

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

**LUIZ CEZAR FERNANDES VILODRE**

**MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS DO GENE DO RECEPTOR DO HORMÔNIO  
FOLÍCULO ESTIMULANTE E ASSOCIAÇÃO COM FALÊNCIA OVARIANA  
PREMATURA**

Porto Alegre

2007

**LUIZ CEZAR FERNANDES VILODRE**

**MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS DO GENE DO RECEPTOR DO HORMÔNIO  
FOLÍCULO ESTIMULANTE E ASSOCIAÇÃO COM FALÊNCIA OVARIANA  
PREMATURA**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Poli Mara Spritzer  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Maria Beatriz da Fonte Kohek

Porto Alegre

2007

Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Laboratório de Endocrinologia Molecular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, com o apoio financeiro das seguintes instituições:

PRONEX 26/98

CNPq

FIPE/HCPA

## AGRADECIMENTOS

Somente quem passa por esta experiência é capaz de avaliar a importância do outro. Assim, mais do que um reconhecimento, agradecer é um ato de dividir os méritos de um trabalho concluído.

Aos meus colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do HCPA, pelo ambiente respeitoso e absolutamente sadio que mantemos ao longo destes anos.

Andréa Prestes Nácul	Marcelo Moretto
Claudia Dickel de Andrade	Maria Augusta Maturana
Débora Martinho Morsch	Maria Cristina Gomes Matos
Denusa Wiltgen	Mariana Kirjner Toscani
Emi da Silva Thomé	Patrícia Schwarz
Fabiane Tiskievicz	Polyana Sartori Maier
Fernanda Amarante	Raphaella de Oliveira Maigliavacca
Fernanda Missio Mario	Simone Matiello
Gislaine Krolow Casanova	Simone Radavelli
Igor Gorski Benedetto	Simone Lara
José Humberto Franco Lambert	Simone Ruchel
Lívia da Silveira Mastella	Sheila Bunecker Leite
Luiza Nunes Lages	Vitor Carlos Thomé Breda

Aos incansáveis e sempre disponíveis colegas e funcionários do Laboratório de Endocrinologia Molecular do Departamento de Fisiologia e curso de pós-graduação do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, UFRGS.

Adriana Pozzobom	Lolita Schenider
Gisele Branchini	Maria Alice Machado
Idelma de Oliveira Pithan	Miriam Santa Helena
Iracema Soares ( <i>in memorian</i> )	Rafael Orcy
Isabel Oliveira de Oliveira	Vanderlei Biolchi
Ilma Brum da Silva	Uiraçara Vilarinho Silva

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Maria Beatriz da Fonte Kohek, pela orientação, estímulo e paciência com que me introduziu ao fantástico mundo da biologia molecular.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Poli Mara Spritzer, que, ao longo destes anos, mais do que uma orientadora, tem sido um exemplo de conduta, profissionalismo e rigor científico.

## RESUMO

A falência ovariana prematura (FOP) é uma patologia rara, definida como a falência da função ovariana antes dos 40 anos de idade, causando amenorréia, hipogonadismo e níveis elevados de gonadotrofinas. Na maioria dos casos, apresenta-se na forma esporádica, pois apenas 5% apresentam história familiar. Com relativa frequência, a causa etiológica não é obtida, sendo então denominada de idiopática. Entre as causas conhecidas estão as alterações dos genes ligados ao cromossomo X e cromossomos autossômicos, doenças autoimunes, alterações tóxicas e iatrogênicas. Vários estudos têm sugerido que a FOP possa ser uma desordem genética, sendo o gene do receptor do FSH (FSHR) considerado um dos principais genes candidato. A primeira mutação inativadora do gene do receptor do FSH (FSHR) foi descrita por Aittomaki et al., 1995, em mulheres de famílias finlandesas que apresentavam amenorréia primária e uma mutação em ponto C566T no exon 7. Posteriormente, outras mutações inativadoras foram descritas: Ile169Thr e Arg573Cys (BEAU et al.,1998), Asp224Val e Leu601Val (TOURAINÉ et al.,1999), Ala419Thr (DOHERTY et al., 2002), Pro348Arg (ALLEN et al., 2003) e Pro519Thr (MEDURI et al., 2003). Por outro lado, duas variantes polimórficas, Ala307Thr e Ser307Asn, também, foram identificadas em pacientes com FOP (DA FONTE KOHEK et al., 1998, SUNDBLAD et al., 2004), embora uma relação com o fenótipo não tenha sido sistematicamente investigada. Assim, estudou-se uma coorte de 39 mulheres com FOP (casos esporádicos e familiares) que estão em acompanhamento na Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o objetivo de determinar a presença de mutações e/ou polimorfismos no gene do FSHR e verificar se estão associadas com o fenótipo clínico. Para este fim foram realizados 2 trabalhos, o primeiro analisando 36 casos com FOP esporádica e incluindo 2 pacientes probantes de 2 famílias com FOP. O segundo estudo descrevendo o genótipo e fenótipo de 5 pacientes oriundas de 2 famílias com FOP. Variáveis clínicas e hormonais foram determinadas de todas as pacientes. O DNA foi isolado de leucócitos periféricos. Os exons 6, 7, 9 e 10 do gene do FSHR foram analisados pela reação de polimerização em cadeia (PCR), seguidos por análise de restrição enzimática, eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e seqüenciamento direto. Também foram medidos o volume uterino, espessura endometrial e volume ovariano por

ultrassonografia pélvica transvaginal. Embora não se tenha encontrado nenhuma mutação no gene do FSHR, identificou-se uma alta prevalência dos polimorfismos Ala307Thr e Ser680Asn, que se encontram em desequilíbrio de ligação. Não foram observadas associações entre a presença destes polimorfismos com os níveis séricos de FSH, LH, estradiol, bem como com volume ovariano e presença de folículos. No entanto, as pacientes com FOP esporádicas, com o polimorfismo Ala307Thr, apresentaram a última menstruação mais precocemente (A: idade=33.3 ± 7.1 anos vs. T: 28.6 ± 11.4 anos, p=0.04). A genotipagem dos casos de FOP familiar evidenciou a presença dos 2 polimorfismos do gene do FSHR nas 5 pacientes e o fenótipo foi semelhante ao apresentado pelas mulheres com FOP esporádica. Em conclusão, a presença do polimorfismo Ala307Thr pode estar associada com um início mais precoce das manifestações clínicas em pacientes com FOP. Entretanto, estudos longitudinais são necessários para confirmar os resultados do presente estudo.

Palavras-chave: falência ovariana prematura, gene do receptor do FSH, mutações, polimorfismos, fenótipo.

## ABSTRACT

Premature ovarian failure (POF) is a rare pathology, defined as the failure of ovarian function before age 40, causing amenorrhea, hypogonadism and high gonadotropin levels. In most cases, premature ovarian failure is sporadic and only 5% of the affected individuals have a family history. Relatively often, the etiological cause is not determined and POF is thus labeled idiopathic. Among the known causes are alterations associated with the X chromosome and autosomal chromosomes, autoimmune diseases, and toxic and iatrogenic alterations. Several studies have suggested that POF may be a genetic disorder, the FSH receptor (FSHR) gene being considered one of the main candidate genes. The first inactivating mutation in the FSHR gene was described by Aittomaki et al., in 1995, in women of Finnish families with primary amenorrhea and a C566T point mutation in exon 7. Other inactivating mutations have since then been described: Ile169Thr and Arg573Cys (BEAU et al., 1998), Asp224Val and Leu601 Val (TOURAINÉ et al., 1999), Ala419Thr (DOHERTY et al., 2002), Pro348Arg (ALLEN et al., 2003), and Pro519Thr (MEDURI et al., 2003). On the other hand, two polymorphic variants, Ala307Thr and Ser307Asn, were also identified in POF patients (DA FONTE KOHEK et al., 1998, SUNDBLAD et al., 2004), although a relation with the phenotype has not been systematically investigated. Thus, a cohort was studied comprising 39 women with POF (sporadic and familial cases) being followed at the Gynecological Endocrinology Unit, Service of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, in order to determine the presence of mutations and/or polymorphisms in the FSHR gene and to ascertain if these are associated with the clinical phenotype. For this purpose, 2 studies were conducted, the first assessing 36 cases with sporadic POF, including 2 patients from 2 families with POF and the second describing the genotype and phenotype of 5 patients from 2 families with POF. Clinical and hormonal variables were determined for all patients. The DNA was isolated from peripheral leukocytes. Exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene were analyzed by polymerase chain reaction (PCR), followed by restriction enzyme analysis, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and direct sequencing. Also, uterine size, endometrial thickness and ovarian size were measured by transvaginal pelvic ultrasonography. Although no mutation of the FSHR gene was found, a high prevalence for Ala307Thr and Ser680Asn polymorphisms was found, that are in linkage

disequilibrium. No association was observed between the presence of these polymorphisms and the serum levels of FSH, LH and estradiol, as well as ovarian size and presence of follicles. However, patients with sporadic POF, presenting Ala307Thr polymorphism, had their latest menses earlier (A: age=33.3 ± 7.1 years vs. T: 28.6 ± 11.4 years, p = 0.04). The genotyping of cases with familial-related POF showed the presence of 2 polymorphisms in the FSHR gene in 5 patients, and the phenotype was similar to that presented by women with sporadic POF. In conclusion, the presence of Ala307Thr polymorphism may be associated with an earlier onset of clinical manifestations in POF patients. However, longitudinal studies are needed to confirm the results of the present study.

Keywords: premature ovarian failure, FSH gene receptor, mutations, polymorphisms, phenotype.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AIRE	Relativo ao gene Autoimmune Regulator
Ala	Aminoácido alanina
Arg	Aminoácido arginina
Asn	Aminoácido asparagina
Asp	Aminoácido ácido aspártico
APECED	Poliendocrinopatia Autoimune-Candidíase-Distrofia Ectodérmica
BMP15	Referente a proteína BMP15
Bms 1	Enzima de restrição clonada do bacillus stearothermophilus 1
BPES	Síndrome Blefarofimose-Ptose-Epicanto Inversa
C	Citosina
CDG1	Glicoproteína carboidrato tipo 1
Cys	Cisteína
DEXA	Absorimetria radiológica de dupla energia
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação
E2	17- $\beta$ - estradiol
ECC	Estrogênio equino conjugado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIV	Fertilização “in vitro”
FMR1	Referente ao gene FMR1
FOP	Falência ovariana prematura
FOXL2	Referente ao gene FOXL2
FRAXA	Relativo ao locus FRAXA
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FSHR	Receptor do Hormônio Folículo Estimulante
GC	Citosina, Guanina
GALT	Galactoquinase, Galactose-1-P-Uridil transferase
Ile	Aminoácido isoleucina
INHA	Inibina alfa
INHBA	Inibina beta A
INHBB	Inibina beta B
Ile	Aminoácido isoleucina
G	Guanina
Leu	Aminoácido leucina
LH	Hormônio Luteinizante

LHR	Receptor do Hormônio Luteinizante
Mfe I	Enzima de restrição clonada do Mycoplasma fermentas
MM	Homodímero, referente a banda mutante
NN	Homodímero, referente a banda normal
NM	Heterodímero, referente a banda normal e mutante
PMM	Fosfomanomutase
Pro	Aminoácido prolina
PCR	Polimerase chain reaction
SDHEA	Sulfato de deidroepiandrosterona
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Ser	Aminoácido serina
SHBG	Proteína carreadora dos hormônios sexuais
T	Timina
TAE	Tampão tris – ácido acético – EDTA
TE	Solução Tampão Tris, EDTA
TEMED	N,N,N',N' – Tetrametiletilenodiamina
TH	Terapia hormonal
Thr	Aminoácido treonina
Tm	Temperatura de fusão ( <i>melting</i> )
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
TSH	Tireotrofina
T4	Tiroxina
TE	Tris, EDTA
UI/L	Unidade internacional por litro
UTR	Região não traduzida
UV	Ultravioleta
Val	Aminoácido valina
WHI	Referente ao estudo Women's Health Initiative

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
cm	Centímetro
h	Hora
kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
L	Litros
M	Molar
mg	Miligramma
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
p	Relativo ao braço curto do cromossomo
pb	Pares de bases
pg/ml	Picograma por mililitro
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
U	Unidades
UI/L	Unidades internacionais por litro
V	Volts
$\geq$	Maior ou igual
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
'	Minuto
''	Segundos

## APRESENTAÇÃO

A apresentação deste trabalho está organizada em cinco capítulos, conforme o formato sugerido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O primeiro capítulo é constituído por um trabalho de revisão (artigo1): *Falência Ovariana Prematura: aspectos atuais*. Este artigo apresenta uma revisão dos aspectos mais importantes do diagnóstico, potenciais etiologias, manifestações clínicas e as modalidades de tratamento. Este manuscrito está submetido para publicação no periódico *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. Ao final deste capítulo, são apresentados os objetivos desta tese.

O segundo capítulo descreve pacientes e métodos utilizados neste trabalho.

No capítulo seguinte, Resultados e Discussão, foram inseridos os artigos 2 e 3, referentes aos dados originais que constituem a parte experimental e discussão desta tese. No artigo 2, “*Screening of FSH receptor gene in women with premature ovarian failure (POF) in southern Brazil and associations with phenotype*”, foram incluídas 36 mulheres, com cariótipo normal 46,XX, idade inferior a 40 anos, níveis de FSH  $\geq 40$  UI/L e sem causa conhecida de falência ovariana hipergonadotrófica (doença ovariana autoimune, cirurgia, quimioterapia e radioterapia). Os objetivos foram determinar a presença de mutações e polimorfismos no gene do receptor do FSH (FSHR) e verificar a associação com o fenótipo. Este manuscrito foi enviado para o periódico *Molecular Human Reproduction* e encontra-se em fase de submissão.

O artigo 3 “*Clinical features and screening of FSH receptor gene in women from two families with premature ovarian failure (POF) in southern Brazil*”, analisa duas famílias com FOP, num total de 5 pacientes. Neste estudo, descreve-se a apresentação clínica das pacientes em cada uma das famílias e os resultados da genotipagem para a presença de mutações e polimorfismos do gene do FSHR. Os resultados são comparados com os dados obtidos na série de casos esporádicos e com descrições de estudos de FOP familiar na literatura. Este manuscrito será enviado para publicação em periódico indexado de circulação internacional.

Por último, neste terceiro capítulo, apresenta-se o resumo do estudo “*Screening of FSH receptor gene in women with premature ovarian failure (POF) in southern Brazil and associations with phenotype*”, aceito para ser apresentado no Endocrine Soc Meet, Toronto, 2007.

No quarto capítulo, são descritas as conclusões e perspectivas futuras. O quinto e último capítulo relacionam a bibliografia utilizada nos capítulos de introdução e material e métodos, distinta da listagem inserida nos artigos.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>10</b>
<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>ARTIGO - 1 FALÊNCIA OVARIANA PREMATURA: ASPECTOS ATUAIS .....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>PACIENTES E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>ARTIGO 2 - SCREENING OF FSH RECEPTOR GENE IN WOMEN WITH PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF) IN SOUTHERN BRAZIL AND ASSOCIATIONS WITH PHENOTYPE.....</b>	<b>53</b>
<b>ARTIGO 3 - CLINICAL FEATURES AND SCREENING OF FSH RECEPTOR GENE IN WOMEN FROM TWO FAMILIES WITH PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF) IN SOUTHERN BRAZIL. ....</b>	<b>75</b>
<b>RESUMO PARA ENDOCRINE SOC MEET, TORONTO, 2007.....</b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>98</b>

## INTRODUÇÃO

Ao contrário da menopausa fisiológica, que acontece em torno dos 50 anos e é definida como a cessação permanente dos períodos menstruais (STEDMAN'S MEDICAL DICTIONARY, 2000), a falência ovariana prematura (FOP) é considerada um evento patológico, bastante complexo e heterogêneo, que tem como seu marco principal a parada das menstruações antes dos 40 anos de idade.

Desde 1939, o perfil endócrino desta síndrome tem sido demonstrado através dos níveis elevados das gonadotrofinas urinárias (HELLER; HELLER, 1939). Atria, em 1950, descreveu os aspectos clínicos de 20 mulheres chilenas com idade inferior a 35 anos que apresentavam amenorréia secundária, fogachos, atrofia endometrial e infertilidade. Apesar de não ter medido os níveis séricos das gonadotrofinas, este é considerado o primeiro relato de mulheres com falência ovariana prematura (HOEK et al., 1997). Porém, foram Moraes e Jones que, em 1967, definiram a FOP como uma condição que leva à amenorréia, infertilidade, hipogonadismo e níveis elevados de gonadotrofinas em mulheres com menos de 40 anos de idade (MORAES-RUEHSEN; JONES, 1967). As pacientes com FOP, normalmente, apresentam a menarca na idade habitual, seguida de ciclos menstruais regulares até o momento que passam a apresentar alterações do tipo oligomenorréia, intercalados com períodos de amenorréia, para então cessarem suas menstruações traduzindo, assim, a fisiopatologia básica desta síndrome, que é a insuficiência da função ovariana (NELSON et al., 2005). É uma patologia rara que afeta aproximadamente 1% das mulheres, ocorrendo em torno de 10-28% das mulheres com amenorréia primária e 4-18% com amenorréia secundária (COULAM et al., 1986; ANASTI, 1998). Apesar da forma esporádica ser a mais comum, em cerca de 5% dos casos, observa-se uma história familiar positiva, o que sugere uma predisposição genética para esta patologia (GOSWAMI; CONWAY, 2005).

Os mecanismos patogênicos que, em última instância, levam a uma redução no número de folículos ou a defeitos nos mecanismos responsáveis por seu desenvolvimento, podem ser agrupados em duas categorias: depleção folicular e disfunção folicular. A depleção folicular caracteriza-se por uma deficiência primordial no número de folículos ou por uma

atresia folicular acelerada após o nascimento; enquanto a disfunção folicular, por uma resistência folicular as gonadotrofinas hipofisárias.

Entre os mecanismos relacionados à depleção folicular, inúmeros trabalhos têm sido descritos associando estas alterações a genes autossômicos, mais precisamente, aos genes do hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante, assim como seus respectivos receptores, tema da presente tese.

Desde os primeiros relatos de Aittomaki et al., 1996, poucas mutações foram descritas responsabilizando-se pelas formas mais graves de FOP e caracterizadas por amenorréia primária, desenvolvimento variável dos caracteres sexuais secundários e na maioria das vezes associadas à infertilidade (AITTOMAKI et al., 1996; BEAU et al., 1998; TOURAINÉ et al., 1999; DOHERTY et al., 2002; ALLEN et al., 2003; MEDURI et al., 2003). Entretanto, a FOP com características menos severas e mais freqüentes associa-se aos dois polimorfismos (Ala307Thr e Ser680Asn) também descritos por Aittomaki et al., 1995, e que, apesar de apresentarem uma condição clínica mais favorável, evoluirão para a falência definitiva com suas importantes conseqüências.

No Brasil, o primeiro estudo foi realizado por Da Fonte Kohek et al., 1998, que investigaram 15 mulheres, 46,XX, com FOP e comparou-as com 42 mulheres férteis controles. Embora não tenham encontrado nenhuma das mutações descritas, identificaram a presença dos dois polimorfismos relatados por Aittomaki (DA FONTE KOHEK et al., 1998). Mais recentemente, Sundblad et al., 2004, avaliaram mulheres argentinas com FOP e também identificaram apenas os polimorfismos Ala307Thr e Ser680Asn (SUNDBLAD et al., 2004).

Diante do grande número de trabalhos publicados, exceto os poucos casos severos de mutações, não encontramos na literatura uma associação entre as características clínicas das mulheres com FOP e a presença dos polimorfismos. Embora haja relatos das alterações dos ciclos menstruais, não demonstram quando estas irregularidades começam, a sua evolução e se existe associação com a idade da falência definitiva. Assim, estudando uma coorte de 39 mulheres com FOP, acompanhadas na Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clinicas de Porto Alegre, por mais de 10 anos, buscam-se estas respostas.



# *Capítulo 1*

---

## **ARTIGO 1**

### **FALÊNCIA OVARIANA PREMATURA: ASPECTOS ATUAIS**

<sup>1,3</sup>Luiz Cesar Vilodre, <sup>2</sup>Maria Beatriz da Fonte Kohek, <sup>1,3</sup>Poli Mara Spritzer.

Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, FFFCMPA e <sup>3</sup>Departamento de Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2007.  
(submetido)

## **Falência Ovariana Prematura: Aspectos Atuais**

<sup>1</sup>Luiz Cesar Vilodre, <sup>2</sup>Maria Beatriz da Fonte Kohek, <sup>1,3</sup>Poli Mara Spritzer.

Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, FFFCMPA e <sup>3</sup>Departamento de Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### Correspondência

Poli Mara Spritzer  
Serviço de Endocrinologia  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
90050-170 Porto Alegre, RS - Brazil  
Telefone: +55-51-3316-3671 - Fax: +55-51-3316-3656  
E-mail: [spritzer@ufrgs.br](mailto:spritzer@ufrgs.br)

Título resumido: **Falência Ovariana Prematura**

**Resumo**

A falência ovariana prematura (FOP) acomete aproximadamente 1:1000 mulheres antes dos 30 anos, 1:250 em torno dos 35 anos e de 1:100 aos 40 anos. Manifesta-se como amenorréia primária ou amenorréia secundária não podendo ser considerada definitiva em todas as pacientes, uma vez que a concepção espontânea pode ocorrer em até 5%-10% das FOP. Na maioria dos casos apresenta-se na forma esporádica, pois apenas 5% apresentam história familiar. Entre as causas conhecidas estão as alterações cromossômicas, dos genes ligados ao cromossomo X e cromossomos autossômicos, doenças autoimunes, alterações tóxicas e iatrogênicas. Com relativa frequência, a causa etiológica não é obtida, sendo então denominada de idiopática. O diagnóstico da FOP é feito baseado na história clínica e níveis elevados do hormônio folículo estimulante (FSH) sendo posteriormente investigadas as causas mais específicas. O manejo clínico visa o suporte emocional, o tratamento hormonal com estrogênios e progestogênios, a abordagem da infertilidade e a prevenção de comorbidades como a osteoporose e potencial maior risco cardiovascular.

**Unitermos:** falência ovariana prematura, hipogonadismo hipergonadotrófico, estrogênio, terapia hormonal e infertilidade.

**Abstract**

Premature ovarian failure occurs in approximately 1:1000 women before 30 years, 1:250 by age 35 and 1:100 by age 40. It is characterized by primary or secondary amenorrhea and can not be considered as definitive because spontaneous conception may occurs in 5 to 10% of cases. In 95% of cases, premature ovarian failure is sporadic. The known causes of premature ovarian failure include chromosomal defects, autoimmune diseases, exposure to radiation or chemotherapy, surgical procedures and certain drugs. Frequently, however, the etiology is not clear and these cases are considered to be idiopathic. Premature ovarian failure is defined by gonadal failure and high serum follicle-stimulating hormone (FSH) levels. Clinical approach includes emotional support, hormonal therapy with estrogens and progesterone or progestogens, infertility treatment and prevention of osteoporosis and potential cardiovascular risk.

**Keywords:** premature ovarian failure, hypergonadotropic hypogonadism, estrogen, hormonal therapy, infertility

## **DEFINIÇÃO, PREVALÊNCIA E APRESENTAÇÃO CLÍNICA**

A falência ovariana prematura (FOP) foi primeiramente definida por Moraes e Jones (1967) como uma condição que leva à amenorréia, infertilidade, hipogonadismo e níveis elevados de gonadotrofinas em mulheres com menos de 40 anos (1). Posteriormente, foram publicados relatos de mulheres com este diagnóstico que voltavam a menstruar espontaneamente e de casos mais raros em que houve gestação, chamando a atenção para o caráter eventualmente intermitente da evolução clínica (2,3).

A incidência de FOP em pacientes com cariótipo 46,XX gira em torno de 1:1000 antes dos 30 anos, 1:250 em torno dos 35 anos e de 1:100 aos 40 anos. A prevalência de FOP em pacientes com amenorréia primária é de 10-28% e 4-18% com amenorréia secundária (4,5). A FOP esporádica é a forma mais comum, porém em cerca de 5% dos casos observa-se uma história familiar positiva, o que sugere uma predisposição genética para esta patologia (6).

A falência ovariana prematura apresenta-se como um quadro de amenorréia e hipogonadismo, em geral precedido em meses ou anos por períodos de irregularidade menstrual. O início preciso da FOP é, em muitos casos, difícil de determinar, pois como já referido, a evolução pode ter um curso flutuante, com níveis elevados de gonadotrofinas seguido por períodos de retorno à normalidade, inclusive com ovulação e, em 5 a 10% dos casos, gestação e parto (5,7). Esta variabilidade da evolução clínica foi também observada numa coorte de 39 pacientes com FOP e cariótipo 46,XX, que estão sendo acompanhadas na Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Serviço de Endocrinologia, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Verificou-se nestas pacientes que a idade mediana da última menstruação variou de 14 a 39 anos e que a duração da irregularidade menstrual antes do diagnóstico firmado de FOP foi inferior a 3 anos em 44% da amostra e superior a 9 anos em 16% das pacientes (8).

## DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de FOP é baseado na história clínica e pela demonstração de níveis elevados de gonadotrofinas. Entretanto, frequentemente o diagnóstico é retardado pela demora na avaliação diagnóstica destas pacientes. As pacientes com FOP e amenorréia secundária apresentam, em geral, menarca na idade habitual, ciclos inicialmente regulares e que a partir de um determinado período tornam-se irregulares variando de oligomenorréia a períodos de amenorréia, até a cessação completa das menstruações (7,8). Inicialmente, e dependendo do grau de comprometimento ovariano, podem ser mais evidentes os sintomas vasomotores, como fogachos e sudorese, alteração de humor e insônia, evoluindo mais tardiamente para a atrofia do trato urogenital, com maior propensão para vaginites, cistites e dispareunia.

Assim, uma vez afastada gestação, serão inicialmente solicitadas dosagens de FSH, prolactina e hormônio estimulante da tireóide (TSH). Níveis séricos de FSH maiores do que 40 UI/L, repetidos pelo menos duas a três vezes, com intervalo superior a 1 mês, são fundamentais para o diagnóstico, embora não reflitam a perda total da função ovariana. Nelson et al (1992) demonstraram que 50% das mulheres com este diagnóstico apresentavam função folicular ovariana quando definido pelos níveis séricos de estradiol maiores do que 50 pg/ml, e aproximadamente 20% delas ovulavam, se considerados níveis de progesterona iguais ou superiores a 3 ng/ml (7).

Uma vez feito o diagnóstico, exames mais específicos serão solicitados, dependendo de cada caso, para tentar elucidar a etiologia, incluindo a pesquisa de doenças autoimunes. A dosagem do estradiol pode ser realizada para confirmar o hipogonadismo, sendo dispensável diante de sintomas vasomotores ou outros sinais de deficiência estrogênica.

A ultra-sonografia pélvica ou preferentemente transvaginal, pode identificar a presença e determinar o volume de folículos ovarianos. Cerca de 25% a 40% de pacientes com FOP apresentam folículos ovarianos à ultra-sonografia pélvica (43). Por outro lado, o papel da biópsia ovariana, no diagnóstico e prognóstico da FOP é controverso e há relatos de gestações ocorridas em pacientes com biópsia negativa (22). A biópsia ovariana com ausência de folículo pode refletir apenas uma amostra

inadequada de tecido, assim como a presença deles não implicar numa resposta positiva ao tratamento (44).

Quanto à análise citogenética, no passado, somente as pacientes com FOP em amenorréia primária ou em amenorréia secundária com idade inferior a 30 anos eram consideradas para realizar o cariótipo. Entretanto, com estudos posteriores demonstrando a presença de anormalidades cromossômicas em mulheres que iniciaram a FOP com idade superior a 30 anos, a realização do cariótipo tem sido sugerida em todas as mulheres com FOP (22). A falência ovariana prematura com amenorréia primária está associada à alteração de cariótipo em aproximadamente 50% dos casos, porém as pacientes com FOP apresentam, com frequência, amenorréia secundária.

Embora muitos casos de FOP sejam idiopáticos, as causas conhecidas e fatores genéticos estão aumentando rapidamente com o avanço dos estudos na área. No momento atual, as causas genéticas são muito raras e o rastreamento genético para todos os casos não está indicado, exceto em centros de pesquisa. Contudo, situações mais comuns e que podem ter outras conseqüências como síndrome de Turner, carreadoras da premutação do gene *FMRI* (FRAXA) e autoimunidade devem ser investigadas.

## **ETIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DA FOP**

As causas da falência ovariana prematura são múltiplas e resultam em redução no número de folículos e/ou defeitos nos mecanismos de estímulo ao desenvolvimento folicular. Por outro lado, embora a divisão em pacientes com e sem folículos presentes seja utilizada, alguns casos de FOP que inicialmente eram do tipo folicular podem evoluir para um estágio afolicular. Do ponto de vista etiológico, a FOP pode ser classificada em duas categorias: depleção folicular e disfunção folicular (Tabela 1).

### **DEPLEÇÃO FOLICULAR**

Pode ocorrer por uma deficiência folicular primordial ou por uma aceleração na atresia folicular. Com relação aos casos de *deficiência no número de folículos*, a maioria das pacientes

apresenta cariótipo normal e não está ainda estabelecido o(s) mecanismo(s) que explique(m) a apoptose oocitária com conseqüente diminuição dos oócitos ovarianos ao nascimento. Por isso, são classificados como FOP idiopática e representam grande parte dos casos de falência ovariana espontânea.

*A atresia folicular acelerada* está associada a causas genéticas, doenças autoimunes, causas iatrogênicas e associadas a toxinas e agentes virais.

### **Causas genéticas**

#### ***Alterações genéticas relacionadas ao cromossomo X***

O desenvolvimento da gônada indiferenciada em ovário dá-se na ausência do cromossomo Y. A diferenciação ovariana necessita da presença de apenas um X, embora seja imprescindível a presença dos genes do segundo X para a manutenção da função ovariana (9). Assim, a associação da FOP com alterações relacionadas ao cromossomo X, reforça a hipótese da necessidade de dois X intactos para o desenvolvimento normal do folículo.

A monossomia do cromossomo X, conhecida como síndrome de Turner, é a mais freqüentemente diagnosticada com uma incidência de 1:2500 nascidos vivos do sexo feminino. Geneticamente, 57% apresentam cariótipo 45,X, sendo os 43% restantes representados por deleções completas do braço curto do X, resultando em isocromossomia para o braço longo do X [46,Xi (Xq)] e deleção parcial do braço curto do X [46,X (Xp)]. O mosaïcismo mais freqüente é 46,XX / 45,X sendo que em 80% dos casos o X perdido é de origem paterna (10).

Embora as trissomias do X afetem 1:900 mulheres na população geral, a primeira associação com FOP foi descrita em 1959 por Jacobs et al. referido em Goswami et al., (2003), sendo relatadas como formas esporádicas de comprometimento (11). As deleções comprometem mais comumente o braço curto do cromossomo X, em especial a região Xq13 – 25, levando à perda de pareamento e atresia dos oócitos (9).



Por outro lado, a região de maior importância para o funcionamento ovariano normal tem sido considerada a Xq13 – q26 (12), sendo que translocações nesta região levam à apoptose oocitária com perda da função ovariana. Porém, dois segmentos fora desta região são definidos como contendo o locus para a falência ovariana: *FOP1* (Falência ovariana prematura 1) que compreende Xq26-qter, e *FOP2* (Falência ovariana prematura 2) Xq13.3-Xq22. Evidências sugerem que translocações distais que afetem o segmento cromossômico *FOP1* resultam em falência ovariana entre 24 e 29 anos, enquanto que mutações em *FOP2* causam disfunção ovariana mais precocemente, entre 16 e 21 anos (13).

A síndrome do X Frágil (FRAXA) é causada pela expansão das repetições CGG na região 5' não traduzida (UTR) do gene *FMR1* no braço longo do cromossomo X (Xq27.3). O número de repetições CGG é altamente polimórfico na população normal, mas considera-se como pré-mutação entre 60 e 200 repetições porque alelos pré-mutados são suscetíveis de expansão quando passam de uma geração a outra. A mutação é definida pelo número de repetições CGG superior a 200 causando hipermetilação da região promotora do gene *FMR1* e conseqüentemente o silenciamento de sua transcrição. Este resulta no fenótipo de retardo mental mais freqüente nos homens. Estudos têm demonstrado que na FOP familiar a incidência desta pré-mutação está em torno de 13% enquanto na FOP esporádica em apenas 3% (14), sendo que em 28% das FOP a herança é paterna e em 4% materna (15). Assim, a investigação genética na FOP familiar para a pré-mutação do gene *FMR1* está indicada, visando o aconselhamento genético das famílias. Neste sentido, a identificação de uma paciente como carreadora de premutação para FRAXA deve levar ao rastreamento de irmãs e primas que são ainda férteis, além de excluir eventual familiar afetada como potencial doadora de oócitos.

Mais recentemente, foi identificada em oócitos a expressão da proteína morfogenética do osso (BMP15), que é responsável pela produção de fatores de crescimento e diferenciação e está envolvida com a foliculogênese e o crescimento das células da granulosa (16). O gene da BMP15 está localizado no Xp11.2, uma região que foi descrita recentemente como crítica para a manutenção da função ovariana, uma vez que deleções de Xp11.2-11.4 são acompanhadas de amenorréia primária,

secundária ou infertilidade, sendo que uma mutação neste gene pode levar à ausência de resposta oocitária e conseqüente falência do mesmo (17).

#### ***Alterações relacionadas a genes autossômicos***

Alterações relacionadas a genes autossômicos estão presentes também em alguns casos de FOP. A síndrome blefarofimose-ptose-epicanto inversa (BPES) é uma doença autossômica dominante causada por mutações no gene do fator de transcrição *FOXL2* e caracteriza-se pela presença de malformação das pálpebras, entre outras alterações faciais, muitas vezes associadas à FOP. O mapeamento de casos familiares levou à identificação de um locus no braço longo do cromossomo 3 (3q23) e posteriormente, foram identificadas mutações pontuais no gene *FOXL2*. A BPES manifesta-se de duas formas: tipo I e tipo II, sendo que apenas o primeiro tipo está associado à FOP. Esta variabilidade é decorrente do tipo de mutação presente no gene *FOXL2* que produz proteína truncada devido a uma mutação sem sentido (18).

A galactosemia é um erro inato do metabolismo devido a uma alteração autossômica recessiva e que se caracteriza por uma incapacidade em converter galactose em glicose decorrente de uma deficiência das enzimas: Galactoquinase, Galactose-1-P-Uridil transferase e Uridina-Difosfogalactose epimerase. O acúmulo de metabólitos da galactose (galactitol e galactonato) compromete vários órgãos, entre eles os ovários, levando à diminuição do número de oogônias com dano folicular e resultando em FOP, numa frequência de até 60-70% dos casos (19). Os três genes *GALT* responsáveis por estas alterações enzimáticas estão localizados respectivamente: *GALT-9p13*, *GALK-17q24* e *GALE-1p36* (20).

A síndrome caracterizada por poliendocrinopatia autoimune-candidíase-distrofia ectodérmica (APECED) é uma doença autossômica recessiva rara que se manifesta pela destruição dos tecidos endócrinos imuno dependentes, sendo seu diagnóstico firmado quando duas das seguintes manifestações clínicas estão presentes: candidíase, hipoparatiroidismo e insuficiência adrenal

primária (21). O gene *AIRE* está localizado no cromossoma 21q22.3 e observa-se associação com FOP em aproximadamente 60% dos casos com mutação neste gene (22).

A síndrome da deficiência da glicoproteína carboidrato tipo 1 (CDG1) é uma doença autossômica recessiva rara. Caracteriza-se por alterações na glicosilação causadas pela deficiência da enzima fosfomanomutase (PMM), levando a alterações neurológicas importantes com letalidade de até 20% no primeiro ano de vida. O gene *PMM1* está localizado no cromossomo 22q13 e o *PMM2* no cromossoma 16p13. Mutações no gene *PMM2* foram já identificadas em pacientes com FOP (23).

Embora inúmeras mutações ativadoras e inativadoras tenham sido identificadas no gene do receptor do LH (LHR), apenas oito mutações inativadoras de herança recessiva foram identificadas no gene do receptor do FSH (FSHR) até o presente. Em 1995, Aittomaki et al., estudaram 75 casos de disgenesia ovariana com cariótipo normal e FSH elevado em uma população da Finlândia composta por seis famílias onde pelo menos dois membros eram afetados, o que através da análise de ligação genética, possibilitou o mapeamento do locus do cromossomo 2 (24). O gene do FSH localiza-se no locus 21 do braço curto do cromossomo 2, 2p21-p16, (25). A primeira mutação foi descrita em 1996, por Aittomaki et al (26), que estudaram 22 mulheres finlandesas com amenorréia primária, 46,XX, com padrão de herança recessivo (Tabela 2). Todas apresentaram uma mutação em ponto, citosina (C) para timina (T), na posição 566 do exon 7 do gene do FSHR. Esta mutação leva à substituição da alanina pela valina no resíduo 189 da proteína do FSHR, mudando assim sua estrutura. A descrição desta mutação no gene do FSHR contribuiu para o entendimento da endocrinologia ovariana e caracterização fenotípica destas pacientes (26).

Mais recentemente sete outras novas mutações foram identificadas (Tabela 2). Estas mutações estão localizadas nos exons 6, 7, 9 e 10 do gene do FSHR e todas levam à substituição de aminoácidos na proteína, alterando a conformação proteica e/ou interferindo no tráfico do receptor à superfície celular (27,28,29,30,31). A amenorréia primária estava presente na maior parte das mutações relatadas (Asp224Val/Leu601Val, Ala189Val/Ala419Thr e Pro519Thr) (28-31) enquanto que a amenorréia secundária foi identificada apenas na paciente portadora da mutação

Ile160Thr/Arg573Cys (27). No Brasil, Da Fonte Kohek et al. (1998), avaliaram vinte e cinco mulheres com amenorréia primária e diagnóstico de falência ovariana prematura e, embora não tenham encontrado as mutações descritas por Aittomaki et al, identificaram a presença de dois polimorfismos no gene do FSHR: Ala307Thr e Ser680Ans (32). Em 2004, Sundblad et al., descreveram os resultados do rastreamento do gene do FSHR em mulheres argentinas com FOP, não tendo encontrado nenhuma com mutação, porém vinte delas apresentavam os polimorfismos Ala307Thr e Ser307Ans (33).

O gene do LHR, localizado no braço curto do cromossomo 2, lócus 21, foi associado com FOP por Latronico et al., em uma mulher com amenorréia e resistência ovariana ao LH, em decorrência de uma substituição em homozigose de uma timina por uma citosina na posição 1660 do gene do LHR (34).

A inibina, uma glicoproteína produzida nas células da granulosa, tem como principal função o controle sobre o FSH, e assim, um papel importante no recrutamento e desenvolvimento folicular. MacNaughton et al. (1992) demonstraram uma relação direta entre a perda da reserva folicular com a diminuição da concentração sérica da inibina (35). Os genes da inibina alfa (*INHA*), inibina beta A (*INHBA*) e inibina beta B (*INHBB*) codificam esta glicoproteína, sendo que muitos estudos têm confirmado a relação entre estes genes e a fisiopatologia da FOP (36).

### **Associação com doenças autoimunes**

A associação da FOP com doenças autoimunes é bem conhecida e pode atingir até 30% dos casos (37). As doenças autoimunes da tireóide estão presentes em até 20% dos casos de FOP sendo que outras alterações tais como hipoparatiroidismo, diabetes méllitus e hipofisite também são relatadas (7). Associações com doenças autoimunes não endócrinas como púrpura trombocitopênica idiopática, vitiligo, alopecia, anemia perniciosa, lupus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjogren, hepatite crônica ativa, anemia autoimune hemolítica, doença de Crohn e artrite reumatóide também são conhecidas (21). Entretanto, a presença de ooforite ao exame histológico encontra-se praticamente restrita aos casos de doença de Addison, ocorrendo em menos de 3% na ausência desta patologia (21).

A ooforite autoimune é caracterizada por infiltração linfocítica e células plasmáticas ao nível das células hilares, teca interna dos folículos em crescimento e corpo lúteo. Na maioria dos casos, existe uma falta de folículos ovarianos e algumas vezes as glândulas parecem fibróticas, ou seja, em fita (38).

Os autoanticorpos para células esteróides são muito raros em soro de paciente com falência ovariana sem doença de Addison. Embora haja evidências para a doença autoimune do ovário, a falta de um marcador específico para diagnosticar autoanticorpos ocorre devido aos diferentes tipos celulares que podem estar envolvidos, como as células do corpo lúteo, da zona pelúcida, do receptor do FSH e o próprio oócito. Muitos autoanticorpos para as gônadas tem sido detectados pelo método de Elisa em pacientes com FOP isolada ou associada com doenças autoimunes não Addison, porém sua especificidade e papel patogênico são questionáveis (39).

#### **Causas iatrogênicas e associadas a toxinas e agentes virais**

Entre as causas iatrogênicas, a radioterapia, a quimioterapia e as cirurgias pélvicas são as mais comuns. Os efeitos adversos da radiação ionizante sobre a função gonadal dependem da dose, área de irradiação e idade, pois os ovários na pré-puberdade apresentam maior grau de resistência a este tipo de toxicidade. As diversas classes de quimioterápicos, freqüentemente utilizadas de forma associada, também comprometem as gônadas principalmente a estrutura e função das células da granulosa e oócitos, sendo este efeito droga, dose e idade dependente (6). As cirurgias pélvicas também podem levar a FOP a partir do comprometimento do suprimento sanguíneo ou como seqüela de processos inflamatórios. Mais recentemente, a embolização da artéria uterina para o tratamento dos leiomiomas tem sido associada à diminuição da fertilidade e complicações durante a gestação assim como, a diminuição da função ovariana e FOP em até 14% (40).

O fumo, através do hidrocarbono policíclico aromático encontrado no cigarro, causa a destruição dos oócitos levando a falência ovariana permanente em experimentos em animais de laboratório (41). Embora mulheres fumantes apresentem a menopausa mais cedo em relação às não fumantes ainda faltam estudos que comprovem que esta condição se dá pelo efeito do cigarro (42). Em

relação ao comprometimento ovariano como consequência de viroses, toxinas, metais pesados e produtos químicos ainda faltam estudos em humanos que sejam suficientemente esclarecedores.

### **DISFUNÇÃO OVARIANA FOLICULAR**

Algumas pacientes com FOP podem apresentar folículos de aparência normal, que embora sejam submetidos a concentrações circulantes adequadas de gonadotrofinas, falham na indução da síntese de estrogênios, resultando em amenorréia hipergonadotrófica. Embora muitas destas pacientes apresentem uma disfunção ovariana folicular idiopática, também denominada síndrome dos ovários resistentes, algumas causas específicas e raras devem ser consideradas, entre elas a deficiência em enzimas relacionadas com a síntese de estradiol. A redução na estrogemia por deficiência enzimática causa retardo puberal, amenorréia primária e níveis aumentados de gonadotrofinas apesar da presença de folículos primordiais no ovário (5,7). Enzimas cujas deficiências estão envolvidas com redução na síntese ovariana de estradiol são a colesterol-desmolase, 17-20 desmolase e 17-alfa-hidroxiase.

### **TRATAMENTO**

O manejo clínico da paciente com FOP é abrangente e envolve o suporte emocional desde o momento do diagnóstico, a abordagem da infertilidade, o tratamento hormonal e a prevenção/tratamento de doenças associadas (autoimunes) ou decorrentes do próprio hipoestrogenismo.

#### **Terapia de reposição hormonal**

Ao contrário do tratamento hormonal da mulher climatérica, na FOP ainda não estão disponíveis estudos a longo prazo que avaliem os riscos desta terapia como eventos cardiovasculares e câncer de mama, o que não autoriza a utilização de estudos como o Women's Health Initiative (WHI)

para basear o tratamento destas mulheres. De fato, a TRH para as mulheres jovens deve ser encarada como a necessidade de substituição de hormônios ovarianos numa situação de evidente hipogonadismo e suas conseqüências a curto e longo prazo. Este conceito também fundamenta o tempo de uso da terapia hormonal, que deve ser continuada até os 50 anos, idade média da menopausa, quando então será reavaliada (7). Além disso, a ausência de estudos controlados a longo prazo que comparem segurança e eficácia para o estrogênio, a progesterona/ progestogênio e o regime (cíclico ou contínuo) ideal, faz com que a abordagem terapêutica da FOP seja necessariamente individualizada.

Os estrogênios podem ser utilizados por via oral, transdérmica, subcutânea e vaginal. A via oral é a mais utilizada possivelmente por ter menor custo e ser utilizada há mais tempo, sendo que o alívio dos sintomas vasomotores, assim como os efeitos adversos do estradiol 17- $\beta$  (E<sub>2</sub>) e dos estrogênios equínos conjugados (EEC), são muito semelhantes. A via transdérmica, gel ou *patch* (adesivo) tem se mostrado uma excelente opção por ser de fácil aplicação, rapidamente absorvida e metabolizada e ter a vantagem de evitar a primeira passagem hepática (45,46). A dose do estrogênio a ser prescrita, deve alcançar níveis séricos de estradiol correspondentes ao de um ciclo menstrual normal, ou seja, próximo de 104 pg/ml, o que na prática clínica corresponde a doses maiores do que aquelas normalmente utilizadas para o alívio dos sintomas vasomotores nas mulheres na pós-menopausa (47). Assim, doses de 2 mg de estradiol micronizado (E<sub>2</sub>), 0,9-1,25 mg de EEC ou 100- $\mu$ g de estradiol transdérmico podem ser necessárias. A via subcutânea necessita inserção no abdome, braço ou glúteos do *pellet* de 25-50 mg de estradiol, o qual fará a liberação lenta do mesmo em aproximadamente 6 meses (47). A via vaginal oferece uma absorção predominantemente local, a partir de cremes e pessários medicados e é certamente a menos utilizada, ficando restrita a casos específicos.

A progesterona e os progestogênios são utilizados na TRH de pacientes com FOP e presença de útero para contrapor o efeito mitogênico do estrogênio sobre o endométrio evitando assim a hiperplasia endometrial. Estão disponíveis para uso por via oral, vaginal, intramuscular e transdérmico, estando suas ações e efeitos adversos relacionados com as diferenças em seu metabolismo. Os níveis circulantes dependem, portanto, da absorção, metabolismo no trato gastro

intestinal (primeira passagem hepática), armazenamento no tecido adiposo e outros tecidos e sua ligação com as proteínas séricas.

Assim, as doses necessárias de progesterona e progestogênios dependerão do regime hormonal a ser ministrado, ou seja, se cíclico (10-14 dias ao mês) ou contínuo e do tipo de hormônio disponível. A progesterona micronizada pode ser usada no esquema seqüencial na dose de 200 mg/dia durante 10 – 12 dias e 100 mg/dia no esquema contínuo. O acetato de medroxiprogesterona, 10 mg/dia durante 10 – 12 dias no seqüencial enquanto 2,5 mg/dia no contínuo. O acetato de ciproterona, na dose de 1 mg/dia, está disponível em nosso meio em associação com valerato de estradiol 2 mg, para regime seqüencial. Entretanto, esta associação tem a desvantagem de deixar uma janela de uma semana sem tratamento. A noretisterona 1 mg/dia durante 10-12 dias, deve ser utilizada no esquema seqüencial e 0,5 mg/dia no contínuo (48).

A escolha do regime hormonal a ser usado dependerá do desejo da paciente em menstruar ou não. Porém, os estrogênios utilizados para o tratamento da FOP não suprimem a ovulação mesmo em regimes contínuos e conseqüentemente não impedem a concepção, uma vez que nem sempre normalizam os níveis de gonadotrofinas. Assim, é preferível optar-se por esquemas cíclicos, pois diante de um atraso menstrual deve-se suspender a TRH imediatamente até excluir uma gestação.

Quanto aos androgênios, não existem estudos suficientes que justifiquem a reposição de rotina. Embora tenha sido descrito níveis circulantes de androgênios inferiores em mulheres jovens com FOP em comparação com mulheres normais, os valores foram limítrofes ou discretamente abaixo dos limites inferiores da normalidade, e o significado clínico deste dado não está ainda bem definido (49,50).

Algumas pacientes preferem utilizar o anticoncepcional oral como tratamento, por considerar seu uso mais prático. Entretanto, deve-se levar em conta que as doses de estrogênio e progestogênios contidos nestas apresentações são fixas, estão além do necessário para uma reposição fisiológica e, na maioria das apresentações, deixam uma janela de uma semana sem estrogênios, o que é inadequado nestas pacientes (6,7).



### **Infertilidade**

Apenas cerca de 5 – 10% das mulheres com FOP engravidam espontaneamente ou durante o tratamento. Porém, estas gestações ocorrem quase que exclusivamente em mulheres que apresentaram amenorréia secundária sendo que, em pacientes com amenorréia primária, a prevalência de gestação é quase nula (6). Estas gestações ocorreriam em conseqüência da flutuação dos níveis hormonais ou atividade da doença básica, fazendo com que as células da granulosa se tornassem sensíveis ao FSH com conseqüente crescimento folicular e ovulação, mesmo em mulheres em uso de contraceptivo oral (51).

Tendo em vista as evidências de ineficácia do uso do citrato de clomifeno isolado ou associado a gonadotrofinas ou FSH recombinante em pacientes com FOP (51), a opção terapêutica para infertilidade nestas pacientes é a fertilização “in vitro“ (FIV) com óvulo de doadora, cujas taxas de gestação chegam a 50% por ciclo (5,52)

Recentemente Donnez et al., 2004 publicaram o primeiro nascimento, fruto de transplante de tecido ovariano crioprecipitado. Esta técnica representa, portanto uma alternativa promissora para mulheres que serão submetidas a tratamento com quimioterápicos ou radioterapia em região pélvica (53).

### **Prevenção de Osteoporose e doença cardiovascular**

As pacientes com FOP representam uma população com maior risco potencial para o desenvolvimento de osteoporose e fraturas futuras, sendo justificável o uso de medidas preventivas e terapêuticas. Apesar de não haver estudos prospectivos que avaliem o impacto do estrogênio sobre fraturas especificamente em mulheres com FOP, evidências sugerem que a TRH aumenta a densidade mineral óssea independente da dose, via de administração ou regime terapêutico.

Além da TRH, medidas de prevenção devem ser associadas e consistem em atividade física diária com peso, dieta alimentar adequada em cálcio e vitamina D assim como evitar condições que promovam a perda óssea como o tabagismo e abuso de bebidas alcoólicas. Em situações específicas, a prescrição de cálcio assim como vitamina D estão indicadas (54).

Estudos epidemiológicos sugerem que mulheres com FOP apresentam maior risco para mortalidade de causa cardiovascular. Kalantaridou et al., 2006, demonstraram que mulheres com FOP, quando comparadas com controles com função ovariana normal, apresentam uma disfunção endotelial significativa, sugerindo que a aterosclerose inicia precocemente nestas mulheres (55). Porém, esta alteração pode ser reversível com seis meses de terapia hormonal cíclica. Estudos futuros são necessários para esclarecer se esta recuperação endotelial significa redução dos eventos cardiovasculares ou não (55).

A falência ovariana prematura é uma condição clínica complexa que ocorre em mulheres jovens e que pode ter inúmeras causas. Entretanto, não pode ser confundida com a menopausa normal, uma vez que pode ter uma evolução intermitente, com retorno mesmo que temporário aos ciclos menstruais normais e inclusive com possibilidade de gestação. Independente da etiologia, estas pacientes devem receber terapia de reposição hormonal com estrogênios e progestogênios favorecendo assim a manutenção do trofismo dos tecidos do trato reprodutivo, os ciclos menstruais e a prevenção da perda de massa óssea.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moraes-Ruehsen M, Jones GS. Premature ovarian failure. **Fertil Steril** 1967;18(4):440-61
2. Johnson TR Jr and Peterson EP. Gonadotropin-induced pregnancy following "premature ovarian failure". **Fertil Steril** 1979;31(3):351-2.
3. Lucky AW, Rebar RW, Blizzard RM, Goren EM. Pubertal progression in the presence of elevated serum gonadotropins in girls with multiple endocrine deficiencies. **J Clin Endocrinol Metab** 1977;45(4):673-8.
4. Anasti JN. Premature ovarian failure: an update. **Fertil Steril** 1998;70(1):1-15.
5. Van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. **Hum Reprod Update** 1999;5:483-92.
6. Goswami D and Conway GS. Premature ovarian failure. **Hum Reprod Update** 2005; 11(4):391-410.
7. Nelson LM, Covington SN, Rebar RW. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. **Fertil Steril** 2005;83(5):1327-32.

8. Vilodre LC, Kohek MBF, Spritzer PM. Screening of FSH receptor gene in women with premature ovarian failure (POF) in southern Brazil and associations with phenotype. 89<sup>th</sup> Endo Soc Meeting, Toronto, June 2007.
9. Simpson JL and Rajkovic A. Ovarian differentiation and gonadal failure. **Am J Med Genet** **1999**;89(4):186-200.
10. Loughlin SA, Redha A, McIver J, Boyd E, Carothers A, Connor JM. Analysis of the origin of Turner's syndrome using polymorphic DNA probes. **J Med Genet** **1991**;28(3):156-8.
11. Goswami R, Goswami D, Kabra M, Gupta N, Dubey S, Dadhwal V. Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders. **Fertil Steril** **2003**;80(4):1052-4.
12. Therman E, Laxova R, Susman B. The critical region on the human Xq. **Hum Genet** **1990**;85(5):455-61.
13. Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC, Wangsa D, Oian C, Nelson LM, et al. Molecular and cytogenetic studies of an X;autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. **Am J Med Genet** **1994**;52(1):19-26.
14. Conway GS, Payne NN, Webb J, Murray A, Jacobs PA. Fragile X premutation screening in women with premature ovarian failure. **Hum Reprod** **1998**;13(5):1184-7.
15. Hundscheid RD, Sistermans EA, Thomas CM, Braat DD, Straatman H, Kiemeneij LA. Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations. **Am J Hum Genet** **2000**;66(2):413-8.
16. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. **Mol Endocrinol** **1998**;12(12): 1809-17.
17. Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab** **2006**;91(5):1976-9.
18. Oley C and Baraitser M. Blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome (BPES syndrome). **J Med Genet** **1988**;25(1):47-51.
19. Waggoner DD, Buist NR, Donnell GN. Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. **J Inherit Metab Dis** **1990**;13(6):802-18.
20. Forges T, Monnier-Barbarino P, Faure GC, Bene MC. Premature ovarian failure in galactosaemia: pathophysiology and clinical management. **Pathol Biol (Paris)** **2003**; 51:47-56.
21. Betterle C, Dal Pra C, Mantero F, Zanchetta R. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. **Endocr Rev** **2002**;23(3):327-64.
22. Laml T, Preyer O, Umek W, Hengstschlager M and Hanzal E. Genetic disorders in premature ovarian failure:.. **Human Reprod Update** **2002**;8(4):483-91.
23. Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cinha M, Jaeken J, Cassiman J, et al. Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). **Nature Genet** **1997**;16:88-92.

24. Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell** **1995**;82(6):959-68.
25. Rousseau-Merck MF, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. **Genomics** **1993**; 15(1):222-4.
26. Aittomaki K, Herva R, Stenman UH, Juntunen K, Ylostalo P, Hovatta O, et al. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** **1996**;81(10):3722-6.
27. Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchasky C, et al. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. **J Clin Invest** **1998**;102(7):1352-9.
28. Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, et al. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. **Mol Endocrinol** **1999**;13(11):1844-54
29. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, et al. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**;87(3):1151-5.
30. Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P, Kotlar TJ, Huhtaniemi IT, Jameson JL, et al. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotropic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. **Hum Reprod** **2003**;18(2):251-6.
31. Meduri G, Touraine P, Beau I, Lahuna O, Desroches A, Vacher-Lavenu MC, et al. 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** **2003**;88(8):3491-8.
32. Da Fonte Kohek MB, Batista MC, Russell AJ, Vass K, Giacaglia LR, Mendonça BB, et al. No evidence of the inactivating mutation ( C566T) in the follicle-stimulation hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. **Fertil Steril** **1998**;70(3):565-7.
33. Sundblad V, Chiauzzi VA, Escobar ME, Dain L, Charreau EH. Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). **Mol Cell Endocrinol** **2004**;222(1/2):53-9.
34. Latronico AC, Anasti J, Amhold IJ, Rapaport R, Mendonça BB, Bloisse W, et al. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. **N Engl J Med** **1996**;334(8):507-12.
35. MacNaughton J, Banah M, McCloud P, Hee J, Burger H. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. **Clin Endocrinol (Oxf)** **1992**;36(4):339-45.
36. Shelling AN, Burton KA, Chand AL, van Ee CC, France JT, Farquhar CM, et al. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. **Hum Reprod** **2000**;15(12):2644-9.
37. Conway GS. Clinical manifestations of genetic defects affecting gonadotrophins and their receptors. **Clin Endocrinol (Oxf)** **1996**;45(6):657-63.

38. Sedmak DD, Hart WR, Tubbs RR. Autoimmune oophoritis: a histopathologic study of involved ovaries with immunologic characterization of the mononuclear cell infiltrate. **Int J Gynecol Pathol** 1987;6(1):73-81.
39. Eisenbarth GS. Autoimmune Polyendocrine Syndromes. **N Engl J Med** 2004;350:2068-79.
40. Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC) clinical practice guidelines. Uterine fibroid embolization (UFE). Number 150, October 2004. **In: J Gynaecol Obstet** 2005;89(3):305-18.
41. Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. **Nat Genet** 2001;28(4):355-60.
42. Bastos CA, Lisboa KO, Fuchs SC, Donato GB, Spritzer PM. Determinants of ovarian pré-, menopausal transition and postmenopausal women: a population based study. **Maturitas** 2005;53(4): 405-12.
43. Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM, Defensor RA, Lipetz KJ, White BJ, et al. Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;79(5):1470-5.
44. Massin N, Gougeon A, Meduri G, Thibaud E, Laborde K, Matuchansky C, et al. Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. **Hum. Reprod** 2004;19(11):2555-60.
45. Henzl MR and Loomba PK. Transdermal delivery of sex steroids for hormone replacement therapy and contraception. A review of principles and practice. **J Reprod Med** 2003;48(7):525-40.
46. Vilodre LC, Wender MC, Castro JÁ, Reis FM, Ruschel S, Magalhães JA, et al. Endometrial response to cyclic regimen of percutaneous 17Beta-estradiol and low-dose vaginal micronized progesterone in women with mild to moderate hypertension. **Gynecol Endocrinol** 2003;17(4): 323-8.
47. Jones SC. Subcutaneous estrogen replacement therapy. **J Reprod Med** 2004;49(3): 139-42.
48. Spritzer PM, Mallmann ES, Vilodre LC. Estrogênios, Progestogênios e Androgênios. In: Camargos A, editor. **Ginecologia Ambulatorial**. 2. ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2007, no prelo.
49. Hartmann BW, Kirchengast S, Albrecht A, Laml T, Soregi G, Huber JC. Androgen serum levels in women with premature ovarian failure compared to fertile and menopausal controls. **Gynecol Obstet Invest** 1997;44:127-31.
50. Bachelot A, Meduri G, Massin N, Misrahi M, Kuttann F, Touraine P. Ovarian steroidogenesis and serum androgen levels in patients with premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab** 2005;90(4):2391-6.
51. Check JH, Chase JS, Spence, M. Pregnancy in premature ovarian failure after therapy with oral contraceptives despite resistance to previous human menopausal gonadotropin therapy. **Am J Obstet Gynecol** 1989;160(1):114-5.
52. Paulson, RJ, Hatch, IE, Lobo, RA, Sauer, MV. Cumulative conception and live birth rates after oocyte donation: implications regarding endometrial receptivity. **Hum Reprod** 1997; 12 (4):835-9.

53. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet** 2004;364(9443): 1405-10.
54. Eastell R. Management of osteoporosis due to ovarian failure. **Med Pediatr Oncol** 2003; 41(3):222-7.
55. Kalantaridou SN, Naka KK, Bechlioulis A, Makriganakakis A, Michalis L, Chrousos GP. Premature ovarian failure, endothelial dysfunction and estrogen–progestogen replacement. **TRENDS Endocrin Met** 2006;17 (3):101-9.

Tabela 1. Classificação etiológica da Falência Ovariana Prematura

**DEPLEÇÃO FOLICULAR****- NÚMERO FOLICULAR INICIAL DEFICIENTE**

Idiopática

**- ATRESIA FOLICULAR ACELERADA**

## CAUSAS GENÉTICAS

Anormalidades do cromossomo X

Síndrome de Turner  
X Frágil

Doenças autossômicas

Blepharophimosis  
Galactosaemia  
APECD\*  
CDG1\*

Relacionada a genes de hormônios/ receptores hormonais

FSHR\*  
LHR\*  
INIBINA

## ASSOCIADA A DOENÇAS AUTOIMUNES

Doença de Addison  
Miastenia gravis  
Tireoidite de Hashimoto  
Anemia perniciosa  
Vitiligo  
Artrite reumatóide  
LES\*

## CAUSAS IATROGÊNICAS

Cirurgia/ irradiação pélvica  
Quimioterapia

## ASSOCIADA A TOXINAS E AGENTES VIRAIS

**DISFUNÇÃO FOLICULAR**

Idiopática

## DEFICIÊNCIA ENZIMÁTICA

17- $\alpha$  – Hidroxilase  
17-20 Desmolase  
Colesterol-desmolase

\* APECD Poliendocrinopatia autoimune-candidíase-distrofia ectodérmica. CDG1 glicoproteína carboidrato tipo 1. FSHR receptor do FSH. LHR receptor do LH. LES Lupus eritematoso sistêmico  
Modificado de Anasti et al. 1998 e Laml et al, 2002.

Tabela 2. Mutações e Polimorfismos descritos no gene do receptor do FSH.

<i>Autores</i>	<i>Exon</i>	<i>Mutação</i>	<i>Polimorfismo</i>
Aittomakiet al, 1996 (26)	7	Ala 189 Val	
Beau et al, 1998 (27)	6 – 10	Ile 160 Thr Arg 573 Cys	
Da Fonte Kohek et al, 1998 (32)	7 – 10		Ala 307 Thr Ser 680 Ans
Touraine et al, 1999 (28)	9 – 10	Asp 224 Val Leu 601 Val	
Doherty et al, 2002 (29)	7 – 10	Ala 189 Val Ala 419 Thr	
Allen et al, 2003 (30)	10	Pro348 Arg	
Meduri, et al, 2003 (31)	10	Pro 519 Thr	
Sundblat , et al, 2004 (33)	10		Ala 307 Thr Ser 680 Ans



## **OBJETIVOS**

1. Identificar a presença de mutações inativadoras no gene do FSHR em uma coorte de pacientes com falência ovariana prematura.
2. Verificar a frequência dos polimorfismos Ala307Thr e Ser680Asn no gene do FSHR nestas pacientes.
3. Determinar se existe associação entre a presença dos polimorfismos Ala307Thr e Ser680Asn no gene do FSHR e o fenótipo das pacientes com FOP.
4. Genotipar e caracterizar o fenótipo de 5 pacientes provenientes de 2 famílias com falência ovariana prematura familiar.

## *Capítulo 2*

---

### **PACIENTES E MÉTODOS**

## **PACIENTES E MÉTODOS**

### ***Delineamento da pesquisa***

Estudo transversal para a identificação de mutações e polimorfismos no gene do FSHR em pacientes com falência ovariana prematura.

### ***Pacientes***

Foram estudadas 39 pacientes que estão em acompanhamento na Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, HCPA, com diagnóstico de falência ovariana prematura.

- Critérios de inclusão: presença de amenorréia primária ou secundária, cariótipo 46,XX e níveis de FSH iguais ou maiores que 40UI/L em pelo menos duas medidas, com intervalo de 30 dias.
- Critérios de exclusão: pacientes com cariótipo diferente de 46,XX, com diagnóstico de FOP associado à radioterapia, quimioterapia e cirurgias pélvicas (ooforectomia bilateral).

### ***Avaliação Clínica***

Todas as pacientes foram submetidas à avaliação clínica, incluindo anamnese e exame físico padronizados, e incluídas no protocolo de avaliação para falência ovariana prematura (em anexo).

### ***Avaliação laboratorial***

A coleta de sangue foi realizada entre 8 e 10 horas, após jejum de 12 horas. Uma alíquota foi encaminhada para dosagens bioquímicas e hormonais visando aos critérios de inclusão e exclusão do protocolo do presente estudo (em anexo). Além disso, foram dosados LH, FSH, estradiol, globulina carreadora de hormônios sexuais (SHBG), tireotrofina (TSH), tiroxina (T4), testosterona total (TT), androstenediona e sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA). Uma terceira amostra foi enviada ao Laboratório de Endocrinologia Molecular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, UFRGS, para extração de DNA e estudo das mutações e polimorfismos do gene do FSHR.

### ***Avaliação do cariótipo***

O cariótipo foi realizado em todas as pacientes no Setor de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### ***Avaliação ultra-sonográfica***

Todos os exames foram realizados na Unidade de Endocrinologia Ginecológica pelo Dr. Marcelo Moretto, utilizando um equipamento da marca Aloka, modelo SSD-500 (Aloka Co., Tokyo, Japan) com modo B e tempo real e transdutor transvaginal de 5MHz de frequência. O volume uterino foi calculado em centímetros cúbicos (cm<sup>3</sup>), usando a fórmula elíptica  $V = ABC \times 0.523$ , em que A, B e C são os diâmetros uterino longitudinal, transversal e anteroposterior, respectivamente. A espessura endometrial foi medida como uma dupla medida da espessura de ambas faces endometriais na maior espessura do corte sagital. O diâmetro máximo transversal (D1), anteroposterior (D2) e longitudinal (D3) de cada ovário foi também medido. O volume ovariano foi calculado em cm<sup>3</sup>, usando a fórmula  $\text{volume} = D1 \times D2 \times D3 \times 0.523$  (Sample, 1977), como anteriormente descrito (Oppermann *et al.*, 2003; Herter *et al.*, 2002). Os volumes dos dois ovários foram somados e divididos por 2 (volume do ovário direito + volume do ovário esquerdo/2), e o resultado expresso como volume ovariano médio.

### ***Avaliação da densidade mineral óssea***

A densidade mineral óssea foi medida na coluna (L1-L4) e colo do fêmur nas 5 pacientes com FOP familiar pela tecnóloga Fernanda do Amarante, por absormetria radiológica de dupla energia (DEXA) (Lunar Radiation Corporation Model DPX,USA), no laboratório de radiologia SIDI de Porto Alegre.

### ***Análise laboratorial***

As determinações hormonais foram processadas nos laboratórios de bioquímica e radioimunoensaio do HCPA, utilizando-se *kits* comerciais conforme especificações a seguir:

- **FSH:** método imunoensaio eletroquimiluminescência (ECLIA) (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), variação intraensaio de 1.8% e interensaio de 3,3%, sensibilidade de 0.05IU/L, valores normais 3.5-12.5mIU/mL.
- **LH:** método imunoensaio eletroquimiluminescência (ECLIA) (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), variação intraensaio de 1.8% e interensaio de 4,8%, sensibilidade de 0.12IU/L, valores normais 2.4-12.6mIU/mL.
- **TT:** método radioimunoensaio (ICN, Costa Mesa, CA), variação intraensaio de 10% e interensaio de 11.3%, sensibilidade de < 0.2ng/mL, valores normais 0.2-0.8ng/dL.
- **Estradiol:** método ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), variação intraensaio de 5.7% e interensaio de 6.4%, sensibilidade de 5.0pg/mL, valores normais 12,5 – 166,0pg/mL, fase folicular.
- **SHBG:** método enzima imunoensaio quimiluminescência (Immulite, DPC, Los Angeles, CA), variação intraensaio de 6.1% e interensaio de 8.0%, sensibilidade de 0.2nmol/L, valores normais 26.1-110.0nmol/L.

- **SDHEA:** método ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), variação intraensaio de 2.8% e interensaio de 6.5%, valores normais 33.9-337.0ug/dL.
- **Androstenediona:** método radioimunoensaio (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas), variação intraensaio de 5.6% e interensaio de 9.8%, sensibilidade de 0.03ng/mL, valores normais 0.5-3.7ng/dL.
- **TSH:** método ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), variação intraensaio de 8.6% e interensaio de 2.83%, sensibilidade de 0.005μIU/mL, valores normais 0.27-4.2uUI/mL.
- **T4:** método ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), variação intraensaio de 4.7% e interensaio de 4.55%, sensibilidade de 0.42μg/dL, valores normais 0.93-1.7ug/dL.

### ***Avaliação Molecular***

#### ***1. Extração do DNA genômico a partir de sangue periférico***

As amostras de DNA foram obtidas a partir de sangue periférico das pacientes com diagnóstico de falência ovariana prematura. Foram colhidos 4ml de sangue venoso em EDTA 25mM. O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos, utilizando-se dois volumes de solução de lise (NH<sub>4</sub>Cl 114mM, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 1mM) com incubação a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado durante 15 minutos a 3000rpm, sendo desprezado o sobrenadante. O botão de células obtido sofreu o procedimento de lise de glóbulos brancos (NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0) com 48μL de SDS a 10% (Sigma, St. Louis, MO, USA), e 40μL de proteinase K (10ng/ml) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), sendo o material incubado a 37°C por 18 horas. Após este período, 0,96ml de solução saturada de cloreto de sódio (6M) foi adicionada, agitando-se o conjunto vigorosamente durante 15 segundos. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo e, em seguida, lavado em etanol 70% durante 5 minutos, repetindo-se a operação por mais três

vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo seco à temperatura ambiente. Após tal procedimento, o DNA foi ressuspenso em tampão TE (10:01) (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 0,1mM, pH 8,0) e armazenado a -20°C até a realização das reações de polimerização em cadeia.

## ***2. Reação de polimerização em cadeia (PCR)***

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação do gene do receptor do FSH para o estudo dos exons 6, 7, 9 e 10 do gene do FSHR de todas as pacientes. As seqüências dos *primers* utilizados nestas amplificações, assim como os tamanhos respectivos dos produtos e as temperaturas de *annealing*, estão apresentados na Tabela 1. As reações de amplificação foram constituídas de 0,2µg de DNA genômico, 200µM de cada nucleotídeo e 2,5U de Taq polimerase diluída em tampão fornecido pelo fabricante (Gibco), e 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador Programable Thermal Controller - PTC 100 - MJ Research, Inc. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob a luz UV e fotografados pelo sistema Image Master VDS (Fugi Film Thermal Imaging System FTI 500, Tokyp, Japan).

**Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e condições de amplificação por PCR utilizados no estudo.**

Exon	Tamanho	T annealing	Seqüência dos oligonucleotídeos
Exon 6	177pb	55°C	F- 5'-CCGCATCATGCCAGTTAAACT-3' R- 5'-CCCCCTTACTTACAGAATCAC-3'
Exon 7	114pb	60°C	F- 5'-GGCCTTTTATTTTCAGATGGCTG-3' R- 5'-TGGCCTTGAAGAATAGTCAGG-3'
Exon 9	199pb	50°C	F- 5'-AGATATTTCAAGAACAAGGATCC-3' R- 5'-AGGATGGACTCACATTTGCC-3'
Exon 10	1200pb	60°C	F- 5'-CTGGATCTGAGATGTTGATTCTA-3' R- 5'-GTTTTGGGCTAAATGACTTAGAGG-3'
Exon 10 A	577pb	63°C	F- 5'-CTAGCTCTGAGCTTCAT-3' R- 5'-GTGATAGCTGTCAGAGTG-3' + "GC clamp"
Exon 10B	435pb	55°C	F- 5'-CGCCATGCTGCCAGTGT-3' + "GC clamp" R- 5'-GTGAAACAGAACCAGCAG-3'
Exon 10C	652pb	52°C	F- 5'-CGCCATGCTGCCAGTGT-3' + "GC clamp" R- 5'-GGCTAAATGACTTAGAGG-3'
Exon 10D	436pb	63°C	F- 5'-ATTGACTGGCAAACCTGGGG-3' + "GC clamp" R- 5'-AGAGGAGGACACGATGTTGG-3'
"GC clamp" – CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCG			
F- sense		R- anti-sense	

### 3. Análise das mutações nos exons 6 e7 do gene do FSHR por digestão enzimática

As mutações Ile169Thr e Ala189Val localizadas na porção extracelular do FSHR e codificadas nos exons 6 e 7 do gene, respectivamente, foram estudadas através da técnica de digestão enzimática, seguindo protocolo demonstrado na Tabela 2.

A mutação 566C>T no exon 7 do gene do FSHR, descrita em mulheres finlandesas com FOP, abole o sítio de restrição da enzima *BsmI*, permitindo o rastreamento através da técnica de digestão enzimática. A presença desta mutação foi avaliada de acordo com o seguinte protocolo: 15µL de produto de PCR foi submetido à digestão com 15U da enzima *BsmI* (New England BioLabs Inc.), a 65°C durante 4 horas, seguido por 20 minutos a 80°C para a inativação. Da mesma forma, a mutação 480T>C no exon 6 do gene, que codifica a substituição Ile160Thr do FSHR, abole o sítio de restrição da enzima *MfeI* seguindo o protocolo a seguir: 15µL de produto da PCR foi submetido à digestão com 15U de *MfeI* (New England BioLabs Inc.), a 37°C durante 1 hora, seguido de 20 minutos a 65°C para a inativação. Os produtos da digestão foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 4% em tampão TAE e os fragmentos de DNA foram visualizados após coloração com brometo de etídio sob a luz UV e fotografados pelo sistema Image Master VDS (Fuji Film Thermal Imaging System FTI 500, Tokyp, Japan).



**Tabela 2 – Análise das mutações do gene do FSHR nos exons 6 e 7**

Exon	Enzima de restrição	Temperatura	Tempo de aquecimento	Temperatura de Inativação	Tempo de Inativação
7	Bsml*	65°C	4h	80°C	20'
6	Mfel**	37°C	1h	65°C	20'

\* *Bsml* (New England BioLabs Inc.); \*\* *Mfel* (New England BioLabs Inc.)

#### ***4. Análise do exon 10 do gene do FSHR por eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE)***

O DGGE é um método sensível para rastreamento de mutações, permitindo a separação de moléculas de DNA que diferem em apenas um único nucleotídeo (ABRAMS et al., 1990; MYERS et al., 1987). O DNA é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida através de um gradiente de concentração crescente de desnaturantes (uréia e formamida) à temperatura constante de 60°C. Quando o fragmento de DNA é submetido a um ambiente desnaturante, ocorre uma fusão parcial das duplas fitas. À medida que as condições de desnaturação tornam-se mais extremas, o fragmento parcialmente fundido dissocia-se completamente em duas fitas simples. O processo de fusão ocorre de maneira gradual. Devido ao aumento da concentração desnaturante, as duplas fitas de DNA tendem a se dissociar de acordo com sua temperatura de fusão ( $T_m$ ). Nestes domínios de fusão (“melting”), ocorre diminuição da mobilidade eletroforética devido à separação das fitas e conseqüente alteração da forma física deste fragmento. Assim, fragmentos parcialmente fundidos migram em velocidade muito menor durante a eletroforese através da matriz de poliacrilamida que os fragmentos de dupla fita. Uma diferença de 1pb entre duas homoduplexes de DNA dupla fita pode alterar a  $T_m$  em 1°C ou mais. O pareamento incorreto das bases nos heteroduplexes leva a uma significativa desestabilização dos domínios, resultando em diferenças de  $T_m$  entre homo e heteroduplexes de até 6°C. Por esta razão, as heteroduplexes formadas entre fragmentos normais e mutantes são geralmente utilizadas para a análise de mutações de ponto. Sequências de GC são adicionadas a um dos oligonucleotídeos iniciadores para aumentar a estabilidade da dupla fita de DNA, o que determina um aumento na capacidade de detecção do método (MYERS et al., 1985; MYERS et al., 1985, SHEFFIELD et al., 1989). Antes da análise, as

condições ideais para cada fragmento estudado são estabelecidas por cálculo em programas específicos de computador e, posteriormente, avaliadas experimentalmente. Quando há mutação em heterozigose, 4 bandas são detectadas após a desnaturação e renaturação correspondente aos dois homodímeros formados (NN', MM') e dois heterodímeros (NM', N'M), onde N refere-se à banda normal e M à banda mutante. As intensidades relativas das bandas dependem da relação quantitativa de DNA mutante e normal.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos para o DGGE estão descritos na Tabela 2. O DGGE foi realizado em géis de poliacrilamida 10% (16 x 18 x 0.1cm) em uma cuba contendo 7 litros de tampão TAE (40mM Tris, 20mM acetato de sódio, 1mM EDTA, pH 7.4), com temperatura constante de 60°C. As concentrações de desnaturação e de acrilamida adequadas foram obtidas em cada gel, através da mistura de duas soluções de estoque, 0% de solução de estoque de desnaturação [10% acrilamida (37,5:1,0 acrilamida:bis acrilamida) em TAE], e 100% de solução de estoque de desnaturação [10% acrilamida (37,5:1,0 acrilamida:bis acrilamida), 7M uréia, 40% formamida em TAE]. As soluções de estoque foram filtradas duas vezes em papel Whatman N°1 e estocadas em frascos âmbar a 4°C. Para a catalisação da polimerização foram usados persulfato de amônia a 10% e TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilenodiamina) nas concentrações de 1/200 e 1/2000, respectivamente.

O exon 10, devido ao seu tamanho (1,2kb), foi subdividido para este estudo em quatro fragmentos: 10A (577pb), 10B (435pb), 10C (652pb) e 10D (436pb). Os gradientes de desnaturação e tempo de eletroforese foram padronizados para cada fragmento de DNA amplificado (DA FONTE KOHEK et al., 1998). Os gradientes de concentração de desnaturantes, assim como o tempo de eletroforese que foram usados para resolução de cada fragmento do gene são apresentados na Tabela 3 (DA FONTE KOHEK et al., 1998). Os géis de DGGE foram corados por imersão em solução com brometo de etídio e examinados em luz ultravioleta e fotografados pelo sistema Image Master VDS (Fugi Film Thermal Imaging System FTI 500, Tokyp, Japan). Optou-se pelo rastreamento de mutações no exon 10 do gene do receptor do FSH pelo DGGE em vista das condições favoráveis apresentadas pelos mapas de fusão e pelo tamanho do exon 10 (~1,2Kb). Para controle do DGGE, foram utilizadas amostras previamente genotipadas para os polimorfismos do exon 10 do gene do FSHR por seqüenciamento direto, gentilmente cedidas pela Dr. Ana Cláudia Latronico, do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM42 do HCFMUSP. Em decorrência, apenas as

amostras que apresentassem um padrão de migração diferente das amostras controle seriam seqüenciadas.

**Tabela 3 – Gradientes de concentração e tempo de eletroforese do DGGE utilizados para estudo do exon 10.**

Exon/Fragmento	Gradientes de concentração desnaturantes	Tempo de eletroforese (horas)
10 A	30% - 60%	20
10 B	40% - 70%	18
10 C	40% - 70%	20
10 D	45% - 75%	20

### 5. Seqüenciamento

Os produtos de PCR do exon 9 do gene do FSHR foram seqüenciados para estudo da presença da substituição Asp224Val, localizada no domínio extracelular do FSHR. Também foram submetidas a seqüenciamento automático, 10 amostras para estudo do exon 10 que não tiveram uma resolução eficiente através de DGGE.

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada através da comparação da intensidade de sinal emitido pelos fragmentos do marcador de peso molecular ( $\Phi$ X 174/Hae III, Invitrogen) de concentração conhecida em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos a uma purificação enzimática prévia com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2U/ $\mu$ L) e exonuclease I (10U/ $\mu$ L) (PCR kit, Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA), A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o kit ABI Prism<sup>TM</sup> Big Dye Terminator V 3.1 (Applied Biosystems) e concentrações variáveis de DNA (10 a 100ng) foram utilizadas de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em seqüenciador automático ABI 3100 – Avante 150 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, EUA.

### ***Considerações éticas***

O presente estudo foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação e Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em 29/10/04, como projeto de número 04043. Foi obtido consentimento informado por escrito das pacientes.

## *Capítulo 3*

---

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## ARTIGO 2

### SCREENING OF FSH RECEPTOR GENE IN WOMEN WITH PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF) IN SOUTHERN BRAZIL AND ASSOCIATIONS WITH PHENOTYPE

<sup>1,2</sup>Luiz Cesar Vilodre, MD;<sup>3</sup> Maria Beatriz F. Kohek, PhD; <sup>1,2</sup>Poli Mara Spritzer, MD, PhD,<sup>1</sup>Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, FFFCMPA, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Poli Mara Spritzer, MD, PhD  
Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Sarmiento Leite, 500  
90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel: +55-51-3308-3671 / Fax: +55-51-3308-3656  
E-mail: [spritzer@ufrgs.br](mailto:spritzer@ufrgs.br)

Molecular Human Reproduction, 2007.

(Submitted)

# **Screening of FSH Receptor gene in women with Premature Ovarian Failure in Southern Brazil and associations with phenotype**

LC Vilodre<sup>1,2</sup>, MB Fonte Kohek<sup>3</sup> and PM Spritzer<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, FFFCMPA, Porto Alegre, Brazil.

**Running title: FSH receptor in women with POF in Brazil**

Corresponding author: Poli Mara Spritzer, MD, PhD

Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500

90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: +55-51-3308-3671 / Fax: +55-51-3308-3656

E-mail: [spritzer@ufrgs.br](mailto:spritzer@ufrgs.br)

## ABSTRACT

We investigated the presence of mutations/polymorphisms in the FSH receptor (FSHR) gene and their association with phenotype in women with premature ovarian failure (POF) in southern Brazil. Clinical and hormonal variables were determined in thirty-six 46,XX women with primary or secondary amenorrhea before the age of 40 years, FSH > 40 IU/L and ovarian failure. DNA was isolated from peripheral leukocytes. Exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene were analyzed by polymerase chain reaction, restriction enzyme analysis, denaturing gradient gel electrophoresis, and direct sequencing. No inactivating mutations were found. Exon 10 had two polymorphisms, Ala307Thr and Ser680Asn (allelic frequency: 52.9% and 35.7%, respectively), which were not related to FSH, LH or estradiol serum levels. Ovarian size and small ovarian follicles on ultrasonography were not associated with FSHR genetic variants. In contrast, the last menstruation occurred significantly earlier in patients with the Ala307Thr polymorphism (A: age=33.3 ± 7.1 years vs. T: 28.6 ± 11.4 years, P=0.04). In conclusion, we did not identify inactivating mutations in exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene. A high frequency of two polymorphisms that are in linkage disequilibrium was found in exon 10 of the FSHR gene. The presence of the Ala307Thr polymorphism may be associated with a more precocious onset of clinical disease.

**Keywords:** Amenorrhea/FSH receptor/polymorphism



## INTRODUCTION

Premature ovarian failure (POF) is defined as failure of ovarian function before the age of 40, causing amenorrhea, sex steroid deficiency, and high gonadotropin levels (Moraes-Ruehsen and Jones, 1967, Christin-Maitre, 1999; Conway, 2000). The disease may be intermittent and transient, with a wide spectrum of pathogenic mechanisms, including chromosomal, genetic, enzymatic, autoimmune, metabolic, infectious and iatrogenic processes (Anastasi,1998). Prevalence of POF at reproductive age is estimated as 1% in women under the age of 40 years and 0.1% in women under the age of 30 years (Coulam,1986). The incidence of familial cases ranges from 4 to 30% in various studies, suggesting that POF may be a genetic disorder (Conway, 2000; Coulam, 1983), with the FSH receptor (FSHR) gene as the foremost candidate for POF.

Since 1996, several mutations in the FSHR gene have been described as a possible cause of POF. The first inactivating mutation of the FSHR gene was described in the women of six Finnish families with C566T missense mutation of exon 7 who presented primary amenorrhea and recessively inherited hypergonadotropic ovarian failure (Aittomaki *et al.*, 1996). Beau *et al.* described a patient with secondary amenorrhea, high gonadotropin levels and normal sized ovaries who presented partial loss-of-function mutations of FSHR gene and was a compound heterozygote, with an Ile160Thr in exon 6 and Arg573Cys in the exon 10 (Beau *et al.*, 1998). More recently, other activating FSHR gene mutations have been reported: Asp224Val and Leu601 Val (Touraine *et al.*, 1999), Ala419Thr (Doherty *et al.*, 2002), Pro348Arg (Allen *et al.*, 2003) and Pro519Thr (Meduri *et al.*, 2003).

On the other hand, two polymorphic variants, Ala307Thr and Ser680Asn have also been identified in POF (da Fonte Kohek *et al.*, 1998, Sundblad *et al.*, 2004), although no relationships with phenotype have been systematically investigated (Simoni *et al.*, 2002). Therefore, the aim of the present study was to determine the presence of mutations and/or polymorphisms in FSHR gene in women with POF in southern Brazil and to verify whether these mutations and/or polymorphisms are associated with phenotype.

## MATERIALS AND METHODS

### *Subjects*

Thirty-six women were included in the study. Most of the patients were referred from several cities in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, for amenorrhea investigation. They had a heterogeneous ethnic background, including Portuguese, Spanish, Italian, and African ancestry. The inclusion criteria for this patient series were as follows: primary or secondary amenorrhea before the age of 40 years, normal female karyotype (46,XX), high gonadotropin levels (FSH > 40 IU/L) in at least two consecutive determinations and hypergonadotropic ovarian failure resulting from causes other than autoimmune ovarian diseases, surgery, chemotherapy or radiotherapy. The study protocol was approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (university hospital) and written informed consent was obtained from every subject.

### *Study protocol*

Anthropometric measurements included body weight, height, waist-to-hip ratio (WHR) (waist circumference recorded at the mid-distance between bottom of rib cage and iliac crest and hip circumference at the level of the greater trochanter) (Pouliot, 1994; Lemieux, 1996), and body mass index (BMI) (current weight in kg divided by height in m<sup>2</sup>) (Keys, 1972).

Hormonal and biochemical variables were assessed on any day after an overnight fast. Blood samples were drawn from an antecubital vein for determination of serum LH, FSH, estradiol, sex hormone binding globulin (SHBG), thyrotropin (TSH), thyroxine (T4), total testosterone (TT), free testosterone index, androstenedione and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS). All samples were obtained between 8 and 10 a.m.

### *Assays*

Serum LH and FSH were measured by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (normal range: LH = 2.4-12.6; FSH = 3.5-12.5 mIU/mL), with intra and inter-assay coefficients of variation (CV) of 1.8% and 4.8%, respectively, for LH, and 1.8% and 3.3% for FSH. The sensitivity of the assays was 0.12

IU/L for LH and 0.05 IU/L for FSH. TT levels were measured by radioimmunoassay (ICN, Costa Mesa, CA) (normal range 0.2-0.8 ng/dL) with an assay sensitivity < 0.2 ng/mL and intra and inter-assay CV of 10% and 11.3%, respectively. Free testosterone index was estimated using the formula  $TT \text{ (nmol/L)}/SHBG \text{ (nmol/L)} \times 100$ . Estradiol was measured by ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), with an assay sensitivity of 5.0 pg/mL, with intra and inter-assay CV 5.7% and 6.4%. SHBG was measured by chemoluminescence enzyme immunoassay (Immulite, DPC, Los Angeles, CA) (normal range: 26.1-110.0 nmol/L), with assay sensitivity of 0.2 nmol/L and intra and inter-assay CV of 6.1% and 8.0%, respectively. SDHEA was measured by ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) normal range: 33.9-337.0 ug/dL with sensitivity of 0.10  $\mu$ g/dL and intra and inter-assay CV of 2.8% and 6.5%, respectively. Serum androstenedione concentrations were measured by radioimmunoassay (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas) (normal range: 0.5-3.7 ng/dL), with assay sensitivity of 0.03 ng/mL and intra and inter-assay CV of 5.6% and 9.8%, respectively. Serum TSH and T4 were measured by ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (normal range TSH: 0.27-4.2 uIU/mL; T4: 0.93-1.7 ug/dL), with intra and inter-assay CV of 8.6% and 2.83% respectively for TSH and 4.7% and 4.55% for T4. The sensitivity of the assays was 0.005  $\mu$ IU/mL for TSH and 0.42  $\mu$ g/dL for T4.

### ***Transvaginal sonography (TVS)***

TVS was performed in all patients with an Aloka apparatus (Aloka Co., Tokyo, Japan) using a 5.0 MHz transvaginal probe. Uterine volume (V) was calculated in cubic centimeters ( $\text{cm}^3$ ), using the ellipse formula  $V = ABC \times 0.523$ , in which A, B and C are the longitudinal, transverse and anteroposterior uterine diameters, respectively.

Endometrial thickness was measured as the double-thickness measurement of both endometrial surfaces at the thickest point in the mid-sagittal view. The maximal transverse (D1), anteroposterior (D2), and longitudinal (D3) diameters of each ovary were also measured. Ovarian volume was calculated in  $\text{cm}^3$ , using the formula  $\text{volume} = D1 \times D2 \times D3 \times 0.523$  (Sample, 1977), as previously described (Oppermann *et al.*, 2003; Herter *et al.*, 2002). The volumes of the two

ovaries were added and divided by 2 (right ovary volume + left ovary volume/2), and the results expressed as mean ovarian volume. The number of identified follicles was recorded, and the largest follicle was measured.

### ***DNA Analysis***

In addition to serum samples, whole blood samples were collected from all women. Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes as previously described (Miller *et al.*, 1998). Exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene (Minegishi *et al.*, 1991) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the use of specific oligonucleotide primers (Table 1). The 480T>C mutation in the exon 6 and 566C>T mutation in the exon 7 of the FSHR gene were screened by restriction enzyme analysis using Mfe I (Biolabs Inc., New England) (Beau *et al.*, 1998) and Bsm I (Biolabs Inc., New England) (Aittomaki *et al.*, 1995), respectively. After the digestion, both were submitted to DGGE (Myers *et al.*, 1987; da Fonte Kohek *et al.*, 1998). Exon 9 was sequenced to screen an Asp224Val substitution in the extracellular domain of the FSHR gene, using a Big Dye Terminator V 3.1 cycle sequencing kit (Foster City, CA) and an automated sequencer ABI 3.100 – Avante Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA (Whitney *et al.*, 1995). For mutation screening of the large exon 10 of the FSHR gene, four separate PCR reactions (10A, 10B, 10C and 10D) with overlapping PCR products were used. The procedures for denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing have been described previously (da Fonte Kohek *et al.*, 1998).

### ***Statistical analysis***

Results are expressed as means  $\pm$  SD or median and interquartile range. Comparisons between the two group means were analyzed by Student's t-test; comparisons between median values were analyzed with Mann-Whitney's U test. Comparisons between ratios were carried out with the chi-square test. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version Chicago, IL, USA). Data were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Table II shows the clinical characteristics of the studied patients. Mean BMI was 24.9 kg/m<sup>2</sup> ( $\pm$  4.6). Thirty-four (94.4%) patients were white and 13 (36.6%) were smokers. Thirteen (36.1%) complained of infertility before the diagnosis of POF, and 22 (61.1%) became pregnant before the diagnosis of ovarian failure. None of the patients became pregnant after the diagnosis of POF. While thyroid autoimmunity was diagnosed in 6 (16.7%) patients, no other autoimmune diseases were found (vitiligo, anemia, diabetes, Crohn's disease, rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, thrombocytopenia purpura, recurrent candidiasis or hepatitis). Median serum androgen levels were on the lower tertile values in relation to reference values [(TT = 0.3 ng/dL (0.20-0.36), free testosterone index 2.36 (1.32-4.01), DHEAS = 67.6 ug/dL (35.3-97.3), androstenedione = 1.4 ng/dL (1.04-1.70), SHBG = 42.8 nmol/L (27.8-57.8)]. Sixteen (44.4%) patients had been experiencing menstrual irregularity for 2 years and 11 months, and 17 (47.2%) for 3 to 9 years before the last period.

The mutations Ile160Thr in exon 6, Ala189Val in exon 7, and Asp224Val in exon 9 were not identified in any of the patients. Although no mutations were identified in exon 10 either, genetic variants were found in fragments 10A (Ala307Thr) and 10C (Ser680Asn) (Figure 1). All genotype frequencies were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium law. The frequency of polymorphic alleles and genotype distribution at the two loci within the FSHR gene were similar to those reported previously for POF patients from Brazil and Argentina (da Fonte Kohek *et al.*, 1998; Sundblad *et al.*, 2004) (Table III). Tables IV and V show clinical, hormonal and ultrasonographic variables according to the allelic frequency of Ala307Th and Ser680Asn polymorphisms in the FSHR gene. No association was found between the two genetic variants with time of tobacco use or number of cigarettes and the duration of menstrual irregularities before the diagnosis of POF. There was no difference between the various alleles in terms of distribution and hormone levels, ovarian volume or presence of follicles. In contrast, patients with the polymorphic T allele of Ala307Thr polymorphism were significantly younger than those with the A allele at the time of the last menstruation ( $P = 0.04$ ) (Table IV). The genotype distribution for this polymorphism was  $24.6 \pm 12.9$

years for the TT genotype (homozygous mutant),  $34.6 \pm 3.8$  years for the AA (wild type) and  $32.4 \pm 8.9$  years for the AT genotype (heterozygous mutant). No differences in age at last menstruation were observed for the Ser680Asn polymorphism ( $30.7 \pm 10.6$  years for the homozygous genotype,  $33.8 \pm 6.7$  years for the wild type and  $29.9 \pm 10.5$  years for the heterozygous genotype).

## DISCUSSION

In the present study, no inactivating mutations were found in exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene in a cohort of thirty-six POF patients in South Brazil. A high frequency of two polymorphisms, Ala307Thr and Ser680Asn, which are in linkage disequilibrium, was found in exon 10 of the FSHR gene. In turn, while the genetic variant of Ser680Asn was not related to phenotype, the presence of the Ala307Thr polymorphism was associated with an earlier age at clinical onset of POF. To our knowledge, this is the first report to describe this association.

The clinical presentation of POF ranges from severe forms, in which patients may present incomplete pubertal development and primary amenorrhea, to less 10 complicated phenotypes, with the presence of secondary sexual characteristics, spontaneous menarche and a variable period of menstrual regularity. This is followed by menstrual changes and periods of amenorrhea until the establishment of definitive ovarian deficiency (Conway, 2000; Nelson *et al.*, 1994). Some studies have reported on individual cases of POF, in which the clinical presentation could be related to the presence of FSHR gene mutation (Aittomaki *et al.*, 1995; Beau *et al.*, 1998; Touraine *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2003; Meduri *et al.*, 2003). From a clinical point of view, the cases described in such studies may be regarded as more severe forms of POF. In contrast, the present cohort of POF patients has a less severe phenotype and only three did not have spontaneous menarche. Beyond the variability of mutation frequencies among different populations, this may help to explain, at least in part, the absence of known inactivation mutations of the gene of FSHR in our POF women. No mutation of the gene of FSHR were either found in Greek women with POF (Loutradis *et al.*, 2006) or in POF patients in Japan (Takakura *et al.*, 2001). In addition, although we were unable to identify any

specific markers of loss of ovarian function, the menstrual dysfunction that precedes the installation of amenorrhea, characterized by oligomenorrhea, transient amenorrhea and short cycles followed by periods of regular cycles, has been regarded as a "prodromal POF" even if not accompanied by other signals. Meskhi and Seif reported that approximately 50% of the patients presented a history of oligomenorrhea or dysfunctional uterine bleeding before definitive POF (Meskhi and Seif, 2006). The data reported herein confirm that the duration of menstrual irregularities preceding the cessation of menstrual cycles varies greatly.

In the present study, the allelic frequencies of polymorphisms (52.9% and 35.7%, respectively, for Ala307Thr e Ser680Asn) were similar to those previously obtained in normal fertile controls in Brazil (58% for both polymorphisms) (da Fonte Kohek *et al.*, 1998). In addition, the overall distribution of genotype and allelic frequencies of these two variants was comparable with results obtained in Brazilian and Argentinean POF patients (da Fonte Kohek *et al.*, 1998; Sundblad *et al.*, 2004).

Only a few studies have reported a relationship between the presence of FSHR gene polymorphisms and the phenotype of POF patients. Perez Mayorga *et al.* (2000) have recently reported an association between the genotype of FSHR and the ovarian induction in response to gonadotropin administration in infertile women submitted to *in vitro* fertilization. In that study, the cumulative dose of FSH in induced cycles was related to allelic variants of the Ala307Thr and Ser680Asn polymorphisms. The possible mechanisms may involve a fine-tuning in the feedback regulation of FSH, modulated by FSHR (Perez Mayorga *et al.*, 2000). In the present study, no associations were found between the allelic frequency of the screened genetic variants of FSHR gene and clinical and endocrine variables, such as hormone profile or ovarian ultrasonographic findings. In contrast, disease severity, as determined by the age at amenorrhea, could be related to the Ala307Thr genetic variant of the FSHR gene. In addition, the genotype distribution showed that patients with the homozygous genotype for the Ala307Thr polymorphism had their last menstrual cycle 10 years earlier than those with the wild type and 8 years earlier than patients with the heterozygous phenotype.

Therefore, although several polymorphisms have been identified in genes of the gonadotropins and their receptors (Whitney *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998; Conway *et al.*, 1999; Themmen *et al.*, 2000) additional research is needed to establish whether receptor polymorphisms promote or suppress reproductive functions, especially due to the considerable difference in frequency displayed by such polymorphisms in different populations (Wu *et al.*, 1998; de la Chesnaye *et al.*, 2001).

In conclusion, mutations in the FSHR gene seem to be rare in women with premature ovarian failure in southern Brazilian. A high frequency of two polymorphisms that are in linkage disequilibrium was found in exon 10 of the FSHR gene. The presence of the Ala307Thr polymorphism may be associated with a more precocious onset of clinical disease. Longitudinal studies are needed to confirm the relevance of the present results.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS (Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul) and PRONEX 26/98 (Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência em Pesquisa), Brazil.

#### REFERENCES

- Aittomaki K, Herva R, Stenman UH, Juntunen K, Ylostalo P, Hovatta O, de la Chapelle A (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 JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehtvaslaiho H, Engel AR et al (1995) Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82,959-968.
- Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P, Kotlar TJ, Huhtaniemi IT, Jameson JL, Cheetham TD, Ball SG (2003) A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing



hypergonadotrophic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum Reprod* 18,251 - 256.

Anastasi JN (1998) Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril*, 70, 1-15.

Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, Milgrom E, Kuttan F, Misrahi M (1998) A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 102,1352-1359.

Christin-Maitre S (1999) Premature ovarian insufficiency. *Rev Prat* 49, 1297-1302.

Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M (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 GS (2000) Premature ovarian failure. *Br Med Bull* 56,643-649.

Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF (1986) Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 67,604-606.

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

da Fonte Kohek, MB, Batista MC, Russell AJ, Vass K, Giacaglia LR, Mendonça BB, Latronico AC (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.

de la Chesnaye E, Canto P, Ulloa-Aguirre A, Mendez JP (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.

Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, Aittomaki K (2002) A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 87,1151-1155.

- Herter LD, Golendziner E, Flores JA, Becker E, Spritzer PM (2002) Ovarian and uterine sonography in healthy girls between 1 and 13 years old: correlation of findings with age and pubertal status. *AJR Am J Roentgenol* 178,1531-1536.
- Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL (1972) Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis* 25,329-343.
- Lemieux S, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP (1996) Anthropometric correlates to changes in visceral adipose tissue over 7 years in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20,618-624.
- Liu JY, Gromoll J, Cedars MI, La Barbera AR (1998) Identification of allelic variants in the follicle-stimulating hormone receptor genes of females with or without hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* 70,326-331.
- Loutradis D, Patsoula E, Stefanidis K, Drakakis P, Antonakis G, Bletsas R, Antsaklis A, Michalakis S. Follicle-stimulating hormone receptor gene mutations are not evident in Greek women with premature ovarian failure and poor responders. *Gynecol Obstet Invest* 2006,61(1):56-60.
- Meduri G, Touraine P, Beau I, Lahuna O, Desroches A, Vacher-Lavenu MC, Kuttenn F, Misrahi M (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.
- Meskhi A and Seif MW (2006) Premature ovarian failure. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18,418-426.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16,1215.
- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Ibuki Y, Igarashi M (1991) Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 175,1125-1130.
- Moraes-Ruehsen M and Jones GS (1967) Premature ovarian failure. *Fertil Steril* 18,440-461.

- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 155,501-527.
- Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM, Defensor RA, Lipetz KJ, White BJ, Shawker TH, Merino MJ (1994) Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 79,1470-1475.
- Oppermann K, Fuchs SC, Spritzer PM (2003) Ovarian volume in pre- and perimenopausal women: a population-based study. *Menopause* 10,209-213.
- Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M (2000) Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 85,3365-3369.
- Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, Nadeau A, Lupien PJ (1994) Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 73,460-468.
- Sample WF, Lippe WF, Gyepes MT (1977) Gray-scale ultrasonography of the normal female pelvis. *Radiology* 125,477-483.
- Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J (2002) Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update* 8,413-421.
- Sundblad V, Chiauzzi VA, Escobar ME, Dain L, Charreau EH (2004) Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol* 222,53-59.
- 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*. 2001, Jan 75(1):207-9

- Themmen APN and Huhtaniemi IT (2000) Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21,551-583.
- Touraine P, Beau I, Gougeon A, Meduri G, Desroches A, Pichard C, Detoeuf M, Paniel B, Prieur M, Zorn JR et al (1999) New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol* 13,1844-1854.
- Whitney EA, Layman LC, Chan PJ, Lee A, Peak DB, McDonough PG (1995) The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls. *Fertil Steril* 64,518-524.
- Wu SM, Jose M, Hallermeier K, Rennert OM, Chan WY (1998) Polymorphisms in the coding exons of the human luteinizing hormone receptor gene. *Mutations in brief no. 124. Online. Hum Mutat* 11,333-334.

**FIGURE LEGEND**

Figure 1. Screening of polymorphisms Ala307Thr and Ser680Asn by DGGE. A. Fragment of FSHR 10A and B. Fragment of FSHR 10C. w: wild type; he: mutant heterozygous; ho: mutant homozygous

Table I -Specific oligonucleotide primers and PCR amplification conditions used in the study

Exon	Size (bp)	Annealing		Nucleotides <sup>a</sup>
		temperature (°C)		
6	177	55		F- 5'-CCGCATCATGCCAGTTAAACT -3'
				R-5'-CCCCCTTACTTACAGAATCAC-3'
7	114	60		F- 5'-GGCCTTTTATTCAGATGGCTG-3'
				R-5'-TGGCCTTGAAGAATAGTCAGG-3'
9	199	50		F- 5'-AGATATTTCAAGAACAAGGATCC -3'
				R-5'-AGGATGGACTCACATTTGCC-3'
10	1200	60		F- 5'-CTGGATCTGAGATGTTGATTCTA-3'
				R-5'-GTTTTGGGCTAAATGACTTAGAGG-3'
10A	577	63		F- 5'-CTAGCTCTGAGCTTCAT-3'
				R-5'-GTGATAGCTGTCAGAGTG-3'+ "GC clamp"
10B	435	55		F- 5'-CGCCATGCTGCCAGTGT-3'+ "GC clamp"
				R-5'-GTGAAACAGAACCAGCAG-3'
10C	652	52		F- 5'-CGCCATGCTGCCAGTGT-3'+ "GC clamp"
				R-5'-GGCTAAATGACTTAGAGG-3'
10D	436	63		F- 5'-ATTGACTGGCAAACCTGGGG-3'+ "GC clamp"
				R-5'-AGAGGAGGACACGATGTTGG-3'

<sup>a</sup>GC clamp - CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCG, F- sense, R- anti-sense.

Table II. Clinical characteristics of POF patients in the study.

Characteristic	No. patients (n = 36)	%/ Percentile 25-75
Spontaneous menarche	33	88.9
Onset of menstrual irregularity before POF diagnosis		
0-2 years and 11 months	16	44.4
3-5 years and 11 months	8	22.2
6-8 years and 11 months	3	8.3
More than 9 years	6	16.7
Infertility	13	36.1
Age at diagnosis of POF <sup>a</sup>	31.1	±9.9
FSH (IU/L) <sup>b</sup>	63.4	(42.2-90.4)
LH (IU/L) <sup>b</sup>	26.2	(16.1-33.5)
Estradiol (pg/mL) <sup>b</sup>	12.0	(6.2-28.4)
Mean ovarian volume <sup>b</sup>	0.94	(0,65-1,77)
Presence of follicles	11	30.6

a: mean ± SD; b: median and interquartile range.

Table III. Comparison of FSHR genotype and allelic frequency studies in POF patients

## A: Genotype frequencies

		Present work (n=35)	da Fonte Kohek <i>et al.</i> (1998) (n=15)	Sundblad <i>et al.</i> (2004) (n=20)
Genotype		No. / %	No. / %	No. / %
Ala 307 Thr	A - A	7 / 20.0	4 / 26.7	5 / 25
	A - T	19 / 54.3	8 / 53.3	10 / 50
	T - T	9 / 25.7	3 / 20.0	5 / 20
Ser 680 Asn	S - S	5 / 14.3	3 / 20.1	5 / 25
	S - A	15 / 42.8	7 / 46.6	10 / 50
	A - A	15 / 42.6	5 / 33.3	5 / 20

Ala307Ser: AA = wild type; AT = heterozygous mutant; TT = homozygous mutant  
 Ser680Asn: SS = wild type; SA = heterozygous mutant; AA = homozygous mutant

## B: Allelic frequencies

		Present work (n=70)	da Fonte Kohek <i>et al.</i> (1998) (n=30)	Sundblad <i>et al.</i> (2004) (n=40)
Allelic		No. / %	No. / %	No. / %
Ala 307 Thr	A	33 / 47.1	16 / 53.3	20 / 50
	T	37 / 52.9	14 / 46.7	20 / 50
Ser 680 Asn	S	45 / 64.3	13 / 43.3	20 / 50
	A	25 / 35.7	17 / 56.7	20 / 50

Ala307Ser: A and T  
 Ser680Asn: S and A



Table IV. Phenotype of POF patients according to the allelic frequency of Ala307Thr (10 A) polymorphism

	A	T	P
Ala307Thr	n=33	n=37	
Spontaneous menarche	32 (97%)	33 (89.2%)	0.61
Onset of menstrual irregularity before POF diagnosis			
0-2 years and 11 months	15 (45.5%)	15 (40.5%)	
3-5 years and 11 months	8 (24.2%)	6 (24.2%)	0.79
6-8 years and 11 months	2 (6.1%)	4 (10.8%)	
More than 9 years	6 (18.2%)	8 (21.6%)	
Infertility	9 (27.3%)	17 (45.9%)	0.17
Age at diagnosis of POF <sup>a</sup>	33.3 ± 7.1	28.6 ± 11.4	0.04
FSH (IU/L) <sup>b</sup>	61.8 (40.1 – 85.6)	67.1 (43.4 – 86.4)	0.60
LH (IU/L) <sup>b</sup>	21.2 (15.3 – 35.6)	26.6 (17.2 – 32.0)	0.76
Estradiol (pg/ml) <sup>b</sup>	14.5 (6.5 – 27.6)	11.4 (5.0 – 32.6)	0.79
Mean ovarian volume <sup>b</sup>	1.3 (0.6 – 1.4)	0.9 (0.7 – 1.9)	0.53
Presence of follicles	7 (21.2%)	11 (29.7%)	0.59

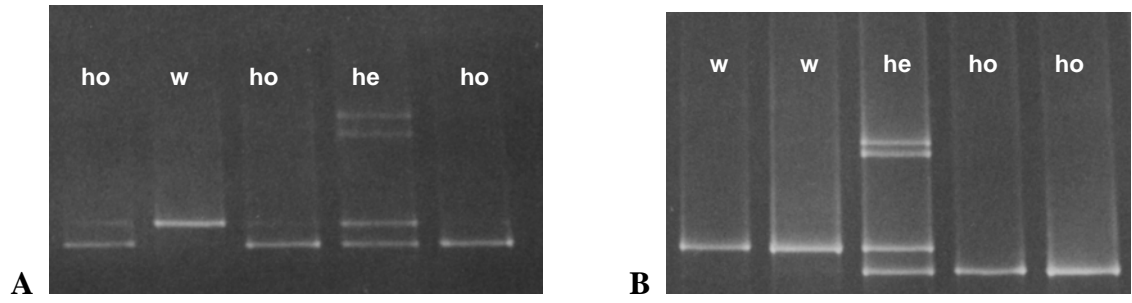
a: mean ± SD; b: median and interquartile range

Table V. Phenotype of POF patients according to the allelic frequency of the Ser680Asn (10C) polymorphism

	S	A	
Ser680Asn	n=25	n=45	P
Spontaneous menarche	22 (88.0%)	41 (91.1%)	0.44
Onset of menstrual irregularity before POF diagnosis			
0-2 years e 11 months	9 (36.0%)	20 (44.4%)	
3-5 years e 11 months	5 (20.0%)	8 (17.8%)	
6-8 years e 11 months	5 (20.0%)	1 (2.2%)	0.75
More than 9 years	3 (12.0%)	11 (24.4%)	
Infertility	7 (28.0%)	19 (42.2%)	0.36
Age at diagnosis of POF <sup>a</sup>	31.4±9.1	30.46±10.3	0.68
FSH (IU/L) <sup>b</sup>	61.8 (41.1 – 82.8)	67.1 (43.4 – 89.1)	0.62
LH (IU/L) <sup>b</sup>	21.7 (15.3– 30.2)	24.6 (18.2 – 33.0)	0.71
Estradiol (pg/ml) <sup>b</sup>	14.2 (5.0-23.6)	12.5 (8.0 -29.7)	0.84
Mean ovarian volume <sup>b</sup>	1.3 (0.7 – 1.9)	0.9 (0.7 – 1.7)	0.40
Presence of follicles	8 (32.0%)	10 (22.2%)	0.54

a: mean ± SD; b: median and interquartile range.

Figure 1



### ARTIGO 3

## CLINICAL FEATURES AND SCREENING OF FSH RECEPTOR GENE IN WOMEN FROM TWO FAMILIES WITH PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF) IN SOUTHERN BRAZIL.

<sup>1,2</sup>Luiz Cesar Vilodre, MD; <sup>3</sup>Maria B da Fonte Kohek, PhD; <sup>1,2</sup>Poli Mara Spritzer, MD,  
PhD

<sup>1</sup>Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, FFFCMPA, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Poli Mara Spritzer, MD, PhD  
Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Sarmiento Leite, 500  
90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel: +55-51-3308-3671 / Fax: +55-51-3308-3656  
E-mail: spritzer@ufrgs.br

Este artigo será enviado para publicação em revista indexada internacional

**Clinical features and screening of FSH receptor gene in women from two families  
with premature ovarian failure (POF) in southern Brazil**

<sup>1,2</sup>Luiz Cesar Vilodre, MD; <sup>1</sup>Fernanda do Amarante; <sup>3</sup>Maria B da Fonte Kohek, PhD;  
<sup>1,2</sup>Poli Mara Spritzer, MD, PhD

<sup>1</sup>Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, FFFCMPA, Porto Alegre, Brazil.

**Abstract**

Premature ovarian failure (POF) is a condition defined by failure of the ovary function prior to the age of 40, causing amenorrhea, sex steroid deficiency, and high gonadotropin levels. Evidences suggest that POF may be a genetic disorder and FSH receptor (FSHR) has been considered the foremost candidate gene for POF. Since 1996, various mutations in the FSHR gene have been described as a possible cause of POF. On the other hand, two polymorphic variants, Ala307Thr and Ser680Asn have also been identified. The aim of the present work was to determine the presence of mutations and/or polymorphisms in FSHR gene in women with familial POF in southern Brazil and to describe their clinical phenotype. We studied 2 families with 5, 46XX women from a cohort of patients with POF, with secondary amenorrhea before the age of 40 years and  $FSH \geq 40$  IU/L. Clinical and hormonal variables were determined. DNA was isolated from peripheral leukocytes. Exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene were analyzed by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis, denaturing gradient gel electrophoresis, and direct sequencing. No inactivating mutations were identified in the studied exons of the FSHR gene in women with familial POF. Family 1 was composed of three women, mother and two daughters in whom ovarian insufficiency was confirmed by the mean age of  $29.3 \pm 7.8$  years old. The mother was homozygous mutant and the daughters were heterozygous to Ala307Thr and Ser680Asn polymorphisms, respectively. Family 2 was composed of

two sisters who developed ovarian failure at the age of  $32 \pm 1.4$  years and were heterozygous to both polymorphisms. Women of both families presented normal pubertal development, spontaneous menarche and regular cycles, followed by a period of oligomenorrhea and transient amenorrhea, before the onset of ovarian insufficiency. In conclusion, no inactivating mutations in exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene were found in these women with familial POF in southern Brazil. A high frequency of two polymorphisms that are in linkage disequilibrium was found in exon 10 of the FSHR gene in these women. The presence of the Ala307Thr and Ser680Asn polymorphisms was not associated with any specific clinical feature and the phenotype was similar to those of the women with sporadic POF.

**Keywords:** FSH receptor, polymorphism, hypergonadotropic hypogonadism, amenorrhea

## Introduction

Premature ovarian failure (POF) is defined as failure of ovarian function before the age of 40, and is characterized by high gonadotropin levels, sex steroid deficiency and primary or secondary amenorrhea (de Moraes-Ruehsen and Jones, 1967, Christin-Maitre, 1999, Conway, 2000). The wide spectrum of pathogenic mechanisms includes chromosomal, genetic, enzymatic, autoimmune, metabolic, infectious and iatrogenic conditions that may determine an intermittent and transient progression. The prevalence of POF among women in reproductive age is estimated in approximately 1:1000 women before the 30 years, 1:250 around the 35 years and of 1:100 before the 40 years. (Anasti, 1998). The incidence of familial cases varies from 4%–30% in several studies, suggesting that POF may be a genetic disorder (Conway, 2000, Coulam, 1983, van Kasteren et al., 1999, Vegetti et al., 1998). The differential diagnosis between familial and sporadic POF is done through an appropriate clinical history, since familial POF is defined by the presence of at least one other affected relative in the family (van Kasteren et al., 1999).

Although a genetic etiology has been suggested to explain some cases of POF, in the majority of cases the mechanism of inheritance is unclear. In turn, consanguinity-linked familial POF seems to be transmitted through autosomal recessive inheritance, and X chromosome-related defects like Fragile X chromosome Syndrome (FRAXA) premutation in exon 1 of FMR 1 gene provides an example of X-dominant inheritance. Blepharophimosis ptosis epicanthus and inversus (BPES) is transmitted in an autosomal dominant fashion (Davis et al., 2000).

Mutations in the FSH receptor (FSHR) gene are inherited as an autosomal recessive trait and have been described as a possible cause of POF since 1996, suggesting this gene as the foremost candidate for POF. The first inactivating mutation of the FSHR gene was described in women of six Finnish families with C566T missense mutation of exon 7 who presented primary amenorrhea and recessively inherited hypergonadotrophic ovarian failure (Aittomaki et al., 1996). More recently, seven other new mutations were identified. These mutations are located on exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene and are related to amino acids substitutions in the FSHR, changing protein conformation and/or

interfering with the traffic of the receptor into the cell surface (Beau et al., 1998, Touraine et al., 1999, Doherty et al., 2002, Allen et al., 2003, Meduri et al., 2003). In addition, two polymorphic variants, Ala307Thr and Ser680Asn have also been identified in POF (da Fonte Kohek et al., 1998, Sundblad et al., 2004), although no relationships with phenotype have been systematically investigated (Simoni et al., 2002).

In the present study, we describe clinical findings and the genotype of two families with POF. The screening of the FSHR gene showed no identified mutations in exon 6 (Ile160Thr), exon 7 (Ala189Val) and exon 9 (Asp224Val) in any patient of either family. While no mutations were found in exon 10, its genetic variants Ala307Thr and Ser680Asn were identified in all 5 patients of these families.

## Materials and Methods

### *Subjects*

Five women were included in the study referred from two cities in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, for secondary amenorrhea and having an heterogeneous origin including Italian and African ancestry. These five patients belong to two families of a cohort of 39 women with diagnosis of POF that has been followed at the Gynecological Endocrinology Unit of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre. The inclusion criteria for this patient series were as follows: primary or secondary amenorrhea before the age of 40 years, normal female karyotype (46, XX), high gonadotropin values (FSH  $\geq$  40 IU/L) in at least two consecutive determinations and exclusion of iatrogenic causes of hypergonadotropic ovarian failure such as pelvic surgery, radiotherapy, chemotherapy and autoimmune disease. The study protocol was approved by the local Ethics Committee and written informed consent was obtained from every subject.



### ***Study protocol***

Anthropometric measurements included body weight, height and body mass index (BMI) (current weight in kg divided by height in m<sup>2</sup>) (Keys, 1972). Blood samples were obtained between 8 and 10 a.m from an antecubital vein for determination of serum LH, FSH, estradiol, thyrotropin (TSH), thyroxine (T4). Transvaginal sonography (TVS) was performed in all patients with an Aloka apparatus (Aloka Co., Tokyo, Japan) using a 5.0 MHz transvaginal probe. Uterine volume and endometrial thickness were measured and mean ovarian volume was calculated as previously described (Oppermann et al., 2003, Herter et al., 2002). Bone mineral density (BMD) was measured in spine (L1-L4) and femoral neck bone in all patients by Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DXA, Lunar Radiation Corporation. Model DPX, USA).

### ***Assays***

Serum LH and FSH were measured by electrochemoluminescence immunoassay (ECLIA) (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), (normal range LH: 2.4 – 12.6; FSH: 3.5 – 12.5 IU/L), with intra and inter-assay coefficients of variation (CV) of 1.8% and 4.8%, respectively for LH, and 1.8% and 3.3% for FSH. The sensitivity of the assays was 0.12 IU/L for LH and 0.05 IU/L for FSH. Estradiol was measured by ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), with an assay sensitivity of 5.0 pg/mL, with intra and inter-assay CV 5.7% and 6.4%. Serum TSH and T4 were measured by ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), (normal range TSH: 0.27 – 4.2 uIU/ml; T4: 0.93 – 1.7 ug/dl), with intra and inter-assay CV of 8.6% and 2.83% respectively for TSH, and 4.7% and 4.55% for T4. The sensitivity of the assays was 0.005  $\mu$ IU/mL for TSH and 0.42  $\mu$ g/dL for T4. Laboratorial evaluation was performed to detect autoimmune diseases, as previously reported (Vilodre et al., 2007, submitted).

### ***DNA Analysis***

In addition to serum samples, whole blood samples were collected from all women. Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes following the technique described by Miller et al., 1999. Exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific oligonucleotide primers. The 480T>C mutation in exon 6 and 566C>T mutation in exon 7 of the FSHR gene were screened by restriction analysis using Mfe I (Biolabs Inc., New England) (Beau et al., 1998) and Bsm I (Biolabs Inc., New England) (Aittomaki et al., 1995), respectively. After the digestion, both were submitted to DGGE (da Fonte Kohek et al., 1998). Exon 9 was sequenced to screen an Asp224Val substitution in the extracellular domain of the FSHR, using a Big Dye Terminator V 3.1 cycle sequencing kit (Foster City, CA) and an automated sequencer ABI 3.100 – Avante Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA (Whitney et al., 1995). For mutation screening of the large exon 10 of the FSHR gene, four separate PCR reactions (10A, 10B, 10C, and 10D) with overlapping PCR products were used. Procedures for denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing have been described elsewhere (da Fonte Kohek et al., 1998).

### ***Statistical analysis***

Descriptive analysis was performed and results of clinical variables are expressed as means  $\pm$  SD or median and interquartile range. Analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version Chicago, IL, USA).

### ***Family 1***

Family 1 (Figure1) was composed of three women, mother and two daughters who developed ovarian insufficiency at the age of  $29.3 \pm 7.8$  years (38, 27, 23 years, respectively, for the mother, daughter 1 and daughter 2). All presented higher levels of FSH,  $60.6 \pm 27.9$  IU/L (88.1, 61.5, 32.3 IU/l, respectively, for the mother, daughter 1 and daughter 2), LH,  $21.5 \pm 2.7$  IU/L (21.9, 24.0, 19.7 IU/l, respectively for the mother, daughter 1 and daughter 2) and low estradiol concentrations, 20.3

(5.0 -21.1) pg/ml. (5.0, 20.3, 21.1 pg/mL, respectively for the mother, daughter 1 and daughter 2). The three women had spontaneous menarche with normal development of the secondary sexual characters, regular cycles, followed by oligomenorrhea and transient amenorrhea for 2 years before ovarian insufficiency. The mother had the two daughters by the age of 25 and 28 years and developed clinical POF by the age of 38 years. Neither daughter became pregnant and the ovarian failure developed at 27 and 23 years of age. Mean body mass index was 24.9 Kg/m<sup>2</sup> ( $\pm$  4.6). While thyroid autoimmunity was diagnosed in 2 patients (mother and one daughter) after the diagnosis of ovarian failure, no other autoimmune diseases were found. By the time of diagnosis, the uterine volume was of 17.3 (16.7 – 42.9) (17.3, 42.9, 16.7 cm<sup>3</sup>, respectively for mother, daughter 1 and 2) ml with endometrial atrophy (< 3mm) and mean ovarian volume of 1.0 $\pm$  0.5 cm<sup>3</sup> where follicles were not observed. T-scores for BMD were -1.2, -0.1 and -1.0 for femoral neck and -0.8, 0.8 and -1.2 for spine (L1-L4) in the mother, daughter 1 and daughter 2, respectively. The mother was homozygous for both the FSHR gene polymorphisms. Both daughters 1 and 2 were heterozygous for the two polymorphisms (Table 1).

### ***Family 2***

Family 2 (Figure 2), was composed of two sisters who developed ovarian failure by the age of 33 and 31 years. Their hormonal levels were: FSH 63.3 and 52.5 IU/L, LH 30.6 and 32.0 IU/L and estradiol 9.2 and 9.3 pg/mL for sister 1 and sister 2, respectively. Both presented spontaneous menarche and normal development of secondary sexual characters. Sister 1 had regular cycles and two pregnancies, a normal childbirth and an abortion. Four years from the second pregnancy, she developed oligomenorrhea for 1 year and the ovarian insufficiency occurred at 33 years of age. Sister 2 had two pregnancies and two normal childbirths, and presented regular cycles up to 20 years of age, when cycles became irregular. The diagnosis of POF had occurred by the age of 31 years. Ultrasonographic examination revealed uterine volume of 12.7 cm<sup>3</sup> and 28.3 cm<sup>3</sup> with endometrial atrophy (< 2mm) and mean ovarian volume of 1.6 and 1.2 cm<sup>3</sup>, respectively, for sister 1 and 2, where follicles were not observed. T-scores for BMD were -1.3 and -2.4 and for femoral neck and -1.5 and -

3.4 for the spine (L1-L4) for sister 1 and sister 2, respectively. Both sisters were heterozygous to the two polymorphisms (Table 1).

## Discussion

In the present study both families presented the Ala307Thr and Ser680Asn polymorphisms of the FSHR gene. Concerning family 1, the mother was homozygous mutant for both polymorphisms and daughters 1 and 2 presented the two polymorphisms in heterozygosis. Regarding family 2, both sisters also presented Ala307Thr and Ser680Asn polymorphisms in heterozygosis. Therefore, none of the 5 patients presented wild type for both polymorphisms. We have previously analyzed a series of 36 patients with POF in southern Brazil. Of these cases, 54.3% and 20.0% were shown to present a genotype frequency for Ala307Thr polymorphism in heterozygosis and homozygosis, respectively. Ser680Asn polymorphism, the genotype frequency was 42.8% and 42.6% in heterozygosis and homozygosis, respectively (Vilodre et al., 2007).

The prevalence of familial cases of FOP is a controversial issue. While some authors describe a low prevalence around 4% (Starup and Sele, 1973, Conway et al., 1996), other epidemiological studies have reported an incidence of approximately 30% (Cramer et al., 1995, Torgersons et al., 1997, Vegetti et al., 1998). Among our POF patients from this and the previous study, a prevalence of 12.8% was found for familial POF, which is in agreement with van Kasteren et al., who referred an incidence of 12.7% of familial POF (van Kasteren et al., 1999).

While the number of familial POF patients was very small for a statistical analysis, the clinical presentation, hormonal profile, bone mineral density and ultrasonographic measurement of the uterus, endometrial thickness and mean ovarian volume were very similar to those observed in the sporadic cases. Our results are in agreement with Vegetti et. al., 1998, who studied 71 women with POF and found 22 (31%) familial cases. The comparison between sporadic and familial cases in that study has

shown no differences in serum FSH, age at menarche, menstrual irregularity and endometrial thickness (Vegetti et al., 1998).

In conclusion, the present study presents no differences in the clinical presentation or hormonal profile between familial and sporadic premature ovarian failure. Although we failed to identify any inactivating mutations in exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene, we did identify the presence of Ala307Thr and Ser680Asn polymorphisms. However, the importance of these polymorphisms in the etiology and phenotype of familial POF is uncertain, and more studies with larger samples are needed for this definition.

## References

- Aittomaki, K., Herva, R., Stenman U. H., Juntunen, K., Ylostalo, P., Hovatta, O., de la Chapelle, A. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81(10): p. 3722-6.
- Aittomaki, K., Lucena, J. L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J. et al., Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, 1995. 82: p. 959- 68.
- Allen, L. A., Achermann, J. C., Pakarinen, P., Kotlar, T. J., Huhtaniemi, I. T., Jameson, J. et al. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotropic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum Reprod*, 2003.18(2): p. 251-6.
- Anastasi, J. N. Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril*, 1998. 70(1): p. 1-15.
- Beau, I., Touraine, P., Meduri, G., Gougeon, A., Desroches, A., Pichard, C., et al., A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest*, 1998. 102(7): p. 1352-9.
- Christin-Maitre, S. Premature ovarian insufficiency. *Rev Prat*, 1999. 49(12): p. 1297-302.
- Conway, G. S. Premature ovarian failure. *Br Med Bull*, 2000. 56(3): p. 643-9.
- Conway, G. S., Kaltsas, G., Patel, A., Davies, M. C., Jacobs, H. S. Characterization of idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 1996. 65(2): p. 337-41.

- Coulam, C. B., Stringfellow, S., Hoefnagel, D. Evidence for a genetic factor in the etiology of premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 1983. 40(5): p. 693-5.
- Cramer, D. W., Xu, H., Harlow, B. L. Family history as a predictor of early menopause. *Fertil Steril*, 1995. 64: p. 740-45.
- Davis, C. J., Davison, R. M., Payne, N. N., Rodeck, C. H., Gerard, G. S. Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: Opinion. *Human Reproduction*, 2000.15(11): p. 2418-22.
- da Fonte Kohek, M.B., Batista, M. C., Russell, A. J., Vass, K., Giacaglia, L. R., Mendonça, B. B., Latronico, A. C. No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 1998. 70(3): p. 565-7.
- de Moraes-Ruehsen, M., Jones, G. S. Premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 1967. 18(4): p. 440-61.
- Doherty, E., Pakarinen, P., Tiitinen, A., Kiilavuori, A., Huhtaniemi, I., Forrest, S., et al. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(3): p.1151-5.
- Herter, L.D., Golendziner, E., Flores, J. A., Becker, E., Spritzer, P. M.. Ovarian and uterine sonography in healthy girls between 1 and 13 years old: correlation of findings with age and pubertal status. *AJR Am J Roentgenol*, 2002. 178(6): p. 1531-6.
- Keys, A., Fidanza, F., Karvonen, M. J., Kimura, N., Taylor, H. L. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis*, 1972. 25(6): p. 329-43.
- Meduri, G., Touraine, P., Beau, I., Lahuna, O., Desroches, A., Vacher-Lavenu, M. C. 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*, 2003. 88(8): p. 3491-8.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., Ghiorse, W. C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*, 1999. 65(11): p. 4715-24.
- Oppermann, K., Fuchs, S. C., Spritzer, P .M. Ovarian volume in pre- and perimenopausal women: a population-based study. *Menopause*, 2003. 10(3): p. 209-13.

- Simoni, M., Nieschlag, E., Gromoll, J. "Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction." *Hum Reprod Update*, 2002. 8(5): p. 413-21.
- Starup, J., Sele, V. Premature ovarian failure. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1973. 52(3): p. 259-68.
- Sundblad, V., Chiauzzi, V. A., Escobar, M. E., Dain, L., Charreau, E. H. Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol*, 2004. 222(1/2): p. 53-9.
- Torgerson, D. J., Thomas, R. E., Reid, D. M. Mothers and daughters menopausal ages: is there a link? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1997. 74: p. 63-66.
- Touraine, P., Beau, I., Gougeon, A., Meduri, G., Desroches, A., Pichard, C., et al. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol*, 1999. 13(11): p. 1844-54.
- van Kasteren, Y. M., Schoemaker, J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update*, 1999. 5(5): p. 483-92.
- Vegetti, W., Grazia, T. M., Testa, G., de Lauretis Yankowski, Alagna, F., Castoldi, E. et al. Ovarian failure: analysis of 71 cases. *Hum Reprod*, 1998. 13: p. 1796- 800.
- Vilodre, L. C., Kohek, M. B. F., Spritzer, P. M. Screening of FSH receptor gene in women with premature ovarian failure (POF) in southern Brazil and associations with phenotype. *Endocrine Soc Meet, Toronto*, 2007.
- Whitney, E. A., Layman, L. C., Chan, P. J., Lee, A., Peak, D. B., McDonough, P. G. The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls. *Fertil Steril*, 1995. 64: p. 518-24.

Table 1. Comparison of FSHR genotype frequency in familial POF patients

	Families	Ala307Thr	Ser680Asn
Family 1	I 1	T -T	A-A
	II1	A-T	S-A
	II2	A-T	S-A
Family 2	II 2	A-T	S-A
	II 3	A-T	S-A

Ala307Ser: AA = wild type; AT = heterozygous mutant; TT = homozygous mutant  
 Ser680Asn: SS = wild type; SA = heterozygous mutant; AA = homozygous mutant



## Legend of Figures

Figure 1. Family 1 is constituted by the affected mother (I1) and daughters (II 1, 2)

Figure 2. Family 2 include 2 affected sisters (II 2, 3)

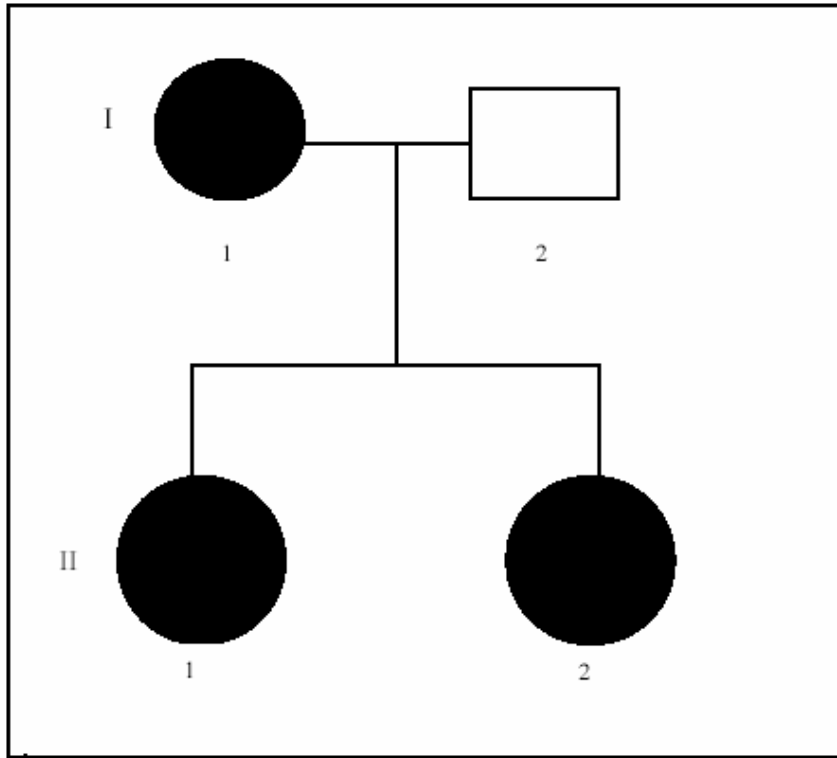


Figure 1

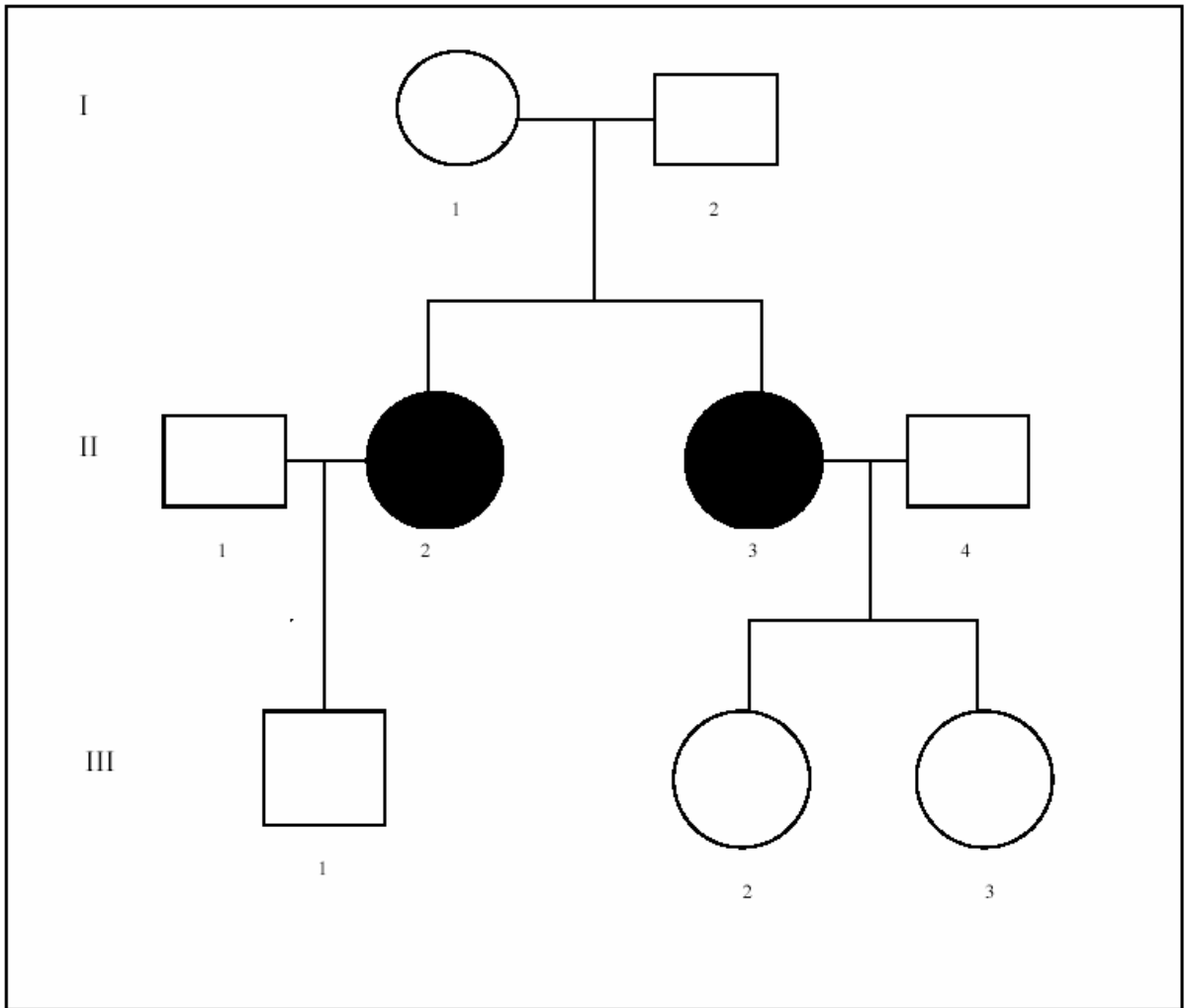


Figure 2

## RESUMO PARA ENDOCRINE SOC MEET, TORONTO, 2007

(Selected)

### SCREENING OF FSH RECEPTOR GENE IN WOMEN WITH PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF) IN SOUTHERN BRAZIL AND ASSOCIATIONS WITH PHENOTYPE

<sup>1,2</sup>Luiz Cesar Vilodre, MD; <sup>3</sup>Maria B da Fonte Kohek, PhD; <sup>1,2</sup>Poli Mara Spritzer, MD, PhD

<sup>1</sup>Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, FFFCMPA, Porto Alegre, Brazil.

Premature ovarian failure (POF) is defined as failure of ovarian function before the age of 40, causing amenorrhea, sex steroid deficiency, and high gonadotropin levels. Evidence suggests that POF may be a genetic disorder, with the FSH receptor (FSHR) gene as the foremost candidate for POF. Since 1996, various mutations in the FSHR gene have been described as a possible cause of POF. On the other hand, two polymorphic variants, Ala307Thr and Ser680Asn have also been identified. The aim of the present study was to determine the presence of mutations and/or polymorphisms in FSHR gene in women with POF in southern Brazil and to investigate whether these mutations and/or polymorphisms are associated with phenotype. We studied a cohort of 36, 46 XX women, with primary or secondary amenorrhea before the age of 40 years, FSH  $\geq$  40 IU/L and cause of hypergonadotropic ovarian failure unknown (autoimmune ovarian diseases, surgery,

chemotherapy and radiotherapy). Clinical and hormonal variables were determined. DNA was isolated from peripheral leukocytes. Exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene were analyzed by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis, denaturing gradient gel electrophoresis, and direct sequencing. No inactivating mutations were found in the studied exons of the FSHR gene. Exon 10 had two polymorphisms, Ala307Thr and Ser680Asn, with allelic frequencies of 52.9% and 35.7%, respectively, in the present population. Previous studies in Brazil have shown an allelic frequency of 58% for both polymorphisms in normal fertile controls. Polymorphic variants in exon 10 of the FSHR gene were not related to FSH, LH or estradiol serum levels. The same was true for ovarian size and presence of small ovarian follicles on ultrasonography, which were not associated with the FSHR genetic variants. In contrast, the last menstruation occurred significantly earlier in patients with the Ala307Thr polymorphism (A: age =  $33.3 \pm 7.1$  years vs. T:  $28.6 \pm 11.4$  years,  $p=0.04$ ). In conclusion, we did not identify any inactivating mutations in exons 6, 7, 9 and 10 of the FSHR gene in women with POF in South Brazil. A high frequency of two polymorphisms that are in linkage disequilibrium was found in exon 10 of the FSHR gene. The presence of the Ala307Thr polymorphism may be associated with a more precocious onset of clinical disease.

## *Capítulo 4*

---

### CONCLUSÕES

## CONCLUSÕES

1. As mutações inativadoras do gene do receptor do FSH não foram identificadas em nenhuma das 39 pacientes estudadas.

2. Os polimorfismos Ala307Thr e Ser680Asn no gene do receptor do FSH foram identificados; sua frequência para o polimorfismo Ala307Thr foi de 54,3% em heterozigose e 20,0% em homozigose; e para o polimorfismo Ser680Asn, 42,8% e 42,6% respectivamente.

3. A presença do polimorfismo Ala307Thr foi associada com um início mais precoce das manifestações clínicas da insuficiência ovariana.

4. A análise dos casos familiares indicou que as 5 pacientes das 2 famílias apresentaram genotipagem positiva para os dois polimorfismos do exon 10. A família 1, com 3 pacientes, apresentou a mãe com mutação em homozigose e a filha 1 e a filha 2 em heterozigose para ambos polimorfismos. A família 2, com 2 pacientes, a irmã 1 e a irmã 2 apresentaram heterozigose para os dois polimorfismos.

### *Perspectivas futuras*

As pacientes que fazem parte deste estudo continuam o seguimento clínico na Unidade de Endocrinologia Ginecológica, assim como estão sendo inclusas novas pacientes com FOP a fim de aumentar-se o tamanho da coorte e avaliar outros genes, como o da inibina.

Por sua vez, a partir de um estudo longitudinal, será possível, no futuro, estudar outros desfechos clínicos e marcadores laboratoriais relacionados com osteoporose e fatores de risco cardiovascular e se estão associados com o genótipo.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMS ES, MURDAUGH SE, LERMAN LS. Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and a GC clamp. **Genomics**, v.7, n.4, p.463-75, 1990.
- AITTOMAKI K, HERVA R, STENMAN UH, JUNTUNEN K, YLOSTALO P, HOVATTA O, et al. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, n.10, p.3722-6, 1996.
- AITTOMAKI K, LUCENA JL, PAKARINEN P, SISTONEN P, TAPANAINEN J, GROMOLL J, KASKIKARI R, SANKILA EM, LEHVASLAIHO H, ENGEL AR et al. Mutation in the follicle stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, v.82, p.959-968, 1995.
- ALLEN LA, ACHERMANN JC, PAKARINEN P, KOTLAR TJ, HUHTANIEMI IT, JAMESON JL, et al. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotrophic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. **Hum Reprod**, v.18, n.2, p.251-6, 2003.
- ANASTI JN. Premature ovarian failure: an update. **Fertil Steril**, v.70, p.1–15, 1998.
- BEAU I, TOURAINÉ P, MEDURI G, GOUGEON A, DESROCHES A, MATUCHASKY C, et al. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. **J Clin Invest**, v.102, n.7, p.1352-9, 1998.
- COULAM CB, ADAMSON SC AND ANNEGERS JF. Incidence of premature ovarian failure. **Obstet Gynecol**, v.67, p.604–606, 1986.
- DA FONTE KOHEK MB, BATISTA MC, RUSSELL AJ, VASS K, GIACAGLIA LR, MENDONÇA BB, et al. No evidence of the inactivating mutation ( C566T) in the follicle-stimulation hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. **Fertil Steril**, v.70, n.3, p.565-7, 1998.
- DOHERTY E, PAKARINEN P, TIITINEN A, KIILAVUORI A, HUHTANIEMI I, FORREST S, et al. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, n.3, p.1151-5, 2002.
- GOSWAMI D, CONWAY GS. Premature ovarian failure. **Hum Reprod Update**, v.11, n.4, p.391-410, 2005.
- HELLER C, HELLER E. Gonadotropic hormone: assays of normal cycling, menopausal, castrated and estrin treated females. **J Clin Invest**, v.18, p.171-78, 1939.
- HOEK A, ACHOEMAKER J, DREXHAGE H. Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity. **Endocrine Reviews**, v.18, n.1, p.107-34, 1997.



- MEDURI G, TOURAINE P, BEAU I, LAHUNA O, DESROCHES A, VACHER-LAVENU MC, et al. 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**, v.88, n.8,3491-8, 2003.
- MORAES-RUEHSEN M, JONES GS. Premature ovarian failure. **Fertil Steril**, v.18, n.4, p.440-61, 1967.
- MYERS RM, FISCHER SG, MANIATIS T, LERMAN LS. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Res**, v.13, n.9, p.3111-29, 1985.
- MYERS RM, LUMELSKY N, LERMAN LS, MANIATIS T. Detection of single base substitution in total genomic DNA. **Nature**, v.313, n.60062, p.495-8, 1985.
- MYERS RM, MANIATIS T, LERMAN LS. Detection and location of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods Enzymol**, v.155, p.501-10, 1987.
- NELSON LM, COVINGTON SN, REBAR RW. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. **Fertil Steril**, v.83, n.5, p.1327-32, 2005.
- SHEFFIELD VC, COX DR, LERMAN LS, MYERS RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.86, n.1, p.232-6, 1989.
- STEDMAN'S MEDICAL DICTIONARY. 27 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- SUNDBLAD V, CHIAUZZI VA, ESCOBAR ME, DAIN L, CHARREAU EH. Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). **Mol Cell Endocrinol**, v.222, n.1/2, p.53-9, 2004.
- TOURAINE P, BEAU I, GOUGEON A, MEDURI G, DESROCHES A, PICHARD C et al. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. **Mol Endocrinol**, v.13, n.11, p.1844-54, 1999.



## *Anexos*

---

## PROTOCOLO PACIENTE COM FALÊNCIA OVARIANA PREMATURA

Registro ..... Data 1ª. Consulta .....

Idade ..... Idade ..... Idade Atual .....

Endereço .....

Telefone: ..... Celular .....

Bairro ..... Cidade ..... CEP .....

### B – ANAMNESE

MENARCA: ..... ESPONTÂNEA : ( ) Mamas ( ) Telarca ( ) Pubarca ( )

TIPO MENSTRUAL: Ciclos regulares ( ) período: .....

Ciclos irregulares ( ) período : .....

Amenorréia ( ) período : .....

IRS: ..... A.O: ( ) ..... Tempo de uso:.....

INFERTILIDADE ( )

PARIDADE: Gesta ..... Para: ..... Cesariana: ..... Aborto: ..... Curetagem:..... LT.....

Complicações.....

TEMPO DE AMENORRÉIA NA 1ª.CONSULTA.....

CIRURGIAS PRÉVIAS:.....

RADIOTERAPIA : ..... QUIMIOTERAPIA: .....

#### TRATAMENTOS HORMONAIS PRÉVIOS:

ESQUEMA	T. USO	MENS	N. DIAS	MAST	DISMEN

### C - ANTECEDENTES GERAIS

DOENÇAS DA INFÂNCIA ( ) .....

HAS: ( ) DIABETES ( ) ARTRITE REUMATÓIDE ( ) LUPUS ( )

VITILIGO ( ) TIREÓIDE ( ) MIASTENIA ( ) PÚRPURA TROMB ( )

ANEMIA ( ) D CROHN ( ) CIRROSE ( ) HEPATITE ( )

DISLIPIDEMIA ( ) CANDIDÍASE REPET ( )

MEDICAÇÕES: ( ) .....

FUMO ( ) N / DIA: ..... ÁLCOOL ( ) QUANTIDADE: ..... TEMPO.....

DROGAS ( ) ..... TEMPO .....

**ATIVIDADE FÍSICA** ( ) **DIÁRIO** ( ) 1X ( ) 2X ( ) 3X ( ) / SEM

**DURAÇÃO** 30' ( ) 60' ( ) 120' ( )

Tipo de atividade física: ..... OSTEOPOROSE ( ) OSTEOPENIA ( )

### D - ANTECEDENTES FAMILIARES

NEOPLASIAS ( ) HÁS ( ) DM ( ) DISLIPIDEMIAS ( )

CARDIOPATIAS ( ) ALT TIREÓIDE ( ) ADDISON ( ) VITILIGO ( )

LÚPUS ( ) CHRON ( ) SICCA ( ) MIASTENIA ( )

ANEMA HEMOLÍTICA ( ) PÚRPURA ( ) ULONEFRITE ( )

CANDIDÍASE DE REPETIÇÃO ( ) COLITE ULCERATIVA ( )

**COSANGUINIDADE** sim ( ) não ( )

INFERTILIDADE.....

FOP FAMILIAR .....

**E – INDICE MENOPAUSAL ( BLATT MODIFICADO )**

DATA				
FOGACHOS (4)				
DEPRESSÃO (1)				
INSÔNIA (2)				
FADIGA (1)				
IRRITAS LIDADE (1)				
DISPAREÚNIA (2)				
CEFALEIA (1)				
LABILIC EMOC. (1)				
PALPITAÇÃO (1)				
ARTRALGIA (11)				
MIALGIAS (11)				
VERTIGENS (1)				
PARESTESIAS (2)				
TOTAL				

**F - EXAME FÍSICO**

TANNER MAMA:.....

TANNER PELOS PUBIANOS:.....

EXAME GINECOLÓGICO: Normal ( )

COR   Caucasiano ( )            Oriental ( )            Preto ( )            Misto ( )

FERRIMAN : .....    TESTE PROVERA            POSITIVO ( )            NEGATIVO ( )

**EXAME FÍSICO**

DATA							
PA							
PESO							
ALTURA							
IMC							
CINTURA							
QUADRIL							
C / Q							

**G - EXAMES LABORATORIAIS**

DATA				
LÁTEX				
FATOR REUMATÓIDE				
CÁLCIO				
FÓSFORO				
F.A.				
FAN				
MICROS.TPA				
TIREOGLOB.				
CORTISOL				
SDHEA				
BIOLOGIA MOLECULAR FSHR				
CONGELAR				

**H. CARIÓTIPO**

DATA	RESULTADO	N. CÉLULAS / CULTURA

**I. MAMOGRAFIA**

DATA							
ACHADOS							
BI RADS 0 1 2 3 4 5							

OBSERVAÇÕES								
-------------	--	--	--	--	--	--	--	--

**J. EXAMES DE ROTINA DURANTE ACOMPANHAMENTO**

DATA								
FSH								
LH								
E2								
TSH								
T4								
TESTO TOTAL.								
INDICE T LIV								
ANDROST.								
17-OH-P								
PROLACTINA								
HEMATOCRITO								
HEMGLOBINA								
LINFOCITOS								
SEGMENTDOS								
GLICOSE								
COLEST.T.								
HDL / LDL								
TRIGLICERÍ								
TGO / TGP								
CREATININA								
UREIA								
SHBG								
SDHEA								

**K. ECOGRAFIA**

DATA							
UTERO	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /
VOL UTERINO							
ENDOMÉTRIO							
OVÁRIO D	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /
OVÁRIO E	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /
FOLÍCULOS <b>OD</b> TAMANHO							
FOLÍCULOS <b>OE</b> TAMANHO							



**UNIDADE DE ENDOCRINOLOGIA GINECOLÓGICA**  
**SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA**  
**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Este ambulatório está pesquisando o diagnóstico genético e sua associação com sintomas e sinais clínicos em pacientes com falência ovariana prematura, ou seja, mulheres que pararam de menstruar antes dos 40 anos de idade. Assim, além das atividades de assistência médica que incluem o diagnóstico, tratamento e prevenção de problemas clínicos, principalmente os relacionados à deficiência de hormônios femininos tais como ondas de calor, sudorese, alteração de humor, ressecamento vaginal, osteoporose e dificuldade para engravidar, pretendemos determinar se a presença de alterações genéticas poderá influir na gravidade e evolução desta doença. Nesta pesquisa, todas as pacientes incluídas serão avaliadas clinicamente e coletarão sangue para exames laboratoriais. Além dos exames de rotina (hemograma, colesterol, triglicérides, glicemia de jejum, dosagens hormonais), parte da amostra de sangue será utilizada para o exame de avaliação genética dos polimorfismos no gene do receptor do hormônio folículo estimulante. Não há risco adicional ao da coleta habitual de sangue e nem risco do material genético ser utilizado para outros fins. Após a coleta dos dados para o estudo, as pacientes receberão tratamento de acordo com a rotina de atendimento assistencial. O benefício desta pesquisa, além da possibilidade de identificar as alterações que possam ter levado a esta patologia é o tratamento hormonal adequado evitando problemas futuros. Da mesma forma, familiares das pacientes, poderão ser estudadas visando a orientação quanto a infertilidade. Caso queira, por qualquer razão, você poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento, sem deixar de ser atendida no ambulatório.

Os resultados da pesquisa poderão ser publicados posteriormente, porém nos comprometemos a não divulgar nenhum dado que possa identificar a participante da mesma.

Nossa equipe estará lhe acompanhando regularmente, sendo responsáveis pela pesquisa os médicos, Dra. Poli Mara Spritzer e Dr Luiz Cezar Fernandes Vilodre, que poderão ser contactados pelos telefones 33 16 82 71 e 99 12 33 24 em caso de necessidade.

Declaro que estou ciente do acima exposto e concordo em participar do estudo.

-----  
Nome e Assinatura da Paciente

-----  
Dr. Luiz Cezar Fernandes Vilodre

-----  
Dra. Poli Mara Spritzer