



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: ENDOCRINOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Freqüência de alterações na densidade mineral óssea em pacientes com falência

Ovariana Prematura: análise de associação com variáveis hormonais e

polimorfismos do gene do receptor do FSH

Fernanda do Amarante

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Poli Mara Spritzer

Porto Alegre, abril de 2008.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: ENDOCRINOLOGIA

Fernanda do Amarante

Frequência de alterações na densidade mineral óssea em pacientes com falência

Ovariana Prematura: análise de associação com variáveis hormonais e

polimorfismos do gene do receptor do FSH

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas:
Endocrinologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Poli Mara Spritzer

**Porto Alegre
2008**

DEDICATÓRIA

A minha grande incentivadora minha amada mãe Marilza, por toda confiança, apoio, carinho e a meu pai Iluir (in memoriam), meu grande incentivador.

AGRADECIMENTOS

Á minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Poli Mara Spritzer, pelas constantes orientações, paciência, competência e determinação.

Á todos do Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da UFRGS, pela colaboração e incentivo.

Ao Cezar por toda orientação, ajuda, amizade e compreensão.

Á Miriam por todo auxílio, paciência e disponibilidade.

A equipe do SIDI Center pela disponibilidade e ajuda nas realizações das densitometrias ósseas, especialmente Dr. Carlos Jader Feldman, Rochelle, Cátia e Lisiele.

As colegas do ambulatório da Unidade de Endocrinologia Ginecológica, do HCPA pela disponibilidade, amizade e agradável convivência.

Agradecimento especial pela ajuda e apoio das colegas e amigas Mariana, Fabiane, Simone Radavelli e Simone Lara.

A todos os amigos, colegas, colaboradores e alunos pelo incentivo e colaboração no trabalho.

Agradecimento especial à família: Eliana, Tatiana, Marina, Eduardo e Lucas pelo incentivo, ajudam e paciência.

RESUMO

A Osteoporose é uma doença esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea predispondo a um risco aumentado de fraturas em mulheres na pós-menopáusia e na população idosa. O processo de remodelamento ósseo é mediado pela atividade dos osteoblastos na formação e a atividade dos osteoclastos na reabsorção da matriz óssea. Entre os vários fatores que modulam o processo de reabsorção óssea estão os hormônios esteróides sexuais. Desta forma, a diminuição dos estrogênios circulantes, como ocorre na menopausa e na Falência Ovariana Prematura (FOP) resulta em uma maior perda da massa óssea. A FOP é uma condição definida como a falência da função ovariana antes dos 40 anos de idade, causando amenorréia, hipogonadismo e níveis elevados de gonadotrofinas. Vários estudos têm sugerido que esta falência gonadal possa ser uma doença genética, sendo o gene do receptor do FSH (FSHR), considerado um dos principais genes candidatos. Entretanto faltam estudos consistentes capazes de avaliar a influência destas variantes genéticas sobre a densidade mineral óssea assim como o risco de osteoporose.

Assim, estudou-se uma coorte de 32 mulheres com FOP acompanhadas na Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com os objetivos de determinar a frequência de alterações na DMO e analisar uma possível associação entre variáveis hormonais e densidade mineral óssea comparando-as com um grupo de referência composto por 80 mulheres, sendo 25 mulheres na pré-menopausa (PRE-M) e 55 mulheres na pós-menopausa (POS-M). Também foi pesquisado se a presença de polimorfismos do gene do receptor do FSH estava associada com alterações na densidade mineral óssea no grupo FOP. Variáveis clínicas e hormonais foram obtidas, assim como a densitometria óssea foi realizada em todas as pacientes de ambos grupos, porém a análise da frequência das variantes Ala307Thr e Ser680Asn do exon 10 do gene do FSHR foi realizada somente das pacientes do grupo FOP. A densitometria óssea de cada paciente foi classificada

como massa óssea normal ou baixa massa óssea (osteopenia ou osteoporose) pelos critérios da OMS.

O IMC apresentou correlação positiva com a DMO do fêmur total ($p < 0.05$). A frequência de baixa massa óssea foi significativamente maior no grupo FOP do que no grupo POS-M ($p = 0,042$). Entretanto, quando a análise foi controlada pelo uso ou não de terapia hormonal, os grupos não apresentaram diferença significativa. Identificou-se maior frequência de baixa massa óssea em L1-L4 no grupo FOP ($p < 0,001$) enquanto o grupo de referência POS-M apresentou maior frequência de baixa massa óssea no fêmur total ($p < 0,001$). Não houve associação entre as variantes Ala307Thr e Ser680Asn do gene do FSH e a densidade mineral óssea (DMO em g/cm^2) em coluna ou fêmur total. Concluindo, o grupo de pacientes com FOP apresentou maior frequência de alterações na DMO, em especial em coluna, quando comparado com o grupo de referência na pós-menopausa. Embora os polimorfismos estudados no exon 10 do gene do FSHR possam modificar a ação do FSH, estas variantes genéticas parecem não ter influência sobre a DMO das pacientes com FOP. Entretanto, estudos longitudinais são necessários para confirmar os resultados do presente estudo.

Palavras-chave: densidade mineral óssea, falência ovariana prematura, polimorfismos do gene do receptor do FSH

ABSTRACT

Osteoporosis is a skeletal disease characterized by impairment of bone strength predisposing to an increased risk of fractures in postmenopausal women and in the elderly population. The process of bone remodeling is mediated by the activity of osteoblasts in the formation and activity of osteoclasts in the resorption of bone matrix. One of the factors modulating bone resorption is sex steroid hormones. Thus, the decline of circulating estrogens, as occurs in menopause and in premature ovarian failure (POF) results in greater loss of bone mass, POF is a condition defined as the failure of ovarian function before the age of 40 years, causing amenorrhea, hypogonadism and high levels of gonadotropins. Several studies have suggested that this gonadal failure can be a genetic disease, and the gene of the FSH receptor (FSHR), is considered as one of the leading candidate genes. Nonetheless, there is lacking studies that could consistently assess the influence of these genetic variants on the bone mineral density and the risk of osteoporosis.

Therefore, a cohort of 32 women presenting POF and being followed at the Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, was studied, with the objectives of determining the frequency of changes on BMD and analyze a possible association between hormonal variables and BMD, compared to a reference group composed of 80 women, with 25 in pre-menopausal (PRE-M) and 55 women in post-menopausal (POS-M). There was also searched if the presence of FSH receptor polymorphisms was associated with changes in the in bone mineral density in the group of POF. Clinical and hormonal variables were obtained as well as bone densitometry was performed in all patients in both groups; however, the analysis of the frequency of Ala307Thr and Ser680Asn variants of exon 10 of the gene of FSHR was performed only in the group of POF. Bone densitometry of each patient was classified as normal bone mass or low bone mass (osteopenia or osteoporosis) by the WHO criteria.

BMI showed a positive correlation with BMD of the total femur ($p < 0.05$). The frequency of low bone mass was significantly higher in the group of POF patients than in the POS-M group ($p = 0.042$). However, when the analysis was controlled by the use of hormonal therapy, the no statistical difference was observed. A higher frequency of low bone mass in L1-L4 was identified in the POF group ($p < 0.001$) while the reference group of POS-M showed higher frequency of low bone mass in the total femur ($p < 0.001$). There was no association between the Ala307Thr and Ser680Asn variants of the FSHR gene and bone mineral density (BMD in g/cm^2) in L1-L4 or in femur total. In conclusion, POF group presented a higher frequency of changes on BMD, mainly in lumbar spine, when compared to the reference POS-M group. While the studied polymorphisms in the exon 10 of the FSHR gene may modify the FSH actions, these genetic variants appear to have no influence on BMD of these patients. However, longitudinal studies are needed to confirm the results of this study.

Key words: bone mineral density, premature ovarian failure, polymorphisms of the FSH receptor gene

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Osteoporose	15
1.2. Falência Ovariana Prematura	17
1.3. Osteoporose e Falência Ovariana Prematura.....	19
1.4. Receptor de FSH (FSHR).....	20
2. OBJETIVOS.....	24
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	25
3.1. Delineamento do Estudo.....	25
3.2. População em Estudo e Fluxograma	25
3.2.1. Grupo FOP.....	25
3.2.2. Grupo de Referência.....	26
3.3. Avaliação Clínica	26
3.4. Avaliação Hormonal e Metabólica.....	27
3.4.1. Dosagem Laboratorial Hormonal e Metabólica	27
3.5. Extração do DNA e análise dos polimorfismos do gene do FSHR.....	28

3.6. Avaliação da Densidade Mineral Óssea por DXA	28
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. Dados Clínicos e Antropométricos.....	33
5.2. Dados Hormonais. Metabólicos e Densitométricos	35
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO.....	Anticoncepcional Oral
ALA.....	Aminoácido Alanina
ARG.....	Aminoácido Arginina
ASN.....	Aminoácido Asparagina
ASP.....	Aminoácido ácido Aspártico
CV.....	Coefficiente de Variação
CYS.....	Cisteína
DMO.....	Densidade Mineral óssea
DNA.....	Ácido desoxiribonucleico
DP.....	Desvio Padrão
DXA.....	Densitometria Óssea
FOP.....	Falência Ovariana Prematura
FSH.....	Hormônio Folículo Estimulante
FSHR.....	Receptor do Hormônio Folículo Estimulante
HCPA.....	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
ILE.....	Aminoácido Isoleucina
IL-1.....	Interleucina 1
IL-6.....	Interleucina 6
IMC.....	Índice de Massa Corporal
ISCD.....	Sociedade Internacional de Densitometria Clínica
LEU.....	Aminoácido Leucina
LH.....	Hormônio Luteinizante
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
PC.....	Ponto de Corte

SER.....	Aminoácido Serina
SDHEA.....	Sulfato de Deidroepiandrosterona
SPSS	Statistical Package for the Social Scieces
TH.....	Tratamento Hormonal
THR	Aminoácido treonina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSH.....	Hormônio Tireotrofina
TT	Testosterona Total Sérica
UEG.....	Unidade de Endocrinologia Ginecológica
VAL.....	Aminoácido Valina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	33
Tabela 2	34
Tabela 3	35
Tabela 4	36
Tabela 5	37
Tabela 6	38
Tabela 7	39
Tabela 8	40
Tabela 9	41
Tabela 10	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Osteoporose

A Osteoporose é uma doença esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea predispondo a um risco aumentado de fraturas. Resistência óssea reflete a integração de dois parâmetros principais: densidade e qualidade ósseas (National Institutes of Health, 2001; Keen et al, 1997). A doença é o resultado do desbalanço entre os processos de formação e reabsorção óssea (Zaidi et al, 1993; Manolaga et al, 1995).

No processo de formação, a atividade dos osteoblastos é modulada por uma ampla série de fatores sistêmicos que têm efeitos diretos sobre esta célula e incluem os hormônios de crescimento e esteróides sexuais. Na etapa de reabsorção, os precursores de osteoclastos aderem às superfícies do endóstio e perióstio das unidades de modelagem óssea para degradar ambas as fases orgânicas e mineral da matriz óssea. Cada ciclo de remodelamento ósseo consiste de um processo de ativação mediado pelas integrinas, onde reabsorvem o osso, criando túneis no osso cortical ou lacunas na superfície das trabéculas ósseas. Este período dura em torno de 1 a 3 semanas, e então os osteoclastos desaparecem e são substituídos pelos osteoblastos que preenchem, novamente, os túneis e as lacunas. Os ciclos de remodelamento não são sincronizados (Berne et al, 2000). Após a menopausa, com a diminuição de estrogênios circulantes, ocorre um alto nível de remodelamento, com o aumento do número de

osteoclastos, o que leva à criação de lacunas maiores e mais profundas que não é acompanhada de igual aumento osteoblástico, sendo então que a reabsorção excede significativamente a formação, resultando na perda óssea (Lindsay et al, 2004).

A osteoporose é uma doença sistêmica que produz uma diminuição absoluta e global de tecido ósseo. É a maior causa de fraturas em mulheres pós-menopáusicas e na população idosa. No Brasil não possuímos dados da prevalência da osteoporose mas conforme a National Osteoporosis Foundation (NOF) nos EUA, aproximadamente 24 milhões de mulheres americanas são afetadas pela doença (ISCD, Manual do Curso de Densitometria Clínica, pg, 12-13, 2006). Em torno de um terço das mulheres acima dos 65 anos terão fraturas vertebrais e 90% das mulheres acima dos 75 anos tem evidências radiológicas de osteoporose. Fraturas do colo femoral são as de maior importância clínica e a mortalidade aumenta segundo a idade em que a fratura ocorre. Metade das pacientes que sobrevivem a fratura do colo femoral permanecem incapazes de deambular sem assistência, 25% permanecem confinadas a cuidados domiciliares. Em 12-20% das fraturas do colo femoral os pacientes morrem nos primeiros 6 meses após as fraturas (Lindsay et al, 2004).

O diagnóstico da osteoporose é realizado através da DXA, e os critérios de diagnóstico são divididos conforme critérios e padrões internacionais, sendo que, as pacientes podem apresentar níveis normais, com baixa massa óssea (osteopenia), osteoporose e osteoporose estabelecida, quando apresenta história de fratura.(ISCD, 2007)

A relação entre a osteoporose e a deficiência estrogênica foi descrita em 1941 por Albright et al. Estes autores foram os primeiros a descrever o elo entre a osteoporose e o sistema endocrinológico, e seus achados levaram à compreensão da associação entre a deficiência de estrogênio e a diminuição da massa óssea e redundaram na indicação dos estrogênios na prevenção e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa

(Albright et al, 1941). A diminuição nos níveis de estrogênios resulta em ativação acelerada dos sítios de remodelamento. Assim, a remodelação óssea é feita pelos osteoclastos e osteoblastos numa seqüência definida. De tal forma que eles apresentam receptores específicos para o estradiol e sua falta ativa a modulação local (Manolaga et al, 1995).

Evidências *in vitro* sugerem que os estrogênios inibem a reabsorção óssea osteoclástica e reduzem a liberação de citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α (Roggia et al, 2001; Cenci et al, 2003). Estrogênios também inibem diretamente a diferenciação osteoclástica e a ação dos precursores de medula óssea vermelha (Shevde et al, 2000; Srivastova et al, 2001).

1.2. Falência Ovariana Prematura

A falência ovariana prematura (FOP) é uma condição que leva à amenorréia, hipoestrogenismo e elevação dos níveis de gonadotrofinas em mulheres abaixo dos 40 anos. Sua prevalência é de aproximadamente 1% das mulheres antes dos 40 anos (Coulam et al, 1986). A idade média da menopausa em mulheres de populações ocidentais é de aproximadamente 51 anos.

A FOP é uma doença com patogênese multifatorial cujas alterações cromossômicas, enzimáticas, iatrogênicas ou infecciosas podem formar a base para a depleção dos folículos ovarianos (Hoeck, 1997), podendo surgir em qualquer estágio da vida. Dependendo da idade do diagnóstico, a probabilidade de uma causa genética, auto-imune, ou idiopática será mais ou menos provável (Santoro et al, 2003, Welt, CK, 2008).

Quadro 1 – Etiologia das Falências Ovarianas Prematuras.

Etiologia	
Iatrogênicas	Cirurgias Pélvicas Irradiação Pélvica e Quimioterapia
Associação com Doenças Autoimunes	Hipotireoidismo Doença De Addison Diabetes Do Tipo 1 Miastenia Gravis Doença De Crohn Vitiligo Anemia Perniciosa Lúpus Eritematoso Sistêmico Artrite Reumatóide
Toxinas E Infecções	Tabagismo Sarampo Varicela Citomegalovírus
Anormalidades Ligadas Ao Cromossomo X	Síndrome De Turner Síndrome Do X Frágil
Doenças Autossômicas	Cdg1 Galactosemia Blefarofimose Apeded

Laml et al. Gynecol Endocrinol 2000;14(4):292-302 MODIFICADO

Os níveis séricos do hormônio folículo estimulante (FSH) maiores de 40UI/L são fundamentais para o diagnóstico, embora não signifiquem perda completa e definitiva da função ovariana (Goldenberg et al, 1973; Anasti, 1998). Sabe-se que além do FSH, outros hormônios como o hormônio luteinizante (LH) também apresenta papel importante no desenvolvimento, diferenciação e função do folículo ovariano e corpo lúteo (Erickson et al, 2001).

1.3. Osteoporose e Falência Ovariana Prematura

Alguns autores referem que as pacientes com FOP possam não apenas ter deficiência estrogênica, mas também um potencial para perda de androgênios ovarianos devido à atrofia do córtex dos ovários, que ocorre numa extensão maior do que a observada em mulheres com menopausa natural (Elias et al., 1996), potencializando ainda mais a diminuição da massa óssea.

Trabalho preliminar realizado anteriormente neste laboratório, indicou que a densidade mineral óssea de pacientes com FOP foi semelhante a um grupo de pós-menopáusicas e inferior ao dos controles na menarca nas regiões estudadas (Bodanezi et al, 1997). Sabendo-se que a osteoporose é uma doença com um forte componente genético, o hipogonadismo resulta na baixa massa óssea e aumento significativo do risco de osteoporose em ambos os sexos.

Alguns autores classificam as pacientes com anomalias cromossômicas, história prévia de quimioterapia, radioterapia e defeitos enzimáticos como portadoras de FOP, enquanto outros só consideram o diagnóstico de FOP naquelas com cariótipo normal e sem as condições citadas acima. Entre os defeitos cromossômicos específicos associados com

falência ovariana prematura, o mais comum é a Síndrome de Turner. Mosaicismo é uma outra variedade de anomalia do cromossomo X que está associado com atresia folicular precoce. Anomalias do braço curto do cromossoma X(Xp) geralmente não afetam a função ovariana, ao contrário das deleções ou translocações do braço longo(Xq) sim. Estudos recentes indicam haver um gene (FOP1) responsável pela falência ovariana prematura localizada no Xq21.3-q27 ou no Xq26.1-q27 (Davis, 1996). No nosso estudo serão consideradas como FOP, apenas as pacientes sem alterações cromossômicas e sem história de quimioterapia, radioterapia ou ooforectomia.

Kinch et al, dividiu a FOP em dois grupos, o primeiro em afolicular que atribuiu a defeitos de migração da célula germinativa ou ao aumento de velocidade de perda folicular. O segundo grupo, chamado folicular, foi subdividido em dois outros grupos: aquele causado por defeitos de receptores e outro por defeitos de auto-imunidade (Kinch et al, 1965).

1.4. Receptor de FSH (FSHR)

Os hormônios esteróides exercem suas funções somente através de receptores nucleares que são fatores de transcrição e regulam a expressão de genes alvo de uma maneira dependente do ligante. Além da ação do hormônio, complexos formados por coativadores ou correpressores causam uma modificação gênica (Kinch et al, 1965). O FSH é considerado o estímulo primário para a produção de estrogênios por células foliculares ovarianas (Hart, 2002) e ligado diretamente na reprodução feminina, sendo necessário para o desenvolvimento gonadal, maturação gonadal na puberdade e para produção de gametas durante a fase fértil na vida adulta (Robker et al, 1998; Nelson et al, 1994; Bradburg et al, 1961) sendo seu controle realizado por feedback negativo (Prior, 1998).

O receptor do FSH está codificado por um gene que se localiza no locus 21 do braço curto do cromossomo 2 (Gromoll et al, 1994; Rousseau-Merck et al, 1993) o qual apresenta dois locais distintos que marcam o início da transcrição e um promotor que se estende por pelo menos 1000 pb acima destes locais (Heckert et al, 1992; Kelton et al, 1992). O gene compreende uma região de 54 Kb sendo constituído por dez exons e nove introns. Os primeiros nove exons codificam o domínio aminoterminal extracelular do receptor (Heckert et al, 1992; Heckert et al, 1998). O exon 1 compreende 251pb e tem como principal função codificar uma região responsável pelo transporte e inserção correta do receptor na superfície celular. Os exons 2 a 8 apresentam extensão semelhante, variando de 68 a 77 pb, enquanto o exon 9 apresenta-se com aproximadamente 185 pb (Heckert et al, 1992). O exon 10, é o maior de todos com mais de 1200 pb, codificando todos os sete segmentos do domínio transmembrana, como também, o domínio carboxiterminal (Heckert et al, 1992; Heckert et al, 1998). Os nove íntrons apresentam grande variabilidade de tamanho indo desde 108 pb para o íntron 7 até 15 Kb para o íntron 1. A região promotora do gene do receptor do FSH não possui os elementos de consenso TATA ou CCAAT (Griswold et al, 1995). A região promotora pode localizar-se nos primeiros 286 pb, que se caracteriza por ser uma região que inclui os principais sítios de início de transcrição. Este achado demonstra que a ausência ou repressão dos elementos localizados em posição anterior a esta região, mediadores da atividade transcricional constitutiva, são mecanismos potenciais de modificação da expressão da atividade promotora do receptor do FSH (Heckert et al, 1992; Gromoll et al, 1994).

Algumas mutações e polimorfismos têm sido identificados nos receptores do FSH (FSHR) em mulheres com falência ovariana hipergonadotrófica (Whitney et al, 1995).

A primeira mutação foi descrita em 1995, por Aittomaki et al, que estudaram 22 mulheres, 46 XX com padrão de herança recessivo, de uma região da Finlândia. Todas

apresentaram uma mutação do exon 7 do gene do FSHR. Esta mutação porém não foi encontrada em estudos posteriores em outras populações. Em 1998, Beau et al, identificaram uma mutação com perda parcial da função do FSHR. Mutação esta em heterozigose composta do gene do FSHR, no exon 6 e no exon 10. O primeiro estudo brasileiro foi realizado por Kohek et al, 1998, que estudou vinte e cinco mulheres amenorréicas primárias, com diagnóstico de falência ovariana prematura, sendo que não observou a presença das mutações encontradas por Aittomaki, embora tenha identificado a presença de dois polimorfismos no receptor do FSH: Ala307Thr e Ser680Asn, com frequências alélicas de 50% e 56%, respectivamente (Vilodre, 2007 a).

Posteriormente, Touraine et al, 1999, relataram a presença de uma nova mutação, em heterozigose composta, em uma mulher de 19 anos, 46 XX, com amenorréia primária, no exon 9 e no exon 10. Em 2002, Doherty et al, publicaram uma nova mutação em uma mulher Filandesa, com 17 anos, 46 XX, que apresentou heterozigose composta para duas mutações inativadoras do FSHR., localizada no exon 7, a nova mutação localiza-se no exon 10 do gene do FSHR.

Recentemente, Allen et al, 2003, descreveram uma nova mutação inativadora no exon 10 do gene do FSHR identificada em uma paciente que apresentava amenorréia primária aos 17 anos. A transversão C para G encontrada no nucleotídeo 1043 leva à substituição Pro348Arg no domínio extracelular do receptor e nos estudos funcionais resultou em uma proteína completamente inativa com perda da capacidade de ligação ao FSH. Este caso confirma a importância do FSHR no desenvolvimento puberal e na reprodução feminina, bem como estabelece uma relação clara entre fenótipo e função para as mutações do FSHR.

O gene do FSHR apresenta dois polimorfismos de único nucleotídeo (SNP), um deles localizado na região promotora e dois localizados no exon 10 que codifica o domínio

transmembrana. Os polimorfismos do exon 10 resultam na formação de quatro variantes alélicas caracterizadas pelas seguintes combinações: Thr307-Asn680, Ala307-Ser680, Ala307-Asn680 and Thr307-Ser680. Diversos estudos têm demonstrado que as variantes Thr307-Asn680 e Ala307-Ser680 são muito freqüentes em caucasianos e que em chineses as variantes mais raras Ala307-Asn680 and Thr307-Ser680 são ainda menos freqüentes (5%). A variante Ala307-Ser680 parece estar associada com concentrações basais elevadas de FSH (Simoni et al, 2002) e a maiores doses de FSH exógeno na estimulação ovariana em mulheres durante reprodução assistida (Perez et al, 2000). Isto sugere que o genótipo do receptor de FSH pode influenciar na resposta ovariana ao estímulo do FSH e que a presença de polimorfismos no gene do FSHR capazes de modificar a ação do FSH podem contribuir para as variações fenotípicas observadas nas pacientes com falência ovariana prematura (Sudo et al, 2002).

Estudos recentes sobre a origem da osteoporose associada ao hipogonadismo evidenciaram que a ação do FSH pode ser independente da ação do estrogênio no osteoclasto, pois o FSH estimula a formação e função do osteoclasto e sua ação seria exercida através do seu receptor (FSHR)(Sun et al, 2006).

Considerando os aspectos referidos acima, variantes do gene do receptor de FSH poderiam exercer influência sobre a massa óssea e o risco de osteoporose. O progresso nesta área poderá aumentar a compreensão sobre os mecanismos relacionados com as alterações de massa óssea em pacientes com FOP e facilitar o desenvolvimento de novas terapias e a prevenção da osteoporose;

2. OBJETIVOS

1. Determinar a frequência de alterações na densidade mineral óssea numa coorte de pacientes com FOP e em grupos de referência;
2. Verificar possíveis associações entre variáveis hormonais com a densidade mineral óssea nos grupos em estudo;
3. Analisar se a presença de polimorfismos do gene do receptor do FSH está relacionada com a densidade mineral óssea no grupo FOP.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo do tipo série de casos.

3.2. População em Estudo e Fluxograma

Foram estudadas 32 pacientes com falência ovariana prematura que estão em acompanhamento na Unidade de Endocrinologia Ginecológica (UEG) do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Estas foram submetidas à anamnese e exame físico realizados pela equipe médica do setor e solicitados exames laboratoriais. No grupo de referência foram estudadas 80 pacientes que realizaram densitometria óssea por rastreamento em uma clínica particular da grande Porto Alegre, no período de setembro de 2007 a novembro de 2007.

3.2.1. Grupo FOP

O grupo FOP foi constituído de 32 mulheres selecionadas pelos seguintes critérios de inclusão: amenorréia primária ou secundária antes dos 40 anos, cariótipo normal 46XX, níveis de FSH iguais ou maiores de 40UI/L em pelo menos duas medidas com intervalos de 30 dias, sem história de dano ovariano como ooforectomia, radioterapia ou quimioterapia. O projeto foi aprovado pelo GPPG do HCPA e todas as pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo.

3.2.2. Grupo Referência

Foram estudadas 80 pacientes, emparelhadas pela idade com o grupo FOP, que realizaram densitometria óssea para rastreamento em clínica particular da grande Porto Alegre. Estas pacientes foram estratificadas em grupo pré-menopausa e grupo pós-menopausa, conforme a data da última menstruação. Foram consideradas pós-menopáusicas aquelas com mais de 40 anos, que estavam em amenorréia há mais de um ano. As pacientes não tinham história de hipotireoidismo, cirurgia pélvica, quimioterapia e radioterapia. Todas as mulheres deram consentimento verbal para que seus dados pudessem ser utilizados neste estudo. Não foram realizadas coletas de sangue ou qualquer outro procedimento adicional à realização da densitometria óssea prescrita por seus médicos assistentes.

3.3. Avaliação Clínica

A avaliação clínica padronizada foi realizada no grupo FOP; no grupo de referência as informações clínicas foram obtidas através de pesquisa ao prontuário médico. A anamnese foi constituída de dados de identificação, idade, idade da menarca, idade da menopausa quando a

mesma havia ocorrido, história de tratamento hormonal ou uso de anticoncepcional oral (ACO). Ao exame físico foram avaliados dados antropométricos, medida de peso e altura e Índice de massa corporal (IMC), calculado pela fórmula peso (kg) /altura² (m). (WHO, 1997).

3.4. Avaliação hormonal e metabólica

Das pacientes do grupo FOP, foram coletados sangue para dosagens hormonais (FSH, LH, prolactina, estradiol, TSH, T4, testosterona total, SDHEA e cortisol), que foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica e de Radioimunoensaio do HCPA. Todos os procedimentos acima descritos já fazem parte da rotina de avaliação de pacientes com Falência Ovariana Prematura. Nas pacientes do grupo de referência, não foram realizados exames laboratoriais, devido ao delineamento do estudo, sendo assim uma limitação do presente estudo.

3.4.1. Dosagens laboratoriais metabólicas e hormonais

As dosagens de LH e FSH séricos, foram mensuradas por imunoensaio eletroquimioluminescência (ECLIA) (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Níveis normais: LH: 2,4-12,6; FSH: 3,5-12,5 mIU/mL), com um coeficiente de variação (CV) intra e interensaio de 1.8% e 4.8%, respectivamente para LH, e 1.8% e 3.3% para FSH. A sensibilidade é de 0,12 IU/L para LH e 0,05 IU/L para FSH. Estradiol foi mensurado por ECLIA com sensibilidade de ensaio de 5,0 pg/mL com um coeficiente de variação (CV) intra e interensaio 5.7% e 6.4%. A dosagem de TSH sérico e T4-livre foram realizados por ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (os níveis

normais: TSH: 0,27-4,2 uUI/mL; T4: 0,93-1,7 ug/dL), com (CV) intra e interensaio de 8.6% e 2.83% respectivamente para TSH e 4.7% e 4.55% para T4. A sensibilidade dos ensaios é de 0,005 µIU/mL para TSH e 0,42 µg/dL para T4. Testosterona (TT) foi medida por método de radioimunoensaio RIA (ICN, Costa Mesa, CA) (níveis normais: 0,2-0,8 ng/dL) com uma sensibilidade < 0.2 ng/mL um CV intra- e interensaio de 10,0% e 11,3%, respectivamente. SDHEA foi dosado por ECLIA (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) níveis normais: 33,9-337,0 µg/dL com sensibilidade de 0,10 µg/dL e CV intra e interensaio de 2.8% e 6.5%, respectivamente.

3.5. Extração do DNA genômico e análise dos polimorfismos do gene do receptor de FSH

A extração do DNA genômico, a partir de sangue periférico e a análise dos polimorfismos do gene do receptor de FSH, do grupo FOP foi realizada pelo Dr. Luiz Cezar Fernandes Vilodre no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia/UFRGS, como parte da tese de doutorado defendida pelo mesmo. Os dados foram associados a este estudo (Vilodre LC, 2007_a, Vilodre et al, 2007_b, Vilodre et al, 2007).

3.6. Avaliação da Densidade Mineral Óssea por DXA

A medida da densidade mineral óssea (DMO) é o método não-invasivo mais preciso, utilizado na identificação de indivíduos com osteoporose, sendo considerado o melhor preditor isolado de risco de fratura. A validade da determinação quantitativa da massa óssea

depende da precisão e acurácia das medidas, isso é dependente dos controles de qualidades realizados nos equipamentos e a forma de realização do exame.

Os controles de calibração asseguram a qualidade do exame e a capacidade do sistema em determinar resultados de medidas consistentes em avaliações repetidas, alguns testes realizados no serviço, utilizam-se de phantoms de alumínio que simulam as vértebras de L1 a L4 e suas diferentes densidades conhecidas. Os fatores que afetam a precisão como a calibração adequada, foram controlados.

Alguns fatores são fundamentais, para garantir maior precisão dos resultados, como por exemplo, o posicionamento do paciente na aquisição do exame, a área de análise adequadamente selecionada, e a ausência de artefatos. Isso tudo foi controlado uma vez que as aquisições e processamentos dos exames foram realizados pela própria autora. Foi calculado o coeficiente de variação, a longo prazo, na coluna lombar é de 1,46% e no fêmur total de 0,9%, conforme as precisões mínimas aceitáveis pela Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (Baim S. et al, 2008, ISCD,2007).

Na coluna lombar a paciente é posicionada em decúbito dorsal, no centro da mesa, as pernas são elevadas a 90° sobre um suporte que auxilia na separação das vértebras, corrigindo a curvatura da coluna lombar, a paciente tem que estar alinhada e centralizada na mesa de exames. A aquisição deve incluir as cristas ilíacas e arcos costais, para que se tenha certeza que todas as vértebras lombares foram incluídas no exame. A análise satisfatória do processamento deve permitir visualizar nitidamente os espaços intervertebrais separados e ausência de artefatos. Quando uma paciente apresenta seis vértebras lombares, usamos as recomendações da ISCD e rotulamos as vértebras de inferior para superior, ou seja, L6 será L5. (Baim S. et al 2008)

Na avaliação do fêmur total, a paciente deve estar posicionada em decúbito dorsal, e a rotação interna de 15 a 20°, proporciona um espaço suficiente entre o osso ísquio e fêmur, para o correto processamento das imagens. [Lunar Corporation – 1996]. Os utensílios de posicionamento são utilizados para manter uma padronização entre as pacientes. No processamento e análise era verificados a centralização femoral, rotação adequada e angulação do trocânter menor. (Baim S, et al 2008)

As medidas de densidade mineral óssea foram realizadas pela autora, no mesmo aparelho por raios x duo energético (DXA), usando o sistema Lunar DPX Alpha (Lunar Radiation Corporation, Madison, WI, USA), na clínica de Radiodiagnóstico – SIDI, Porto Alegre. As regiões analisadas foram da primeira a quarta vértebras lombares e fêmur total.

A Densitometria Óssea fornece a paciente uma dose efetiva de radiação muito menor que raios x de tórax ou mamografias. A dose de exposição dos pacientes é estimada em microSievert (μSv), na densitometria de coluna lombar e fêmur proximal a dose efetiva é em torno de 1-5 μSv enquanto que no raio X de tórax é de 50 μSv e em mamografia é de 450 μSv .(Genant et al, 1996)

O diagnóstico clínico foi baseado através de escores que variam de $\geq -1,0$ DP à $\leq -2,5$ DP de mulheres jovens que tenham entre 20 e 40 anos. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) a densidade mineral óssea que define os valores da utilização do T-score foram originalmente estabelecidos a partir da medida feita em coluna lombar e fêmur proximal em pósterio-anterior.

De acordo com os critérios diagnósticos propostos por WHO e Kanis et al, 1994, os resultados poderiam ser agrupados em quatro grupos, para mulheres pós-menopáusicas:

- 1) Normal: Valores de densidade mineral óssea, não menor que 1,0 desvio-padrão (DP) abaixo do esperado para uma mulher jovem. Densidade óssea na coluna lombar \geq a 1,050g/cm² e no colo do fêmur \geq a 0,830g/ cm².
- 2) Baixa massa óssea: Valores de densidade mineral óssea entre 1,0 e 2,5 DP abaixo do esperado para uma mulher jovem. Densidade óssea na coluna lombar entre 1,050 e 0,880g/ cm² e no colo do fêmur entre 0,830 e 0,710g/ cm².
- 3) Osteoporose: Valores de densidade mineral óssea entre \leq a 2,5 DP abaixo do esperado para uma mulher jovem. Densidade óssea na coluna lombar \leq 0,880g/ cm² e no colo do fêmur \leq a 0,710g/ cm².
- 4) Osteoporose estabelecida: Valores de densidade mineral óssea \leq a 2,5 DP abaixo do esperado para uma mulher jovem. Na presença de uma ou mais fraturas.

Foram consideradas pacientes normais aquelas que apresentaram T-Score nos níveis adequados (até -1,0 DP), aquelas que apresentam no mínimo um sítio de osteopenia ou osteoporose (igual ou menor que -1,0 DP) foram caracterizadas como baixa massa óssea. A medida da coluna é calculada pelo próprio equipamento sendo considerada, a média entre L1–L4, no entanto a medida do fêmur total, também calculada pelo equipamento é a média entre o valor de triângulo de wards e trocânter.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos a média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil, conforme distribuição normal ou não normal para caracterizar as amostras.

Utilizamos os testes estatísticos paramétricos para as variáveis com distribuição normal. A fim de comparar duas amostras independentes, para variáveis contínuas, utilizamos o teste t de Student. A comparação entre médias foi realizada pelo teste de análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey.

Para as variáveis que não seguem uma curva de distribuição normal, utilizamos testes estatísticos não-paramétricos. Para comparações de duas amostras independentes utilizamos o teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney. E os testes qui-quadrado e exato de Fisher, em tabelas 2X2, para as variáveis categóricas.

A análise estatística foi realizada com o programa Statistical Package for the Social Scieces (SPSS) para o Windows, versão 14.0.

Considerou-se nível de significância quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

6.1. Dados Clínicos e Antropométricos

As características clínicas e antropométricas das pacientes com FOP e do grupo referência (pré-menopausa e pós-menopausa) estão apresentadas na tabela 1. Verifica-se que a média de idade das pacientes entre o grupo de referência pós-menopausa é maior que o grupo FOP e que o grupo de referência pré-menopausa, existindo diferença estatisticamente significativa entre si. As outras variáveis foram similares entre os grupos.

Tabela 1 – Dados Clínicos e Antropométricos das amostras estratificadas por amenorréia.

	GRUPO FOP (n: 32)	GRUPO REFERÊNCIA		P
		Pré- menopausa (n: 25)	Pós- menopausa (n: 55)	
Idade (anos)	46,28 ± 10,38 ^a	43,96 ± 7,08 ^a	52,16 ± 3,65 ^b	0,001
Peso (Kg)	63,35 ± 12,68	65,28 ± 14,51	68,38 ± 12,76	0,213
Altura (cm)	159,06 ± 7,93	158,84 ± 5,13	159,23 ± 5,93	0,967
IMC	24,98 ± 4,77	25,80 ± 5,25	27,00 ± 5,01	0,182
Idade da Menarca (anos)	12,90 ± 2,51	12,08 ± 1,41	12,41 ± 1,69	0,259

Valores expressos como média ± desvio padrão (teste *anova*).

Letras diferentes indicam diferença estatística.

A tabela 2 apresenta valores de correlação entre IMC e DMO, em coluna lombar e fêmur total, entre as pacientes estudadas.

Tabela 2 – Correlação entre IMC e DMO.

	GRUPO FOP (n: 32)		GRUPO REFERÊNCIA			
			Pré-menopausa (n: 25)		Pós-menopausa (n: 55)	
			L1-L4	FEMUR T	L1-L4	FEMUR T
IMC	L1-L4	FEMUR T	L1-L4	FEMUR T	L1-L4	FEMUR T
	R: -0,001	R: 0,522	R: 0,279	R: 0,603	R: 0,303	R: 0,641
	p: 0,994	p: 0,002*	P: 0,039*	P: 0,001*	P: 0,140	P: 0,001*

Correlação de Pearson

6.2. Dados Hormonais, Metabólicos e Densitométricos

Com relação ao uso de terapia hormonal (TH), 65% das pacientes do grupo FOP fazem ou fizeram uso de hormônios (n= 21); já entre as pacientes do grupo de referência pós-menopausa somente 30,4% são ou foram usuárias de TH (n= 17). 12% das pacientes do grupo referência pré-menopausa usam ACo (n=3). Quando comparamos os grupos quanto ao uso ou não de tratamento e avaliação do status densitométrico não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p= 0,164). (Tabela 3)

Tabela 3 – Comparações entre o uso de TH/ACo e status densitométrico.

	TH	NORMAIS	BAIXA MASSA ÓSSEA	p	p
FOP (n: 32)	SIM	6(28,6%)	15 (71,4%)	0,89	0,164
	NÃO	4(36,4%)	7(63,6%)		
Referência Pré-Menopausa (n: 25)	SIM	1(33,3%)	2(66,7%)	0,49	
	NÃO	12(54,5%)	10(45,5%)		
Referência Pós-Menopausa (n: 55)	SIM	8(47,1%)	9(52,9%)	0,73	
	NÃO	21 (55,3%)	17 (44,7%)		

Teste χ^2 e exato de Fisher

Com o objetivo de comparar o impacto da menopausa, analisamos os grupos FOP e referência pós-menopausa. Comparamos a média de idade da menopausa entre as pacientes, sendo que a idade das pacientes com FOP foi de $31 \pm 9,8$ anos e a do grupo referência pós-menopausa foi $47,5 \pm 3,7$ anos, havendo diferença estatisticamente significativa ($p= 0,001$).

Na tabela 4 são apresentadas comparações entre o grupo FOP e pós-menopausa com o status densitométrico. Vinte e duas pacientes (68,7%) do grupo FOP tinham baixa massa óssea, enquanto que no grupo referência pós-menopausa foram vinte e seis (47,3%). Quando comparamos o grupo FOP com o grupo de referência pós-menopausa encontramos uma proporção aproximada de 1 normal: 1 baixa massa óssea no grupo de referência, enquanto que no grupo FOP a relação foi de 1:2. Esta diferença apresenta-se estatisticamente diferente. ($p= 0,042$)

Tabela 4 – Grupos FOP x Referência e Status Densitométrico.

	NORMAIS	BAIXA MASSA ÓSSEA	P
FOP (n: 32)	10 (31,3%)	22 (68,7%)	0,042
Referência Pós- Menopausa (n: 55)	29 (52,7%)	26(47,3%)	

Teste χ^2 e exato de Fisher.

Na tabela 5, estão representadas as frequências entre os grupos FOP e Referência pós-menopausa quanto à densidade mineral óssea estratificada em diferentes sítios avaliados. O Grupo FOP apresentou maior frequência de baixa massa óssea na coluna lombar e no conjunto coluna e fêmur total.

Tabela 5 – Frequência entre os Grupos FOP x Referência e diferentes sítios de análise.

	FOP (n: 32)	REFERÊNCIA PÓS-MENOPAUSA (n:55)	P
Coluna Lombar e Fêmur Total Normais	10 (31,25%)	29 (52,7%)	< 0,001
Baixa Massa Óssea em Coluna Lombar	8 (25%)	6 (10,9%)	< 0,001
Baixa Massa Óssea em Fêmur Total	2 (6,25%)	5 (9,1%)	< 0,001
Baixa Massa Óssea em Coluna Lombar e Fêmur Total	12 (37,5%)	15 (27,3%)	< 0,001

Teste χ^2 e exato de Fisher.

A tabela 6 mostra comparações entre tempo de amenorréia no momento da avaliação densitométrica, entre os grupos FOP e Referência pós-menopausa, com a densidade mineral óssea (status densitométrico). A frequência de baixa massa óssea foi similar com \leq ou $>$ 4 anos, tanto no grupo FOP quanto no grupo de Referência pós-menopausa, e também não houve diferença entre os grupos.

Tabela 6 – Tempo de amenorréia na densitometria óssea nos grupos FOP e Pós-menopausa e Status Densitométrico (Ponto de Corte: 4anos).

	NORMAIS	BAIXA MASSA ÓSSEA	P	p
FOP (n: 32)				
Tempo de Amenorréia				
\leq 4 anos	2 (40%)	3 (60%)	0,503*	0,241**
$>$ 4 anos	8 (29,6%)	19 (70,4%)		
Referência Pós-Menopausa (n: 55)				
Tempo de Amenorréia				
\leq 4 anos	15 (57,7%)	11 (42,3%)	0,783*	
$>$ 4 anos	14 (48,3%)	15 (51,7%)		

*Teste χ^2 e exato de Fisher entre tempo de amenorréia e status densitométrico.

** Teste χ^2 e exato de Fisher entre tempo de amenorréia e status densitométrico entre os grupos.

Analisando somente as pacientes FOP, estratificadas pelo status densitométrico, observamos que não houve diferença significativa para nenhuma variável hormonal estudada.

Tabela 7.

Tabela 7 – Dados Hormonais e Status Densitométrico do grupo FOP.

	NORMAIS (N: 10)	BAIXA MASSA ÓSSEA (N: 22)	P
FSH (IU/L)	56,30 (32,30-139,00) ^b	52,55(6,03-170,00) ^b	0,88
LH (IU/L)	21,45 (12,50-70,10) ^b	23,55 (2,28–76,80) ^b	0,58
Prolactina (ng/ml)	12,10(5,70 – 27,60) ^b	7,45 (4,22 -26,80) ^b	0,12
Estradiol (pg/ml)	23,55 (5,00–58,43) ^b	10,75 (5,00 - 118,10) ^b	0,23
TSH (UI/ml)	3,15 (0,29–5,38) ^b	1,90 (0,52 – 8,68) ^b	0,30
T4 - livre (µg/dl)	7,05 ± 3,19 ^a	7.82 ± 2,77 ^a	0,49
Testosterona Total (ng/dl)	0,27 (0.05 – 0.71) ^b	0,24 (0.05 -0.98) ^b	0,79
SDHEA (µg/dl)	50,30(15,00– 195,80) ^b	67,60 (20,30-196,00) ^b	0,34
Cortisol (µg/dl)	17,13 ± 4,25 ^a	15,98 ± 5,20 ^a	0,54

^a Valores expressos em média ± desvio padrão (teste *t* de Student).

^b Valores expressos em mediana e intervalo interquartil (25%-75%) (teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Foi, então, analisado se variantes polimórficas no exon 10 do gene do FSHR, detectadas em trabalho prévio do grupo (47,48), poderiam estar relacionadas com variáveis densitométricas. A tabela 8 mostra a DMO em coluna lombar e fêmur total de acordo com a distribuição genotípica dos dois polimorfismos. Não houve diferença significativa entre a DMO e a frequência genotípica dos dois polimorfismos estudados.

Tabela 8 – Avaliação dos Polimorfismos do FSHR e DMO.

	L1-L4 (g/cm²)	p	Fêmur Total (g/cm²)	p
Ala 307 Thr				
A-A Normal (n:7)	1,068		0,973	
T-T Polimórfico homozigoto (n: 6)	0,963	0,412	0,890	0,481
A-T Polimórfico heterozigoto (n:19)	1,071		0,908	
Ser 680 Asn				
S-S Normal (n: 5)	1,091		1,004	
A-A Polimórfico homozigoto (n: 14)	1,028	0,775	0,935	0,141
S-A Polimórfico heterozigoto (n: 13)	1,059		0,869	

Valores expressos como média (teste *anova*).

Também não foi observada influencia dos polimorfismos sobre a frequência de baixa massa óssea no grupo de pacientes com FOP (Tabela 9 e 10).

Tabela 9 – Avaliação dos Polimorfismos do FSHR e Status Densitométrico.

Ala 307 Thr	NORMAIS	BAIXA MASSA ÓSSEA	P
Normais A-A (n= 7)	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0,273
Polimórficos T-T e A-T (n=25)	9 (36%)	16 (64%)	

Teste χ^2 e exato de Fisher.

Tabela 10 – Avaliação dos Polimorfismos do FSHR e Status Densitométrico.

Ser 680 Asn	NORMAIS	BAIXA MASSA ÓSSEA	P
Normais S-S (n= 5)	2 (40%)	3 (60%)	0,646
Polimórficos A-A e S-A (n=27)	8 (29,6%)	19(59,4%)	

Teste χ^2 e exato de Fisher.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo a análise da DMO entre os grupos FOP e referência foi realizada considerando a idade no momento da realização da densitometria, ou seja, para algumas pacientes com falência ovariana e algumas pacientes referência pós-menopausa, a densitometria óssea foi realizada muitos anos após a última menstruação. No entanto, mesmo com a dispersão dos resultados de DMO, em decorrência disso, as pacientes com falência ovariana prematura apresentaram massa óssea significativamente menor quando comparadas ao grupo de referência pós-menopausa. Estes dados salientam o impacto que a redução abrupta nos níveis de estrogênios pode exercer sobre a massa óssea em mulheres antes dos 40 anos.

Além disso, alguns autores referem que as pacientes com FOP possam não apenas ter deficiência estrogênica, mas também menores níveis circulantes de androgênios ovarianos devido à atrofia dos ovários, que ocorre numa extensão maior do que a observada em mulheres com menopausa natural (Elias et al, 1996), o que poderia potencializar ainda mais a diminuição da massa óssea (Bermudez et al, 1993).

No presente estudo, as pacientes com FOP apresentaram associação significativa entre IMC e DMO em fêmur total, e o mesmo ocorreu, com os grupos de referência que avaliamos, estratificados em pré - e pós-menopausa.

Baixo IMC tem sido relatado como fator de risco para futuras fraturas. Trabalho prospectivo publicado em 2005, estudou o efeito do IMC, DMO e idade sobre fraturas osteoporóticas, e observou que baixo IMC confere risco importante de fraturas independente da idade e sexo, mas dependente da DMO (De Laet C, et al, 2005)

Embora seja bem conhecida a associação entre DMO e IMC em diferentes populações, poucos estudos foram realizados com pacientes portadoras de FOP. Hadjidakis et al, 1999, compararam a influência da menopausa e da idade em que ela ocorreu, com a DMO, em mulheres com menopausa precoce, menopausa cirúrgica e menopausa natural e concluíram que o tempo de menopausa afeta negativamente a massa óssea. Já, Bagur et al, 1992, também observaram esta mesma associação em mulheres com FOP, estratificadas em obesas e não-obesas, sendo que as mulheres obesas tinham DMO significativamente maior do que as não-obesas. Outro estudo, realizado por Ott, 1990, analisando mulheres com amenorréia, relatou uma correlação positiva entre IMC e DMO na coluna lombar, e ainda revelou que o IMC tem um significado melhor de predição de densidade óssea em amenorreicas quando corrigido pelo tempo de amenorréia. Existe controvérsia na literatura sobre se realmente é só o peso que influencia ou, se isso decorre de alterações hormonais, como por exemplo, produção de esteróides sexuais no tecido adiposo de mulheres obesas (Ott et al, 1990).

A diminuição nos níveis de estrogênios resulta em ativação acelerada dos sítios de remodelamento. Evidências *in vitro* sugerem que os estrogênios inibem a reabsorção óssea osteoclástica e reduzem a liberação de citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α (Roggia et

al, 2001; Cenci et al, 2003). Os estrogênios também inibem diretamente a diferenciação osteoclástica e a ação dos precursores de medula óssea vermelha (Shevde et al, 2000; Srivastova et al, 2001). Assim, a remodelação óssea é feita pelos osteoclastos e osteoblastos numa seqüência definida. De tal forma que eles apresentam receptores específicos para o estradiol e sua falta ativa a modulação local (Manolaga et al, 1995).

A importância da deficiência estrogênica e a diminuição da massa óssea no climatério pré e pós-menopausa têm sido muito estudada nos últimos anos. Vários estudos têm demonstrado relação direta entre a idade, idade da menopausa e DMO (Kritz-Silverstein et al, 1993; Pouilles et al, 1994; Otha et al, 1996). Entretanto, a maioria dos trabalhos avaliou esta questão em mulheres com mais de 50 anos de idade. Inúmeros estudos que analisaram mulheres entre 45 e 65 anos demonstraram que a deficiência de secreção de estrogênios após a menopausa está associada com diminuição da densidade mineral óssea (Mazess et al, 1987; Pocock et al, 1987; Mautalen et al, 1990; Alicia et al, 1992).

Por outro lado, estudos com mulheres jovens em amenorréia resultante de intensa atividade física (Slemenda et al, 1987), e outras causas (Drinkwater et al, 1990) demonstram, também, que a deficiência de estrogênios está associada à baixa massa óssea. (Lindsay et al, 1980; Crosby et al, 1985). Em estudo realizado por Otha et al, 1996, que analisou massa óssea em pacientes que entraram na menopausa antes e após 43 anos, foi observado que o grupo com menopausa antes dos 43 anos apresentou DMO significativamente menor que o grupo com menopausa em idade mais tardia (Otha et al, 1996). Da mesma forma, Uygur et al. 2005, estudando pacientes com FOP demonstraram que valores de DMO eram significativamente menores que no grupo controle.

Os dados do presente estudo mostram que as pacientes no grupo FOP com amenorréia hipergonadotrófica apresentam massa óssea significativamente menor na coluna lombar quando comparadas as pacientes do grupo referência pós-menopausa, confirmando os dados da literatura.

Outro estudo demonstrou que a DMO foi mais baixa em áreas do esqueleto predominantemente composta de osso trabecular comparada ao osso cortical e que a DMO foi menor nas pacientes com menopausa precoce cirúrgica, antes dos 40 anos do que em menopausa natural (Bagur et al, 1992; Geusens et al, 1986). Estas pacientes com menopausa cirúrgica estariam sofrendo uma diminuição abrupta de estrogênios comparada com o declínio gradual que ocorre na menopausa natural (Ribot et al, 1986).

A FOP causa rapidamente uma diminuição da BMD na coluna (Ribot et al, 1986; Richelson et al, 1984; Stepan et al, 1987). Esta diminuição é maior em osso trabecular que em osso cortical (Genant et al, 1982). No estudo de Cann et al, foram avaliadas mulheres jovens em amenorréia hipotalâmica e FOP, sendo que a prevalência de diminuição da massa óssea foi de 20% e 30% no fêmur (Cann et al, 1984). Outro estudo com pacientes jovens com amenorréia primária mostrou que a prevalência de alterações na massa óssea foi de 90% e 55% na coluna lombar e fêmur respectivamente (Benetti-Pinto et al, 2002). Corroborando estes achados, Devleta et al. 2004, demonstraram que mulheres com amenorréia hipergonadotróficas têm menor massa óssea em coluna lombar que as hipogonadotróficas, chamando a atenção para uma correlação negativa entre os níveis de FSH e DMO da coluna lombar, o que sinaliza o esgotamento da reserva folicular.

Alguns estudos sugerem que a perda de osso cortical está mais associada ao envelhecimento do que à deficiência estrogênica, enquanto que o osso trabecular é muito mais

sensível à falta dos esteróides sexuais (Nordin et al, 1990). Isso talvez possa explicar o maior decréscimo da DMO na coluna, uma vez que, a perda óssea relacionada à menopausa é intensa, porém, auto-limitada, com uma duração aproximada de dez anos, enquanto que a perda de massa esquelética associada à idade é contínua (Lewin et al, 1997; Luckey et al, 1996; Sowers et al, 1992; Riggs et al, 1986; Rodin et al, 1990; Recker et al, 1992). Conforme Riggs e Melton, 1986, a perda de massa esquelética associada à idade é contínua e tem início antes da menopausa no colo femoral. Isso também pode ser explicado pelo fato de que o osso trabecular tem maior superfície e é metabolicamente mais ativo que o osso cortical, sendo, mais susceptível a alterações do equilíbrio mineral.

A relação entre a osteoporose e a deficiência estrogênica foi descrita em 1941 por Albright et al. Estes autores foram os primeiros a descrever o elo entre a osteoporose e o sistema endocrinológico, e seus achados levaram à compreensão da associação entre a deficiência de estrogênio e a diminuição da massa óssea e redundaram na indicação dos estrogênios na prevenção e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa (Albright et al, 1940, Albright et al, 1948).

Os benefícios do tratamento hormonal (TH) na prevenção de fraturas osteoporóticas é bem documentado e vários estudos epidemiológicos e observacionais com o uso de TH têm demonstrado uma diminuição do risco de fraturas, uma vez que a diminuição dos níveis de estradiol está associado com a diminuição da BMD e assim risco aumentado de fraturas. (Gambacciani et al, 2008; Cauley et al, 1995; Kiel et al, 1987) O estradiol tem efeito protetor no osso, possibilitando uma redução do remodelamento do esqueleto (Stevenson et al, 2005; Ettinger et al, 1998; Yasui et al, 2001). A administração de hormônios em mulheres na pós-

menopausa tem sido utilizada na prevenção e tratamento da osteoporose (Gambacciani et al, 2008; Christiansen et al, 1980; Christiansen et al, 1984, Anasti, 1998).

Um outro aspecto que vem sendo estudado refere-se à influência do tempo de amenorréia sobre alterações na massa óssea em mulheres na peri e pós-menopausa. Alguns estudos demonstram que o tempo de amenorréia tem correlação negativa com a densidade mineral óssea (Devleta et al, 2004). Myerson et al, 1992, evidenciaram que uma amenorréia com duração de 5 a 6 anos é o tempo necessário para expressar seu efeito sobre o osso cortical.

No nosso estudo, avaliamos o tempo de amenorréia em relação a modificações da DMO, e observamos que após mais de quatro anos de amenorréia, pelo menos dois terços das pacientes com FOP e a metade das mulheres do grupo referência pós-menopausa, apresentaram baixa massa óssea.

Segundo Hobeika et al, a perda óssea pode iniciar quando a função ovariana está declinando, antes da instalação definitiva da menopausa natural ainda no período de irregularidade menstrual da perimenopausa (Hobeika et al, 2002; Christiansen et al, 1990; Slemenda et al, 1987) ao contrário do que ocorre nos casos de menopausa cirúrgica. No caso da FOP, também foi observado que os anos que precedem o quadro definitivo, e que são marcados pela irregularidade menstrual, estão associados com significativas perdas na massa óssea (Prior et al, 1998).

Os hormônios esteróides exercem suas funções principalmente através de receptores nucleares que são fatores de transcrição e regulam a expressão de genes alvo de uma maneira dependente do ligante. Além da ação do hormônio, complexos formados por coativadores ou

correpressores causam uma modificação gênica (Kinch et al, 1965; Zaidi et al, 2007; Dunkel et al, 1994; Tilly et al., 1992). O FSH é considerado o estímulo primário para a produção de estrogênios por células foliculares ovarianas (Hart et al, 2002; Richards et al, 1980; Meduri et al, 2008; Baird et al, 2006) estando envolvido nas condições reprodutivas na mulher, sendo necessário para o desenvolvimento e maturação gonadal na puberdade e para crescimento folicular durante a fase fértil na vida adulta (Robker et al, 1998; Nelson et al, 1994; Bradburg et al, 1961).

Devleta et al, 2004 descreveram uma forte correlação negativa entre altos níveis de FSH e DMO, assim condições relacionadas com concentrações séricas elevadas de FSH são indicadores de baixa massa óssea em mulheres com amenorréia (Devleta et al, 2004; Iqbal et al, 2006).

Estudos recentes, em modelos animais, camundongos *knockout*, evidenciaram a origem da osteoporose associada ao hipogonadismo e demonstraram que a ação do FSH pode ser independente da ação do estrogênio no osteoclasto, pois o FSH estimularia a formação e função do osteoclasto e sua ação seria exercida através do seu receptor (FSHR). Assim, a inativação completa FSHR $-/-$, FSH β $-/-$ teria um efeito protetor no osso. Além disso, níveis mais baixos de FSH circulante, mesmo na presença de níveis normais de estrogênio, estaria associado a aumentos na massa óssea e redução na reabsorção óssea osteoclástica (Sun et al, 2006; Gao et al, 2007). Estes receptores específicos intermediam a ação pró-osteoclastogênica do FSH (Zaidi et al, 2007; Wu et al, 2007).

O genótipo do receptor de FSH pode influenciar na resposta ovariana ao estímulo do FSH (Vilodre et al, 2007; Vilodre et al, 2007_b) e a presença de polimorfismos no gene do FSHR, capazes de modificar a ação do FSH, podem contribuir para as variações fenotípicas

observadas nas pacientes com falência ovariana prematura (Meduri et al,2008; Abel et al,2000; Burns et al,2001; Kumar et al,2005; Huhtaniemi et al,2002; Anda et al, 2000; Themmen et al,2005; Brethrick et al,2008; Hammond et al,2002). Embora as mutações dos genes das gonadotrofinas sejam raras, as alterações dos genes de seus receptores são relativamente mais freqüentes e podem causar a ganho ou perda de função (Meduri et al, 2008; Themmen and Huhtaniemi et al,2000). Assim, mutações que provocam ganho de funções foram encontradas principalmente no domínio transmembrana da glicoproteína (Vassart et al., 2004). As mutações que levam a perda de função estão localizadas em qualquer região do gene do receptor e podem provocar supressão hormonal (Beck-Peccoz et al,2006; Calebiro et al, 2005).

Estudo de Danilovich et al 2000, demonstraram que a falta de estrogênio causa a perda de sinalização no receptor de FSH em camundongos e poderia também causar importantes anormalidades esqueléticas e obesidade, semelhante ao que ocorre na pós-menopausa. A maior perda óssea em mulheres amenorreicas hipo e hipergonadotróficas foi provocada não apenas por hipoestrogenismos também por um possível efeito direto do FSH no metabolismo ósseo, e isso poderia ter sido causado pela perda de receptores de FSH no tecido ósseo (Yarram et al, 2003).

O gene do FSHR apresenta dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), um deles localizado na região promotora e dois localizados no exon 10 que codifica o domínio transmembrana. Os polimorfismos do exon 10 resultam na formação de quatro variantes alélicas caracterizadas pelas seguintes combinações: Thr307-Asn680, Ala307-Ser680, Ala307-Asn680 and Thr307-Ser680. Diversos estudos têm demonstrado que as variantes Thr307-Asn680 e Ala307-Ser680 são muito freqüentes em caucasianos e que em chineses as

variantes mais raras Ala307-Asn680 and Thr307-Ser680 são ainda menos frequentes (5%). A variante Ala307-Ser680 parece estar associada com concentrações basais elevadas de FSH (Simoni et al, 2002) e a maiores doses de FSH exógeno na estimulação ovariana em mulheres durante reprodução assistida (Perez et al, 2000). Isto sugere que o genótipo do receptor de FSH pode influenciar na resposta ovariana ao estímulo do FSH e que a presença de polimorfismos no gene do FSHR capazes de modificar a ação do FSH podem contribuir para as variações fenotípicas observadas nas pacientes com falência ovariana prematura (Sudo et al, 2002).

Em 2007, Vilodre et al, em trabalho realizado no nosso laboratório, estudaram a associação entre o fenótipo de mulheres com FOP e a presença de dois polimorfismos no exon 10 do gene do FSHR, quais sejam, (Ala307Thr) no fragmento 10 A e (Ser680Asn) no fragmento 10 C. Naquele estudo foi identificado uma possível associação entre a presença do polimorfismo Ala307Thr com um início mais precoce da irregularidade menstrual.

Várias mutações e polimorfismos do gene do FSHR têm sido estudadas nos últimos anos, entretanto nenhum estudo associou variantes do gene do receptor do FSH com o metabolismo ósseo ou com a densidade mineral óssea. No presente estudo, a análise das relações entre variáveis densitométricas e a frequência genotípica destes dois polimorfismos, Ala307Thr e Ser680Asn, nas pacientes com FOP não evidenciou associação entre estes e a presença de massa óssea normal ou baixa ou com valores da DMO.

Desta forma, os resultados do presente trabalho indicam maior frequência de baixa massa óssea em pacientes com FOP, especialmente em coluna lombar, em comparação com mulheres na pós-menopausa. A DMO em fêmur total, por sua vez, correlacionou-se com o IMC tanto nas pacientes com FOP quanto nas mulheres na pós-menopausa. Finalmente, os

polimorfismos estudados no exon 10 do gene do FSHR parecem não ter influência sobre a DMO das pacientes com FOP.

7. CONCLUSÃO

- Observou-se maior frequência de baixa massa óssea em pacientes do grupo FOP, em comparação com o grupo de referência Pós-menopausa.
- Baixa massa óssea em coluna lombar foi observada com maior frequência em pacientes do grupo FOP em comparação às mulheres do grupo referência Pós-menopausa; este efeito não foi observado em outras áreas periféricas do esqueleto.
- Houve uma correlação positiva significativa entre IMC e DMO em fêmur total, em todos os grupos estudados, no entanto, não se observou associações entre outras variáveis antropométricas e clínicas com a DMO.
- Embora os polimorfismos estudados no exon 10 do gene do FSHR possam modificar a ação do FSH, estas variantes não foram associadas à DMO ou ao status densitométrico no grupo FOP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, M.H; WOOTTON, A.N; WILKINS, V; et al. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. **Endocrinology**. v.141, p. 1795–1803, 2000.

AITTOMAKI K; LUCENA J.L.D; PAKARINEN P; et. al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, v.2, p.:959-69, 1995.

ALBRIGHT F; BLOOMBERG F; SMITH P.H. Postmenopausal osteoporosis. **Trans Assoc Am Physicians**, v..55, p. 298-305, 1940.

ALBRIGHT T; SMITH P.H; RICHARDSON A.M. Postmenopausal osteoporosis, its clinical feature. **Jama**, v. 116, p. 2465, 1941.

ALBRIGHT F; REIFENSTEIN E.C JR. Metabolic bone disease: osteoporosis. **Parathyroid glands and metabolic bone disease**. **Baltimore**: Williams and Wilkins, p. 145-204, 1948.

ALLEN L.A; ACHERMANN J.C; PAKARINEN P; 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.**, v. 18(2), p. 251-6, 2003.

ANASTI J.N. Premature ovarian failure: an update. **Fertil Steril.**, v. 70, p.1-15, 1998.

ANASTI, J; KALANTARIDOU S.N; KIMZEY, L.M; DEFENSOR, R.A. *Bone loss in young women with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure.* **Obst. Gynecol**, v. 91, p. 12-5, 1998.

BAGUR A.C and MAUTALEN C.A. Risk for Developing Osteoporosis in Untreated Premature Menopause. **Calcif Tissue Int**, v. 51, p, 4-7, 1992.

BAIM S et al: Official positions of ISCD. **Journal of Clinical Densitometry** v. 11, p 75, 2008.

BAIRD D. Role of FSH and LH in follicle development. **J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.** V. 35, p. 2S24-2S29, 2006.

BEAU I; TOURAINE P; MEDURI G; et. al. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. **J.Clin Invest.** v.102, p.1352-9, 1998.

BECK-PECCOZ P; PERSANI L; CALEBIRO D; BONOMI M; MANNAVOLA D; CAMPI I. Syndromes of hormone resistance in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Clin. Endocrinol. Metab.** v.. 20, p 529–546, 2006.

BENETTI-PINTO C.L; BEDONE A; MAGNA L.A; MARQUES-NETO; J.F. Factors associated with reduction of bone density in patients with gonadal dysgenesis. **Fertil.Steril**, v.77, p. 571-575, 2002.

BERMUDEZ J.A; MORÁN C; HERRERA J; et al. Determination of the steroidogenic capacity in premature ovarian failure. **Fertil. Steril.** v.60, p. 668-671, 1993.

BERNE, R.M; LEVY M. Fisiologia, 4^o.ed. São Paulo: **Guanabara Koogan**, p.799-820, 2000.

BODANEZI J; NÁCUL A.P; SPRITZER P.M. Níveis de estradiol, gonadotrofinas, SDHEA e androstenediona em pacientes com falência ovariana prematura: comparação com pacientes pós-menopáusicas e controle na menacme. **Reprod.Climat.**, 12(supl.1), 1997.

BRADBURG T.J. Direct action of estrogen on the ovary of the immature rat. **Endocrinology**, v.68, p . 115, 1961.

BREThERICK K; HANNA C.W; CURRIE L.M; et al. Estrogen receptor a gene polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. **Fertility and Sterility**. v..89, n. 2, p. 318-324, 2008.

BURNS K.H; YAN C; KUMAR T.R; MATZUK M.M. Analysis of ovarian gene expression in follicle-stimulating hormone beta knockout mice. **Endocrinology** v.142, p. 2742–2751, 2001.

CALEBIRO D; DE FILIPPIS T; LUCCHI S; COVINO C; PANIGONE S; BECK-PECCOZ P; DUNLAP D; PERSANI L. Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. **Hum. Mol. Genet.** v.14, p. 2991–3002, 2005.

CANN C.E; MARTIN M.C; GENANT H.K; JAFFE R.B. Decreased spinal mineral content in amenorrheic women. **Jama**, v.251, p. 626-9, 1984.

CAULEY J.A; SEELEY D.G; et al., Estrogen replacement and fractures in older women: Study of Osteoporosis Fractures Research Group. **Ann Inter Med.** v.122, p. 9-16, 1995.

CENCI S; TORALDO G. et al. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN- gamma-induced class ii transactivator. **Proc.Natl Acad. Sci. Usa.** v.100, p. 10405-10410, 2003.

CHRISTIANSEN C; CHRISTIANSEN M.S et al., Prevention of early postmenopausal bone loss. Controlled 2-year study in 315 normal females. **Eur. J. Clin Invest.** v.10, p. 273-279, 1980.

CHRISTIANSEN M.S; HAGEN C, et al. Dose-response evaluation of cyclic estrogen/gestagen in postmenopausal women. Placebo-controlled trial of its gynecologic and metabolic actions. **Am J. obstet. Gynecol.** v144, p. 873-879, 1984.

CHRISTIANSEN C; LINDSAY.R. Estrogens, bone loss and preservation. **Osteoporosis Int.** v.1, p. 7-13, 1990.

COULAM C.B; ADAMSON S.C and ANNEGERS J.F. Incidence of premature ovarian failure. **Obstet Gynecol.**, v.67, p. 604-06, 1986.

CROSBY L.O; KAPLAN F.S; PERTSCHUK M.J and MULLEN J.L. The effect of anorexia nervosa on bone morphometry in young women. **Clin. Orthop.**.v.201, p. 271–277, 1985.

D'ALVA C.B; SERAFINI P; MOTTA E; LATRONICO A.C et al. FSH receptor polymorphisms and iatrogenic ovarian hyperstimulation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.90, p. 4978, 2005.

DANILOVICH N; BABU P.S; XING W; GERDES M. et al. Estrogen deficiency, obesity, and skeletal abnormalities in follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) female mice. **Endocrinology** v.141, p.4295–4308, 2000.

DAVIS S.R. Premature ovarian failure. **Maturitas**, v.23, p. 1-8,1996.

DE LAET C; KANIS J.A. et al, Body mass index as a predictor of fracture risk: A meta-analysis. **Osteoporos Int.** v.16, p. 1330-1338, 2005.

DEVLETA B; ADEM B and SENADA S. Hypergonadotropic amenorrhea and bone density: new approach to an old problem. **J. Bone Miner. Metab.** v.22, p. 360-364, 2004.

DOHERTY E; PAKARINEN P; TIITINEN A. et. al.. A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metabol.**, v.87, p.1151-55, 2002.

DRINKWATER B.L; BREUMNER B. and CHESTNUT, C. Menstrual history as a determinant of current bone density in athletes. **Jama** v.263, p.545–548, 1990.

DUNKEL L; TILLY J.L; SHIKONE T. et al., Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and the regulation by the opposing actions of transforming growth factors β and α . **Biol. Reprod.** v.50, p. 940-948, 1994.

ELIAS A.N; PANDIAN M.R; ROJAS F.J. Serum levels of androstenedione, testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in patients with premature ovarian failure to age-matched menstruating controls. **Gynecol. Obstet.invest.**, v.43, p.47-48, 1996.

ETTINGER B; PRESSMAN A; SKLARIN P. et al. Associations between low levels of serum estradiol, bone density, and fractures among elderly women: the study of osteoporosis fractures. **J Clin. Endocrinol Metab.** v.83, p. 2239-43, 1998.

ERICKSON G.F. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertil Steril.**, v.76, p. 943-49, 2001.

GAMBACCIANI, M, CAPPAGLI, B. et al., Ultra low-dose hormone replacement therapy and bone protection in postmenopausal women. **Maturitas**, v.59, p. 2-6, 2008.

GAO, J, TIWARI-PANDEY, R; et al., Altered Ovarian Function Affects Skeletal Homeostasis Independent of the actions of follicle-stimulating hormone. **Endocrinology** v.148, n. 6, p. 2613-2621, 2007.

GENANT H.K, CANN C.H, ETTINGER B, GORDAN G.S, Quantitative computed tomography of vertebral spongiosa: a sensitive method for detecting early bone loss after oophorectomy. **Ann Intern Med** v.97, p. 699-705, 1982.

GENANT H.K, et al., Universal standardization for dual x-ray absorptiometry: patient and phantom cross-calibration results. **J. Bone Miner Res.** v.9, p. 1503-1514, 1994.

GEUSENS P; DEQUEKER J; VERSTRAETEN A; NIJS J. Age, sex and menopause-related changes of vertebral and peripheral bone: population study using dual and single photon absorptiometry and radiogrammetry. **J Nucl Med** v.27, p. 1540-1549, 1986.

GOLDENBERG R.L; GRODIN J.M; RODBARD D. et al: Gonadotropins in women with amenorrhea. **Am J Obstet Gynecol.**, v116, p.1003, 1973.

GRISWOLD M.D; HECKERT L; LINDER C. The molecular biology of the FSH receptor. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v.53, p. 215-8, 1995.

GROMOLL J; DANKBAR B; GUDERMANN T. Characterization of the 5' flanking region of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. **Mol Cell Endocrinol.**, v.102, p. 93-102, 1994.

GROMOLL J; RIED T; HOLTGREVE-GREZ H. et. al. Localization of the human FSH receptor to chromosome 2 p21 using a genomic probe comprising exon 10. **J Mol Endocrinol.**v.12, p. 265-71, 1994.

HADJIDAKIS D; KOKKINAKIS E; SFAKIANAKIS M. The type and time of menopause as decisive factors for bone mass changes. **Eur. J. Clin. Investig.** v.29, p. 877-85,1999.

HAMMOND G.L. Access of reproductive steroids to target tissues. **Obstet Gynecol Clin North Am.**v.29, p.411-23, 2002.

HART S. Modulation of nuclear receptor dependent transcription. **Biol Res**, v.35, n.2, p.295-303, 2002.

HECKERT L.L; DALEY I.J; GRISWOLD MD. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. **Mol Endocrinol.**, v.6, p. 70-80, 1992.

HECKERT L.L; DAGGETT MA C.J. Multiple promoter elements contribute to activity of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene in testicular Sertoli cells. **Mol Endocrinol.**, v.12, p.1499-1512, 1998.

HOBEIKA J.D; PINTO-NETO A.M; PAIVA L.H. et al. A histectomia simples realizada no menacme e a densidade mineral óssea da mulher na pós-menopausa. **Cad. Saúde Pública**, v.18, n.6, p. 1705-1712, 2002.

HOECK A; SCHOEMAKER J; DREXHAGE H.A. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. **Endocrine reviews**, v.18, p.107-134, 1997.

HUHTANIEMI I.T. LH and FSH receptor mutations and their effects on puberty. **Horm. Res.** v.57 (Suppl. 2), p. 35–38, 2002.

IQBAL J; SUN L.I. et al. Follicle-stimulating hormone stimulates TNF production from immune cells to enhance osteoblast and osteoclast formation. **PNAS**. v.103, n.40, p. 14925-18930, 2006.

ISCD, Manual do Curso de Densitometria Clínica, pg 12-13, 2007.

KANNIS A.A et al. The diagnosis osteoporosis. **J Bone Miner Res.** v.9, p. 1137-1141, 1994.

KEEN R.W; KLLY P.J. Genetic factors in ostoporosis: what are the implications for prevention in treatment? **Drug aging**, v.11, p.333-7, 1997.

KELTON C.A; CHENG S.V.Y; NUGENT N.P; SCHWEICKHARDT R.L et al. The cloning of the human follicle-stimulating hormone receptor gene and it expression in COS-7, CHO, and Y-1 cells. **Mol Cell Endocrinol.**, v.89, p.141-51, 1992.

KIEL D.P; FELSON D.T. et al. Hip fracture and use of estrogen in postmenopausal women: the Framingham study. **N. Engl. J. Med.** v.317, p. 1169-1174, 1987..

KINCH R.A.H; PLUNKETT E.R. et al. Primary ovarian failure: a clinopathological and cytogenetic study. **Am. J Obstet. Gynecol.** v.91, p. 630-641, 1965.

KOHEK M.B.F; BATISTA M.C; RUSSELL A.J. 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.565-67, 1998.

KRITZ-SILVERSTEIN D; BARRET-CONNOR E.. Early menopause, number of reproductive years and bone mineral density in postmenopausal women. **Am J. Public Health**, v.83, p.983-8,1993.

KUMAR T.R. What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? **Reproduction** v.130, p. 293–302, 2005.

LEWIN S; GOUVEIA A; MARONE M.M.S. et al. Densidade mineral óssea vertebral e femoral de 724 mulheres brancas brasileiras: influência da idade e do peso corporal. **Ass. Med. Brasil**, v.43, n. 2, p. 127-136, 1997.

LINDSAY.R; HART D.M; FORREST C and BAIRD C.. Prevention of spinal osteoporosis in oophorectomized women. **Lancet**. v. 2, p.1151–1154, 1980.

LINDSAY.R. Hormones and bone health in postmenopausal women. **Endocrine** v.24, p. 223-230, 2004.

LUCKEY M.M; WALLENSTEIN S; LAPINSKI R. A prospective study of bone loss in African-American and white women - a clinical research center study. **J Clin Endocrinol Metab** v.81, p. 2948-2956., 1996.

MANOLAGA S.C; JILKA R.L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **Osteoporosis**. v.332, p 305-311, 1995.

MAUTALEN C; RUBIN Z; VEGA E; GHIRINGHELLI G; FROMM G. Densidad mineral de la columna lumbar y femur proximal em mujeres normales de Buenos Aires. **Medicina** v.50, p. 25-29, 1990.

MAZESS R.B; BARDEN H.S; ETTINGER M; JOHNSTON C et al. Spine and femur density using dual photon absorptiometry in US white women. **Bone Miner** v.2, n. 21 , p.219, 1987.

MEDURI G; BACHELTO A. et al. Molecular pathology of the FSH receptor: New insights into FSH physiology. **Mol. And Cell Endocrinology**, v.282, p. 130-142, 2008.

MYERSON M; GUTIN B; WARREN M.P; WANG J. et al. Bone density in amenorrheic runners. **Obstet Gynecol.** v.79, p. 973-978, 1992.

NELSON L.M; ANASTASI J.N; KIMZEY L.M. et. al. Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metabol.**, v.79, n.5, p.1470-7, 1994.

NHI-National Institutes of Health. Consensus Development Panel on Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. **Jama**, v.285, p. 785-795, 2001.

NORDIN B.E.C; NEED A.G. et al. The relative contributions of age and years since menopause to postmenopausal bone loss. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.70, p. 83-8, 1990.

OTHA H; SUGIMOTO I; MASUDA A. et al. Decreased bone mineral density associated with early menopause progress for at least ten years: cross sectional comparisons between early and normal menopausal women. **Bone**, v.18, p. 227-31, 1996.

OTT S.M. Attainment of peak bone mass. **J. Clin Endocrinol. Metabol**, v.71,p. 108-2AC,1990.

PEREZ M.M; GROMOLL J; BEHRE H.M. et. al. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.85, n.9, p.3365-9, 2000.

POCOCK N.A; EBERL S; EISMAN J.A; YEATES M.G; SAMBROOK P.N; et al.. Dual photon bone densitometry in normal Australian women: a cross-sectional study. **Med J Aust** v.146, p.293-297, 1987.

POUILLES J.M; TREMOLLIERES F. et al. Influence of early age at menopause on vertebral bone mass. **J. Bone miner res**, v.9, p. 311-5, 1994.

PRIOR J.C. Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition. **Endocrinol. Rev.** v.19, p. 397-428, 1998.

RECKER R.R; LAPPE J.M; DAVIES K.M. Changes in bone mass immediately before menopause. **J. Bone Miner Res** v.7, p. 857-862, 1992.

RIBOT C; PONLHES J.M; IBRAHIM A; LOUVER J.P. Measure de la densite osseuse vertebrale par absorptiometrie biphotonique dans un population menopause (abstract 11) **Presse Med** v.15, p.130, 1986.

RICHARDS, JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell development. **Recent Prog. Horm. Res.** v.32, p. 477-527, 1980.

RICHELSON L; WAHNER H; MELTON L; RIGGS L. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. **N Engl J Med** v.311, p.1273-t275, 1984.

RIGGS B.L; MELTON I.I; Involutional Osteoporosis. **New Engl. J Med.** v.314, p. 1676-86, 1986.

ROBKER R.L and RICHARDS J.S. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation vs differentiation. **Biol. Reprod.**, v.59, p. 476-482, 1998.

RODIN A; MURBY B; SMITH M.A. Premenopausal bone loss in the lumber spine and neck of femur: a study of 225 Caucasian women. **Bone** v.11, p.1-5, 1990.

ROGGIA C; GAO Y; CENCI S. Up-regulation of tnf-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa** v.98, p. 13960-13965, 2001.

ROUSSEAU-MERCK M.F; ARGER M; LOOSFELT H et al. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2 p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. **Genomics**, v.15, p.222-4, 1993.

SANTORO N. Mechanisms of premature ovarian failure. **Ann endocrinol.**, v.64, n.2, p: 87-92, 2003.

SHEVDE N.K; BENDOXEN A.C; DIENGER K.M and PIKE J.W. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. **Proc. Natl. Acd. Sci. USA**, v. 9, p. 7829-7834, 2000.

SIMONI M; NIESCHLAG E; GROMOLL J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. **Hum. Reprod. Update** v.8, n.5, p.413-21, 2002.

SLEMENDA C; HUI S.L; LONGCOPE C et al. Sex steroids and bone mass; a study of changes about the time of the menopause. **J Clin Invest.** v.80, p. 1261-9, 1987.

SLEMENDA C; LONGCOP C.E; PEACOCK M. Sex Steroids, Bone Mass, and Bone Loss: A Prospective Study of Pre-, Peri-, and Postmenopausal Women osteoporosis—its clinical features. **J Clin Invest.** v.97, p. 14-21, 1996.

SOWERS M.R; CLARK M.K; HOLLIS B; WALLACE R.B. et al. Radial bone mineral density in pre-and perimenopausal women: a prospective study of rates and risk factors for loss. **J. Bone Miner Res.** v.7, p. 647-657, 1992.

SRIVASTOVA S; TORALDO G; WEITZMANN M.N; CENCI S. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-Kappa B ligand (RANKL) – induced JNK activation. **J. Biol. Chem.** v.276, p. 8836-8840, 2001.

STEPAN J; POSPICHAL J; PRESL J; POCOVSKY V. Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. **Bone** v.8, p.279-284, 1987.

STEVENSON, JOHN C. Justification for use of HRT in the long-term prevention of osteoporosis. **Maturitas** v.51, p. 113-126, 2005.

SUDO S; KUDO M; WADA S; et. al. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. **Mol Hum Reprod.**, v.8, n.10, p. 893-9, 2002.

SUN L.; PENG Y. et al. FSH directly regulates bone mass. **Cell**, v.125, p. 247-260. 2006.

THEMMEN A.P.N; HUHTANIEMI I.T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. **Endocr. Rev.** v.21, p. 551–583, 2000.

THEMMEN A.P. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. **Reproduction** v.130, p. 263–274, 2005.

TILLY J.L, et al. Hormonal regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. **Endocrinology.** v.130, p. 1296-1302, 1992.

TOURAINÉ P; BEAU I; GOUGEON A. et. al. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. **Mol. Endocrinol.**, v.12, p.1844-54, 1999.

UYGUR D; SENGÜL O; BAYAR D. Bone loss in young women with premature ovarian failure. **Arch Gynecol. Obstet.** v.273, p.17-19, 2005.

VILODRE L.C, Mutações e polimorfismos do gene do receptor do hormônio foliculo estimulante e associação com falência ovariana prematura. **Tese Doutorado, UFRGS**, 2007_a.

VILODRE L.C; MORETTO M; KOHEK M.B; SPRITZER P.M. Falência ovariana prematura: aspectos atuais. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.51, n. 6, p. 920-929, 2007_b.

VILODRE L.C; KOHEK M.B; SPRITZER P.M. Screening of follicle-stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure in southern Brazil and associations with phenotype. **Endocrinol Invest** v.31, n.6, p. 552-557, 2008.

WHITNEY E; LAYMAN L; CHAN P. The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls. **Fertility and Sterility**, v.64, n. 3, p. 518-524, 1995.

WU Y; TORCHIA, J et al. Bone microenvironment specific roles of ITAM adapter signaling during bone remodeling induced by acute estrogen-deficiency. **PLoS One**. v.42, p. e586, 2007.

YARRAM S.J; PERRY M.J; CHRISTOPHER T.J et al Luteinising hormone receptor knockout (LuRKO) mice and transgenic human chorionic gonadotropin (hCG)-overexpressing mice (hCG alphabeta) have bone phenotypes. **Endocrinology** v.144, p.3555–3564, 2003.

YASUI T; UEMURA H. et al. Biological effects of HRT in relation to serum estradiol levels. **Horm Res**. v.56, p. 38-44, 2001.

WELT C.K, Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. **Clinical Endocrinology** v.68, p.499-509, 2008.

ZAIDI M; ALAM A.S; SHANKAR V.S; BAX B.E. et al., Cellular biology of bone resorption. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.** v.68, p. 197-264, 1993.

ZAIDI S; ZHU L; MALI R. et al. Regulation of FSH receptor promoter activation in the *osteoclast*. **Bioch. Biop. Res. Com.** v.361, p.910-915, 2007.