades autoinmunes; FOP-I: FOP idiopático

Las pacientes fueron agrupadas según presentaran alelos con un número menor o mayor a 50 tripletes, respectivamente. Se consigna para cada grupo el número de pacientes con amenorrea primaria o secundaria, presencia de enfermedades autoinmunes asociadas o antecedentes familiares.

descripto también asociada a una enfermedad neurodegenerativa: *Síndrome de temblor y ataxia asociado a Síndrome del cromosoma X frágil*, o FXTAS<sup>(38)</sup>. Si bien no se conoce el mecanismo por el cual la premutación del gen FMR-1 puede causar la disfunción ovárica y la falla ovárica prematura, se ha postulado que podría ocurrir una disminución inicial del número de folículos o una velocidad acelerada de la atresia<sup>(21,36)</sup>. Es sabido que la proteína FMRP se expresa en altas cantidades en células germinales del ovario fetal<sup>(39-40)</sup>. Asimismo, esta proteína actúa como inhibidor de la traducción de otros ARN mensajeros<sup>(41)</sup>. Por lo tanto, se ha postulado que un aumento de FMRP en estadios del desarrollo de los ovocitos podría conducir a una haploinsuficiencia de proteínas involucradas en este proceso, provocando una disminución del *pool* inicial de folículos<sup>(36)</sup>. Alternativamente, y dado que en FXTAS se ha observado un aumento del ARN mensajero del gen como consecuencia de la premutación<sup>(42)</sup>, un mecanismo alternativo podría ser que el aumento del ARN mensajero ejerciera un efecto tóxico en el tiempo, con el consecuente incremento de la atresia folicular<sup>(36)</sup>.

En el presente trabajo se ha desarrollado una técnica de PCR para estudiar la región 5' no codificante del gen FMR-1 en una muestra de mujeres con falla ovárica prematura de nuestra población. En este grupo hemos analizado previamente varios genes candidatos como posibles causales de su disfunción ovárica<sup>(8,16)</sup>.

La distribución de alelos de FMR-1 indica que los alelos más comunes son aquellos de 26 a 30 repeticiones CGG, similar a lo descripto para otras poblaciones. Estudios previos han mostrado como valor más común 28 repeticiones CGG para la población de Winnipeg, Canadá<sup>(43)</sup>, 29 repeticiones

CGG en Taiwán<sup>(44)</sup>, 29 y 30 en España<sup>(45)</sup> y 29 repeticiones CGG en la población china<sup>(46)</sup>, aunque las diferencias pequeñas (1-2 repeticiones) se pueden atribuir a errores de metodología. Por otro lado, aproximadamente 29-30 repeticiones CGG parecen reflejar una reserva ovárica normal y valores por encima de éstos indicarían un incremento en el riesgo de envejecimiento ovárico prematuro<sup>(47)</sup>. Estas observaciones han llevado a proponer que el estudio de las repeticiones CGG del gen FMR-1 podría representar un nuevo test para predecir reserva ovárica y las condiciones de fertilidad en la mujer<sup>(48,49)</sup>.

Se ha sugerido que las mujeres portadoras de la premutación en el gen FMR-1, tienen entre 10 y 15 veces más probabilidad de presentar menopausia antes de los 40 años que la población general y en consecuencia, su edad reproductiva finalizaría prematuramente<sup>(21)</sup>. Sin embargo, no existe consenso en la literatura sobre cuál sería el número de tripletes que se debe considerar como límite de corte. Algunos estudios sugieren que el desarrollo de FOP podría incrementarse con alelos de tamaño intermedio entre 41 y 58 repeticiones<sup>(50,51)</sup>. Sin embargo, otros trabajos no han encontrado asociación para valores menores a 45 tripletes CGG<sup>(36)</sup>. La Asociación Americana de Ginecología y Obstetricia (ACOG), por su parte, considera a un paciente no afectado con alelos de tamaño  $\leq 40$  tripletes CGG, intermedios con 41-60 y premutado entre 61-200 tripletes CGG<sup>(52)</sup>. Es necesario, por lo tanto, un número mayor de estudios en diferentes poblaciones a los efectos de determinar con mayor precisión cuáles serían los alelos de riesgo para el desarrollo de FOP.

En este trabajo se analizaron 100 pacientes FOP y 145 mujeres control. Siete pacientes FOP (3 de ellas pertenecientes a una misma familia),

presentaron un número de tripletes CGG mayor a 50, (en 2 de las cuales el número de tripletes es menor o igual a 50, zona gris), y corresponden al 2,6% de alelos premutados dentro de la población de FOP. Nuestros resultados sobre el gen FMR-1 en pacientes FOP revelaron valores similares a los obtenidos por otros autores en otras poblaciones<sup>(43-46)</sup>. En el grupo de individuos control, de las 145 mujeres control, sólo una de ellas presentó un alelo con valores de tripletes CGG mayor a 50, representando el 0,34% de alelos premutados dentro de la población control. Estos valores están en concordancia con otros estudios que sugieren que 1 de cada 100 a 130 mujeres pueden ser portadoras de la premutación en la población general<sup>(26,29)</sup>.

El presente estudio representa el primer trabajo para alelos expandidos del gen FMR-1 en pacientes FOP en nuestra población y demuestra que, mediante una PCR y un método gráfico, se puede hacer una estimación aproximada de las características de las pacientes respecto del número de tripletes CGG en este gen. Sin embargo, aquellas muestras en las que se ha observado sólo una banda de amplificación (homocigotas) deberán ser estudiadas mediante Southern blot, ya que se ha demostrado que la técnica de PCR no permite la amplificación de alelos con un alto número de repeticiones<sup>(35)</sup>.

Dado que las pacientes con premutación poseen un riesgo aumentado de dar a luz niños con SFX, el análisis de tripletes expandidos del gen FMR-1 en pacientes FOP abre la discusión acerca de la pertinencia o no de realizar esta determinación, a los efectos de brindar asesoramiento genético. De hecho, un valor de 59 tripletes CGG se ha descrito hasta el presente, como el tamaño de repeticiones más pequeña que puede expandir a mutación completa en una sola generación<sup>(35)</sup>.

Del trabajo se concluye que: - Se ha demostrado la presencia de tripletes expandidos en siete pacientes FOP de nuestra población.

- Es aconsejable solicitar el estudio de la zona repetitiva CGG del gen FMR-1 a las mujeres que consultan por FOP, bien se trate de una forma familiar o de un caso esporádico, tanto si desean descendencia como si ya la tienen.

**Agradecimientos:** CONICET, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y Fundación Roemmers por el apoyo económico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Moraes-Ruehsen M, Jones GS.** Premature ovarian failure. *Fertil Steril* 18:440-61, 1967.
2. **Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF.** Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 67: 604-6, 1986.
3. **Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA.** Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 18: 107-34, 1997.
4. **Coulam CB, Stringfellow S, Hoefnagel D.** Evidence for a genetic factor in etiology of premature ovarian failure. *Fertil Steril* 40: 693-5, 1983.
5. **Mattison DR, Evans MI, Schwimmer WB, White BJ, Jensen B, Schulman JD.** Familial premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 36: 1341-8, 1984.
6. **Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehtälä H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I, de la Chapelle A.** Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82: 959-68, 1995.
7. **Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P, Kotlar TJ, Huhtaniemi IT, Jameson JL, Cheetham TD, Ball SG.** A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotropic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum Reprod* 18: 251-6, 2003.
8. **Sundblad V, Chiauzzi V, Escobar ME, Dain L, Charreau E.** Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol* 222: 53-9, 2004.
9. **da Fonte Kohek MB, Batista MC, Russell AJ, Vass K, Giacaglia LR, Mendonca BB, Latronico AC.** No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 70: 565-7, 1998.
10. **Layman LC, Made S, Cohen DP, Jin M, Xie J.** The Finnish follicle-stimulating hormone receptor gene mutation is rare in North American women with 46,XX ovarian failure. *Fertil Steril* 69: 300-2, 1998.
11. **Conway GS, Conway E, Walker C, Höppner W, Gromoll J, Simoni M.** 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* 51: 97-9, 1999.
12. **Takakura K, Takebayashi K, Wang HQ, Kimura F, Kasahara K, Noda Y.** Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are rare in Japanese women with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 75: 207-9, 2001.
13. **Jiang M, Aittomäki K, Nilsson C, Pakarinen P, Iitiä A, Torresani T, Simonsen H, Goh V, Pettersson K, de la Chapelle A, Huhtaniemi I.** The frequency of an inactivating point mutation

- (<sup>566</sup>C→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: 4338-43, 1998.
14. **Marozzi A, Porta C, Vegetti W, Crosignani PG, Tibiletti MG, Dalprà L, Ginelli.** Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Hum Reprod* 17: 1741-45, 2002.
  15. **Shelling AN, Burton KA, Chand AL, van Ee CC, France JT, Farquhar CM, Milsom SR, Love DR, Gersak K, Aittomäki K, Winship IM.** Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Hum Reprod* 15: 2644-9, 2000.
  16. **Sundblad V, Chiauzzi V, Landreone L, Campos S, Charreau E, Dain L.** Controversial role of inhibin alpha-subunit gene in the aetiology of premature ovarian failure (POF). *Hum Reprod* 21: 1154-60, 2006.
  17. **Milà M, Mallolas J.** Fragile syndrome: premature ovarian failure preimplantation and preconception genetic diagnosis. *Rev Neurol* 33 (Supl 1): 20-3, 2001.
  18. **Oostra B, Willemsem R.** A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet* 12: 249-57, 2003.
  19. **Allen E, He W, Yadav-Shah M, Sherman S.** A study of the distributional characteristics of FMR1 transcript levels in 238 individuals. *Hum Genet* 114: 439-47, 2004.
  20. **Goswami D, Conway G.** Premature ovarian failure. *Hum Reprod* 11: 391-410, 2005.
  21. **Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, Corrigan EC, Simpson JL.** The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril* 87: 456-65, 2007.
  22. **Conway GS, Payne NN, Webb J, Murray A, Jacobs PA.** Fragile X premutation screening in women with premature ovarian failure. *Hum Reprod* 13: 1184-7, 1998.
  23. **Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P.** Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet* 35: 637-40, 1998.
  24. **Gersak K, Meden-Vrtovec H, Peterlin B.** Fragile X premutation in women with sporadic premature ovarian failure in Slovenia. *Hum Reprod* 18:1637-40, 2003.
  25. **Bussani C, Papi L, Sestini R, Baldinotti F, Bucciantini S, Bruni V, Scarselli G.** Premature ovarian failure and fragile X premutation: a study on 45 women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 112:189-91, 2004.
  26. **Hagerman RJ, Hagerman P.** The fragile X permutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev* 12: 278-83, 2002.
  27. **Musci TJ, Caughey AB.** Cost-effectiveness analysis of prenatal population-based fragile X carrier screening. *Am J Obstet Gynecol* 192:1905-12, 2005.
  28. **Cronister A, DiMaio M, Mahoney MJ, Donnenfeld AE, Hallam S.** Fragile X syndrome carrier screening in the prenatal genetic counseling setting. *Genet Med* 7:246-50, 2005.
  29. **Beckett L, Yu Q, Long AN.** The impact of fragile X: prevalence, numbers affected, and economic impact. Presented at National Fragile X Awareness Day Research Seminar, Sacramento, CA, July 21, 2005.
  30. **Sherman SL.** Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 97: 189-94, 2000.
  31. **Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen E, Anido A, Paquin M, Sherman S.** Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod* 20: 402-12, 2005.
  32. **Ennis S, Ward D, Murray A.** Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *Eur J Hum Genet* 14: 253-5, 2006.
  33. **Murray A, Ennis S, Macswiney F, Webb J, Morton NE.** Reproductive and menstrual history of females with fragile X expansions. *Eur J Hum Genet* 8: 247-52, 2000.
  34. **Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, Oostra BA, Nelson DL, Caskey CT.** Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67:1047-58, 1991.
  35. **Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA.** Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genet Med* 7: 584-7, 2005.
  36. **Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, Charen K, He W, Taylor KC, Sherman SL.** Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod* 22: 2142-52, 2007.
  37. **Fernandez-Carbajal I, Walichiewicz P, Xiaosen X, Pan R, Hagerman PJ, Tassone F.** Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population. *J Mol Diagn* 11: 324-9, 2009.
  38. **Oostra BA, Willemsen R.** FMR1: a gene with three faces. *Biochim Biophys Acta.* 1790: 467-77, 2009.
  39. **Bachner D, Manca A, Steinbach, Wöhrle D, Just W, Vogel W, Hameister H, Poustka A.** Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proliferation suggests a special function in both the male and female gonad. *Hum Mol Genet* 2: 2043-50, 1993.
  40. **Rifé M, Nadal A, Milà M, Willemsen R.** Immunohistochemical FMRP studies in a full mutated female fetus. *Am J Med Genet A.* 124:129-32, 2004.
  41. **Jin P, Alisch RS, Warren ST.** RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* 6:1048-53, 2004.
  42. **Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ.** Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 66:6-15, 2000.
  43. **Dawson AJ, Chodirker BN, Chudley AE.** Frequency of FMR1 premutations in a consecutive newborn population by PCR screening of Guthrie blood spots. *Biochem Mol Med* 56: 63-9, 1995.
  44. **Wang YC, Li C, Lin ML, Lin WH, Li SY.** Molecular diagnosis of fragile X syndrome and distribution

- of CGG repeats in the FMR1 gene in Taiwanese. *J Formos Med Assoc* 99: 402-7, 2000.
45. **Milà M, Kruyer H, Glover G, Sánchez A, Carbonell P, Castellví-Bel S, Volpini V, Rosell J, Gabarrón J, López I, Villa M, Ballesta F, Estivill X.** Molecular analysis of the (CGG)<sub>n</sub> expansion in the FMR-1 gene in 59 Spanish fragile syndrome families. *Hum Genet* 94: 395-400, 1994.
  46. **Chen TA, Lu XF, Chen PK, Ho WK.** Variation of the CGG repeat in FMR-1 gene in normal and fragile X Chinese subjects. *Ann Clin Biochem* 34: 517-20, 1997.
  47. **Gleicher N, Weghofer A, Oktay K, Barad D.** Relevance of triple CGG repeats in the FMR1 gene to ovarian reserve. *Reprod Biomed* 19: 385-90, 2009.
  48. **Gleicher N, Weghofer A, Barad DH.** A pilot study of premature ovarian senescence: I. Correlation of triple CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Müllerian hormone. *Fert Steril* 91: 1700-6, 2009.
  49. **Gleicher N, Weghofer A, Oktay K, Barad DH.** Correlation of triple repeats on the FMR1 (fragile X) gene to ovarian reserve: a new infertility test? *Acta Obstet Gynecol Scand* 88: 1024-30, 2009.
  50. **Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP.** FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum Genet* 117: 376-82, 2005.
  51. **Bodega B, Bione S, Dalprà L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, Ginelli E, Marozzi A.** Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod* 21: 952-7, 2006.
  52. **ACOG, Committee Opinión, 338.** Screening for fragile X syndrome. *Obstet Gynecol* 107: 1483-5, 2006.