



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Avaluació de l'efecte de l'expansió del gen *FMR1* sobre la reserva ovàrica en dones joves portadores de la premutació

Inés Agustí Sunyer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

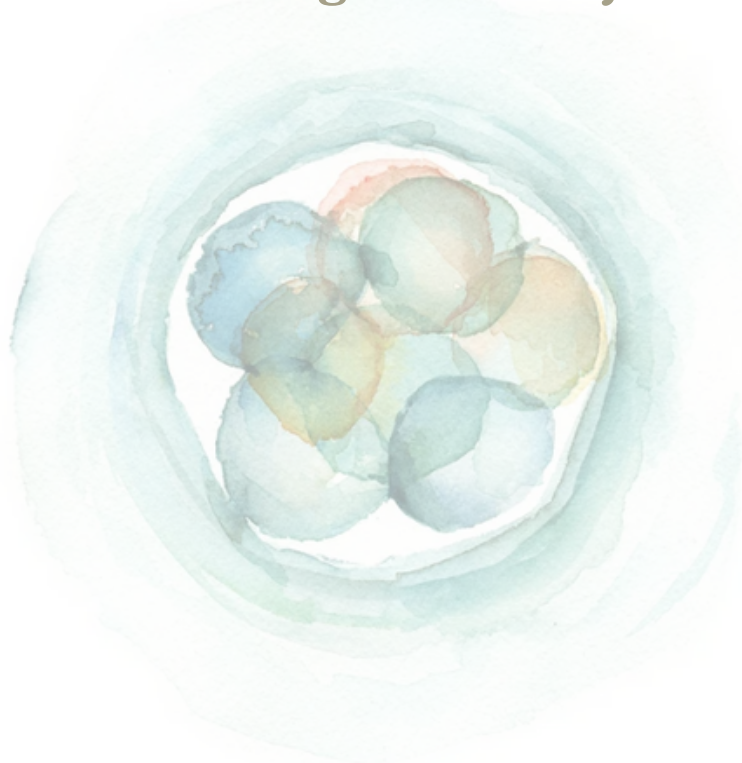
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi doctoral

AVALUACIÓ DE L'EFFECTE DE
L'EXPANSIÓ DEL GEN *FMR1* SOBRE
LA RESERVA OVÀRICA EN DONES
JOVES PORTADORES DE LA
PREMUTACIÓ

Inés Agustí Sunyer



Directores de tesi

Dra. M^a Dolors Manau Trullàs

Dra. Laia Rodríguez-Reventa Bodi



AVALUACIÓ DE L'EFECTE DE L'EXPANSIÓ DEL GEN *FMR1* SOBRE LA RESERVA OVÀRICA EN DONES JOVES PORTADORES DE LA PREMUTACIÓ

Memòria de tesi doctoral presentada per

Inés Agustí Sunyer

per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

Dirigida per:

Dra. Maria Dolors Manau Trullàs: Professor Metge Associat.
Universitat de Barcelona. Cap de secció Reproducció Humana
Assistida. ICGON. Hospital Clínic de Barcelona.

Dra. Laia Rodríguez-Revengea Bodi: Departament de
Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic de Barcelona.
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer
(IDIBAPS). CIBER de Malalties Rares, Institut de Salut Carlos
III, Madrid, Espanya

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional. Facultat de
Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona.

Març 2025

“Quien no sabe lo que busca, no entiende lo que encuentra”

Claude Bernard

Agraïments

Gràcies a tot l'equip de la Unitat de Reproducció Humana Assistida del Clínic: metges, biòlegs, infermeres i TCAEs. És un privilegi comptar amb un equip al teu costat que t'ajuda i t'acompanya en el camí. Moltes gràcies pels bons moments, i també pels no tan bons, perquè d'això es tracta: d'estar sempre, "a las bones i a les no tan bones."

Un especial agraïment també a totes les pacients que han participat en aquest estudi. La seva generositat i implicació han estat fonamentals per al desenvolupament d'aquesta tesi. Sense elles, aquest projecte no hauria estat possible. Gràcies per la seva confiança i col·laboració.

A les meves directores de tesi;

Laia, no ens coneixíem, fins que ens vam embarcar en aquest camí de la tesi. Sempre present quan ho he necessitat i ajudant-me amb els mil dubtes sobre genètica que tenia. Moltes gràcies per tot l'acompanyament aquests anys. Estic segura que realment, això es el començament de un camí molt més llarg de recerca en aquesta patologia.

Dolors, no estaria aquí si no fos per tu. Moltes gràcies per donar-me l'oportunitat de poder formar-me amb vosaltres i poder estar treballant amb un equip referent com és aquest. Encara m'enrecordo d'aquell dia que vaig anar al teu despatx al 2018, quan encara era resident i vaig picar la porta... "Hola Dra. Manau, jo sóc la Inés Agustí, m'agradaria fer la tesi amb vosaltres si fos possible". I fins aquí hem arribat, han passat ja uns quants anys, i espero que passin molts més! Sempre estaré agraïda per la oportunitat que em vas donar. ¡Moltes gràcies!

Gràcies a la meva família. Els meus pares, Álvaro i Gemma, i els meus germans, Álvaro i Belen. Tinc la gran sort de tenir una família unida i molt present sempre. M'han transmès els valors del sacrifici i de que la feina ben feta té sempre la seva recompensa. I que millor que avui per a que es demostrï això! Os quiero mucho, gran parte de esta tesis es gracias a vosotros.

I per últim, agrair al meu marit, en Marc. He tingut la gran sort de trobar-te. Ets una persona increïble amb una capacitat inimaginable. Acabes de llegir la teva tesi i ho has bordat (no en tenia cap dubte)! Ha estat una època dura i intensa, però també molt gratificant i emocionant, marcada per l'arribada de la nostra petita gran revolució: en Martí, que ens té el cor robat. Hem passat moltes estones parlant (entre migdiades del peque) del dia que els dos tinguéssim la tesi i a on ens aniríem de viatge per celebrar-ho. Doncs aquí estem, ho hem aconseguit, perquè som un equipàs! Us estimo moltíssim, UBUNTU.

Gràcies a tots els que heu format part d'aquest camí. Com deia Isaac Newton "Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes".

Finançament

Els estudi que conformen la present Tesi Doctoral han sigut finançats gràcies a:

- Beca Fundación Merck Salud 2019
- Instituto de Salud Carlos III (PI21/01085), co-finançat amb "Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)"

-

Índex

INTRODUCCIÓ	21
1. Gen <i>FMR1</i>	23
1.1 Trastorns associats a la premutació del gen <i>FMR1</i>	26
1.2 Mecanismes fisiopatològics	28
2. Insuficiència ovàrica prematura	34
2.1 Definició	34
2.2 Impacte en la dona i familiars	34
2.3 Causes genètiques d'insuficiència ovàrica prematura	35
2.4 Factors de risc per FXPOI	36
3. Baixa Reserva Ovàrica	39
3.1 Definició	39
3.2 Classificació	43
3.3 Causes genètiques de baixa reserva ovàrica	47
4. Maneig reproductiu de les dones portadores de la premutació a <i>FMR1</i>	48
4.1 Assessorament genètic pre-gestacional	48
4.2 Valoració reproductiva	50
4.2.1 Pacient amb desig genèsic amb bons marcadors de reserva ovàrica (dona no FXPOI)	51
4.2.2 Pacient amb desig genèsic amb MRO alterats (dona amb FXPOI).	55
4.2.3 Pacient sense desig genèsic	56
5. Rellevància i justificació de la Tesi	60

HIPÒTESI	75
OBJECTIUS	79
MATERIAL, MÈTODES & RESULTATS	83
Article 1	87
Article 2	99
Article 3	109
DISCUSSIÓ	123
CONCLUSIONS	141
BIBLIOGRAFIA	145

Glossari d'abreviatures

- **5'UTR:** Regió 5' no traduïda

A

- **ADN:** Àcid desoxiribonucleic
- **AGG:** adenina-guanina-guanina
- **AMH:** Hormona anti-Mülleriana
- **ARN:** Àcid ribonucleic
- **ARNInc:** ARN llarg no codificant
- **ARNm-expCGG:** ARN missatger amb tracte expandit de CGGs
- **ARNm:** ARN missatger
- **AUG:** Codó d'inici de la traducció de l'ARNm

B

- **BRCA:** Gen supressor de tumors, associat al càncer de mama i ovari
- **BRO:** Baixa reserva ovàrica

C

- **CGG:** Citosina-Guanina-Guanina
- **CPEB:** Proteïna d'unió al final poliadenilat de l'ARNm

D

- **DGCR8:** Proteïna de la regió crítica de la deleció del cromosoma 22q11
- **DGP-M:** Diagnòstic genètic pre-implantacional per malaltia monogènica.
- **Drosha:** Endonucleasa responsable del processament primari de miARNs

E

- **ESHRE:** Societat Europea de Reproducció Humana i Embriologia

F

- **FIV:** Fecundació in Vitro
- **FMR1:** Ribonucleoproteïna Missatgera X Fràgil 1
- **FMR4:** Ribonucleoproteïna Missatgera X Fràgil 4
- **FMR5:** Ribonucleoproteïna Missatgera X Fràgil 5
- **FMR6:** Ribonucleoproteïna Missatgera X Fràgil 6
- **FMRpolyA:** FMRpoliadenina
- **FMRpolyG:** FMRpoliglicina
- **FSH:** Hormona fol·licle-estimulant
- **FXAND:** *Fragile X premutation associated conditions*
- **FXPAC:** *Fragile X associated neuropsychiatric disorder*
- **FXPOI:** Insuficiència ovàrica prematura associada al X-fràgil
- **FXTAS:** Síndrome tremor/atàxia associat al X-fràgil

G

- **GWAS:** Estudis d'Associació del Genoma Sencer

H

- **hnRNP As/B1:** Ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies As/B1
- **HP1:** Proteïna heterocromàtica 1

I

- **Illa CpG:** Illa Citosina- fosfat-Guanina
- **IOP:** Insuficiència ovàrica prematura

K

- **KLOTHO**: Proteïna reguladora del metabolisme i de la longevitat.

L

- **LHCGR**: Receptor de l'hormona luteïntzant i de la gonadotropina coriònica

M

- **MBNL1**: Proteïna d'unió a motius de miotonia 1
- **miARN**: microARN
- **MRO**: Marcadors de reserva ovàrica

N

- **NGS**: Seqüenciació de nova generació
- **NR5A1**: Factor nuclear subfamília 5, grup A, membre 1

P

- **Pura**: Proteïna púrica alfa

R

- **RAN translation**: Traducció independent de codons d'inici
- **RFA**: Recompte fol·licles antrals
- **ROP**: Resposta ovàrica pobra

S

- **SXF**: Síndrome X-Fràgil

T

- **TBPL2**: Factor de transcripció TATA-Box-Binding Protein-Like 2.
- **TDH**: Dèficit d'atenció i hiperactivitat
- **TEA**: Trastorn del espectre autista
- **TGF- β** : Factor de creixement transformador beta
- **TRA**: Tècniques de reproducció assistida

Presentació

La present tesi s'estructura seguint la normativa per a tesis doctorals en format de compendi d'articles, per a l'obtenció del grau de Doctor en Medicina.

La tesi consta de quatre objectius i tres articles. Els projectes inclosos en aquesta tesi pertanyen a una mateixa línia de recerca, que ha conduït a la publicació de tres articles en revistes internacionals:

Article 1

Alvarez-Mora MI, **Agusti I**, Wijngaard R, Martinez-Barrios E, Barcos T, Borrás A, Peralta S, Guimera M, Goday A, Manau D, Rodriguez-Revenge L.

Evaluation of FMR4, FMR5 and FMR6 Expression Levels as Non-Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI). J Clin Med. 2022 Apr 14;11(8):2186. doi: 10.3390/jcm11082186. PMID: 35456280; PMCID: PMC9025681.

Estat: publicat. Factor d'impacte de la revista: 4.22, 1er quartil en Medicina

Article 2

Agusti I, Alvarez-Mora MI, Wijngaard R, Borrás A, Barcos T, Peralta S, Guimera M, Goday A, Manau D, Rodriguez-Revenga L.

Correlation of FMR4 expression levels to ovarian reserve markers in *FMR1* premutation carriers. J Ovarian Res. 2024 May 17;17(1):103. doi: 10.1186/s13048-024-01425-0. PMID: 38760837; PMCID: PMC11100203.

Estat: publicat. Factor d'impacte de la revista: 4.80, 1er quartil en Obstetricia i Ginecologia.

Article 3

Agustí I, Méndez M, Borrás A, Goday A, Guimerà M, Peralta S, Ribera L, Rodriguez-Revenga L, Manau D.

Prevalence of the *FMR1* Gene Premutation in Young Women with a Diminished Ovarian Reserve Included in an IVF Program: Implications for Clinical Practice. Genes. 2024; 15(8):1008. <https://doi.org/10.3390/genes15081008>

Estat: publicat. Factor d'impacte de la revista: 2.8, 2n quartil en Genètica.

INTRODUCCIÓ



1. Gen *FMR1*

El **gen *FMR1* o gen de la Ribonucleoproteïna Missatgera X Fràgil 1 (OMIM*309550)**, situat al braç llarg del cromosoma X (Xq27.3), conté una repetició de trinucleòtids citosina-guanina-guanina (CGG) a la regió 5' no traduïda (5'UTR) de l'exó 1. El gen *FMR1* comprèn 17 exons i 40 kb d'ADN genòmic. Transcriu un ARN missatger (ARNm) de 3,9 kb. La proteïna traduïda s'anomena FMRP (*Fragile X messenger ribonucleoprotein*) i és necessària des de les primeres etapes del desenvolupament fins al llarg de la vida (1). La proteïna FMRP és una proteïna d'unió a ARN àmpliament expressada que regula la traducció d'altres proteïnes. **FMRP s'expressa sobretot a neurones i cèl·lules de la granulosa**, amb un paper clau en la formació i funció de la sinapsis (2). En la població general el nombre de repeticions CGG és polimòrfic i es troba entre les 6 i 44 repeticions. En aquesta situació, l'illa CpG adjacent, que actua com a promotor, no està metilada, i per tant, el gen està actiu i hi ha síntesi de proteïna FMRP. Els al·lels que contenen entre 6 a 44 CGG es consideren normals i es mantenen estables quan es transmeten de generació en generació.

La segona classe d'al·lels dins del rang normal superior conté entre 45 a 54 repeticions CGG. Aquest rang, conegut com a zona gris, correspon als al·lels intermedis. Aquests poden ser estables o lleugerament inestables, sobretot si no presenten interrupcions del triplet adenina-guanina-guanina (AGG), i transmetre's a generacions posteriors amb la possibilitat d'expandir-se a un al·lel premutat. La freqüència d'al·lels intermedis a la població general varia d'1 de cada 35 a 1 de cada 57 individus (3).

Quan el nombre de repeticions CGG està entre 55 i 200, es parla d'al·lels premutats. En aquest estat, l'al·lel és inestable amb una tendència a incrementar la seva longitud en cada divisió cel·lular



i amb major risc d'expandir-se cap al rang de la mutació completa. En aquesta situació de premutació, el gen *FMR1* es transcriu ja que l'illa de CpG no està metilada. Per tant, **els portadors de la premutació en el gen *FMR1* tenen una síntesi normal o lleugerament reduïda de FMRP** i, per tant, són asimptomàtics per a la síndrome X fràgil (SXF; OMIM #300624), tot i que ens els darrers anys s'han associat diverses patologies (4). Els trastorns associats més coneguts són el síndrome de tremolor/atàxia associat a X fràgil (FXTAS; OMIM #300623) i la insuficiència ovàrica prematura associada a X fràgil (FXPOI; OMIM #311360) (5). La freqüència d'individus portadors d'una premutació a *FMR1* a la població general és d'aproximadament 1:850 per als homes i 1:257–300 per a les dones (6, 7). A les poblacions occidentals, la freqüència en dones oscil·la entre 1 de cada 151 a 1 de cada 259, tot i que hi ha proves de variabilitat ètnica i racial. A Israel, per exemple, la freqüència de la premutació és al voltant d'1 de cada 113 i a Taiwan d'1 de cada 837 (3, 8-10).

Per últim, quan el número de triplets CGG supera les 200 repeticions, es quan es defineix la mutació completa del gen. Davant d'aquesta situació, la regió promotora del gen *FMR1* es metila, el gen no es transcriu, donant lloc a l'absència de la proteïna FMRP i a les manifestacions clíniques característiques de la SXF. La SXF és la causa hereditària més freqüent de discapacitat intel·lectual i autisme (11). Les característiques clíniques inclouen discapacitat intel·lectual, trets facials característics amb orelles grans i mandíbula prominent, troballes de teixit conjuntiu (hipermobilitat articular), macroorquidisme després de la pubertat i anomalies del comportament (12). Al tractar-se d'un gen lligat al cromosoma X, tots els individus homes amb la mutació completa estan afectats de la síndrome, mentre que en dones i degut al fenomen de la inactivació del cromosoma X, entre un 30% a 50% presenten manifestacions



clíniques similars a les d'un home. La incidència de la SXF és d'aproximadament 1:4000 en homes i 1:8000 en dones (13).

Els diferents estats al·lèlics pel gen *FMR1* es troben representats en la Figura 1.

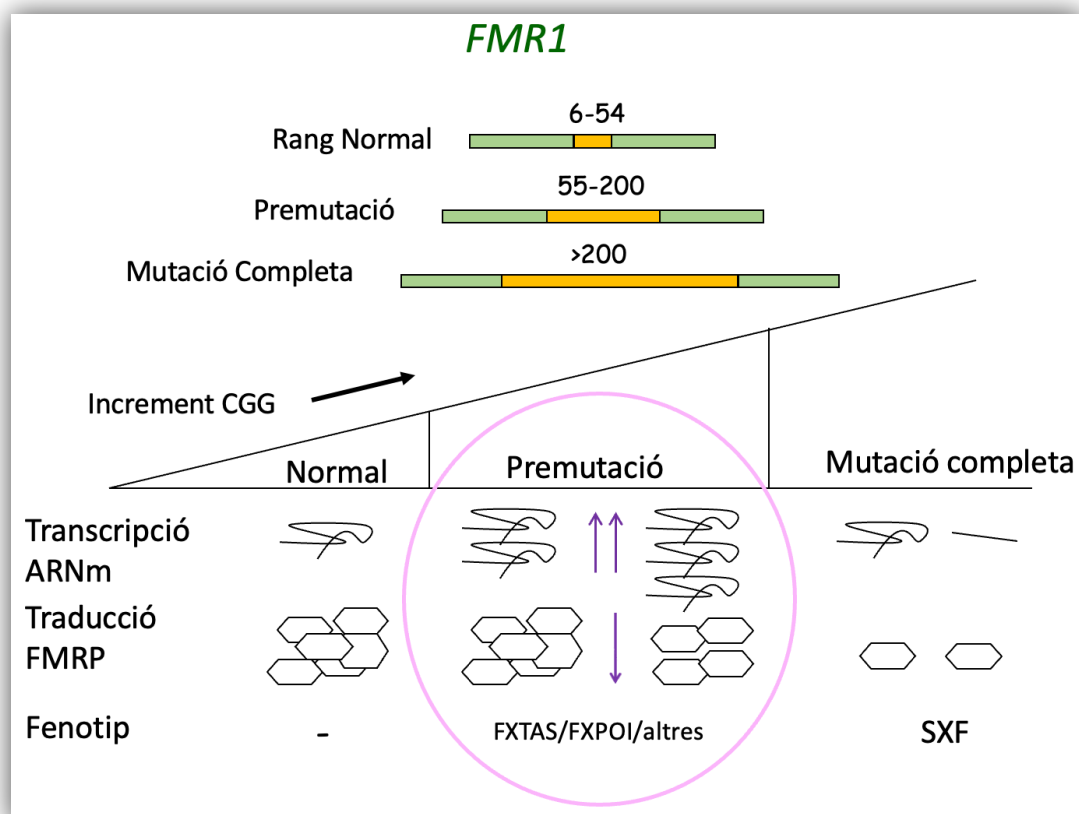


Figura 1. Distribució del gen *FMR1* segons el número de triplets CGG. ARNm: ARN missatger; FMRP: proteïna sintetitzada pel gen *FMR1*; FXTAS: Síndrome tremolor/atàxia associat al X fràgil, FXPOI: insuficiència ovàrica prematura associada al X fràgil; SXF: Síndrome X fràgil.



1.1 Trastorns associats a la premutació del gen *FMR1*

Tot i que històricament els portadors de la premutació a *FMR1* s'han considerat asimptomàtics al tenir un funcionament cognitiu normal, actualment diverses patologies s'associen als al·lels premutats. Els trastorns associats més coneguts són el FXTAS i l'FXPOI. A part d'aquestes dues condicions, també s'ha descrit que els portadors de la premutació a *FMR1* poden presentar una varietat d'altres problemes mèdics, com trastorns psiquiàtrics d'ansietat i depressió, trastorns del neurodesenvolupament o trastorn per dèficit d'atenció/hiperactivitat. Recentment s'ha proposat utilitzar el terme FXAND (*fragile X associated neuropsychiatric disorder*) per recollir i englobar tot aquest perfil neuropsiquiàtric (14). De manera similar, també es proposa el nom de **FXPAC** (*fragile X premutation associated conditions*) per referir-se a l'ampli espectre clínic que afecta als portadors de la premutació (15).

Totes aquestes patologies associades a la premutació mostren una penetrància reduïda, es a dir, que no tots els portadors de la premutació a *FMR1* desenvolupen aquests trastorns.

FXTAS és un trastorn neurodegeneratiu caracteritzat per atàxia cerebel·losa progressiva d'inici tardà i tremolor d'intenció. Els dèficits cognitius també són característics i inclouen problemes de memòria i dèficits de funció executiva que, en alguns individus, progressen a demència. L'edat d'inici del FXTAS és típicament entre 50 i 60 anys i, la seva incidència, al tractar-se d'una malaltia lligada al cromosoma X, és més alta en homes (40%) que en dones (16-20%) portadores de la premutació (5).



L'**FXPOI**, es defineix com la insuficiència ovàrica prematura (IOP) associada a la dona portadora de la premutació. Mentre que la IOP afecta al 1% de les dones de la població general, la incidència d'FXPOI entre les dones portadores de la premutació en el gen *FMR1* és del 16-24% (11, 16). Aquesta disfunció ovàrica condueix a la reducció o pèrdua de la fertilitat a una edat molt prematura. A més, el dèficit dels nivells d'estrogen en edats joves, comporta conseqüències clíniques addicionals com un augment en el risc de patir una baixa densitat òssia, osteoporosi prematura i fractures òssies, així com problemes coronaris i cardiovasculars que incrementen la mortalitat.

D'altra banda, el **FXAND** fa referència als problemes neuropsiquiàtrics que generalment ocorren a una edat més precoç que el FXTAS. Els trastorns neuropsiquiàtrics en nens amb la premutació inclouen ansietat, trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat (TDAH), dèficit social o trastorn del espectre autista (TEA). En adults, l'ansietat i la depressió són els problemes més comuns. Aquests problemes sovint es veuen agreujats per la fatiga crònica, el dolor crònic, la fibromiàlgia, els trastorns autoimmunes i els problemes del son, que també sembla s'associen amb una incidència superior entre els/les portadors/es de la premutació respecte a la població general (17) (Figura 2).

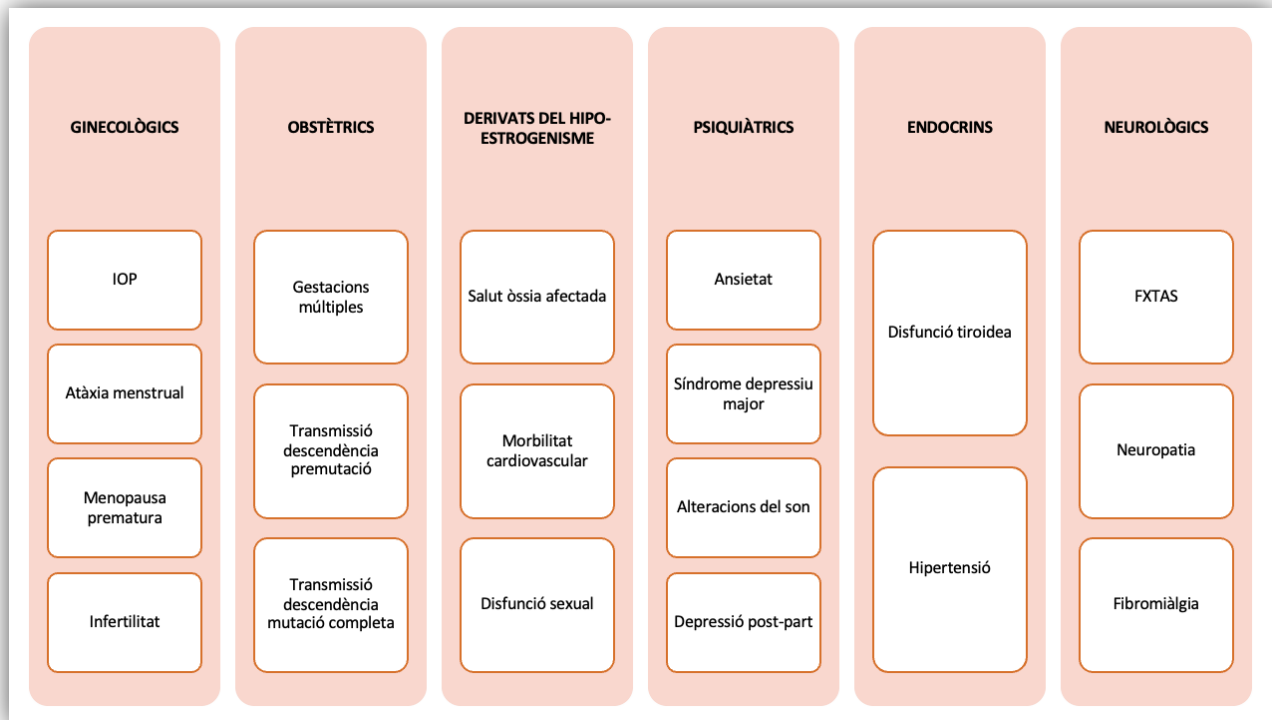


Figura 2. Trastorns associats a la premutació del gen *FMR1*. IOP: Insuficiència ovàrica prematura; FXTAS: Síndrome tremolor/atàxia associat al X fràgil; FXPOI: insuficiència ovàrica prematura.

1.2 Mecanismes fisiopatològics

Actualment sorgeix una interrogant important, i és per què el FXTAS i FXPOI es limita únicament a les persones portadores de la premutació i no a les que presenten una mutació completa. Hi ha varies teories publicades, en aquesta tesi remarcarem les que tenen més reconeixement.



1.2.1 Mecanisme de toxicitat per un guany de funció

Aquest model sorgeix de l'observació de **nivells incrementats d'ARNm del gen *FMR1* entre els portadors de la premutació (~2-8 vegades)** (18), i de la identificació d'inclusions ubiquitina-positives en mostres de teixit cerebral de pacients amb FXTAS (19).

Segons aquest model, l'ARNm amb tracte expandit de CGGs (ARNm-expCGG) és exportat des del nucli de la cèl·lula al citoplasma on la traducció es veu afectada, donant lloc a una reducció dels nivells de proteïna FMRP. Com a efecte compensatori, la transcripció d'*FMR1* s'incrementa i, conseqüentment, augmenten els nivells d'ARNm d'*FMR1* (20). Les cèl·lules, a través de la via de degradació de la ubiquitina-proteasoma, intentarien eliminar l'excés ARNm-expCGG i, al no ser possible, es formarien unes inclusions intranuclears que contindrien l'ARNm-expCGG. Aquest ARNm-expCGG, se sap que és capaç d'adoptar unes estructures secundàries, tipus forquilles d'ARN (21), que atrapen de forma no canònica proteïnes d'unió a l'ARN donant lloc a agregats proteics. El segrest d'aquestes proteïnes d'unió a l'ARN inhibiria les seves funcions normals, comprometent la integritat cel·lular i potencialment causant la mort cel·lular. És important tenir en compte que en aquest model, la toxicitat sorgeix com a resultat de la repetició CGG expandida, ja que la sobreexpressió de l'ARNm d'*FMR1* sense una expansió de repetició CGG no desencadena la mort cel·lular (22).

Gràcies al model murí de l'FXPOI, es creu que la premutació del gen *FMR1* no té efecte en la reserva de fol·licles primordials, ja que no es troben diferències en comparar el nombre de fol·licles o la mida ovàrica entre els ratolins que desenvoluparan FXPOI i els no afectats. No obstant això, el nombre de fol·licles madurs sí que es veu marcadament reduït, suggerint que la premutació podria actuar bloquejant el seu desenvolupament i/o incrementant l'apoptosi



d'aquests fol·licles (23, 24). En aquesta línia, s'han referit nivells incrementats d'ARNm del gen *FMR1* en l'ovari de ratolí i en cèl·lules de la granulosa de dones portadores de la premutació (24, 25). Totes aquestes dades donarien suport a aquest mecanisme de guany de funció (26) (Figura 3).

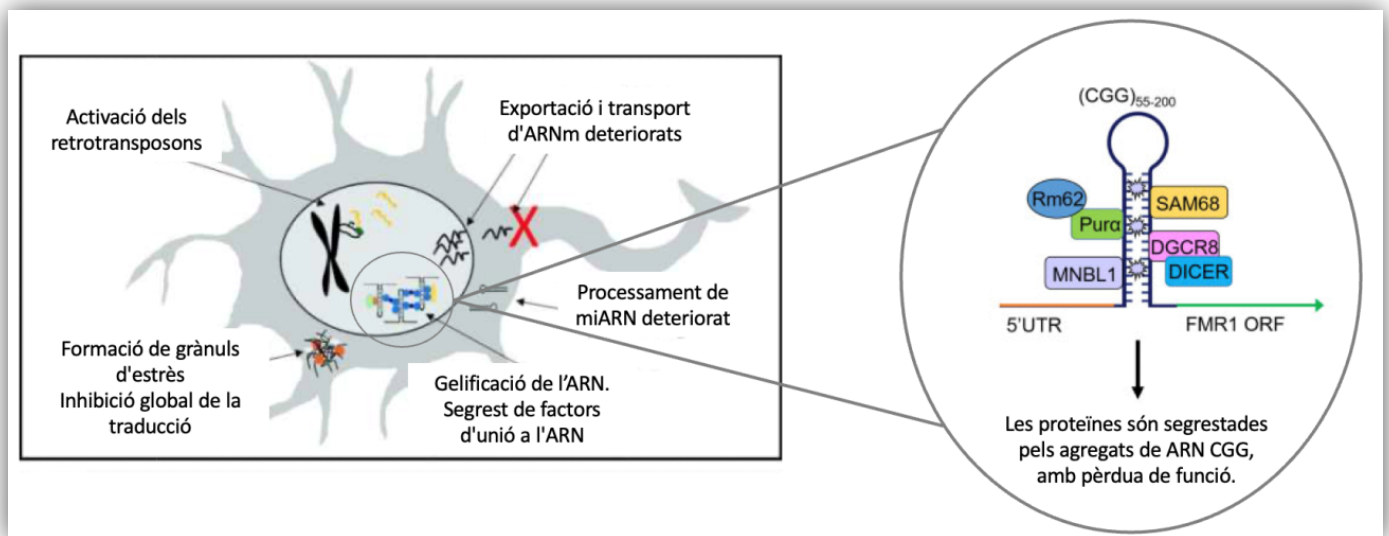


Figura 3. Mecanisme de guany de funció en trastorns associats al X-fràgil. miARN: microARN. Figura modificada de Glineburg et al., 2018 i Rosario et al., 2020 (27, 28).

La identificació de les proteïnes que s'uneixen i són segrestades per l'ARNm-expCGG dins de les inclusions intranuclears al cervell ha estat un pas important per entendre la contribució de la toxicitat de guany de funció de l'ARN a la patogènesi de FXTAS. Entre les proteïnes que s'han identificat unides a aquestes inclusions trobem proteïnes associades a la regulació de la transcripció (p.ex. hnRNP As/B1, Pura, MBNL1), de processament de miARNs (p.ex. DGCR8, Drosha) o manteniment de la cromatina (HP1). Tanmateix, tot i que es preveu



que aquestes també siguin rellevants en la patogènesi de l'FXPOI, encara no existeix una validació en models específics d'ovari. A més, tot i que s'espera un grau de superposició donats els paral·lelismes amb FXTAS, és probable que algunes proteïnes desregulades siguin específiques de les cèl·lules de la granulosa, per tant, la identificació d'aquestes dianes ovàriques serà essencial, ja que és probable que siguin clau per entendre el mecanisme de guany de funció en l'FXPOI. Finalment, el descobriment dels ARN llargs no codificants (ARNlnc) originats a partir del locus *FMR1* també recolza la teoria del guany de funció ARNm-expCGG com un dels els possibles mecanismes fisiopatològics subjacents a l'FXPOI. Per al locus *FMR1* es deriven 3 ARNlnc anomenats FMR4, FMR5 i FMR6 (Figura 4) (29, 30). Estudis previs han descrit diferents nivells d'expressió d'aquests ARNlnc entre portadors de premutació, suggerint una associació funcional amb els trastorns associats a la premutació (31).

Els ARNlnc es defineixen com a molècules d'ARN no traduïdes de més de 200 nucleòtids de longitud capaces de modular l'expressió gènica a través de diferents mecanismes (32). S'ha demostrat que els ARNlnc es poden detectar en alguns fluids corporals extracel·lulars com el plasma o l'orina i que mostren una alteració dinàmica en les malalties. Els ARNlnc poden ingressar al torrent sanguini encapsulats en exosomes i vesícules extracel·lulars o dins dels cossos apoptòtics, conferint-los estabilitat i resistència a la degradació per ARNases. Per tant, l'estabilitat que presenten en els principals fluids corporals juntament amb els patrons d'abundància específics de malaltia, fan que els ARNlnc estiguin despertant un enorme interès com una nova classe de biomarcadors de pronòstic i diagnòstic no invasiu.



Gen *FMR1*

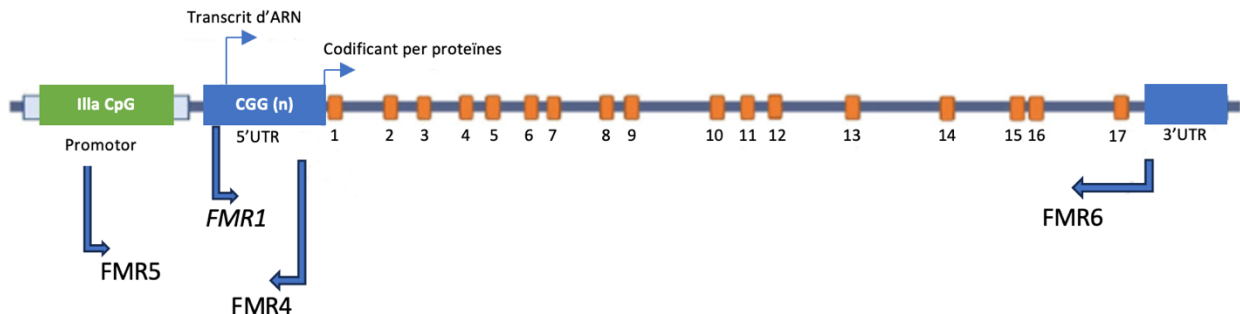


Figura 4. Representació esquemàtica dels diferents transcrits generats del locus del gen *FMR1*. Figura modificada de Malecki et al., 2020 (33).

1.2.2 Mecanisme de toxicitat de proteïnes transcrites mitjançant el procés de traducció no promogut pel codó d'inici AUG (*RAN-translation* o *Repeat-associated non-AUG translation*)

L'inici de la traducció és un procés molt complex que resumidament, requereix d'un assemblatge entre el ribosoma i el codó d'inici de traducció de l'ARNm (codó AUG). En malalties causades per l'expansió de triplets se sap que existeix un mecanisme de traducció no canònic que es dona com a conseqüència de la regió repetitiva. Aquest mecanisme, conegut com a *RAN translation*, no necessita del codó d'inici AUG i permet la producció de proteïnes homopolimèriques o dipèptides aberrants generades a partir de múltiples pautes de lectura de la mateixa repetició de nucleòtids. En el cas de FXTAS, l'any 2013 Todd i col·laboradors, van demostrar que la *RAN-translation* es produeix en el tracte CGG expandit de la premutació, donant lloc a FMRpolyG i FMRpolyA tant en cultius cel·lulars com en models animals de FXTAS i en teixit cerebral *postmortem* de pacients



FXTAS (34). Aquests mateixos autors també van veure que les proteïnes FMRpolyG s'agregaven i co-localitzaven amb les inclusions característiques que presenten els pacients (Figura 5). Tot i que això proporciona evidències que **l'expressió de la FMRpolyG podria estar relacionada amb les malalties associades a la premutació a *FMR1***, encara són necessàries més dades per establir, de manera concloent, que les inclusions d'FMRpolyG són una característica patològica d'FXPOI.

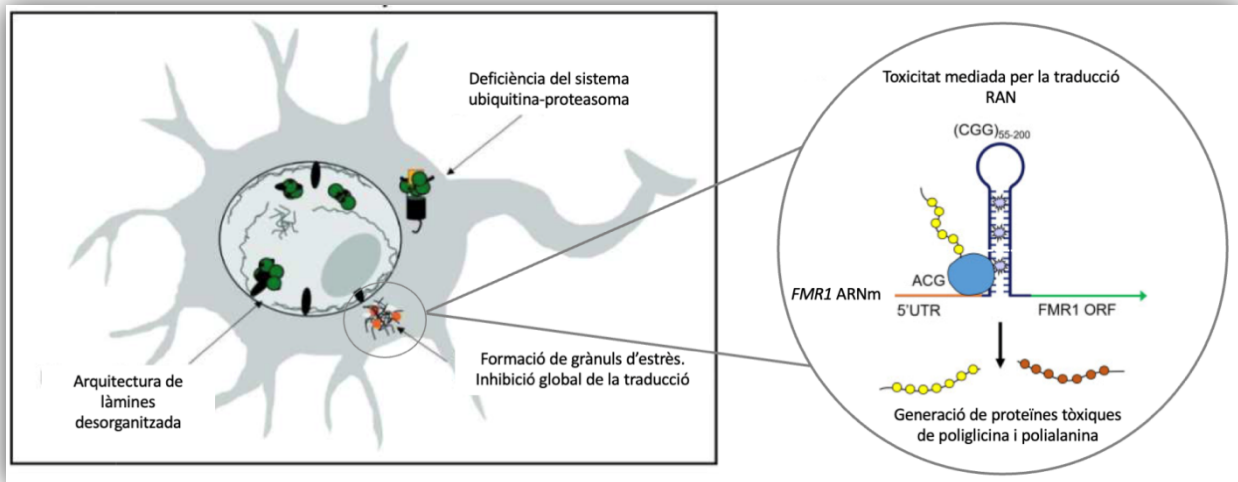


Figura 5. Tant l'ARNm amb repeticions CGG com els polipèptids derivats de la traducció RAN de CGG promouen la formació de grànuls de l'estrès, afectant la traducció global de proteïnes. ARNm: ARN missatger. Figura modificada de Glineburg et al., 2018 i Rosario et al., 2020 (27, 28).



2. Insuficiència ovàrica prematura

2.1 Definició

La definició de la IOP ha anat canviant al llarg del temps. Segons l'última actualització de la guia de la Societat Europea de Reproducció Humana i Embriologia (ESHRE), es defineixen com criteris diagnòstics de la IOP, la presència d'**oligo/amenorrea** durant almenys **4 mesos** i un nivell d'hormona fol·licle-estimulant (**FSH**) **per sobre de 25 UI/l** en dues ocasions separades per un mes en **dones menors de 40 anys**. Des d'un punt de vista estadístic, el límit d'edat de 40 anys és aproximadament dues desviacions estàndard per sota de l'edat habitual de la menopausa (50 ± 4 anys). Convencionalment, la menopausa que es produeix en el grup d'edat de 40 a 44 anys es coneix com a 'menopausa precoç'; tot i que, en alguns estudis, això pot incloure els 45 anys (35). La prevalença de la IOP és d'aproximadament de l'1% en població general i és una de les principals causes d'infertilitat. Un estudi al 2003, va identificar una menor prevalença de IOP en dones asiàtiques en comparació amb les hispàniques, afroamericanes o caucàsiques. Això podria reflectir tant factors genètics com no genètics (36).

2.2 Impacte en la dona i familiars

Quan una dona jove es troba en estat de fallida ovàrica (o transitant cap a ella), comporta una sèrie d'alteracions que poden condicionar la seva vida i la seva salut (tant física com mental). Entre els trastorns s'inclouen trastorns ginecològics com atàxia menstrual, menopausa prematura i infertilitat, i trastorns derivats del **hipoestrogenisme**. Quan s'estableix el fallida ovàrica ovàric, hi ha una hipoestrogenisme



associat degut a la falta de cicles menstruals. Això pot afectar a la salut òssia, augmentar la morbiditat cardiovascular i alterar-se la funció sexual.

El diagnòstic d'infertilitat va intrínsec al concepte de IOP, donat que es tracta d'una fallida ovàrica en una dona jove menor a 40 anys amb impossibilitat de poder recuperar cicles ovàrics i plantejar-se una gestació espontània o tècniques de reproducció assistida (TRA). En conseqüència, en el moment que la dona tingui desig gestacional, l'única possibilitat per aconseguir una gestació seria recórrer a una donació d'òvuls. Aquesta situació, pot tenir un **fort impacte psicològic en la dona i els familiars, afectant així la seva qualitat de vida.**

2.3 Causes genètiques d'insuficiència ovàrica prematura

La IOP es una condició clínica amb una **etiologia heterogènia** ja que pot ser causada tant per defectes genètics, com per malalties autoimmunes, factors iatrogènics (quimioteràpia o radioteràpia), infeccions víriques o toxines, alteracions metabòliques o pot romandre idiopàtica (37). L'etiologia genètica representa el 20-25% dels casos y entre els diferents defectes genètics, tant les anomalies cromosòmiques como alteracions monogèniques poden donar lloc a la IOP.

Les **anomalies cromosòmiques** són una causa ben establerta de IOP, i la seva freqüència és d'aproximadament 10-13% (38). Defectes que impliquen tot el cromosoma X o una part important, com la monosomia X (45,X; síndrome de Turner), formes mosaic (45,X/46,XX i 45,X/47,XXX), delecions del cromosoma X o translocacions entre el cromosoma X i un autosoma, s'associen amb IOP (37). La regió del braç llarg del cromosoma X que sembla ser



crítica per la IOP, s'estén de Xq13-Xq21 a Xq23-Xq27. L'avaluació d'aquests tipus d'alteracions cromosòmiques es pot realitzar mitjançant un cariotip per tècniques de citogenètica convencional.

Per altra banda, centenars de **gens** han estat implicats en l'etiologia de la IOP per la seva participació tant en processos biològics claus en l'ovari, com ara la meiosi i la reparació del dany a l'ADN, la recombinació homòloga, el desenvolupament fol·licular, la diferenciació i proliferació de cèl·lules de la granulosa i l'ovulació. En els darrers anys i gràcies a la implementació de tècniques moleculars d'alt rendiment com la seqüenciació massiva (NGS), s'ha ampliat molt el coneixement de la patogènesi de la IOP, amb aproximadament **90 gens associats, tant a formes aïllades com sindròmiques** (39).

Tot i això, la **causa monogènica coneguda més freqüent en la IOP és la premutació en el gen *FMR1*, representant el 4-6% dels casos** (40, 41). Aquest trastorn associat a la premutació es coneix amb el nom d'FXPOI.

Actualment, un procés diagnòstic típic de IOP a nivell genètic ha d'incloure un anàlisi per a la detecció de la premutació del gen *FMR1* (estudi de l'expansió del tracte CGG) i una prova de cariotip.

Donat que els casos de IOP associats a condicions genètiques no són freqüents, a vegades es diagnostiquen quan la fallida ovàrica ja està establerta, motiu pel qual les TRA (com per exemple la preservació de fertilitat o la fecundació in vitro (FIV)) no són aplicables.

2.4 Factors de risc per FXPOI

Com s'ha indicat anteriorment, hi ha un risc d'aproximadament 20 vegades major de que les dones portadores de la premutació presentin IOP. Per tant, identificar els factors de risc per predir l'inici



de l'FXPOI es essencial per a la salut de les dones. Al llarg dels anys s'han estudiat diferents aspectes moleculars que podrien estar associats amb el risc a desenvolupar FXPOI (Figura 6). Aspectes com l'origen patern de l'al·lel premutat (42), el número d'interrupcions AGG, els nivells d'expressió de l'ARNm d'*FMR1* o la inactivació del cromosoma X s'han estudiat sense arribar a obtenir resultats concloents (43, 44). Actualment, únicament la mida de l'expansió, l'hàbit del tabaquisme i els antecedents genètics es descriuen com a factors de risc ben documentats per a FXPOI.

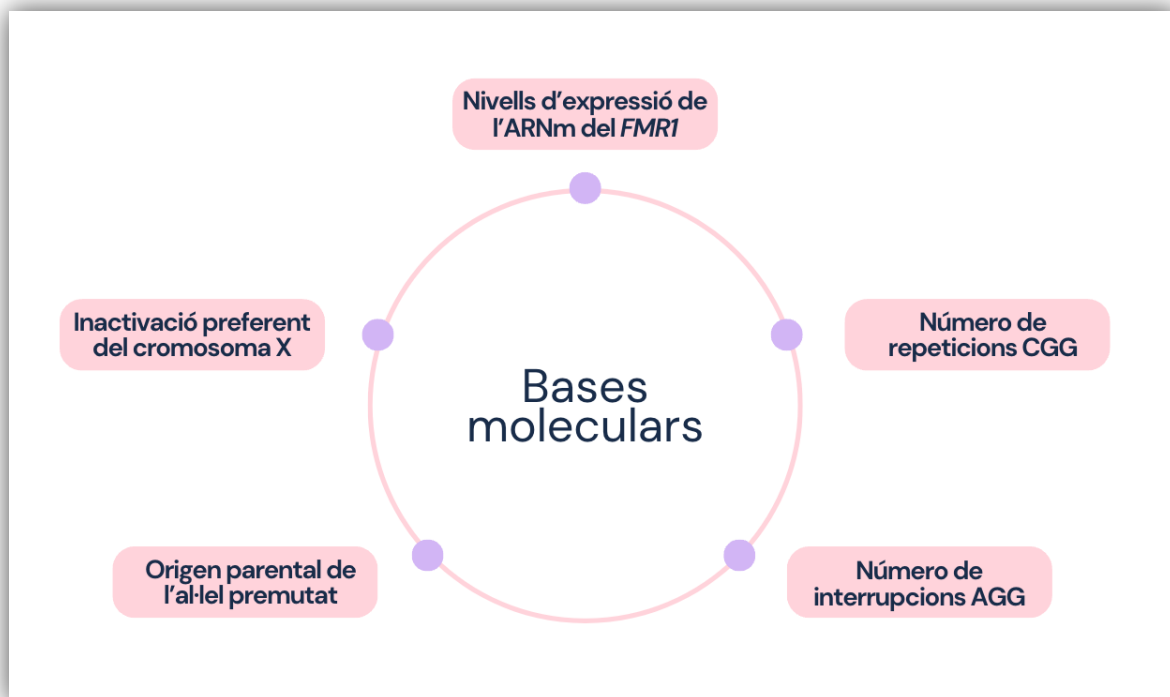


Figura 6. Bases moleculars proposades que podrien influir en el risc de desenvolupar FXPOI. AGG: adenina-guanina-guanina; ARNm: ARN missatger; CGG: citosina-guanina-guanina; FXPOI: insuficiència ovàrica prematura associada a l'X-fràgil.



2.4.1. La mida de l'expansió de CGG.

Pel que fa al nombre de repeticions CGG, s'ha demostrat una **correlació significativa entre el nombre de triplets i el risc de desenvolupar FXPOI**, encara que aquesta **relació no és lineal**, essent major el risc en aquelles dones amb al·lells compresos entre 80 i 99 repeticions CGG (45-48). En un estudi publicat per Allen i col·laboradors (45), es calcula en un 38% el risc a desenvolupar FXPOI en aquets grup de portadores d'alt risc amb expansions entre 80-99 CGGs.

2.4.2. Tabaquisme.

El **tabac** és un factor de risc modificable important, conegut per reduir l'edat de la menopausa en totes les dones, no només entre aquelles portadores de la premutació. A més, s'ha observat un **efecte dosi-resposta**, on l'impacte nociu del tabac augmenta proporcionalment amb l'exposició. L'efecte tòxic del tabac pot portar a la destrucció d'ovòcits primaris a nivell ovàric i accelerar el desenvolupament de la IOP. Els estudis en FXPOI han mostrat que fumar té el mateix efecte negatiu en les dones amb premutació que en les no portadores, amb un risc relatiu d'1.34 (45, 49).

2.4.3 Antecedents genètics.

L'edat mitjana de la menopausa entre els **familiars de primer grau** és un predictor significatiu de l'edat de la menopausa entre les dones portadores de la premutació (50, 51). Això dona suport a la hipòtesi que el risc d'FXPOI no només depèn del gen *FMR1*, sinó també d'altres factors genètics. S'han identificat diverses variants genètiques associades a l'edat de la menopausa en estudis GWAS



(*Genome-Wide Association Studies*) en la població general (52, 53), i molts gens també han estat identificats per NGS com a candidats per a FXPOI, tot i que només uns pocs han estat validats funcionalment (54).

3. **Baixa Reserva Ovàrica**

3.1 Definició

La baixa reserva ovàrica (BRO) és una condició en què l'ovari perd el seu potencial reproductiu normal i que es caracteritza per menstruacions regulars amb alteracions en els marcadors de reserva ovàrica (MRO). Pot existir una relació entre IOP i BRO formant part d'un mateix espectre, tot i que cal considerar aquestes dues condicions com a entitats separades (35).

El terme "reserva ovàrica" abasta tant la quantitat com la qualitat dels fol·licles primordials.

Al llarg del temps s'han proposat diferents MRO, com per exemple, els nivells de la hormona fol·licle-estimulant (FSH) produïda a la hipòfisi i els nivells d'estradiol (hormona produïda pels fol·licles). Actualment aquest marcadors estan en desús i en la pràctica clínica habitual, **els MRO establerts i normalitzats són els nivells d'hormona anti-mülleriana (AMH) i el recompte de fol·licles antrals (RFA)** (Figura 7).

L'AMH es una hormona que es produeix a nivell dels fol·licles petits (<10mm) de l'ovari i que reflecteix la quantitat d'òvuls que queden als ovaris. Actualment, es considera un nivell sèric d'AMH per sobre de 1.2 ng/mL un bon tall per valorar una reserva ovàrica normal.



Per altre banda, el recompte de fol·licles antrals (RFA) és el comptatge del nombre de fol·licles petits (2 a 9 mm) que es poden observar a les estructures antrals dels ovaris mitjançant una ecografia transvaginal al començament del cicle menstrual (Figura 8 i 9). Quan parlem d'una normo-reserva, esperem un RFA entre 7-10 comptant els dos ovaris.

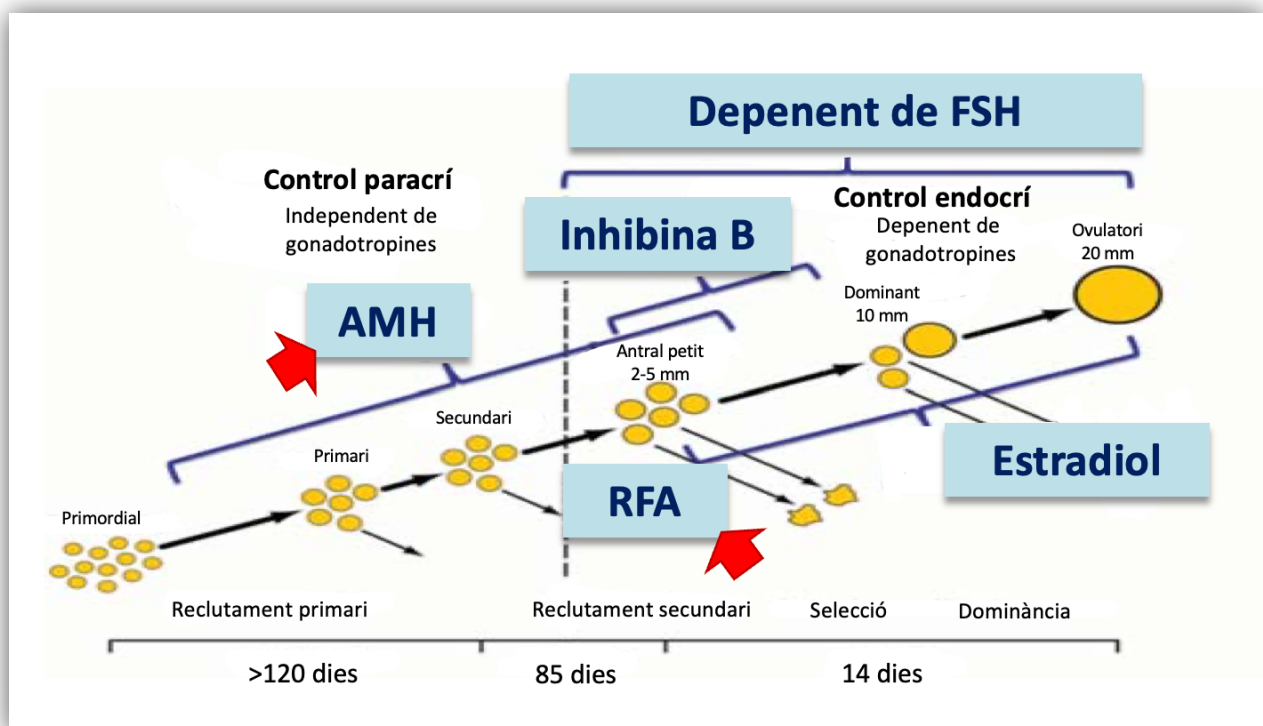


Figura 7. Possibles marcadors de reserva ovàrica proposats al llarg del temps. Amb la fletxa vermella s'assenyalen els marcadors que actualment es fan servir. RFA: recompte fol·licles antrals; AMH: Hormona anti-Mülleriana; FSH: Hormona fol·licle estimulant. Figura modificada de La Marca et al., 2009 (55).

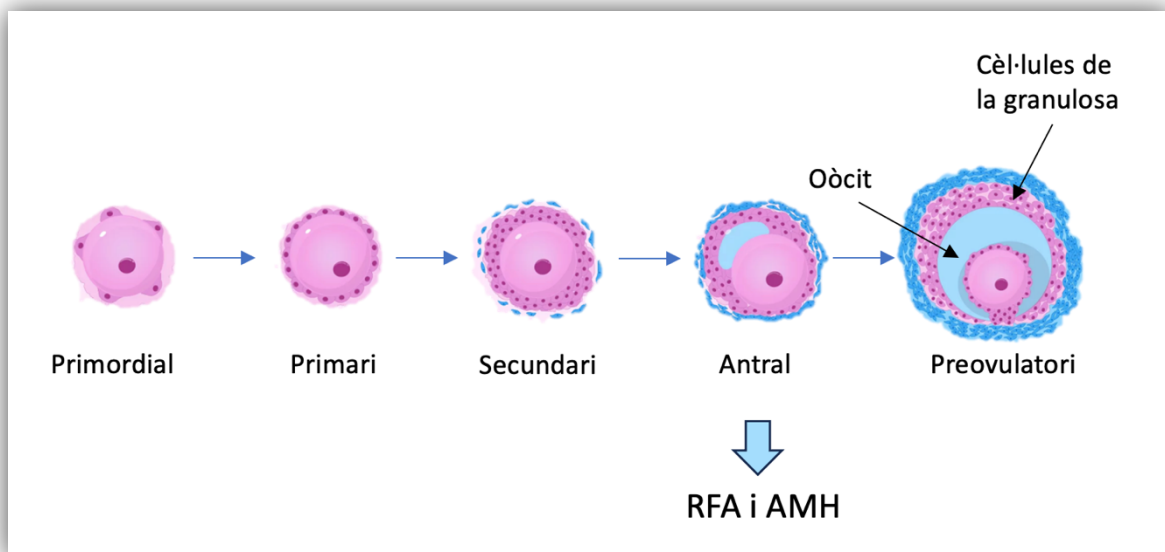


Figura 8. Desenvolupament d'un fol·licle ovàric durant el cicle menstrual. S'observen els diferents estadis pels que passarà fins l'ovulació. Quan estem a l'etapa antral, és quan es fa el recompte de fol·licles antrals. Aquests fol·licles tenen una mida entre 2-9 mm i són els responsables de la secreció d'hormona anti-Mülleriana. RFA: recompte fol·licles antrals; AMH: Hormona anti-Mülleriana

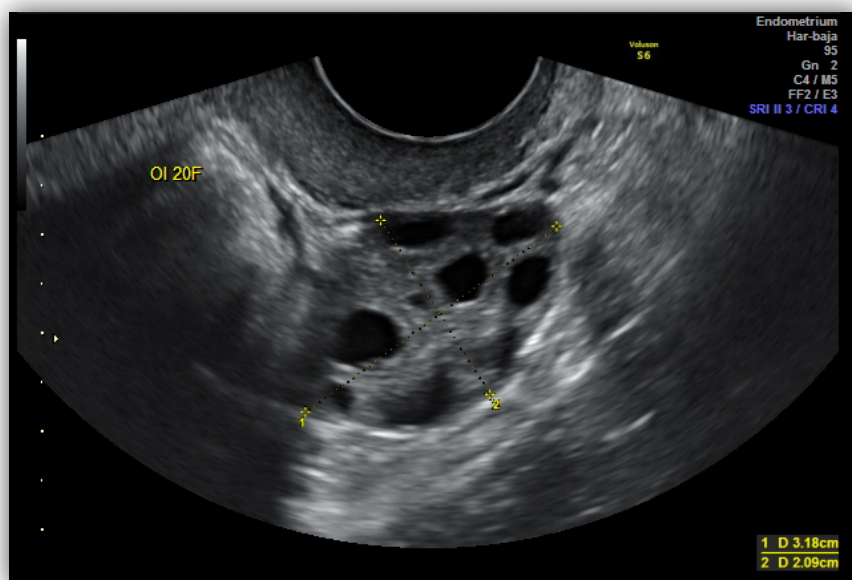


Figura 9. Imatge per ecografia transvaginal a l'inici del cicle ovàric per realitzar el recompte de fol·licles antrals.



No existeixen uns criteris establerts per la definició de BRO, i la definició ha evolucionat amb el temps, segons diferents criteris hormonals i de resposta a l'estimulació ovàrica.

Segons Streuli i col·laboradors, l'any 2009 es considerava BRO la dona amb cicles regulars o irregulars, nivells de FSH >10 IU/l, nivells d'AMH <7 pmol/L o una resposta pobre a l'estimulació ovàrica controlada (56). Més endavant, al 2011, Karimov *et al.*, definia els criteris amb nivells elevats de FSH (>10 IU/l) durant els dies 2-4 del cicle menstrual, després d'un test de citrat de clomifè o de forma aleatòria si els cicles eren irregulars. També es podia diagnosticar amb nivells elevats d'estradiol (>80 pg/ml) o amb una resposta pobre a la estimulació ovàrica, si hi havia menys de cinc fol·licles ≥ 12 mm després de tractament amb 450 UI diàries de gonadotropines (57).

El grup de Pastore *et al.*, al 2012 i posteriorment al 2017, definia la BRO amb nivells de FSH >10 mIU/mL durant els dies 2-5 del cicle, o >12 mIU/mL després de 5 dies de tractament amb 100 mg de citrat de clomifè, o per la presència de menys de 6 fol·licles antrals de 2-10 mm, en pacients de 42 anys amb cicles menstruals regulars durant els últims 6 mesos. També eren criteris, nivells baixos d'AMH per a la seva edat, o la presència de menys de 6 fol·licles antrals de 2-10 mm a l'ecografia ovàrica (58, 59). El grup espanyol de Barasoain (60) defineix la BRO en dones amb cicles irregulars i fecunditat reduïda, i nivells de FSH ≥ 10 IU/l. Segons Eslami *et al.*, es considera que pertanyen al grup BRO les pacients menors de 40 anys amb menys de tres oòcits després d'una estimulació convencional, amb un RFA inferior a 5-7, nivells de FSH >11 IU/l el tercer dia del cicle i cicles menstruals regulars durant els últims 6 mesos (61).



Finalment, en un metanàlisi recentment publicat defineix la BRO en dones amb cicles regulars o irregulars, nivells elevats de FSH (>10 IU/l), un RFA inferior a 5–7 (de 2–10 mm de diàmetre) o una resposta pobre a l'estimulació ovàrica controlada abans dels 40 anys (42).

Així, les definicions han anat evolucionant amb el temps, compartint criteris basats en nivells hormonals anòmals i una baixa resposta a l'estimulació ovàrica, amb algunes variacions en els llindars hormonals i altres factors diagnòstics.

3.2 Classificació

En les tècniques de reproducció és molt important definir les pacients en base als MRO i classificar-les per poder **personalitzar al màxim el protocol d'estimulació**, valorar proves complementàries i poder fer una bona valoració del cas i l'èxit reproductiu.

És per aquesta raó que al 2011, amb la **classificació de Bolonya**, es va fer el primer esforç per part de la comunitat científica d'estandarditzar la definició de la resposta ovàrica pobre (ROP) d'una manera simple i reproduïble. La ROP a l'estimulació generalment indica una reducció en la resposta fol·licular, resultant en un menor nombre d'òcits recuperats (62). Dels criteris diagnòstics següents, almenys dues de les següents tres característiques han d'estar presents:

- (i) Edat materna avançada (>40 anys) o qualsevol altre factor de risc per a resposta ovàrica subòptima;
- (ii) Cicle previ d'estimulació ovàrica amb menys de 3 òcits recuperats;
- (iii) Baixa reserva ovàrica ($AFC <7$ i/o $AMH <1.1$ ng/mL)



També seria un criteri classificatori dues estimulacions prèvies a dosis màximes amb menys de 3 oòcits recuperats tot i que no hi hagi una edat materna avançada o una alteració en els MRO.

Pocs anys després de la seva publicació va ser qüestionat el seu ús degut a que agrupava dones que diferien significativament en característiques biològiques. És important tenir en compte, no només el nombre d'oòcits recuperats, sinó també diverses característiques que poden influir en els resultats del tractament, com poden ser:

- 1) la taxa d'aneuploïdia embrionària/blastocística relacionada amb l'edat, que pot canviar dràsticament el pronòstic en dones amb el mateix nombre d'oòcits; i
- 2) la "sensibilitat" ovàrica a les gonadotropines exògenes, que podria estar relacionada amb un perfil genètic específic.

Es per això, que posteriorment, al 2016, es publiquen els **criteris de Poseidon** (63). Aquests proposen una nova definició de pacients amb "mal pronòstic" i tenen en compte diferents característiques clínicament rellevants que ajuden a guiar als metges en la gestió de les pacients. Per una banda introdueixen dues noves categories de resposta deficient:

- a) Una "resposta subòptima", definida com la recuperació de 4-9 oòcits, associada a una taxa de naixements vius significativament més baixa en comparació amb els pacients amb resposta normal (10-15 oòcits).
- b) Una "hiporesposta", en la qual es requereix una dosi més alta de gonadotropines i una estimulació més prolongada per obtenir un nombre adient d'oòcits (>3).



Per altre banda, es combinen paràmetres "qualitatius" i "quantitatius," com ara:

- a) L'edat de la pacient i la taxa esperada d'aneuploidia.
- b) Biomarcadors i marcadors funcionals (AMH i RFA).

De tal manera que les pacients es poden agrupar en 4 grups diferents de mal pronòstic, cadascun requerint algoritmes clínics basats en l'evidència que incloguin totes les estratègies possibles "abans, durant i després" de l'estimulació (Figura 10):

- Grup 1: Pacients <35 anys amb paràmetres suficients de reserva ovàrica (RFA ≥ 5 , AMH $\geq 1,2$ ng/mL) i amb una ROP o subòptima inesperada. Aquest grup es divideix alhora en 2 subgrups, en funció dels oòcits recuperats després d'una estimulació ovàrica estàndard i que s'associa a una taxa de naixement viu més baixa que les respostes normals corresponents a la mateixa edat :
 - Subgrup 1a: Pacients amb <4 oòcits recuperats.
 - Subgrup 1b: Pacients amb 4-9 oòcits recuperats.
- Grup 2: Pacients ≥ 35 anys amb paràmetres suficients de reserva ovàrica i una ROP o subòptima inesperada. De la mateixa manera que el grup 1, aquest grup es subdivideix en:
 - Subgrup 2a: Pacients amb <4 oòcits recuperats.
 - Subgrup 2b: Pacients amb 4-9 oòcits recuperats.
- Grup 3: Pacients <35 anys amb paràmetres de reserva ovàrica deficient (RFA <5, AMH <1,2 ng/mL).
- Grup 4: Pacients ≥ 35 anys amb paràmetres de reserva ovàrica deficient.



La proposta de classificació serveix com a guia per adaptar els protocols de tractament de manera individualitzada,

considerant, per exemple, l'ús de diferents règims d'analògics de GnRH, la detecció de polimorfismes en les gonadotropines i els seus receptors, l'ajust de la dosi inicial de FSH, la personalització de les dosis de gonadotropines (ja sigui amb FSH sola o amb fàrmacs que continguin LH), i l'avaluació de règims especials com l'acumulació d'oòcits o embrions per millorar els resultats. En aquest sentit, es proposa una nova mesura d'èxit del tractament basada en la capacitat de recuperar suficients oòcits per obtenir almenys un embrió euploide per a la transferència. Així, aquest nou concepte de mal pronòstic permet una millor gestió de les pacients que se sotmeten a TRA, afavoreix un tractament més personalitzat i facilita la identificació de poblacions més homogènies per als assaigs clínics, contribuint a optimitzar les taxes d'èxit de la FIV.

Tot i així, en alguns aspectes, aquesta classificació pot resultar insuficient per a determinats subgrups de pacients. Per exemple, en el subgrup de pacients Poseidon 4, es podria considerar la implementació sistemàtica de la selecció embrionària per identificar embrions euploides, atès l'elevat percentatge d'aneuploidies associat a l'edat materna avançada (>35 anys).

Pel que fa al subgrup Poseidon 3 (dones joves amb marcadors de reserva ovàrica baixos), aquest representa un repte clínic especialment complicat. En aquests casos, seria aconsellable incloure estudis complementaris, com l'anàlisi del gen *FMR1* (o altres gens relacionats amb la fallida ovàrica). Si el resultat fos positiu, es podria indicar la FIV amb selecció embrionària per evitar el naixement d'un fill afectat pel síndrome de l'X-fràgil.

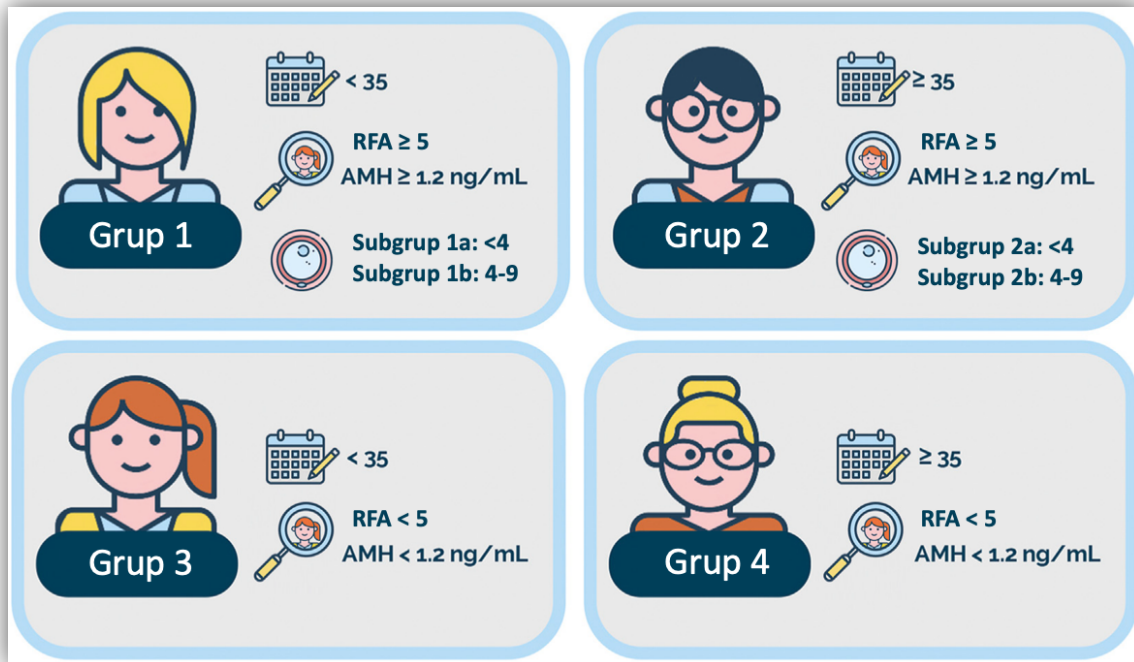


Figura 10. Els criteris Poseidon classifiquen els pacients amb mal pronòstic reproductiu en quatre grups diferents, basats en paràmetres quantitatius i qualitatius. Aquests criteris ajuden a valorar millor el pronòstic en tractaments de reproducció assistida. RFA: recompte fol·licles antrals; AMH: hormona anti-Mülleriana. Figura modificada de Esteves et al., 2022 (64).

3.3 Causes genètiques de baixa reserva ovàrica

Hi ha **diversos gens i proteïnes que s'han relacionat amb la BRO**, entre ells destaquen el gen *BRCA*, com a gen clau per reparar trencaments de doble cadena d'ADN; la superfamília del factor de creixement transformador- β (TGF- β) que té un paper important en la regulació del desenvolupament fol·licular; la proteïna de connexió de l'element de poliadenilació citoplasmàtica (CPEB), important en la maduració oocitària; el gen *KLOTHO*, relacionat amb l'envelliment saludable; el receptor de l'hormona luteinitzant/choriogonadotropina



(LHCGR) que està estretament associat amb la funció del cos luti i la regulació de les cèl·lules de la granulosa; la proteïna semblant a la proteïna de connexió de la caixa TATA2 (TBPL2) implicada en la regulació de l'expressió gènica i el membre 1 del grup A de la subfamília 5 dels receptors nuclears (NR5A1) que actua com a regulador transcripcional clau dels gens implicats en l'eix hipotàlem-hipofisari-esteroide (65).

En relació amb el gen *FMR1*, tot i que l'associació entre la premutació del gen *FMR1* i la fallida ovàrica està ben establerta, entre la premutació i la BRO és, avui en dia, un tema controvertit. Hi ha autors que defensen la idea d'una situació de BRO precedint l'FXPOI (66) i per tant, d'una associació entre la premutació i la BRO (42). En la literatura hi ha diversos estudis publicats en els que es descriu una major freqüència d'al·lels premutats entre les dones amb BRO que en els grups controls estudiats (42, 56, 57, 60). No obstant, és difícil extreure una conclusió definitiva de tots aquest estudis ja que els límits entre els rangs d'al·lels del gen *FMR1* establerts en cada treball varien, de la mateixa manera que també ho fan les poblacions control seleccionades.

4. Maneig reproductiu de les dones portadores de la premutació a *FMR1*

4.1 Assessorament genètic pre-gestacional

Un cop tenim diagnosticada la dona, és important un **exhaustiu assessorament genètic i reproductiu**.



És important tenir en compte que l'expansió d'un al·lel premutat a mutació completa (>200 CGGs), es produeix quasi exclusivament a

través de la meiosi femenina. Per tant, totes les filles d'un pare portador de la premutació seran portadores obligades, és a dir heretaran la premutació i mai la mutació completa.

Per altre banda, **en les dones, els al·lels premutats es comporten de manera inestable i tenen la capacitat d'expandir-se a una mida de CGG més gran o inclús d'arribar a la mutació completa en una sola generació.**

A mesura que passen les generacions, la probabilitat de que un tracte premutat transmès per via materna s'expandeixi fins la mutació completa va augmentant, arribant a ser un **risc del 100% en els casos de tractes CGG al voltant de les 100 repeticions** (67) .

És conegut que les **interrupcions AGG** intercalades dins la regió repetitiva de CGG fan una funció estabilitzadora del gen durant la transmissió (68).

Entre la població general, aproximadament el 95% dels al·lels tenen entre una o dues interrupcions AGG. Pel contrari, els al·lels premutats contenen poques o cap repetició del triplet AGG, de manera que el tram de CGG és llarg i ininterromput. Al 2015 es va publicar un estudi on es relacionava l'estabilitat del tram CGG amb el número d'interrupcions AGG, amb l'objectiu de calcular de manera més precisa el risc de transmissió completa en la següent generació (69).

Per tot això, aquest coneixement en la distribució d'AGG i el nombre de CGGs és clau en el moment de l'assessorament genètic a la pacient portadora de la premutació.



A la Taula 1, s'il·lustra el risc d'expansió dels al·lels premutats d'*FMR1* depenent de la mida de repeticions CGG i l'efecte de les interrupcions AGG (11).

REPETICIONS CGGs	RISC EXPANSIÓ AL·LEL PREMUTAT (%)			
	SENSE CONSIDERAR REPETICIONS AGS	INTERRUPCIIONS AGG		
		0	1	≥2
45-59	0.25	2.3	0	0
60-75	9.15	22.8	2.78	0
60-69	4	11.1	0	0
70-74	21.43	51.7	7.31	0
75-89	59.5	80.5	59	16
90-109	98.22	100	100	90.5
110-129	100	100	100	100
>130	100	100	No detectat	No detectat

Taula 1. Risc d'expansió dels al·lels *FMR1* depenent de la mida de repeticions CGG maternes i de l'efecte de la interrupció AGG (Taula modificada de Mila *et al.*, 2018 (11)).

4.2 Valoració reproductiva

Un cop realitzat l'assessorament genètic, es procedeix a l'avaluació de la reserva ovàrica en la consulta de reproducció assistida amb el MRO anteriorment esmentats (AMH i RFA) i la posterior classificació de la pacient segons els resultats de les proves.

En base a aquestes proves i tenint en compte el desig genèsic de la pacient, es personalitzarà el seu l'abordatge terapèutic.



A continuació plantegem diferents opcions reproductives en funció de l'escenari clínic.

4.2.1 Pacient amb desig genèsic amb bons marcadors de reserva ovàrica (dona no FXPOI)

A aquesta dona se li proposarà realitzar un cicle de FIV **amb selecció embrionària mitjançant diagnòstic genètic preimplantacional (DGP-M)**, amb l'objectiu d'evitar la transmissió de la malaltia de la SXF a la descendència.

En la Figura 11, podem observar els diferents estadis embrionaris:

- Dia 0 (d+0): correspon al dia de la punció fol·licular i extracció oocitària.
- Dia 1 (d+1): es poden observar signes de fecundació amb dos pronuclis (matern i patern).
- Dia 2 (d+2): divisió cel·lular de 2 a 4 cèl·lules (blastòmer).
- Dia 3 (d+3): 6-8 cèl·lules. Aquest dia es realitza la biòpsia per fer l'estudi genètic de la malaltia monogènica.
- Dia 4 (d+4): les cèl·lules es comencen a compactar i arriba a convertir-se en mòrula.
- Dia 5 (d+5): estadi de blastocist, amb una cavitat central (blastocel), una massa cel·lular interna (que esdevindrà el fetus) i una capa de cèl·lules externes (trofèctoderma, que formarà la placenta).

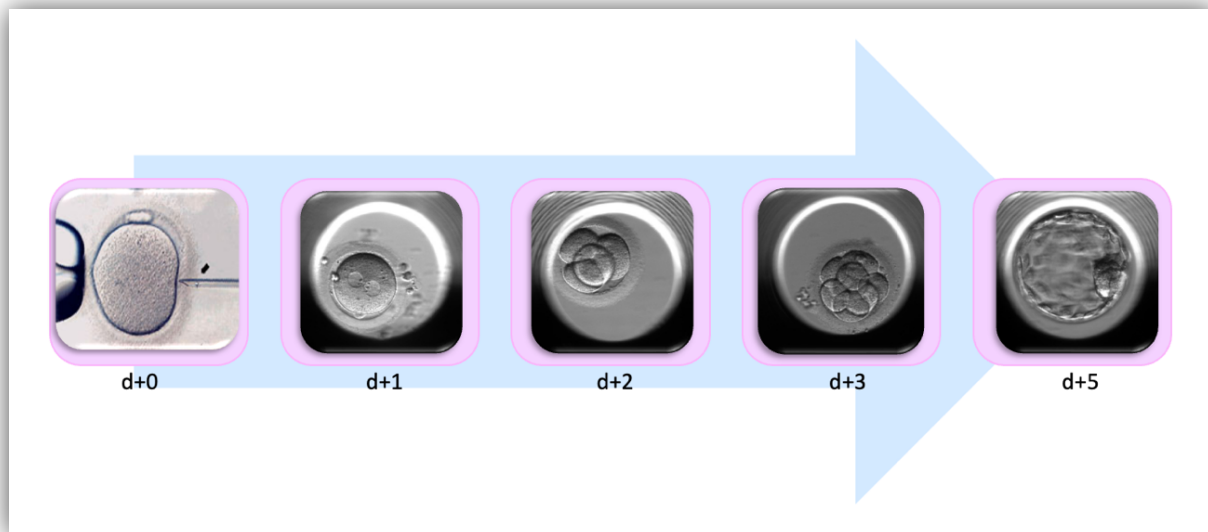


Figura 11. Procés de cultiu embrionari: s'observen els diferents estadis des del dia 0 (d+0) de vida embrionària (dia que es realitza l'extracció dels òvuls i es realitza la fertilització) fins el dia cinc (d+5). La biòpsia embrionària es pot realitzar a partir del dia tres de vida embrionària (d+3) per a dur a terme el diagnòstic genètic preimplantacional. En el cas que també s'hagi de fer un diagnòstic per aneuploïdies, aquesta biòpsia es realitzar en dia cinc de vida embrionària.

El DGP-M és una tècnica que a través d'un làser fa una excisió d'unes poques cèl·lules (blastòmeres) de cada un dels embrions obtinguts després de la FIV, permetent l'estudi genètic dels embrions i seleccionant aquells lliure de la malaltia (Figura 12). Els embrions sans es podran transferir a l'úter de la dona després del diagnòstic, i els restants de bona qualitat es podran vitrificar per al seu ús posterior.

El DGP-M destaca per la seva alta complexitat, ja que requereix d'un assessorament genètic adaptat a la pacient, confirmació de variants genètiques específiques (mutacions), una exhaustiva revisió del cas i l'adaptació de proves de laboratori, abans d'iniciar el cicle de FIV.



Durant la preparació i anàlisi de la prova, poden sorgir desafiaments tècnics únics, i la interpretació i gestió dels resultats del DGP-M solen ser complexes.

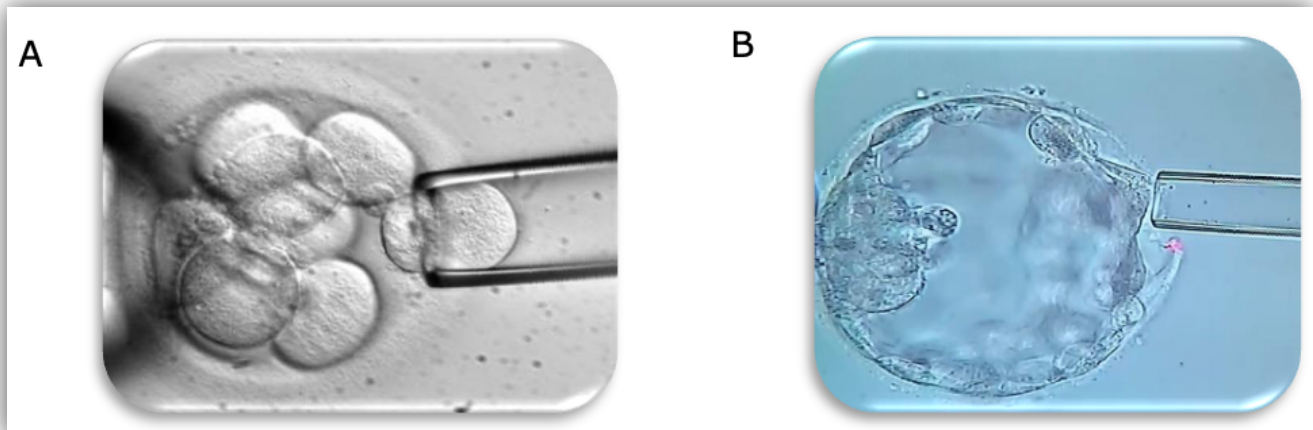


Figura 12. Imatges microscòpiques en el moment de fer la biòpsia per realitzar la tècnica de diagnòstic genètic preimplantacional. A) Biòpsia realitzada en dia 3 de vida embrionària; B) biòpsia realitzada en dia 5 de vida embrionària (estadi de blastocist).

En relació als resultats de les TRA en dones portadores de la premutació en el gen *FMR1*, hi ha pocs estudis publicats. En general, suggereixen una **resposta disminuïda a les gonadotropines exògenes durant l'estimulació ovàrica en el context de FIV** (70, 71). En l'estudi de Bibi *et al.*, van estudiar si existia una correlació entre número de repeticions CGG i número d'òcits recuperat. Els resultats posaven de manifest l'existència de un punt mínim de resposta ovàrica (menys òcits obtinguts) situat en les dones amb un número de repeticions entre 80-120 CGGs (72). Seguint la línia d'aquest article, un altre grup va publicar que aquesta reducció en la resposta ovàrica a l'estimulació podria ser deguda a



l'acumulació d'ARNm de *FMR1* a les cèl·lules de la granulosa de l'ovari (25).

Posteriorment, una revisió publicada al 2019, relacionant també els resultats de les TRA en relació al número de repeticions del triplet CGG del gen *FMR1*, descrivia que les pacient amb un número de repeticions en el rang de mutació completa (>200 triplets CGG) els resultats de la FIV no es diferenciaven dels de la població general (<45 triplets CGG), incloent-hi dosis de gonadotropines requerides, número d'òcits recuperats, evolució i qualitat embrionària i finalment taxa de gestació. En canvi, en dones amb la premutació descrivia un menor número d'òcits obtinguts i en conseqüència, una disminució en la taxa de gestació respecte a les dones sense la premutació o amb la mutació completa, tot i que les dades resultaven inconsistentes pel baix número d'estudis i casos reclutats (73).

Una altra opció que es pot plantejar a la pacient, quan aquesta no desitja realitzar una FIV amb PFT-M, i sempre i quan mantingui cicles ovàrics espontanis, seria la de la cerca gestacional espontània, realitzant posteriorment un diagnòstic prenatal mitjançant biòpsia de vellositats corials en les primeres setmanes d'embaràs (Figura 13).

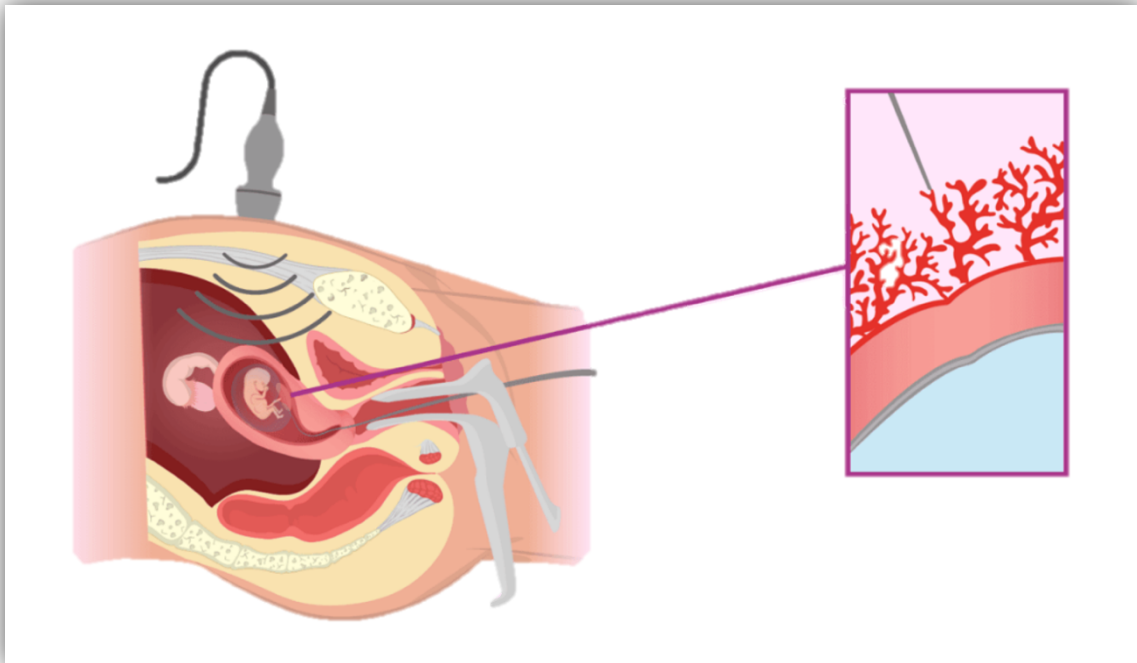


Figura 13. Representació d'una biòpsia corial, també coneguda com a biòpsia de les vellositats corials o biòpsia de còrion. Es realitza per via trans cervical i amb ajuda de la imatge d'un ecògraf per via abdominal. És una prova prenatal que es realitza per obtenir una petita mostra del còrion amb l'objectiu de fer un estudi i diagnosticar anomalies genètiques i cromosòmiques en el fetus.

4.2.2 Pacient amb desig genèsic amb MRO alterats (dona amb FXPOI).

En cas d'objectivar ja un estadi de fallida ovàrica ovàric, una alternativa que es pot valorar es dur a terme un **cicle de FIV amb recepció d'òocits de donant** (74, 75). Una vegada complert el desig genèsic de la pacient i des del punt de vista endocrinològic, s'hauria de proposar tractament hormonal substitutiu a llarg termini.



Pel que fa als resultats obstètrics i perinatals, els estudis publicats mostren ser similars entre les poblacions de dones premutades i població general, sense que s'hagin descrit riscos obstètrics addicionals fins a la data (76).

4.2.3 Pacient sense desig genèsic

Quan la pacient, en el moment del diagnòstic, ens comuniqui que no té desig reproductiu en aquell període de la seva vida, es podria plantejar un **seguiment periòdic dels MRO**. Aquest tema és controvertit, donada la falta d'evidència científica disponible, tant pel que fa al perfil de pacient candidata, com a la periodicitat del seguiment.

El que es proposa es fer un seguiment dels nivells d'AMH i el RFA, amb l'objecti d'identificar de manera precoç, la pèrdua accelerada de fol·licles i per tant, posant en risc a la pacient a desenvolupar un fallida ovàrica prematura (77). En el moment que s'observa que els nivells d'AMH disminueixin a una velocitat no fisiològica o en el cas de dones amb edat superior de 30 anys sense desig genèsic i amb MRO alterats, s'hauria de plantejar la possibilitat de realitzar tècniques de preservació de la fertilitat.

Actualment es proposen dues tècniques de preservació de la fertilitat diferents: la criopreservació d'òcits i la criopreservació de teixit ovàric. L'elecció d'una tècnica sobre l'altra depèn principalment de l'edat i l'estat puberal de la pacient, així com de circumstàncies personals i mèdiques.

a) Criopreservació d'òcits:

Es considera **la tècnica establerta i d'elecció en aquests casos**, ja que ofereix els millors resultats en dones adultes amb malalties



benignes, genètiques o pacients amb càncer la teràpia del qual es pugui posposar. També és la tècnica escollida per aquelles dones que desitgen preservar la seva fertilitat per raons personals o socials.

Els estudis publicats assenyalen una forta correlació entre l'èxit de la tècnica i l'edat en què es realitza, establint un llindar clau als 35

anys. Un altre factor crucial per a les taxes acumulades de naixements vius és el nombre d'òcits recuperats, amb un rang òptim situat entre 10 i 15 (78). Un estudi del 2016 va revelar que la taxa acumulada de naixements vius amb 10 òcits era el doble en dones menors de 35 anys (60,5%) en comparació amb les dones de més edat (29,7%) (79). Així doncs, per aquest motiu, és crucial garantir una ràpida derivació i un assessorament reproductiu adequat.(80).

Aquestes mesures permetran tenir una major probabilitat d'obtenir embrions sans i una taxa de gestació més alta, un escenari especialment rellevant en aquestes pacients en les quals es requereix la realització de DGP-M (71).

b) Criopreservació de teixit ovàric:

Aquesta **tècnica** és una **alternativa** i, actualment, no es considera la d'elecció en aquests casos. No obstant això, és la més adequada per a nenes prepuberals i per a dones el tractament de les quals no es pot endarrerir, com en casos d'inici imminent de quimioteràpia. El seu principal avantatge és que permet preservar un gran nombre de fol·licles en una sola intervenció, sense necessitat d'estimulació hormonal. Tot i així, continua sent considerada una tècnica experimental segons la guia de Preservació de la Fertilitat de l'ESHRE (81-84).

En situacions on sigui necessari aplicar aquesta tècnica, és essencial tenir en compte l'edat de la dona. Segons la literatura, l'edat mitjana



de les dones que van aconseguir gestació després de la reimplantació de teixit ovàric era significativament més baixa que en aquelles que no ho van aconseguir, establint-se un límit superior d'edat als 35 anys (85). Pel que fa a la funció ovàrica, es recupera en el 95% dels casos entre tres mesos i mig i sis mesos i mig després de la intervenció —el temps necessari perquè es reprengui la foliculogènesi—, i la durada mitjana de l'empelt és d'entre quatre i cinc anys (86).

Per tant, per concloure aquest apartat, el maneig reproductiu de la dona amb la premutació del gen *FMR1* dependrà del seu desig genèsic en el moment del diagnòstic. La Figura 14 planteja l'algoritme proposat basat en el desig gestacional de la pacient.

És important tenir present que la infertilitat relacionada amb la IOP té un impacte negatiu important en la qualitat de vida de les dones, per la qual cosa és essencial oferir tècniques de preservació de la fertilitat abans que es desenvolupi la fallida ovàrica, amb **l'objectiu de tenir una descendència sana i complir amb el projecte reproductiu de la dona en tots els casos.**

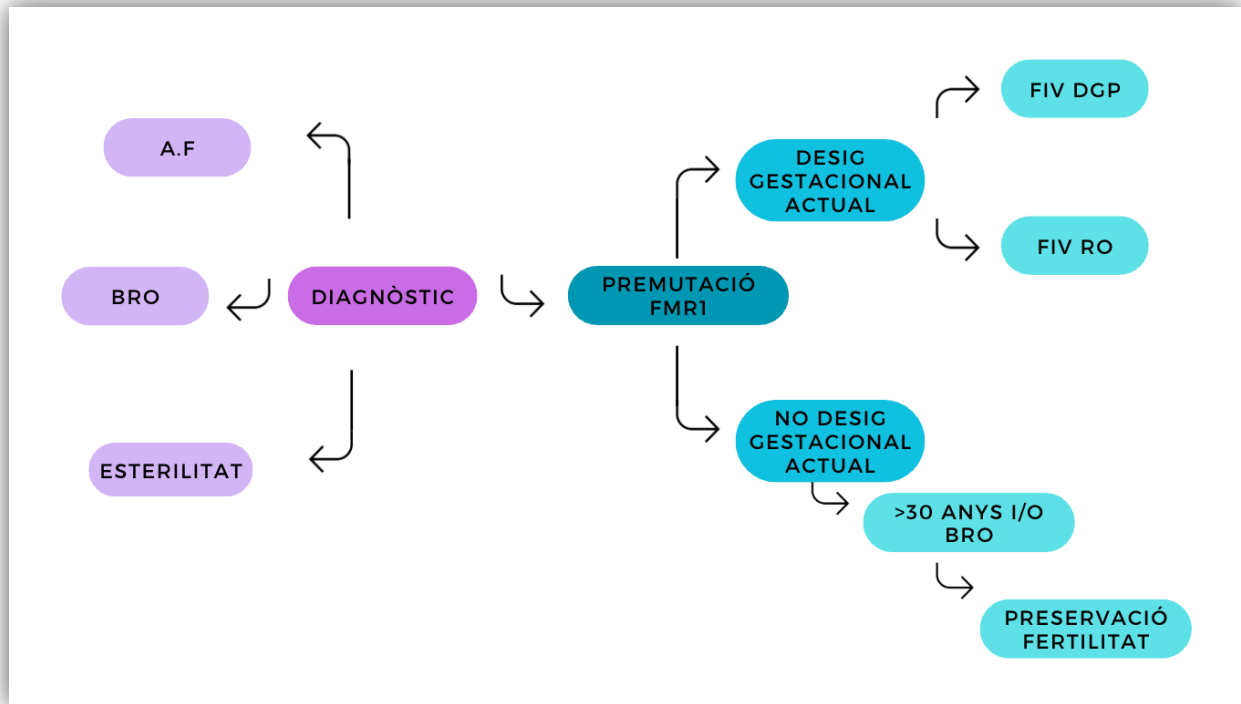


Figura 14. Algoritme per al maneig de les pacients amb la premutació. A.F: Antecedents familiars; BRO: Baixa reserva ovàrica; FIV DGP: Fecundació in Vitro amb diagnòstic genètic pre-implantacional; FIV RO: Fecundació in Vitro amb recepció d'oòcits.



5. Rellevància i justificació de la Tesi

La premutació del gen *FMR1* afecta a 1 de cada 150/300 dones de la població general. Tot i que no disposem de registres a nivell de l'estat espanyol, inferim que aproximadament 80.000 dones a Espanya són portadores de la premutació a *FMR1*. Durant la seva vida reproductiva aproximadament un 20% d'aquestes dones desenvoluparan una IOP (coneguda amb el nom d'FXPOI).

No obstant això, la caracterització de les bases moleculars d'aquesta condició ha estat poc investigada, i encara desconeixem tant el paper que juga el gen *FMR1* en la funció ovàrica com les vies moleculars implicades en el desenvolupament de l'FXPOI. Actualment, no disposem de cap biomarcador que permeti predir quines pacients tenen un risc més elevat de desenvolupar aquesta patologia. Aquest ha estat l'objectiu dels **articles 1 i 2**, en els quals hem estudiat diversos ARNlnc (*FMR4*, *FMR5* i *FMR6*) que podrien actuar com a possibles biomarcadors. Per tant, un dels àmbits principals d'aquesta tesi és **ampliar el coneixement sobre la fisiopatologia associada a la premutació del gen *FMR1***.

La deficiència prematura d'estrògens és una conseqüència de l'FXPOI i els símptomes d'aquesta inclouen fogots, suors nocturns, sequedat vaginal i dolor a les relacions sexuals. La deficiència d'estrògens també provoca una densitat mineral òssia reduïda, osteoporosi, un major risc de malaltia cardiovascular i de demència. A més s'ha de tenir també present, l'impacte psicològic que suposa el diagnòstic de premutació en la dona i la seva associació amb la fallida ovàrica, infertilitat i risc de transmissió a la seva descendència (tant de transmissió de la premutació com la de mutació completa). És per aquesta raó, que el maneig reproductiu d'aquesta pacient és realment important. En la present tesi, en centrem en dos tipus de població en



reproducció assistida ben definits. Per una banda, la població de dones que ja han desenvolupat una fallida ovàrica. En aquesta població en centrem en la recerca d'un biomarcadors que ens ajudi a **predir i avançar-nos a l'FXPOI**, evitant així, la necessitat de recorre a donació d'òvuls quan la pacient tingui desig gestacional. I per l'altre banda, la població amb baixa reserva ovàrica. Sabem que és una població amb problemes de fertilitat associats, que necessitaran tècniques de reproducció assistida (**article 3**) i que el resultat d'aquestes seran subòptimes degut a la resposta a l'estimulació ovàrica i la qualitat oocitària. Millorant el maneig d'aquestes pacients, **optimitzarem el cicle de FIV** millorant la resposta i tenint la possibilitat de seleccionar els embrions, **evitant d'aquesta manera el naixement d'un nadó afecte**.

Amb l'objectiu de situar aquesta investigació en el seu context científic, s'ha considerat rellevant realitzar una revisió de la literatura existent sobre els aspectes clau relacionats amb el tema. Aquesta revisió no forma part dels estudis principals de la tesi, però proporciona una visió general que contribueix a entendre millor la complexitat de la insuficiència ovàrica prematura associada a la premutació del gen *FMR1*.

Sota el títol: *"Manejo reproductivo de las mujeres con la premutación del FMR1. Revisión de la literatura"*, aquest article aborda les principals teories fisiopatològiques, les dificultats en la predicció de l'afectació i les recomanacions actuals per al seu maneig clínic, incloent-hi les consideracions sobre preservació de la fertilitat. Tot plegat serveix per complementar els estudis presentats en aquesta tesi, aportant un marc de referència ampli i actualitzat.



clínica e investigación en ginecología y obstetricia

www.elsevier.es/gine



REVISIÓN

Manejo reproductivo de las mujeres con la premutación del *FMR1*. Revisión de la literatura



I. Agustí^{a,*}, A. Borrás^{a,b}, L. Rodríguez-Revenge^{c,b} y D. Manau^{a,b}

^a Unidad de Reproducción Humana Asistida, Servicio de Ginecología, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetricia i Neonatologia (ICGON), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España

^b Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

^c Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 16 de agosto de 2023; aceptado el 26 de febrero de 2024

PALABRAS CLAVE

Insuficiencia ovárica;
Preservación de la
fertilidad;
Genética;
X frágil;
FXPOI

Resumen La preservación de la fertilidad (PF) está indicada en la mayoría de las ocasiones en enfermedades oncológicas y ante la indicación de tratamientos gonadotóxicos, sin embargo, en los últimos años van en aumento los ciclos de preservación realizados en enfermedades benignas y enfermedades con riesgo de desarrollar un fallo ovárico prematuro. La insuficiencia ovárica prematura (IOP) se relaciona en un 10% de los casos a un trastorno genético. Las condiciones más frecuentes conocidas son la premutación (PM) del cromosoma X frágil y el síndrome de Turner; y recientemente otras enfermedades se han visto implicadas en esta patología como la mutación de los genes *BRCA 1/2*.

Realizamos una revisión bibliográfica sobre la IOP asociada a la PM del gen *FMR1*, las diversas teorías fisiopatológicas descritas y la dificultad en la predicción de qué mujeres van a desarrollar el fallo ovárico por no disponer de un marcador útil predictivo. Además, valoramos las diferentes recomendaciones para el manejo de estas mujeres y de cuándo indicar la realización de técnicas de PF. Esta opción podría evitar el impacto psicológico derivado de la afectación en la salud reproductiva en estas mujeres.

© 2024 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Ovarian insufficiency;
Fertility
preservation;
Genetics;
Fragile X;
FXPOI

Reproductive management of women with *fmr1* premutation. Literature review

Abstract fertility preservation is indicated in most cases of oncologic diseases and when gonadotoxic treatments are prescribed. However, in recent years, there has been an increase in preservation cycles carried out for benign diseases and conditions with a risk of developing premature ovarian failure. Premature ovarian insufficiency is related to a genetic disorder in

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: iagustis@clinic.cat (I. Agustí).

10% of cases. The most common known conditions are *FMR1* premutation and Turner syndrome, and recently, other diseases such as mutations in the *BRCA 1/2* genes have been implicated in this pathology.

We conducted a bibliographic review on premature ovarian insufficiency associated with the premutation of the *FMR1* gene or *Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1*, the various pathophysiological theories described, and the difficulty in predicting which women will develop ovarian failure due to the lack of a useful predictive marker. Additionally, we evaluated different recommendations for managing these women and when to indicate the implementation of fertility preservation techniques. This option could prevent the psychological impact women of these women's reproductive health impairment.

© 2024 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

De los casos de insuficiencia ovárica prematura (IOP), el 10% se debe a enfermedades genéticas, y se pueden dividir en dos grupos¹. El primero comprende el de anomalías cromosómicas, en el que el síndrome de Turner (falta total o parcial de un cromosoma X) es la más común, mientras que el segundo grupo es el de las anomalías génicas, donde la premutación (PM) del gen *FMR1* es la más frecuente². En los últimos años se han estudiado otras condiciones monogénicas asociadas al IOP, por ejemplo, las mutaciones en los genes *BRCA1/2* o en el gen *GALT* (asociado a galactosemia)³.

La PM en el gen *FMR1* representa la causa monogénica conocida más común para el IOP, llegando al 4-6% de los casos^{4,5}. Consiste en la expansión de la repetición del triplete citosina-guanina-guanina (CGG), con un número de repeticiones entre 55 y 200. Hasta el 20% de las mujeres afectas de la PM desarrollarán una IOP asociada a la alteración del gen *FMR1* (también conocida como falla ovárica prematura asociada al X frágil [FXPOI]), pero el mecanismo molecular por el cual hay esta reducción en la reserva ovárica no está establecido, existiendo diferentes teorías que se expondrán más adelante.

El número de repeticiones en el triplete CGG es inestable y puede aumentar en la descendencia. Si supera las 200 copias se produce la metilación del gen *FMR1*, inactivándolo completamente, causando el síndrome X frágil. Este síndrome es la causa más frecuente de discapacidad intelectual hereditaria acompañado de otras alteraciones (cognitivas y físicas), aunque no de riesgo de menopausia prematura.

La IOP se define como ausencia de menstruación (amenorrea) debida a la pérdida de función ovárica antes de los 40 años. Según la guía de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), la precisión diagnóstica de IOP es limitada y recomienda los siguientes criterios diagnósticos: oligo/amenorrea durante al menos cuatro meses y un nivel de la hormona foliculoestimulante (FSH) por encima de los 25 UI/l en dos ocasiones separadas por más de cuatro semanas⁶.

Dado que el IOP finaliza en el establecimiento de un fallo ovárico prematuro e infertilidad, puede tener un fuerte

impacto psicológico en la mujer y familiares, afectando así en su calidad de vida. Por ello, la preservación de la fertilidad (PF) es de gran importancia en el manejo a largo plazo de estas pacientes, sin embargo, las condiciones genéticas asociadas al IOP no son frecuentes y a veces se diagnostican cuando el fallo ovárico ya está establecido, motivo por el cual las técnicas de preservación no son aplicables. Por esta razón, hay pocos datos disponibles sobre estos subgrupos de pacientes, en relación con las tasas de éxito y riesgos asociados a la técnica y al futuro embarazo.

El objetivo de este artículo es proporcionar a los profesionales de salud una guía para el asesoramiento de estas pacientes, esta revisión pretende resumir la patología de la FXPOI y dar herramientas para poder avanzar al fallo ovárico con el objetivo de realizar una preservación de fertilidad a las mujeres afectas antes de que se haya establecido, evitando así el impacto psicológico de la enfermedad y la esterilidad asociada.

Metodología

Se realizó una búsqueda extensa de la literatura publicada centrándose en la PM en el gen *FMR1* asociada a IOP y la baja reserva ovárica (BRO), así como en el mecanismo fisiopatológico, marcadores diagnósticos y técnicas de PF disponibles en la actualidad. Se revisaron todos los estudios relevantes publicados hasta febrero de 2023, artículos científicos y documentos localizados en páginas web de instituciones médicas científicas como la *American Society of Reproductive Medicine* (ASRM), *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) y la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), siendo un total de más de 110 artículos científicos y documentos revisados. La búsqueda bibliográfica se ha centrado en los buscadores PubMed/Medline y Google Scholar. Se han utilizado las siguientes palabras clave: «*fertility preservation*», «*oocyte cryopreservation*», «*embryo cryopreservation*», «*ovarian tissue cryopreservation*», «*in vitro fertilization*», «*reproductive techniques*», «*premature ovarian insufficiency*», «*genetic disease*», «*X-fragile premutation*», «*FXPOI physiopathology*». Se utilizaron los operadores «AND» y «OR» para combinar los

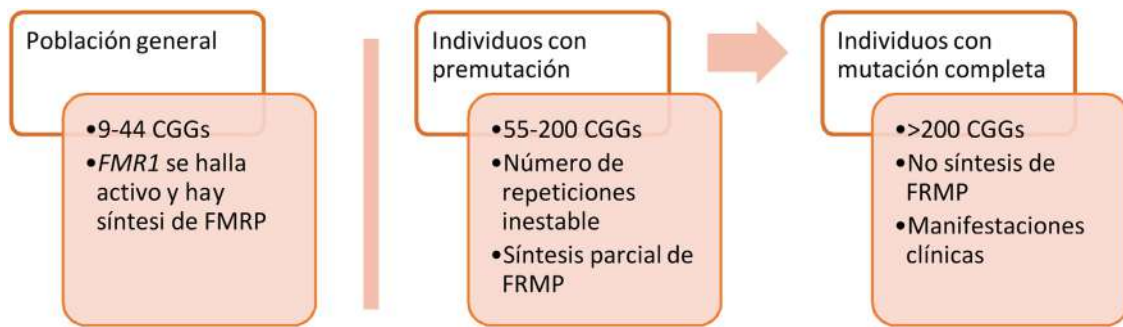


Figura 1 Distribución del gen *FMR1* en la población según el número de tripletes CGG.

CGG: citosina-guanina-guanina; *FMR1*: gen *Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1*; FMRP: proteína sintetizada por el gen *FMR1*.

términos de búsqueda según correspondiera. Los criterios se identificaron en el título y/o resumen de las publicaciones.

Gen *FMR1*

La alteración genética descrita en la mayoría de los casos con síndrome X frágil se centra en la región no traducida del extremo 5' del gen *FMR1*, ubicado en el brazo largo del cromosoma X, en Xq27.3⁷. Esta región del gen contiene repeticiones del trinucleótido CGG de forma polimórfica, variando entre 5 y 44 en la población general. En la situación normal, el gen se encuentra activo y sintetiza a la proteína (FMRP). Las repeticiones en este intervalo son estables cuando se transmiten de generación en generación, y es conocido que la proteína sintetizada desempeña un papel importante en el desarrollo y la función del cerebro. La FMRP regula la síntesis de proteínas en las células cerebrales y está involucrada en la formación y función de las sinapsis (conexiones neuronales), proceso crucial para la transmisión de señales y el procesamiento de la información en el cerebro. Una segunda clase de alelos son los que contienen entre 45 a 54 CGG. Este rango, conocido como zona gris, corresponde a los alelos intermedios los cuales pueden presentar cierto grado de inestabilidad, con la posibilidad de expandir a PM en las siguientes generaciones. Cuando el número de tripletes supera las 200 copias, la región promotora del gen *FMR1* se metila, silenciando así la expresión de este gen⁸. Esta situación de «mutación completa» causa el síndrome X frágil afectando aproximadamente al 50% de las mujeres y al 100% de los hombres. Entre las manifestaciones de este síndrome se encuentran problemas en el desarrollo cerebral y trastornos del espectro autista, discapacidad intelectual u otras alteraciones cognitivas y rasgos dismórficos⁹.

Por último, individuos con un número de repeticiones comprendido entre 55 y 200 tripletes de CGG se clasifican como portadores de la PM. En esta situación, hay un incremento en la transcripción del ARN mensajero (ARNm) pero una síntesis ligeramente reducida de FMRP¹⁰. Este número de repeticiones es inestable y tiende a aumentar en cada división celular, confiriendo así un incremento en el riesgo de tener descendencia afecta con el síndrome X frágil (fig. 1), cuando este se transfiere vía materna. La frecuencia estimada para la condición de PM del *FMR1* en la población general se encuentra entre 1/800-1.200 en los hombres y entre 1/250-400 en las mujeres¹¹. Los hombres y mujeres que presentan la PM se encuentran en riesgo de

desarrollar una patología neurológica llamada síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil (FXTAS). Además, el 20% de estas mujeres padecerán FXPOI antes de los 40 años^{5,12}. Pueden existir otros trastornos asociados como alteraciones endocrinas o psiquiátricas que se resumen en la figura 2.

Mecanismos fisiopatológicos de la falla ovárica prematura asociada al X frágil y biomarcadores propuestos

La caracterización de las bases moleculares de la FXPOI ha sido poco estudiada y hoy en día desconocemos tanto el papel que juega el gen *FMR1* en la función ovárica como las vías moleculares implicadas en la FXPOI. Gracias al modelo murino de la FXPOI se cree que la PM en el gen no tiene efecto en la reserva de folículos primordiales, ya que no se encuentran diferencias al comparar el número de folículos o el tamaño ovárico entre los ratones que desarrollarán FXPOI y los no afectados. Sin embargo, el número de folículos maduros sí que se ve marcadamente reducido, sugiriendo que la PM actuaría bloqueando su desarrollo y/o incrementando la apoptosis de dichos folículos^{13,14}.

Pero surge una interrogante importante: ¿por qué la disfunción ovárica se limita únicamente a las mujeres portadoras de la PM? A nivel molecular sabemos que los niveles de ARNm del gen *FMR1* en los/las portadores/as están incrementados¹¹, por lo que (y de manera similar a lo descrito para FXTAS) se ha propuesto un mecanismo de ganancia de función de este ARNm, el cual tendría un efecto tóxico para la célula¹⁵. Se ha sugerido que el ARNm con un tracto expandido de repeticiones CGG (expCGG ARNm) podría estar interfiriendo en el desarrollo normal del folículo. En esta línea, recientemente se han referido niveles incrementados de ARNm del gen *FMR1* en ovario de ratón y en células de la granulosa de mujeres portadoras de la PM^{14,16}. Todos estos datos apoyarían esta teoría¹⁷.

Por otra parte, se ha demostrado que el expCGG ARNm es capaz de secuestrar proteínas y otros transcritos formando agregados o inclusiones intranucleares que se detectan tanto en células humanas del estroma ovárico, como en otros tejidos y órganos de individuos portadores de la PM¹⁸. Recientemente, se ha descrito que estas inclusiones contienen polipéptidos tóxicos (FMRpolyG) que junto con las inclusiones y los niveles incrementados del expCGG ARNm,

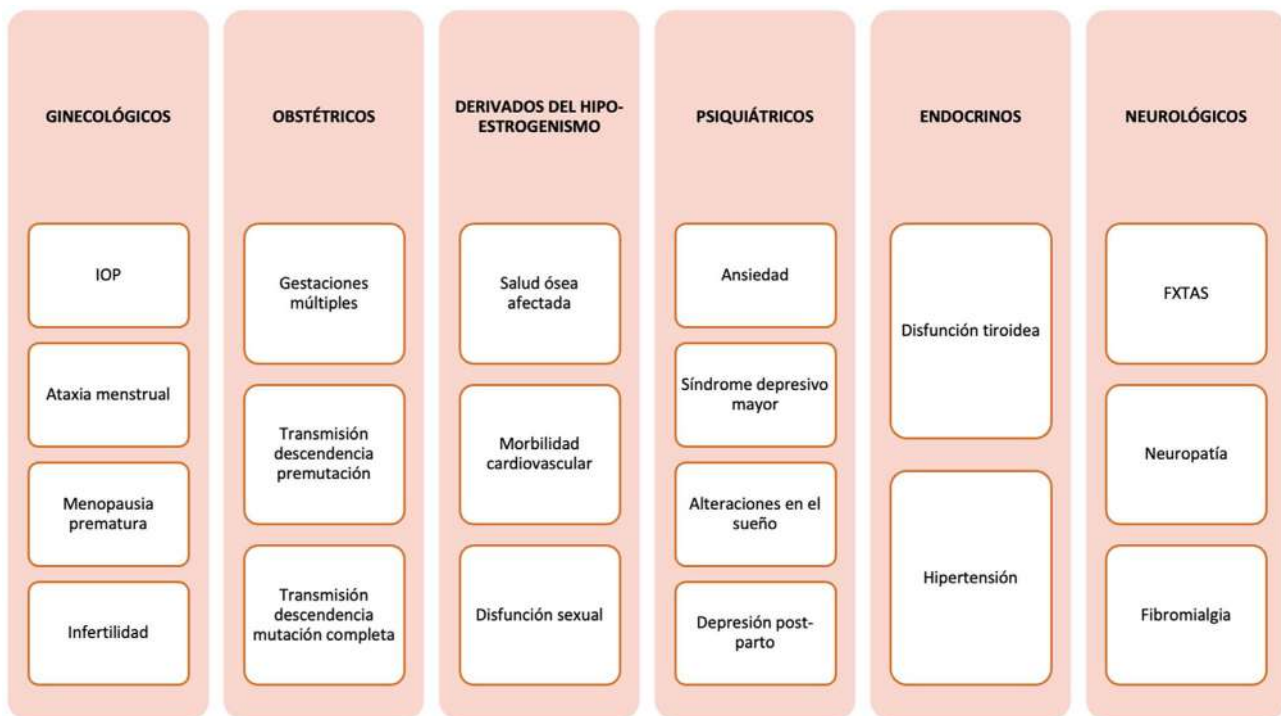


Figura 2 Trastornos asociados a la premutación del gen *FMR1*. FXTAS: síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil; IOP: insuficiencia ovárica prematura.

contribuirían al desarrollo de las distintas enfermedades asociadas a la PM del gen: FXPOI y FXTAS¹⁹.

En relación con el número de repeticiones CGG, se ha demostrado una correlación significativa entre el número de tripletes y el riesgo de desarrollar FXPOI, aunque esta relación no es lineal, siendo mayor el riesgo en aquellas con alelos comprendidos entre 80 y 99 repeticiones CGG²⁰⁻²³.

También se han valorado como posibles mecanismos otros factores moleculares, como el origen parental del alelo premutado⁸, la inactivación preferencial del cromosoma X, el número de interrupciones adenina-guanina-guanina (AGG) o los niveles de expresión del ARNm en *FMR1* que podrían influenciar el riesgo a desarrollar FXPOI^{24,25}. A excepción del número de CGG, para ninguno de los otros factores moleculares estudiados se ha podido establecer una correlación clara con el riesgo a desarrollar FXPOI. La figura 3 describe las diversas bases moleculares propuestas que podrían influenciar en el desarrollo de la FXPOI.

Uno de los marcadores moleculares que se propone para el seguimiento de una mujer con la PM es el *FMR4*, un ARN largo no codificante (ARNlnc). Los ARNlnc son definidos como moléculas de ARN no traducido de más de 200 nucleótidos de longitud, con funciones moleculares versátiles y participando en procesos biológicos²⁶. Recientemente se han publicado los resultados de un estudio que revela una asociación significativa entre FXPOI y los niveles elevados de expresión de *FMR4*. El análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC) reveló que *FMR4* puede distinguir a las portadoras de la PM de *FMR1* con FXPOI con un poder diagnóstico moderado. Aunque son hallazgos preliminares, sugieren un posible papel de *FMR4* como biomarcador para predecir FXPOI⁹.

En conclusión y tal y como se comentaba al inicio del apartado, las bases moleculares propuestas de FXPOI han sido poco estudiadas, y en la actualidad no disponemos de ningún biomarcador específico de FXPOI.

Manejo reproductivo de las mujeres con la premutación del *FMR1*

Consejo genético pregestacional

Tras el diagnóstico de la PM del gen *FMR1* se requiere un completo y exhaustivo consejo genético y asesoramiento reproductivo.

La expansión de un alelo de PM a una mutación completa se produce casi exclusivamente a través de meiosis femeninas y, por lo tanto, todas las hijas de un portador masculino de la PM heredarán la PM y no manifestarán el síndrome X frágil. En las mujeres, los alelos premutados son muy inestables y se pueden expandir a un tamaño de CGG mayor o incluso a una mutación completa en una sola generación. Con un número cada vez mayor de repeticiones CGG, aumenta la probabilidad de que una PM transmitida por vía materna se expanda hasta convertirse en una mutación completa, alcanzando el 100% en ~100 CGG²⁷. Las interrupciones AGG intercaladas dentro de la región repetitiva de CGG estabilizan el gen durante la transmisión²⁸. En la población general, casi el 95% de los alelos tienen una o dos interrupciones AGG. Por el contrario, los alelos premutados contienen pocas o ninguna AGG, presentando largos tramos de CGG ininterrumpidos. En 2015, en el estudio de Nolin et al., se valoraba una posible relación entre el número de interrupciones AGG y la estabilidad de las repeticiones

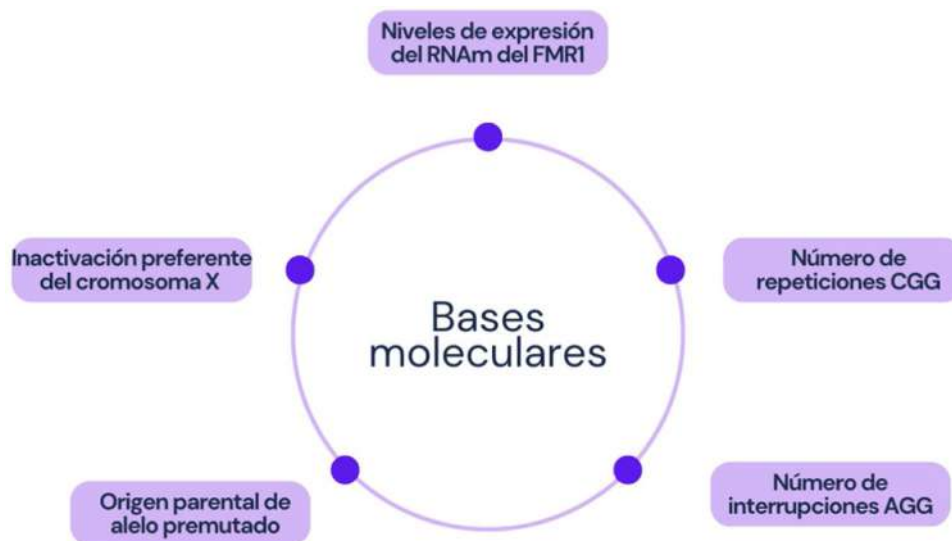


Figura 3 Bases moleculares propuestas que podrían influenciar el riesgo a desarrollar FXPOI.

AGG: adenina-guanina-guanina; ARNm: ARN mensajero; CGG: citosina-guanina-guanina; FXPOI: falla ovárica prematura asociada al X frágil.

Tabla 1 Riesgo de expansión de alelos *FMR1* dependiendo el tamaño de repeticiones CGG maternas y/o el efecto de la interrupción AGG

Repeticiones CGG	Riesgo expansión alelo premutado (%)			
	Sin considerar repeticiones AGG	Interrupciones AGG		
		0	1	≥ 2
45-59	0,25	2,27	0	0
60-75	9,15	22,77	2,78	0
60-69	4	11,11	0	0
70-74	21,43	51,72	7,31	0
75-89	59,5	80,5	59	16
90-109	98,22	100	100	90,48
110-129	100	100	100	100
> 130	100	100	No detectado	No detectado

Modificada de Mila et al., 2018¹⁵.

AGG: adenina-guanina-guanina; CGG: citosina-guanina-guanina.

CGG, ofreciendo así estimaciones más precisas del riesgo de transmisión de la mutación completa²⁹. Por tanto, el conocimiento de la distribución de estas interrupciones en los alelos es importante para el asesoramiento genético de la paciente. En la [tabla 1](#) se recogen los distintos riesgos de expansión teniendo en cuenta el tracto de CGG y el número de interrupciones AGG¹⁵.

Valoración reproductiva

Una vez realizado el consejo genético se procede a la valoración en la consulta de reproducción asistida.

Los marcadores que utilizamos para valorar la reserva ovárica de la paciente son dos. El recuento de folículos antrales (RFA) mediante ecografía transvaginal y consiste en contar el número de folículos de 2 a 9 mm presentes en los ovarios al comienzo del ciclo menstrual y la hormona antimülleriana (AMH), producida por los folículos pequeños en los

ovarios. Los niveles de AMH en sangre se correlacionan con la cantidad de óvulos que quedan en los ovarios.

Actualmente se utilizan los criterios de Bolonia (definidos por la ESHRE) para predecir la respuesta ovárica a la estimulación ovárica a las pacientes que se someten a procesos de reproducción asistida³⁰.

Como se ha comentado con anterioridad, aproximadamente el 20% de las portadoras de la PM desarrollarán FXPOI, no obstante, la PM del gen *FMR1* también se ha asociado a la BRO, conllevando una mayor incidencia de infertilidad. En los últimos años, se han publicado diferentes estudios en relación con este tema, destacando uno publicado en 2009 en el que se comparaba un grupo de mujeres con esterilidad y BRO con uno de mujeres estériles con reserva ovárica normal (control). Los resultados sugerían que había más riesgo en el grupo de mujeres BRO de presentar un número de repeticiones en rango intermedio o premutado (> 40 repeticiones CGG)³¹ respecto al grupo control. El grupo de Karimov et al.,

en 2011, halló una frecuencia de PM incrementado en un grupo de pacientes con BRO respecto a pacientes de un grupo control (reserva ovárica normal), aconsejando así valorar el estado del gen *FMR1* en pacientes con BRO, dado que alguna podría presentar la PM³².

Por lo que se refiere a la población española, el grupo de Barasoain et al. en 2013 realizó un estudio que comparaba mujeres con esterilidad y mujeres fértiles con el fin de determinar si el tamaño de la repetición CGG estaba asociado con su patología, y si las portadoras de alelos intermedios y PM tenían signos endocrinos de función ovárica disminuida (utilizando como medida la hormona FSH). Se observó que había mayor incidencia tanto de PM como de rango intermedio en las mujeres infértiles³³.

Posteriormente, Pastore et al. concluyó que parecía haber una mayor tasa de pérdida folicular que empezaba a edades más avanzadas en mujeres con BRO y ≥ 35 repeticiones CGG³⁴. En 2016 Eslami et al. realizaron un estudio comparativo entre un grupo de mujeres control con reserva ovárica normal y mujeres con BRO, demostrando una mayor frecuencia de PM en el grupo BRO³⁵. Consistente con esto, se informa en la literatura que las pacientes con la PM tienen niveles más bajos de estrógenos, de AMH y experimentan la menopausia, en promedio, cinco años antes que las mujeres no portadoras³⁶⁻³⁸.

Por otro lado, el mismo grupo de Pastore et al. en 2017, investigaron si las asociaciones entre las longitudes de repeticiones CGG se diferenciaban entre las mujeres diagnosticadas con BRO a los controles de la población y si las asociaciones variaban según el grupo racial/étnico. No se encontraron diferencias significativas en el rango normal/intermedio entre casos y controles ni por grupo racial/étnico y concluían que el estudio rechazaba la asociación entre BRO y repeticiones altas normales/intermedias, y confirmaba una asociación entre BRO y repeticiones bajas/normales en mujeres de raza blanca³⁹.

Recientemente, en 2019 se publicó un metaanálisis⁴⁰ donde se evaluaba la asociación entre las longitudes de repeticiones CGG del gen *FMR1* y la gravedad del IOP. Se incluyeron 18 estudios, observando una asociación significativa entre la PM del gen y un mayor riesgo para desarrollar IOP y BRO; mientras que, por el contrario, no se encontró correlación entre IOP y el rango intermedio (entre 45 y 54 repeticiones).

Paciente con deseo genésico

Si la mujer tiene **deseo gestacional** en ese momento, la consulta se orientará hacia dos tratamientos posibles:

Si la valoración de los marcadores de reserva ovárica es correcta, se planteará realizar un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV) con selección embrionaria mediante el diagnóstico genético preimplantacional (PGT-M) evitando así la transmisión a la descendencia. Esta opción permite la selección de embriones sin la mutación, que se estudiará tras la escisión de unas pocas blastómeras de todos los embriones que se obtengan tras la FIV. Los embriones sanos se podrán transferir al útero de la mujer tras el diagnóstico, y los restantes no afectos de buena calidad se podrán vitrificar para su uso posterior. Este tratamiento se podrá llevar a cabo si la reserva ovárica lo permite, es decir, si no se encuentra en situación de FXPOI.

El PGT-M destaca por su alta complejidad, ya que requiere un asesoramiento genético adaptado al paciente, confirmación de variantes genéticas específicas (mutaciones), una exhaustiva revisión del caso y la adaptación de pruebas de laboratorio, antes de iniciar el ciclo de FIV. Durante la preparación y análisis de la prueba pueden surgir desafíos técnicos únicos, y la interpretación y gestión de los resultados del PGT-M suelen ser complejas.

En cuanto a los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA) en estos casos, los pocos estudios disponibles sugieren una respuesta disminuida a los procedimientos de estimulación ovárica en el contexto de FIV en portadoras de la PM^{3,41}. Bibi et al. plantearon la hipótesis de una correlación entre el número de repeticiones CGG y el número de ovocitos recuperados, y concluyeron que el punto mínimo de respuesta ovárica (menos ovocitos obtenidos) se encuentra en las mujeres con un número de repeticiones entre 80-120⁴². El grupo de Elizur et al., en 2014, publicó que esta reducción en la respuesta ovárica a la estimulación podía ser debida a la acumulación de ARNm de *FMR1* en las células de la granulosa del ovario¹⁶.

Una reciente revisión llevada a cabo por el grupo de Pastore en 2019 explora los resultados de las TRA en relación con el estado de PM del gen *FMR1*. Los resultados muestran que en las mujeres con un número de repeticiones en el rango de mutación completa (> 200) los resultados de la FIV no se diferencian a los de la población general (< 45 tripletes CGG), incluyendo dosis de gonadotropinas requeridas, número de ovocitos recuperados, evolución y calidad embrionaria y, finalmente, tasa de gestación. En cambio, en mujeres con la PM hallamos una disminución en la tasa de gestación debido a un menor número de ovocitos obtenido respecto a las mujeres sin la PM o con la mutación completa, aunque los datos son inconsistentes por el bajo número de estudios y casos reclutados⁴³.

Los resultados obstétricos y perinatales muestran ser similares entre las poblaciones de mujeres PM y la población general, sin que se hayan reportado riesgos obstétricos adicionales hasta la fecha⁴⁴.

Si la mujer no desea realizar el diagnóstico genético preimplantacional, mientras mantenga ciclos ováricos se puede plantear la búsqueda gestacional espontánea, realizando posteriormente un diagnóstico prenatal mediante biopsia de vellosidades coriales en las primeras semanas de embarazo.

En caso de objetivar ya un estadio de fallo ovárico, se puede plantear llevar a cabo un ciclo de FIV con recepción de ovocitos donados^{2,6}. Una vez cumplido el deseo genésico de la paciente y desde el punto de vista endocrinológico, se debería proponer tratamiento hormonal sustitutivo a largo plazo.

Los resultados obstétricos y perinatales muestran ser similares entre las poblaciones de mujeres PM y la población general, sin que se hayan reportado riesgos obstétricos adicionales hasta la fecha⁴⁴.

Paciente sin deseo genésico

Si la mujer **no tiene deseo reproductivo** en el momento del diagnóstico, dada la falta de evidencia científica, se puede plantear un seguimiento periódico de los niveles de AMH séricos y RFA de cara a identificar, de forma precoz, la pér-

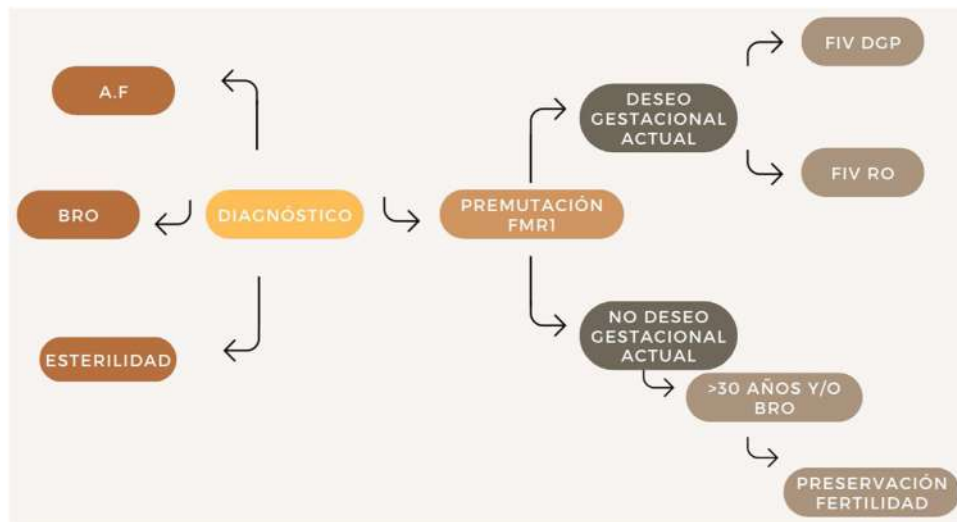


Figura 4 Algoritmo para el manejo de las pacientes con la premutación. A.F: antecedentes familiares; BRO: baja reserva ovárica; FIV DGP: fecundación *in vitro* con diagnóstico genético preimplantacional; FIV RO: fecundación *in vitro* con recepción de óvulos.

didada acelerada de folículos⁴⁵. Cuando los niveles de AMH disminuyan a una velocidad no fisiológica (desarrollándose BRO) o en el caso de mujeres mayores de 30 años sin deseo genésico en ese momento y con marcadores de reserva ovárica alterados se debería plantear la realización de técnicas de PF. Actualmente se proponen dos técnicas diferentes, la criopreservación de ovocitos y la criopreservación de tejido ovárico. La elección de una técnica sobre la otra depende principalmente de la edad y el estado puberal del paciente, así como de circunstancias personales y médicas.

La **criopreservación de ovocitos** se considera la técnica establecida y de elección en estos casos, ofrece los mejores resultados en mujeres adultas con enfermedades benignas, genéticas o, aquellas que desean preservar su fertilidad por razones personales y pacientes con cáncer cuya terapia pueda posponerse.

En un estudio realizado por Cobo et al. en 2016, se presentaron los resultados de 137 mujeres sometidas a PF mediante vitrificación de ovocitos por razones no malignas. Entre las mujeres menores de 35 años en el momento de la preservación, la tasa de nacimientos vivos acumulados fue considerablemente más baja cuando se utilizaban solo cinco ovocitos (15,4%), en contraste con ocho o 10 ovocitos (40,8 y 60,5%, respectivamente). En mujeres de más de 35 años en el momento del procedimiento, las tasas acumulativas de nacimientos vivos fueron del 5,1, 19,9 y 29,7% con cinco, ocho y 10 ovocitos, respectivamente. Por lo tanto, la tasa de nacimientos vivos acumulados con 10 ovocitos fue el doble en el grupo de mujeres menores de 35 años (60,5%) en comparación con el grupo de mujeres mayores (29,7%)⁴⁶.

Posteriormente, en 2021 se publicó una revisión ratificando los resultados del anterior estudio. Se valoraba la idoneidad de cada técnica según la edad del paciente y su eficacia en términos de tasas de embarazo y nacimientos vivos. Se observó una fuerte correlación entre el éxito de la técnica y la edad en el momento de realizarla, poniendo un punto de corte en los 35 años. Otro factor determinante en las tasas acumuladas de nacimientos vivos fue el número de ovocitos recuperados, con un rango ideal de 10 a 15⁴⁷.

Referente a las técnicas de laboratorio, los datos publicados en la revisión de Rienzi et al., sugerían que la estrategia de vitrificación y descongelación de ovocitos era superior al congelamiento lento en términos de resultados clínicos⁴⁸.

Es crucial un buen asesoramiento reproductivo y una derivación temprana, ya que el éxito de la técnica y la probabilidad de embarazo está altamente correlacionado no solo con la cantidad de ovocitos, sino también con la edad de la mujer⁴⁹. Todo ello permitirá tener una mayor probabilidad de tener embriones sanos y una tasa de gestación mayor, escenario especialmente relevante en estas pacientes en las que se requiere la realización de PGT-M³.

Por otra parte, la **criopreservación de tejido ovárico** sería una alternativa, aunque no se considera la técnica de elección. Es la técnica más adecuada para niñas prepúbereles y mujeres cuyo tratamiento no pueda ser aplazado. Tiene la ventaja de preservar un gran número de folículos de una vez y no requiere ninguna estimulación hormonal. Aún es considerada una técnica experimental según la guía de PF de la ESHRE y, sobre todo, debería individualizarse en cada caso⁵⁰⁻⁵³. Uno de los criterios básicos sería de nuevo la edad de la mujer. En el estudio realizado por cinco centros europeos informaron sobre una serie de 285 mujeres sometidas a trasplante de tejido ovárico congelado y descongelado se confirmó que la edad promedio en la criopreservación de mujeres que gestaron después de la reimplantación del tejido ovárico fue significativamente menor que en aquellas que no consiguieron gestación, proponiéndose así el límite superior de edad los 35 años, cuando la reserva ovárica aún es relativamente abundante⁵⁴.

La recuperación de la función ovárica se restablece en más del 95% de los casos, observándose a los 3,5-6,5 meses después de la intervención (tiempo necesario para que la foliculogénesis se reanude)⁵⁵ y con una duración media del injerto de cuatro a cinco años⁵⁶.

En conclusión, el manejo reproductivo de la mujer con la PM del gen *FMR1* va a depender de su deseo genésico en el momento del diagnóstico. La [figura 4](#) plantea el algo-

ritmo propuesto de manejo reproductivo de estas pacientes basándose en el deseo gestacional.

Es importante tener presente que la infertilidad relacionada con el IOP tiene un impacto negativo importante en la calidad de vida de las mujeres, por lo que es esencial ofrecer técnicas de PF antes de que se desarrolle el fallo ovárico, con el objetivo de tener una descendencia sana y cumplir con el proyecto reproductivo de la mujer en todos los casos³.

Conclusiones

- De los casos de IOP, el 10% se debe a enfermedades genéticas, siendo la PM del gen *FMR1* la alteración monogénica más frecuentemente descrita (4-6% de los casos).
- La PM del gen *FMR1* consiste en la expansión de la repetición del triplete CGG (entre 55-200 copias). Este rango es inestable y tiende a aumentar en cada división celular materna, confiriendo un incremento del riesgo de tener descendencia afecta con el síndrome X frágil.
- Hasta el 20% de las mujeres afectas de la PM desarrollarán FXPOI, aunque el mecanismo molecular subyacente a esta reducción en la reserva ovárica es desconocido, existiendo diferentes teorías.
- El asesoramiento genético y el seguimiento médico adecuado son fundamentales para las mujeres con la PM de *FMR1*, ya que pueden beneficiarse de intervenciones tempranas y opciones de planificación familiar informadas, siendo la principal la fecundación *in vitro* con estudio genético preimplantacional (PGT-M).
- La IOP asociada a la PM presenta una progresión continua en la disfunción ovárica en edades tempranas, por lo que es imprescindible valorar de forma periódica los marcadores de reserva ovárica y ofrecer técnicas de PF precozmente, principalmente la vitrificación de ovocitos.
- La condición de PM puede llevar a una pérdida de fertilidad. Es de gran importancia ofrecerles a estas pacientes la oportunidad de realizar una preservación de su fertilidad para que en un futuro puedan gestar con sus propios gametos tras realizar un diagnóstico genético preimplantacional.
- La criopreservación de ovocitos se considera la técnica de elección y la establecida. También existe la posibilidad de criopreservación de tejido ovárico en casos individualizados.

Consideraciones éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo no ha recibido ningún tipo de financiación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.gine.2024.100955](https://doi.org/10.1016/j.gine.2024.100955).

Bibliografía

1. Grynberg M, Bidet M, Benard J, Poulain M, Sonigo C, Cédric-Durnerin I, et al. Fertility preservation in Turner syndrome. *Fertil Steril*. 2016;105:13–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.042>.
2. ACOG Committee Opinion No. 469: Carrier screening for fragile X syndrome. *Obstet Gynecol*. 2010;116:1008–10, <http://dx.doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181fae884>.
3. La Marca A, Mastellari E. Fertility preservation for genetic diseases leading to premature ovarian insufficiency (POI). *J Assist Reprod Genet*. 2021;38:759–77, <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-021-02067-7>.
4. Sullivan SD, Welt C, Sherman S. FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med*. 2011;29:299–307, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1280915>.
5. Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;97:189–94, [http://dx.doi.org/10.1002/1096-8628\(200023\)97:3<189::AID-AJMG1036>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/1096-8628(200023)97:3<189::AID-AJMG1036>3.0.CO;2-J).
6. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2016;31:926–37, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dew027>.
7. Pastore LM, Johnson J. The FMR1 gene, infertility, and reproductive decision-making: a review. *Front Genet*. 2014;5:195, <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00195>.
8. Murray A. Premature ovarian failure and the FMR1 gene. *Semin Reprod Med*. 2000;18:59–66, <http://dx.doi.org/10.1055/s-2000-13476>.
9. Alvarez-Mora MI, Agustí I, Wijngaard R, Martínez-Barrios E, Barcos T, Borrás A, et al. Evaluation of FMR4 FMR5 and FMR6 Expression Levels as Non-Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI). *J Clin Med*. 2022;11:2186, <http://dx.doi.org/10.3390/jcm11082186>.
10. Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH, Warren ST. Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1449–54, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/10.14.1449>.
11. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Mills JB, Harris SW, Gane LW, et al. Clinical involvement and protein expression in individuals with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet*. 2000;91:144–52, [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(20000313\)91:2<144::aid-ajmg14>3.0.co;2-v](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(20000313)91:2<144::aid-ajmg14>3.0.co;2-v).
12. Hagerman RJ, Hagerman PJ. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12:278–83, [http://dx.doi.org/10.1016/s0959-437x\(02\)00299-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0959-437x(02)00299-x).
13. Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman SL, Gao F, et al. Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. *Hum Mol Genet*. 2012;21:5039–47, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/dds348>.
14. Sherman SL, Curnow EC, Easley CA, Jin P, Hukema RK, Tejada MI, et al. Use of model systems to understand the etiology of fragile

- X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). *J Neurodev Disord.* 2014;6:26, <http://dx.doi.org/10.1186/1866-1955-6-26>.
15. Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clin Genet.* 2018;93:197–205, <http://dx.doi.org/10.1111/cge.13075>.
 16. Elizur SE, Lebovitz O, Derech-Haim S, Dratviman-Storobinsky O, Feldman B, Dor J, et al. Elevated levels of FMR1 mRNA in granulosa cells are associated with low ovarian reserve in FMR1 premutation carriers. *PLoS One.* 2014;9:e105121, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0105121>.
 17. Hagerman P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS): pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013;126:1–19, <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1138-1>.
 18. Buijsen RA, Visser JA, Kramer P, Severijnen EA, Gearing M, Charlet-Berguerand N, et al. Presence of inclusions positive for polyglycine containing protein FMRpolyG, indicates that repeat-associated non-AUG translation plays a role in fragile X-associated primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2016;31:158–68, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dev280>.
 19. Friedman-Gohas M, Elizur SE, Dratviman-Storobinsky O, Aizer A, Haas J, Raanani H, et al. FMRpolyG accumulates in FMR1 premutation granulosa cells. *J Ovarian Res.* 2020;13:22, <http://dx.doi.org/10.1186/s13048-020-00623-w>.
 20. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod.* 2007;22:2142–52, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dem148>.
 21. Tejada MI, García-Alegria E, Bilbao A, Martínez-Bouzas C, Beristain E, Poch M, et al. Analysis of the molecular parameters that could predict the risk of manifesting premature ovarian failure in female premutation carriers of fragile X syndrome. *Menopause.* 2008;15:945–9, <http://dx.doi.org/10.1097/gme.0b013e3181647762>.
 22. Mailick MR, Hong J, Greenberg J, Smith L, Sherman S. Curvilinear association of CGG repeats and age at menopause in women with FMR1 premutation expansions. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2014;165B:705–11, <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.32277>.
 23. Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, et al. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod.* 2005;20:402–12, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh635>.
 24. Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Badenas C, Xunclà M, Jiménez L, Milà M. Premature ovarian failure and fragile X female premutation carriers: no evidence for a skewed X-chromosome inactivation pattern. *Menopause.* 2009;16:944–9, <http://dx.doi.org/10.1097/gme.0b013e3181a06a37>.
 25. Alvarez-Mora MI, Rodriguez-Revenga L, Feliu A, Badenas C, Madrigal I, Milà M. Skewed X Inactivation in Women Carrying the FMR1 Premutation and Its Relation with Fragile-X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome. *Neurodegener Dis.* 2016;16(3–4):290–2, <http://dx.doi.org/10.1159/000441566>.
 26. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:2491–509, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-016-2174-5>.
 27. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.* 2003;72:454–64, <http://dx.doi.org/10.1086/367713>.
 28. Yrigollen CM, Martorell L, Durbin-Johnson B, Naudo M, Genoves J, Murgia A, et al. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. *J Neurodev Disord.* 2014;6:24, <http://dx.doi.org/10.1186/1866-1955-6-24>.
 29. Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Cao R, et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet Med.* 2015;17:358–64, <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2014.106>.
 30. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011;26:1616–24, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der092>.
 31. Streuli I, Fraisse T, Ibecheole V, Moix I, Morris MA, de Ziegler D. Intermediate and premutation FMR1 alleles in women with occult primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2009;92:464–70, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.007>.
 32. Karimov CB, Moragianni VA, Cronister A, Srouji S, Petrozza J, Racowsky C, et al. Increased frequency of occult fragile X-associated primary ovarian insufficiency in infertile women with evidence of impaired ovarian function. *Hum Reprod.* 2011;26:2077–83, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der168>.
 33. Barasoain M, Barrenetxea G, Huerta I, Téllez M, Carrillo A, Pérez C, et al. Study of FMR1 gene association with ovarian dysfunction in a sample from the Basque Country. *Gene.* 2013;521:145–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.032>.
 34. Pastore LM, McMurry TL, Williams CD, Baker VL, Young SL. AMH in women with diminished ovarian reserve: potential differences by FMR1 CGG repeat level. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:1295–301, <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-014-0276-2>.
 35. Eslami A, Farahmand K, Totonchi M, Madani T, Asadpour U, Zari Moradi S, et al. FMR1 premutation: not only important in premature ovarian failure but also in diminished ovarian reserve. *Hum Fertil (Camb).* 2017;20:120–5, <http://dx.doi.org/10.1080/14647273.2016.1255356>.
 36. Welt CK. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68:499–509, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03073.x>.
 37. Lisik MZ. Abnormal function of ovaries in women carriers of premutation in the FMR1 gene. *Wiad Lek.* 2007;60(5–6):265–9.
 38. Rohr J, Allen EG, Charen K, Giles J, He W, Dominguez C, et al. Anti-Müllerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: a preliminary study. *Hum Reprod.* 2008;23:1220–5, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/den050>.
 39. Pastore LM, Young SL, Manichaikul A, Baker VL, Wang XQ, Finkelstein JS. Distribution of the FMR1 gene in females by race/ethnicity: women with diminished ovarian reserve versus women with normal fertility (SWAN study). *Fertil Steril.* 2017;107:205–11.e1, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.032>.
 40. Huang J, Zhang W, Liu Y, Liu Y, Wang J, Jiang H. Association between the FMR1 CGG repeat lengths and the severity of idiopathic primary ovarian insufficiency: a meta analysis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47:3116–22, <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2019.1645153>.
 41. Avraham S, Almog B, Reches A, Zakar L, Malcov M, Sokolov A, et al. The ovarian response in fragile X patients and premutation carriers undergoing IVF-PGD: reappraisal. *Hum Reprod.* 2017;32:1508–11, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dex090>.
 42. Bibi G, Malcov M, Yuval Y, Reches A, Ben-Yosef D, Almog B, et al. The effect of CGG repeat number on ovarian response among fragile X premutation carriers undergoing pre-implantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 2010;94:869–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.047>.
 43. Pastore LM, Christianson MS, McGuinness B, Vaught KC, Maher JY, Kearns WG. Does the FMR1 gene affect

- IVF success? *Reprod Biomed Online*. 2019;38:560–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.009>.
44. Hipp HS, Charen KH, Spencer JB, Allen EG, Sherman SL. Reproductive and gynecologic care of women with fragile X primary ovarian insufficiency (FXPOI). *Menopause*. 2016;23:993–9, <http://dx.doi.org/10.1097/GME.0000000000000658>.
45. Santulli P, Blockeel C, Bourdon M, Coticchio G, Campbell A, De Vos M, et al. Fertility preservation in women with benign gynaecological conditions. *Hum Reprod Open*. 2023;2023:hoad012, <http://dx.doi.org/10.1093/hropen/hoad012>.
46. Cobo A, García-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril*. 2016;105:755–64.e8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.027>.
47. Dolmans MM, Hossay C, Nguyen TYT, Poirot C. Fertility Preservation: How to Preserve Ovarian Function in Children, Adolescents and Adults. *J Clin Med*. 2021;10:5247, <http://dx.doi.org/10.3390/jcm10225247>.
48. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23:139–55, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmw038>.
49. Cobo A, García-Velasco J, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Elective and Onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Hum Reprod*. 2018;33:2222–31, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dey321>.
50. ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation. Anderson RA, Amant F, Braat D, D'Angelo A, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. ESHRE guideline: female fertility preservation. *Hum Reprod Open*. 2020;2020:hoaa052, <http://dx.doi.org/10.1093/hropen/hoaa052>.
51. Paradisi R, Macciocca M, Vicenti R, Rossi S, Morselli-Labate AM, Mastroberto M, et al. New insights in the selection and management of cancer patients applicants for ovarian tissue cryopreservation. *Gynecol Endocrinol*. 2016;32:881–5, <http://dx.doi.org/10.1080/09513590.2016.1188373>.
52. Diaz-Garcia C, Domingo J, García-Velasco JA, Herraiz S, Mirabet V, Iniesta I, et al. Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. *Fertil Steril*. 2018;109:478–85.e2, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.018>.
53. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG, Bay-Björn AM, Ernst E, Yding Andersen C. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35:561–70, <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-018-1144-2>.
54. Dolmans MM, von Wolff M, Poirot C, Diaz-Garcia C, Cacciotola L, Boissel N, et al. Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers. *Fertil Steril*. 2021;115:1102–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.008>.
55. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9:735–49, <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.205>.
56. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32:1167–70, <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-015-0544-9>.

HIPÒTESI



El coneixement de les bases moleculars de l'FXPOI no és complert i tot i que la premutació a *FMR1* és el principal factor de risc, encara hi ha factors genètics, epigenètics o ambientals desconeguts que podrien estar afectant la penetrància. Per altre banda, mentre l'associació entre la premutació en el gen *FMR1* i l'FXPOI està ben establerta, la implicació d'aquest amb altres condicions que cursen amb esterilitat està encara per definir. La investigació actual té com a objectiu identificar biomarcadors que puguin ajudar a predir l'aparició d'FXPOI i millorar els protocols clínics en reproducció assistida per a la identificació de les dones portadores de la premutació en diferents poblacions infèrtils a fi de poder oferir un assessorament genètic i reproductiu personalitzat.

Amb la intenció de, aquesta tesi doctoral es planteja d'acord amb les següents hipòtesis:

1. Es possible trobar algun biomarcador específic per la patologia FXPOI que ajudi a predir quina de les dones premutades està en major risc de desenvolupar el fallida ovàrica i poder assessorar-la en el seu futur reproductiu i endocrí.
2. La premutació del gen *FMR1* impacta en la població estèril jove amb baixa reserva ovàrica.

OBJECTIUS



L'objectiu general d'aquesta tesi és el d'investigar la fisiopatologia de l'FXPOI i d'intentar optimitzar el maneig reproductiu de les dones amb la premutació del gen *FMR1*.

Objectius específics:

1. Caracterització de biomarcadors relacionats amb la fallida ovàrica en les pacients portadores de la premutació del gen *FMR1* (Estudi 1 i 2).
2. Avaluar l'efecte de l'expansió del gen *FMR1* sobre la reserva ovàrica en dones joves portadores de la premutació que encara no han desenvolupat l'FXPOI (Estudi 2).
3. Estudiar la prevalença de la premutació al gen *FMR1* en la població de dones joves amb baixa reserva ovàrica que es troben en un programa de FIV (Estudi 3).
4. Millorar el maneig reproductiu de les dones portadores de la premutació del gen *FMR1* (Estudi 3)

MATERIAL, MÈTODES & RESULTATS



A continuació, s'inclouen els estudis tal i com han estat acceptats per a la publicació en la literatura científica.

Tant la població d'estudi, com la metodologia utilitzada en les investigacions, i la presentació dels resultats es troben detallats en les seccions de "*Materials and Methods*" i "*Results*" de cadascun dels tres articles que constitueixen el cos doctrinal de la present Tesi Doctoral.



Article 1

Evaluation of FMR4, FMR5 and FMR6 Expression Levels as Non-Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI)

Alvarez-Mora MI, **Agusti I**, Wijngaard R, Martinez-Barrios E, Barcos T, Borrás A, Peralta S, Guimera M, Goday A, Manau D, Rodriguez-Revenge

Estat: publicat. Factor d'impacte de la revista: 4.22, 1er quartil en Medicina

Resum

Les dones portadores de la premutació en el gen *FMR1* estan a risc de desenvolupar insuficiència ovàrica primària associada a l'X fràgil (FXPOI), una condició caracteritzada per amenorrea abans dels 40 anys. No totes les dones amb una premutació al gen *FMR1* pateixen insuficiència ovàrica primària i avui dia no existeixen biomarcadors moleculars o d'altres tipus que puguin ajudar a predir l'ocurrència de l'FXPOI. Els ARN llargs no codificants (ARNlnc) comprenen un grup de transcrits reguladors amb funcions moleculars versàtils, fet que els converteix en importants reguladors en tots els aspectes de l'expressió gènica. En estudis recents, els ARNlnc han estat descrits com a possibles biomarcadors diagnòstics per a moltes malalties. Aquest estudi es va dissenyar per determinar el perfil d'expressió de tres ARNlnc derivats del locus *FMR1*, FMR4, FMR5 i FMR6, en dones portadores de la premutació en *FMR1* amb l'objectiu de:



- (i) determinar un possible paper en la patogènesi de l'FXPOI i
- (ii) investigar si podrien servir com a biomarcador per al diagnòstic de l'FXPOI.

Material i Mètodes: Els nivells de transcrits FMR4, FMR5 i FMR6 es van avaluar en ARN total extret de sang perifèrica mitjançant PCR digital i es van comparar entre portadores de la premutació amb FXPOI i sense FXPOI. El valor diagnòstic dels ARNInc es va avaluar mitjançant anàlisi de la corba ROC (corba característica de funcionament del receptor).

Resultats: els resultats van mostrar una associació significativa entre FXPOI i alts nivells d'expressió d'FMR4. No es va obtenir cap associació per FMR5 o FMR6. L'anàlisi de la corba ROC va revelar que FMR4 pot distingir portadores de la premutació amb FXPOI amb un poder diagnòstic de 0,67.

Conclusió: Aquests resultats suggereixen un potencial paper d'FMR4 com a possible biomarcador per a l'FXPOI.

Article

Evaluation of FMR4, FMR5 and FMR6 Expression Levels as Non-Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI)

Maria Isabel Alvarez-Mora ^{1,2} , Ines Agusti ³ , Robin Wijngaard ¹, Estefania Martinez-Barrios ¹ , Tamara Barcos ¹ , Aina Borrás ³ , Sara Peralta ³ , Marta Guimera ³, Ana Goday ³ , Dolors Manau ^{3,†} and Laia Rodriguez-Revengea ^{1,2,*,†}

¹ Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic of Barcelona and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; mialvarez@clinic.cat (M.I.A.-M.); wijngaard@clinic.cat (R.W.); estefaniamartinezbarrios@gmail.com (E.M.-B.); tamara_barcos@hotmail.com (T.B.)

² CIBER of Rare Diseases, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

³ Clinical Institute of Gynecology, Obstetrics and Neonatology (ICGON), Hospital Clinic of Barcelona and Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; iagustis@clinic.cat (I.A.); aborras1@clinic.cat (A.B.); speralta@clinic.cat (S.P.); mguimera@clinic.cat (M.G.); goday@clinic.cat (A.G.); dmanau@clinic.cat (D.M.)

* Correspondence: lbodi@clinic.cat; Tel.: +34-93-227-56-73; Fax: +34-93-451-52-72

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Alvarez-Mora, M.I.; Agusti, I.; Wijngaard, R.; Martinez-Barrios, E.; Barcos, T.; Borrás, A.; Peralta, S.; Guimera, M.; Goday, A.; Manau, D.; et al. Evaluation of FMR4, FMR5 and FMR6 Expression Levels as Non-Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI). *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 2186. <https://doi.org/10.3390/jcm11082186>

Academic Editor: Ferdinando Antonio Gulino

Received: 17 February 2022

Accepted: 8 April 2022

Published: 14 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Female *FMR1* (Fragile X mental retardation 1) premutation carriers are at risk for developing fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI), a condition characterized by amenorrhea before age 40 years. Not all women with a *FMR1* premutation suffer from primary ovarian insufficiency and nowadays there are no molecular or other biomarkers that can help predict the occurrence of FXPOI. Long non-coding RNAs (lncRNAs) comprise a group of regulatory transcripts which have versatile molecular functions, making them important regulators in all aspects of gene expression. In recent medical studies, lncRNAs have been described as potential diagnostic biomarkers in many diseases. The present study was designed to determine the expression profile of three lncRNAs derived from the *FMR1* locus, FMR4, FMR5 and FMR6, in female *FMR1* premutation carriers in order: (i) to determine a possible role in the pathogenesis of FXPOI and (ii) to investigate whether they could serve as a biomarker for the diagnosis of FXPOI. FMR4, FMR5 and FMR6 transcripts levels were evaluated in total RNA extracted from peripheral blood by digital droplet PCR and compared between *FMR1* premutation carriers with FXPOI and without FXPOI. The diagnostic value of lncRNAs was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) analysis. Results revealed a significant association between FXPOI and high expression levels of FMR4. No association was obtained for FMR5 or FMR6. ROC curve analysis revealed that FMR4 can distinguish *FMR1* premutation carrier with FXPOI with a diagnostic power of 0.67. These findings suggest a potential role of FMR4 as a possible biomarker for FXPOI.

Keywords: FMR4; FMR5; FMR6; *FMR1* gen; CGG repeat; *FMR1* premutation and FXPOI

1. Introduction

The *FMR1* (Fragile X mental retardation 1) gene (OMIM*309550) contains a CGG trinucleotide repeat in the 5' untranslated region [1–3]. Among individuals in the general population, the number of CGG repeats is polymorphic and varies between 6 and 44. In this situation the *FMR1* gene is active and there is synthesis of the Fragile Mental Retardation Protein (FMRP). Repeats in this size interval are stable when transmitted from generation to generation. In contrast, when the number of CGGs exceeds 200 repeats (full mutation) the *FMR1* gene is silenced resulting in the absence of FMRP and the clinical

manifestations of fragile X syndrome (FXS, OMIM#300624; ORPHA:908): intellectual disability and characteristic dysmorphic features [4]. Finally, individuals with alleles between 55 and 200 CGG repeats are the so-called *FMR1* premutation carriers. In this situation, there is increased transcription of the *FMR1* mRNA transcript, and slightly reduced synthesis of FMRP [5]. These repeat alleles are unstable and tend to increase in each cell division, conferring an increased risk of having FXS affected offspring.

FMR1 premutation occurs in the general population with an estimated frequency that range from 1 in 800 to 1200 males and from 1 in 250 to 400 females [6]. These individuals are at risk for fragile X-associated premature ovarian insufficiency (FXPOI) in females [7], and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in both, males and females [8].

FXPOI symptoms include the cessation of ovarian function before the age of 40 years, ovarian dysfunction, and decreased fertility as evidenced by abnormal ovarian reserve biomarkers and reduced ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation [9–11]. FXPOI occurs in ~20% of women with the *FMR1* premutation, compared to only 1% of the general population [12]. Women with the *FMR1* premutation not only struggle with the possibility of developing FXPOI but also with the risk of passing on the full mutation to their offspring.

Long non-coding RNAs (lncRNAs), defined as untranslated RNA molecules greater than 200 nucleotides in length, can be derived from sense or antisense strands within protein-coding genes, intergenic regions, or pseudogenes [13–15]. A lot of evidence has been accumulated showing that lncRNAs have versatile molecular functions, making them important regulators in all aspects of gene expression (reviewed in [16]). The biological mechanisms of lncRNAs are multiple. They can interact with DNA, RNA and protein as well as with other biological molecules, regulating the gene expression through controlling processes such as protein synthesis, RNA maturation and transport, or the chromatin structure [17]. Moreover, lncRNAs participate in diverse biological processes, such as development, differentiation, energy metabolism, apoptosis and angiogenesis; controlling every level of gene expression pathway [18]. These particularities make them good candidate biomarkers for several diseases.

Several lncRNAs are derived from the *FMR1* gene locus: *FMR4*, *FMR6* and the *ASFMR1* in the antisense direction and *FMR5* in the sense direction (reviewed in [19]). Previous studies have described different expression levels of these lncRNAs among *FMR1* premutation carriers, suggesting a functional association with fragile X-associated disorders [20–24]. Although the *FMR1* premutation is the major risk factor for developing FXPOI, there are still some unknown genetic, epigenetic or environmental factors that might be affecting gene penetrance. On the basis of this observation, we aim to determine the expression profile of *FMR4*, *FMR5* and *FMR6* in female *FMR1* premutation carriers in order to determine a possible role in the pathogenesis of FXPOI.

2. Material and Methods

2.1. Subjects

For this study, 36 female *FMR1* premutation carriers registered in the FXS database from the Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic of Barcelona were selected. The cases met the following criteria: 20 women diagnosed with FXPOI (development of amenorrhea due to disruption of ovarian function before the age of 40 years) carrying the *FMR1* premutation (CGG repeats between 55–200) and 16 non-FXPOI *FMR1* premutation carriers with a reported normal ovarian function (regular cycles between 24–35 days) over the age of 40 years. This study was approved by the Institutional Ethical Review Board of Hospital Clinic, Barcelona. All patients that were included in this study signed a written informed consent.

2.2. RNA Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA isolation was performed from blood using the PAXgene® Blood RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocols. A Qubit

RNA IQ assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to determine the RNA concentration. Its integrity was verified with the Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The cDNA was synthesized from 350 ng RNA using the High-Capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions.

2.3. Digital Droplet Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

LncRNA expression analysis was performed by ddPCR technology, which is an improvement of conventional PCR. Using a droplet generator, the sample is diluted and divided into multiple aliquots and subjected to endpoint PCR. Amplification occurs in each individual partition, which contains an individual nucleic acid molecule. A fluorescence signal is produced in each droplet with the target molecule. Quantification of cDNA molecules relies on the ability of the ddPCR system to determine the number of target molecules by the Poisson statistical analysis of "positive" (containing amplified target) and "negative" (no amplified target detected) droplets [25]. The assay was performed using the QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 100 nM specific primers targeted to FMR4 (f:5'-ACCAAACCAACCAACCAACCA-3' and r:5'-GTGGGAAATCAAATGCATCC-3'), FMR5 (f:5'-AATGCTGGCAGTCGTTTCTT-3' and r:5'-TTGACGGAGCATCTATCGTG-3'), FMR6 (f:5'-AGCACTTCAGGGCAGATTTT-3' and r:5'-TGGTGAATGATCACCCAATG-3') and the housekeeping gene GAPDH (f:5'-TCTCCTCTGACTTCAACAGCGAC-3' and r:5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC-3') and 9 µL of the diluted cDNA sample. Droplet emulsion formation was performed by mixing 20 µL of reaction with 70 µL of droplet generation oil using a microfluidic droplet generation cartridge and QX200 Droplet Generator (Bio-Rad). End-point PCR amplification was performed using a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Primers for FMR5 and GAPDH were designed with Primer-3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (accessed on 10 May 2019). Primer sequences for FMR4 and FMR6 were extracted from Elizur and co-workers [24]. In order to normalize lncRNAs copies relative to nuclear DNA, the GAPDH gene was used as reference gene.

Results were analyzed with Quantasoft™ Software (Bio-Rad). Target RNA concentrations were calculated using the Poisson statistics and the expression of the lncRNA was reported as [copies/cell] corrected for the expression of the reference gene GAPDH. Expression levels are shown as transcripts per ten thousand cells.

2.4. FMR1 Molecular Parameters

CGG repeat analysis and X-chromosome inactivation (XCI) pattern were determined using the AmplideX® PCR/CE FMR1 and AmplideX® mPCR FMR1 kits, following manufacturer's recommendations (Asuragen, Austin, TX, USA). Skewed XCI status was considered with a threshold value greater than 90% [26]. FMR1 mRNA quantification was performed as previously described [27].

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the IBM® SPSS® Statistics software version 25 (SPSS, Chicago, IL, USA) and the open-source computing environment R version 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The pROC, ggplot2, MASS and caret R packages were used for assessment of the expression data. Results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical significance of differences between means or medians was examined using the parametric *t*-test or the non-parametric Mann–Whitney U test. The discriminatory ability of the lncRNAs to separate FXPOI from non-FXPOI women was assessed using receiver operating characteristic (ROC) curves and by calculating the area under the curve (AUC). Cut-off values were decided based on the optimal combined sensitivity and specificity threshold (Youden Index). The Odds Ratio (OR) was calculated to assess the association between the increased biomarker and FXPOI. Additionally, a

multivariate logistic regression model was generated including FMR4 expression levels corrected by CGG repeats. Significance was accepted for p -value < 0.05 .

3. Results

3.1. Expression Levels of FMR4, FMR5 and FMR6 in FMR1 Premutation Carriers

Thirty-six *FMR1* premutation female carriers were recruited; 20 with FXPOI and 16 without FXPOI. There were no differences between the two groups regarding patients' CGG repeat expansion or *FMR1* mRNA expression levels (Table 1). As for the patients' age at time of analysis, statistically significant differences were obtained ($p = 0.03$). This difference can be attributed to a bias in the recruitment of women without FXPOI. Older women were included in this cohort in order to make sure that they did not have ovarian dysfunction. X-chromosome inactivation (XCI) pattern was also examined and compared between the FXPOI and non-FXPOI groups. Results evidenced that both groups showed a similar random XCI pattern (data not shown).

Table 1. Clinical and molecular characteristics of individuals recruited in the study.

	<i>FMR1</i> Premutation with FXPOI (n = 20)	<i>FMR1</i> Premutation without FXPOI (n = 16)	<i>p</i> -Value
Age (mean $\pm$ SD, years)	41 $\pm$ 6.9	47 $\pm$ 8.3	0.03 *
CGG repeat (mean $\pm$ SD)	100 $\pm$ 35	88 $\pm$ 26	0.3
<i>FMR1</i> mRNA (mean $\pm$ SD)	1.5 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 1.3	0.3

Significance: * $p < 0.05$. The exact p -values were calculated with the U-Mann Whitney test.

FMR4, FMR5 and FMR6 transcripts levels were evaluated in total RNA extracted from peripheral blood by ddPCR and compared between *FMR1* premutation carriers with FXPOI and without FXPOI. Results showed no significant differences between groups for none of the lncRNAs analyzed ($p = 0.09$ for FMR4; $p = 0.46$ for FMR5 and $p = 0.56$ for FMR6) (Figure 1 and Table S1). Subsequently, and since the expression of the three lncRNAs varies over a wide range, we compared *FMR1* premutation carriers with and without FXPOI among stratified subgroups based on expression levels. These subgroups consisted of low, medium and high expression levels for FMR4, FMR5 and FMR6. When comparing the distribution of lncRNAs expression levels (low, medium and high) between *FMR1* premutation carrier groups (with and without FXPOI), significant results were obtained for FMR4 ($p = 0.039$). As shown in Table 2, while 30% (6/20) of FXPOI women showed high levels of FMR4 expression, only 10% (2/16) of women without FXPOI were found to have similar levels. Therefore, evidence was obtained for an association between FMR4 transcript levels and the development of FXPOI. A similar association was also found for FMR5, although not statistically significant. Contrary, for FMR6, no significant evidence of an association was obtained (Table 2).

In addition, the correlation between the expression levels of FMR4, FMR5, FMR6 and the *FMR1* gene was appraised among the total number of female *FMR1* premutation carriers as well as in the distinct groups with and without FXPOI (Figure 2). A high correlation was found between FMR5 and FMR6 expression levels while the correlation of these two lncRNAs with FMR4 was lower. All lncRNAs correlated negatively with respect to *FMR1* expression. The correlation pattern did not change when FXPOI and non-FXPOI females were considered separately, suggesting that their relative expression behavior is not substantially affected by the presence of FXPOI.

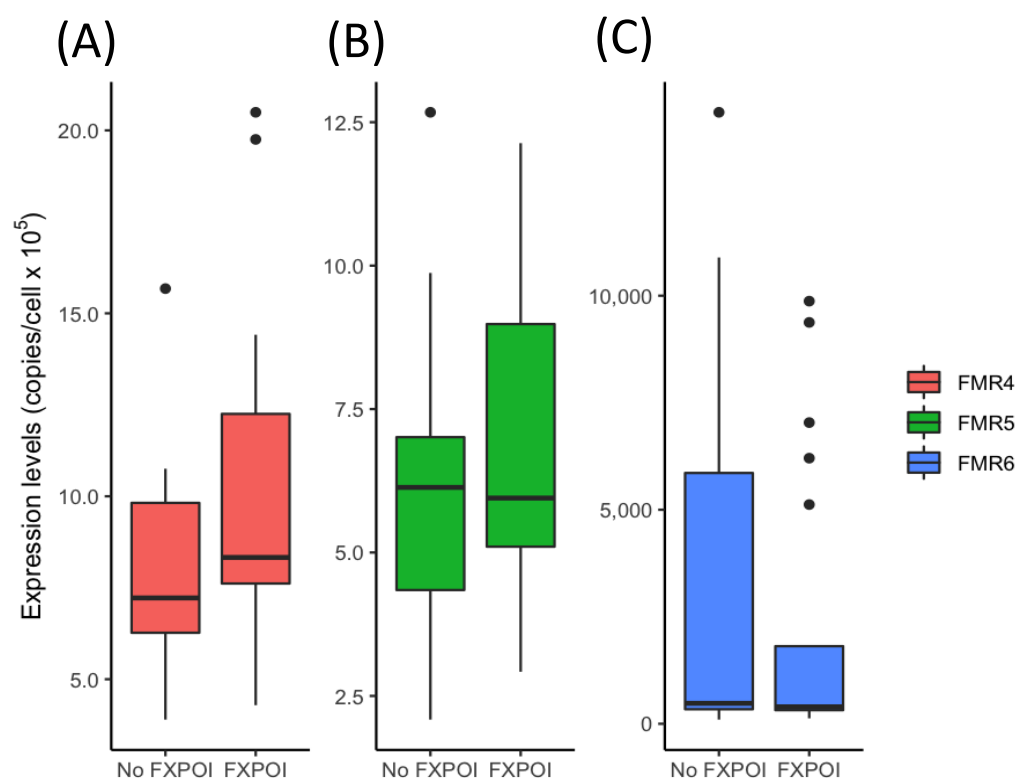


Figure 1. Expression levels of FMR4, FMR5 and FMR6 were compared between *FMR1* premutation carriers with FXPOI and without FXPOI. (A) The expression level of FMR4, (B) The expression level of FMR5 and (C) The expression level of FMR6. None of the comparisons were statistically significant ($p > 0.05$).

Table 2. Distribution of *FMR1* premutation carriers with and without FXPOI based on FMR4, FMR5 and FMR6 expression levels.

	FMR4 expression level			<i>p</i> -Value
	1–7	7–12	>12	
FXPOI (n = 20)	2 (10%)	12 (60%)	6 (30%)	0.039 *
No FXPOI (n = 16)	7 (44%)	8 (50%)	1 (6%)	
	FMR5 expression level			
	1–5	5–10	>10	
FXPOI (n = 20)	5 (25%)	10 (50%)	5 (25%)	0.14
No FXPOI (n = 16)	7 (44%)	8 (50%)	1 (6%)	
	FMR6 expression level			
	<400	400–1000	>1000	
FXPOI (n = 20)	10 (50%)	5 (25%)	5 (25%)	0.556
No FXPOI (n = 16)	6 (38%)	5 (31%)	5 (31%)	

Significance: * $p < 0.05$. The exact *p*-values were calculated with the Fisher exact test.

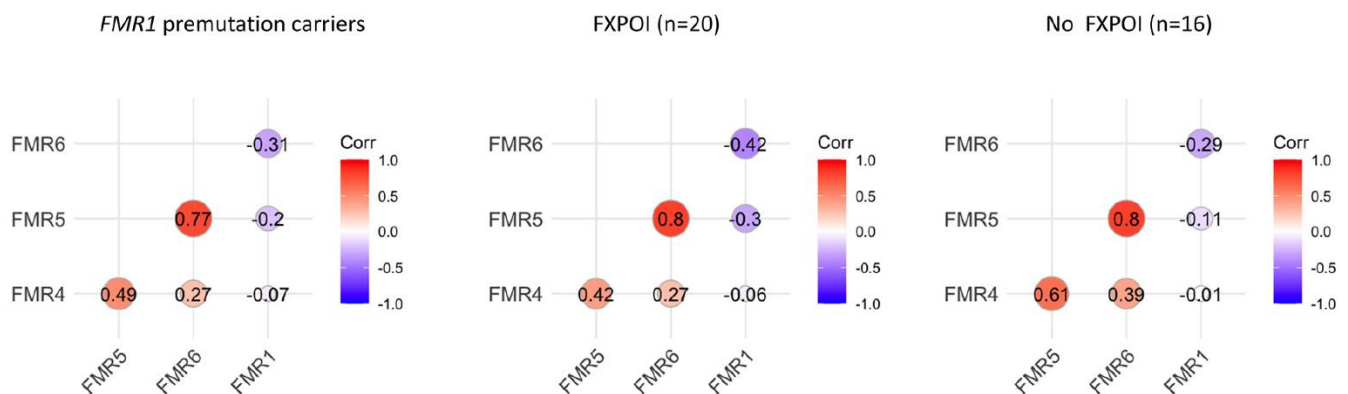


Figure 2. Correlation between expression levels of FMR4, FMR5 and FMR6 was evaluated among total FMR1 premutation carriers as well as groups of women with FXPOI and without FXPOI.

3.2. Diagnostic Value of FMR4 for FXPOI

Since significant differences were obtained in the distribution of FMR4 expression levels between women with FXPOI and without FXPOI, the diagnostic value of FMR4 was assessed by establishing a ROC curve. As can be observed in Figure 3, the curve had an AUC value of 0.67 (95% CI 0.45–0.86). A sensitivity of 0.80 and specificity of 0.63 were achieved at the optimal threshold. These data indicate that FMR4 expression levels had a certain diagnostic value for FXPOI. FMR4 levels above the established threshold conferred a significantly increased risk of developing FXPOI (OR: 6.67 95% CI: 1.5–29.63, $p = 0.016$).

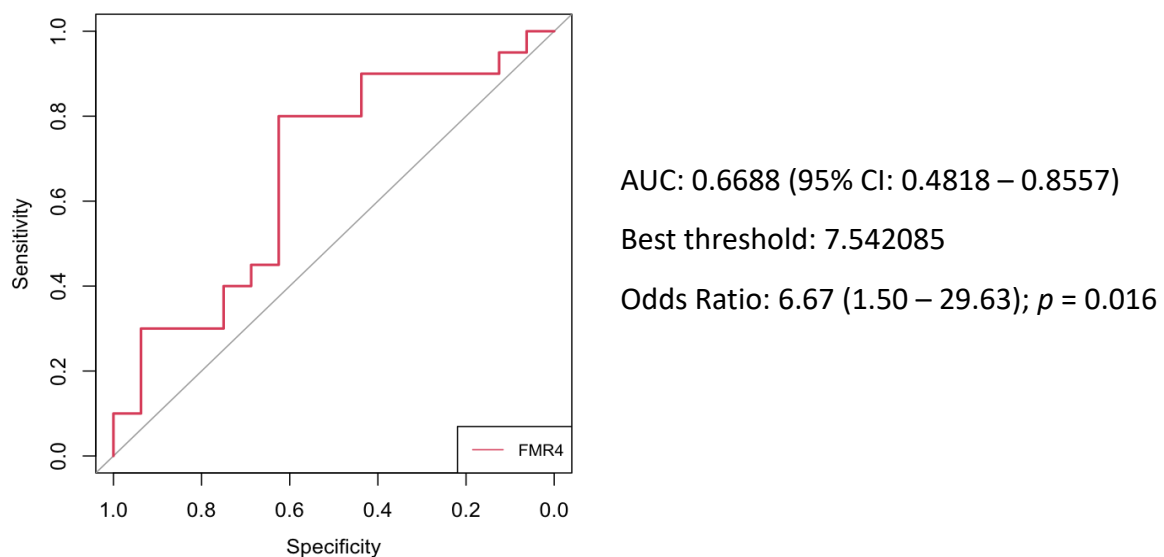


Figure 3. ROC curve for assessment of diagnostic power of FMR4 among total FMR1 premutation female carriers. The area under the curve (AUC) was 0.67.

3.3. Association of lncRNAs Expression Levels with FMR1 CGG Repeat Size

We evaluated the correlation between the expression levels of the lncRNAs and the CGG repeat size (Figure 4). Expression of FMR4 and FMR5 showed a non-linear distribution, although the association was only statistically significant for FMR4 ($p = 0.037$). The highest levels of FMR4 were detected in women with 80–99 CGG repeats (Figure 4A). For FMR6, as the expression levels showed a wide distribution range, no evidence of an association was inferred ($p = 0.9$) (Figure 4C).

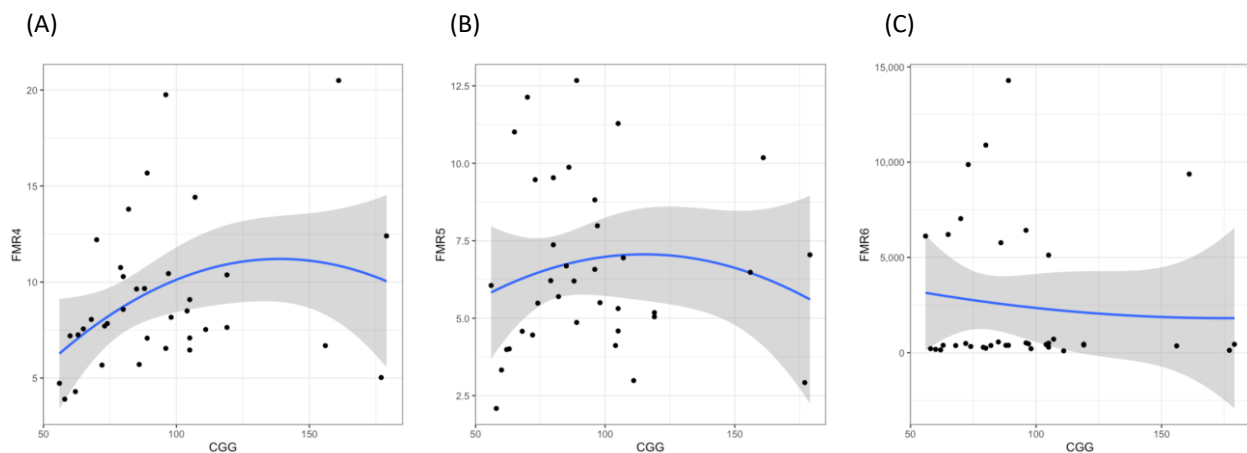


Figure 4. lncRNAs expression level in peripheral blood of *FMR1* premutation carriers according to the number of CGG repeats. (A) FMR4 expression levels, (B) FMR5 expression levels, and (C) FMR6 expression levels.

A multivariate logistic regression analysis was performed to explore whether the correction of FMR4 expression levels for the number of CGG repeats (as a curvilinear confounder) could improve the prediction of FXPOI. Although, the inclusion of both parameters also showed a similar 0.67 AUC, FMR4 expression did not show a significant adjusted odds ratio in the model ($p = 0.15$).

4. Discussion

Little is known about the disease pathology underlying FXPOI. Although the *FMR1* premutation is the major risk factor, there are still some unknown genetic, epigenetic or environmental factors that might be affecting gene penetrance. Current research aims to identify molecular or other biomarkers that can predict the occurrence of FXPOI and help women with the *FMR1* premutation to make decisions regarding their reproductive and family planning. lncRNAs have attracted a lot of attention in recent medical studies since emerging evidence suggests that they could be used as diagnostic biomarkers in many diseases such as cancer [28], cardiovascular or neurodegenerative disorders [29,30]. FMR4, FMR5 and FMR6 comprise a group of *FMR1*-derived lncRNAs which might partake to aspects of the clinical presentation of the Fragile X-associated disorders [21–24]. In fact, it has been described that the expression of these lncRNAs is different in both FXS patients and *FMR1* premutation carriers. In brain tissue from FXS patients both, FMR4 and FMR6 expression have been found to be down-regulated [21,22]. On the other hand, in *FMR1* premutation carriers whereas the FMR4 expression has been described up-regulated [22], the FMR6 expression has been found down-regulated [21].

On the basis of these observations, this study investigated FMR4, FMR5 and FMR6 expression levels in peripheral blood of female *FMR1* premutation carriers with and without FXPOI in order to explore their feasibility as potential biomarkers of FXPOI. For this purpose, the ddPCR technique was used, as it is a highly sensitive and specific method for absolute quantification of transcript gene expression per cell.

The results showed a wide range of expression levels for all three lncRNAs analyzed, leading to a non-significant difference when comparing mean expression levels between female *FMR1* premutation carriers with FXPOI and without FXPOI. We further assessed pairwise correlation between the expression of FMR4, FMR5, FMR6 and *FMR1* mRNA transcripts. Again, no differences were observed when comparing women with FXPOI and without FXPOI; suggesting that pairwise correlations between expressions of these lncRNAs and the *FMR1* gene might not be affected by the presence of FXPOI (Figure 2). However, a statistically significant difference was obtained for FMR4 ($p = 0.039$) when comparing both groups stratified by expression levels (low, medium or high), indicating a disequilibrium

in the distribution. Among all the *FMR1* premutation carriers presenting higher FMR4 expression levels, 86% (6/7) developed FXPOI whereas only 29% (1/6) did not. ROC curve analysis revealed that FMR4 can modestly distinguish female *FMR1* premutation carriers with and without FXPOI with an AUC of 0.67. Although caution must be taken due to the limited sample size, our results showed an association between high FMR4 expression levels and FXPOI (OR 6.67, 95% CI = 1.5–29.63, $p = 0.016$), suggesting that this lncRNA could be a possible marker for FXPOI among female *FMR1* premutation carriers.

To date, only CGG repeat size has been associated with the risk of developing FXPOI in a non-linear way [31–33]; leading to the highest risk for FXPOI in the mid-range of the repeat expansion (~80–99 CGG). Interestingly, our findings, although not statistically significant, also showed a non-linear correlation between the FMR4 and FMR5 expression levels and the *FMR1* repeat size; yielding higher levels of both, FMR4 and FMR5 expression, in the mid-range. This correlation was not detected for FMR6 (Figure 4C). Nevertheless, since FMR6 showed the highest range of expression levels, it cannot be completely discarded. To our knowledge, only Elizur and co-workers [24] have previously analyzed the transcript levels of FMR4 and FMR6 in granulosa cells of *FMR1* premutation carriers in order to determine a putative role in the pathogenesis of FXPOI. Contrary to our results, the authors did not observe any association neither between granulosa cells FMR4 expression levels nor between the number of CGG repeats in the *FMR1* gene. On the other hand, whereas the FMR6 expression levels were not significantly different between *FMR1* premutation carriers and controls, they reported a significant non-linear association between the number of CGG repeats and FMR6 levels in the granulosa cells [24]. Although these results are not in line with ours, it has to be taken into consideration that the methodology and tissue used to measure the lncRNAs levels were different. Whereas Elizur et al. [24] used qRT-PCR and granulosa cells, we used peripheral blood and ddPCR. Moreover, although the sample size was similar in both studies, they compared *FMR1* premutation carriers against controls and we compared *FMR1* premutation carriers with FXPOI against those without FXPOI. Finally, another important difference is that their cohort lack of *FMR1* premutation carriers with *FMR1* repeat size above 150 CGGs, which could somehow bias the results.

Our study, although exploratory, has two main limitations. First, the sample size, which is not large enough to provide reliable evidence for an association between FMR4, FMR5 and FMR6 expression levels and FXPOI. However, our study provides statistically significant results, highlighting a potential role of FMR4 in predicting FXPOI. Second, the age differences between groups and the fact that *FMR1* premutation women with FXPOI had already developed ovarian dysfunction. Thus, it would be necessary to replicate our findings in other female *FMR1* premutation cohorts and, ideally, in a longitudinal study, in order to make sure that age is not affecting lncRNAs expression levels. If validated in other populations, these results might provide evidence of a potential role of FMR4 as a possible biomarker for FXPOI.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm11082186/s1>, Table S1: Expression levels of FMR4, FMR5 and FMR6 measured in peripheral blood of *FMR1* premutation carriers with and without FXPOI.

Author Contributions: M.I.A.-M.: substantial contributions to conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data. Final approval of the version to be published. I.A.: substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data. Final approval of the version to be published. R.W.: substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data. Final approval of the version to be published. E.M.-B. and T.B.: acquisition, analysis and interpretation of data. Drafting the article and final approval of the version to be published. A.B., S.P., A.G. and M.G.: acquisition, analysis and interpretation of data. Final approval of the version to be published. D.M.: revising the work critically for important intellectual content and final approval of the version to be published. L.R.-R.: drafting the work or revising it critically for important intellectual content and final approval of the version to be published. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Fundación Merck Salud (19-FE-011) and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (through the project (PI21/01085), co-funded by the European Union, and AGAUR from the Autonomous Catalan Government (2017SGR1134).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the Hospital Clinic Barcelona (protocol code HCB/2021/1030 at 21 January 2022).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The analyzed data sets generated during the study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We want to thank the Fragile X families, the “Associació Catalana Síndrome X fràgil”, and the Federación Española del Síndrome X Frágil for their cooperation. This study was supported by Fundación Merck Salud (19-FE-011), the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (through the project (PI21/01085), co-funded by the European Union, and AGAUR from the Autonomous Catalan Government (2017SGR1134). The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

Conflicts of Interest: The authors have no conflict of interest.

References

1. Verkerk, A.J.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J.S.; Fu, Y.H.; Kuhl, D.P.; Pizzuti, A.; Reiner, O.; Richards, S.; Victoria, M.F.; Zhang, F.P.; et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **1991**, *65*, 905–914. [\[CrossRef\]](#)
2. Oberle, I.; Rousseau, F.; Heitz, D.; Kretz, C.; Devys, D.; Hanauer, A.; Boue, J.; Bertheas, M.F.; Mandel, J.L. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **1991**, *252*, 1097–1102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Yu, S.; Pritchard, M.; Kremer, E.; Lynch, M.; Nancarrow, J.; Baker, E.; Holman, K.; Mulley, J.C.; Warren, S.T.; Schlessinger, D.; et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* **1991**, *252*, 1179–1181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Sutcliffe, J.S.; Nelson, D.L.; Zhang, F.; Pieretti, M.; Caskey, C.T.; Saxe, D.; Warren, S.T. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **1992**, *1*, 397–400. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Kenneson, A.; Zhang, F.; Hagedorn, C.H.; Warren, S.T. Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 1449–1454. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Tassone, F.; Long, K.P.; Tong, T.H.; Lo, J.; Gane, L.W.; Berry-Kravis, E.; Nguyen, D.; Mu, L.Y.; Laffin, J.; Bailey, D.B.; et al. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome Med.* **2012**, *4*, 100. [\[CrossRef\]](#)
7. Sherman, S.L. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **2000**, *97*, 189–194. [\[CrossRef\]](#)
8. Hagerman, P.J.; Hagerman, R.J. The fragile-X premutation: A maturing perspective. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *74*, 805–816. [\[CrossRef\]](#)
9. Wheeler, A.C.; Raspa, M.; Green, A.; Bishop, E.; Bann, C.; Edwards, A.; Bailey, D.B., Jr. Health and reproductive experiences of women with an FMR1 premutation with and without fragile X premature ovarian insufficiency. *Front. Genet.* **2014**, *5*, 300. [\[CrossRef\]](#)
10. Rohr, J.; Allen, E.G.; Charen, K.; Giles, J.; He, W.; Dominguez, C.; Sherman, S.L. Anti-Mullerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: A preliminary study. *Hum. Reprod.* **2008**, *23*, 1220–1225. [\[CrossRef\]](#)
11. Bibi, G.; Malcov, M.; Yuval, Y.; Reches, A.; Ben-Yosef, D.; Almog, B.; Amit, A.; Azem, F. The effect of CGG repeat number on ovarian response among fragile X premutation carriers undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 869–874. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Allingham-Hawkins, D.J.; Babul-Hirji, R.; Chitayat, D.; Holden, J.J.; Yang, K.T.; Lee, C.; Hudson, R.; Gorwill, H.; Nolin, S.L.; Glicksman, A.; et al. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: The International Collaborative POF in Fragile X study—Preliminary data. *Am. J. Med. Genet.* **1999**, *83*, 322–325. [\[CrossRef\]](#)
13. Mercer, T.R.; Dinger, M.E.; Mattick, J.S. Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 155–159. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Wilusz, J.E.; Sunwoo, H.; Spector, D.L. Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world. *Genes. Dev.* **2009**, *23*, 1494–1504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Derrien, T.; Johnson, R.; Bussotti, G.; Tanzer, A.; Djebali, S.; Tilgner, H.; Guernec, G.; Martin, D.; Merkel, A.; Knowles, D.G.; et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* **2012**, *22*, 1775–1789. [\[CrossRef\]](#)
16. Yao, R.W.; Wang, Y.; Chen, L.L. Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 542–551. [\[CrossRef\]](#)
17. Wang, K.C.; Chang, H.Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell* **2011**, *43*, 904–914. [\[CrossRef\]](#)

18. Wapinski, O.; Chang, H.Y. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 354–361. [[CrossRef](#)]
19. Huang, G.; Zhu, H.; Wu, S.; Cui, M.; Xu, T. Long Noncoding RNA Can Be a Probable Mechanism and a Novel Target for Diagnosis and Therapy in Fragile X Syndrome. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 446. [[CrossRef](#)]
20. Ladd, P.D.; Smith, L.E.; Rabaia, N.A.; Moore, J.M.; Georges, S.A.; Hansen, R.S.; Hagerman, R.J.; Tassone, F.; Tapscott, S.J.; Filippova, G.N. An antisense transcript spanning the CGG repeat region of FMR1 is upregulated in premutation carriers but silenced in full mutation individuals. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 3174–3187. [[CrossRef](#)]
21. Khalil, A.M.; Faghihi, M.A.; Modarresi, F.; Brothers, S.P.; Wahlestedt, C. A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pastori, C.; Peschansky, V.J.; Barbouth, D.; Mehta, A.; Silva, J.P.; Wahlestedt, C. Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human FMR1 gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Hum. Genet.* **2014**, *133*, 59–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Peschansky, V.J.; Pastori, C.; Zeier, Z.; Motti, D.; Wentzel, K.; Velmeshev, D.; Magistri, M.; Bixby, J.L.; Lemmon, V.P.; Silva, J.P.; et al. Changes in expression of the long non-coding RNA FMR4 associate with altered gene expression during differentiation of human neural precursor cells. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Elizur, S.E.; Dratviman-Storobinsky, O.; Derech-Haim, S.; Lebovitz, O.; Dor, J.; Orvieto, R.; Cohen, Y. FMR6 may play a role in the pathogenesis of fragile X-associated premature ovarian insufficiency. *Gynecol. Endocrinol.* **2016**, *32*, 334–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zmienko, A.; Samelak-Czajka, A.; Goralski, M.; Sobieszczuk-Nowicka, E.; Kozłowski, P.; Figlerowicz, M. Selection of Reference Genes for qPCR- And ddPCR-Based Analyses of Gene Expression in Senescing Barley Leaves. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0118226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Amos-Landgraf, J.M.; Cottle, A.; Plenge, R.M.; Friez, M.; Schwartz, C.E.; Longshore, J.; Willard, H.F. X chromosome-inactivation patterns of 1005 phenotypically unaffected females. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 493–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tassone, F.; Hagerman, R.J.; Taylor, A.K.; Gane, L.W.; Godfrey, T.E.; Hagerman, P.J. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: A new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *66*, 6–15. [[CrossRef](#)]
28. Yan, X.; Hu, Z.; Feng, Y.; Hu, X.; Yuan, J.; Zhao, S.D.; Zhang, Y.; Yang, L.; Shan, W.; He, Q.; et al. Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 529–540. [[CrossRef](#)]
29. Haemmig, S.; Feinberg, M.W. Targeting LncRNAs in Cardiovascular Disease: Options and Expeditions. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 620–623. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, M.; He, P.; Bian, Z. Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases: Pathogenesis and Potential Implications as Clinical Biomarkers. *Front. Mol. Neurosci.* **2021**, *14*, 685143. [[CrossRef](#)]
31. Sullivan, A.K.; Marcus, M.; Epstein, M.P.; Allen, E.G.; Anido, A.E.; Paquin, J.J.; Yadav-Shah, M.; Sherman, S.L. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 402–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ennis, S.; Ward, D.; Murray, A. Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *Eur. J. Hum. Genet.* **2006**, *14*, 253–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Allen, E.G.; Sullivan, A.K.; Marcus, M.; Small, C.; Dominguez, C.; Epstein, M.P.; Charen, K.; He, W.; Taylor, K.C.; Sherman, S.L. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 2142–2152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article 2

Correlation of FMR4 expression levels to ovarian reserve markers in *FMR1* premutation carriers

Agusti I, Alvarez-Mora MI, Wijngaard R, Borrás A, Barcos T, Peralta S, Guimera M, Goday A, Manau D, Rodríguez-Revenga L

J Ovarian Res. 2024 May 17;17(1):103. doi: 10.1186/s13048-024-01425-0. PMID: 38760837; PMCID: PMC11100203.

Estat: publicat. Factor d'impacte de la revista: 4.80, 1er quartil en Obstetrícia i Ginecologia.

Resum

La insuficiència ovàrica primària associada a l'X-fràgil (FXPOI), caracteritzada per amenorrea abans dels 40 anys, es produeix en el 20% de les dones portadores de la premutació en el gen *FMR1*. Actualment, no hi ha biomarcadors moleculars que puguin ajudar a predir quines dones portadores de la premutació desenvoluparan FXPOI. Anteriorment, vam demostrar que els nivells elevats de FMR4 poden discriminar entre les dones portadores de la premutació que presenten FXPOI i les que no. En el present estudi, es va avaluar la relació entre els nivells d'expressió de FMR4 i els marcadors de la reserva ovàrica en dones portadores de la premutació *FMR1* menors de 35 anys.

Material i Mètodes: Estudi on s'examina l'associació entre els nivells de transcripció de FMR4 i les mesures del recompte total de fol·licles



antrals (RFA) i els nivells de l'hormona anti-mülleriana (AMH) en sèrum com a marcadors de la reserva ovàrica.

Resultats: els resultats van mostrar una associació negativa entre els nivells de FMR4 i l'AMH ($r = 0.45$) i l'RFA ($r = 0.64$). Es van trobar nivells de transcripció de FMR4 estadísticament significativament més alts entre les dones amb la premutació *FMR1* que tenien tant RFA com nivells d'AMH baixos.

Conclusió: Aquests resultats reforcen estudis previs que donen suport a l'associació entre els nivells elevats de FMR4 i el risc de desenvolupar FXPOI en portadores de la premutació *FMR1*.

RESEARCH

Open Access



Correlation of FMR4 expression levels to ovarian reserve markers in *FMR1* premutation carriers

Ines Agusti¹, Maria Isabel Alvarez-Mora^{2,3}, Robin Wijngaard⁴, Aina Borrás¹, Tamara Barcos², Sara Peralta¹, Marta Guimera¹, Anna Goday¹, Dolors Manau^{1†} and Laia Rodriguez-Revenga^{2,3*†}

Abstract

Background Fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI), characterized by amenorrhea before age 40 years, occurs in 20% of female *FMR1* premutation carriers. Presently, there are no molecular or biomarkers that can help predicting which *FMR1* premutation women will develop FXPOI. We previously demonstrated that high FMR4 levels can discriminate between *FMR1* premutation carriers with and without FXPOI. In the present study the relationship between the expression levels of FMR4 and the ovarian reserve markers was assessed in female *FMR1* premutation carriers under age of 35 years.

Methods We examined the association between FMR4 transcript levels and the measures of total antral follicle count (AFC) and serum anti-müllerian hormone (AMH) levels as markers of ovarian follicle reserve.

Results Results revealed a negative association between FMR4 levels and AMH ($r=0.45$) and AFC ($r=0.64$). Statistically significant higher FMR4 transcript levels were found among those *FMR1* premutation women with both, low AFCs and AMH levels.

Conclusions These findings reinforce previous studies supporting the association between high levels of FMR4 and the risk of developing FXPOI in *FMR1* premutation carriers.

Keywords *FMR1* premutation, Fragile X-associated primary ovarian insufficiency, FMR4, Ovarian follicle reserve

[†]Dolors Manau and Laia Rodriguez-Revenga share senior authorship.

*Correspondence:

Laia Rodriguez-Revenga
lbodi@clinic.cat

¹Clinical Institute of Gynecology, Obstetrics and Neonatology (ICGON), Hospital Clinic of Barcelona and FCRB-Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

²Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic of Barcelona and FCRB-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), C/Villarreal, 170, Barcelona 08036, Spain

³CIBER of Rare Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁴Department of Human Genetics, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands

Background

Primary ovarian insufficiency (POI) refers to the dysfunction or depletion of ovarian follicles with cessation of menses before age 40 years. Ovarian reserve markers (anti-müllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC)) are related to the number of follicles in human ovaries; therefore, AMH and AFC have considerable value as diagnostic test for POI and highlight those at increased risk [1]. POI may be caused by many different factors including, chromosomal and genetic abnormalities, endocrinopathies, infectious processes or iatrogenic causes (anticancer treatments) [2]. While POI affects approximately 1% of women from the general



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

population, it has been observed in 20% of women who carry the *FMRI* premutation [3]. POI associated with the *FMRI* gene premutation is referred to as Fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). The *FMRI* gene (OMIM*309550) contains a CGG repeat tract in the 5' untranslated region. Based on the number of CGG repeats, four different *FMRI* alleles can be differentiated: normal, intermediate, premutation and full mutation [4–6]. While the full mutation (>200 CGGs) is responsible for the fragile X syndrome (FXS), the leading single-gene cause of inherited intellectual disability, the *FMRI* premutation (55–200 CGG repeats) has been associated, among others pathologies, with FXPOI. Neither FXPOI nor diminished ovarian reserve is observed in women with full mutations [7], therefore, expanded CGG repeats within the *FMRI* premutation range have been proposed as the main pathogenic mechanism. *FMRI* premutation carriers have elevated levels of *FMRI* mRNA, and it is currently accepted that the excess expanded-repeat mRNA, per se, is pathogenic, leading to fragile X-associated pathologies (e.g. [8]).

FXPOI is an important health condition in which women do not only experience fertility problems, but are also at risk for other medical problems such as reduced bone mineral density, depression and anxiety problems, and increased risk of cardiovascular disease. Women with FXPOI should receive hormone replacement therapy until the typical age of natural menopause [9]. Currently, there are no biomarkers that help to predict those women that will develop a FXPOI. The risk for FXPOI has only been associated in a non-linear fashion with the CGG repeat size [10–12]; being those women with a *FMRI* premutation of approximately 80–99 CGG repeats the ones at the highest risk for FXPOI. In a previous study, we characterized the expression profiles of FMR4, FMR5 and FMR6 in female *FMRI* premutation carriers in order to determine a possible role in the pathogenesis of FXPOI and to investigate whether they could serve as a biomarker for the diagnosis of FXPOI [13]. FMR4, FMR5 and FMR6 are long-non coding RNAs (lncRNAs) originated from the *FMRI* gene locus that showed variable expression levels among *FMRI* premutation carriers, suggesting a functional association with fragile X-associated pathologies [14–17]. Our results revealed a significant association between FXPOI and high expression levels of FMR4, suggesting a potential role of FMR4 as a possible biomarker for FXPOI [13]. A limitation in the study design was that it was exploratory and, thus, *FMRI* premutation carriers with FXPOI enrolled had already developed ovarian dysfunction. In the present study, the relationship between *FMRI* expression levels and ovarian reserve markers was examined in young *FMRI* premutation female carriers under age of 35 years with regular menses (without FXPOI established).

Materials and methods

Study population

The present work is an extension of an earlier study on the prospective discriminatory capacity of FMR4 and other *FMRI* lncRNAs for FXPOI [13]. Based on the previous study of 36 *FMRI* premutation female carriers (20 with FXPOI and 16 without FXPOI), FMR4 expression levels >12 increased the risk for developing FXPOI whereas FMR4 levels <7 reduced the risk ($p=0.039$). As previously reported in Alvarez-Mora et al. [13], while 30% of FXPOI women showed high levels of FMR4 expression, only 6% of women without FXPOI were found to have similar levels (supplementary Table 1).

In the present study, a total of 10 young female *FMRI* premutation carriers (CGG repeats between 55 and 200) were enrolled in order to validate the statistically significant distribution of FMR4 expression levels among *FMRI* premutation carriers with FXPOI and without FXPOI. All participants enrolled in the present study were recruited from fragile X syndrome families, reported normal ovarian function (regular cycles between 24 and 35 days) and none of them were under any hormonal contraceptive method. The women's age range was 21–35 years old. None of them reported having smoking habits or alcohol use (<1 day per week). The majority of the participants reported no use of oral contraception. The remaining discontinued the oral contraception by more than 5 years ago prior to this study. This study was approved by the Institutional Ethical Review Board of Hospital Clinic, Barcelona. All research was performed in accordance with relevant guidelines/regulations and in accordance with the Declaration of Helsinki (2013). All patients that were included in this study signed a written informed consent.

Assessment of ovarian reserve

A peripheral blood sample was obtained and transvaginal ultrasonography and hormonal controls were routinely conducted. Serum anti-müllerian hormone (AMH) estimation was done by chemoluminescence immunoassay with paramagnetic particles for quantitative determination (AMH B13127 Beckman Coulter kit and in the ACCES2 device) (LOQ 0.02 ng/ml, interassay coefficient of variation <5%; results expressed in ng/ml). Normal level, corresponding to normal ovarian reserve, was considered over 1.1 ng/ml. Antral follicle count (AFC) was defined as the number of bilateral follicles (2–9 mm in diameter) in early follicular phase. AFC was done by scanning the ovary from the outer to the inner margin. A Voluson S6 unit, General Electrics Medical Systems (Austria), equipped with a 5–7 MHz vaginal probe were used. In this examination, a baseline gynecological assessment was performed to exclude gynecological

pathology together with the AFC. Normal AFC was taken if it ≥ 7 .

DNA, RNA extraction and cDNA synthesis

A blood sample for determination of CGG repeat number, *FMR1* mRNA and FMR4 level was obtained from each subject. Genomic DNA and total RNA were isolated from 5 ml of peripheral blood by standard methods (Puregene and Purescript kits, Gentra). Total RNA isolation was performed from blood using the PAXgene® Blood RNA Kit (Qiagen) according to the manufacturer’s protocols. In order to determine the RNA concentration, a Qubit RNA IQ assay (ThermoFisher Scientific) was used. The RNA integrity was proved with the Bioanalyzer 2100 (Agilent). Using the High-Capacity cDNA reverse transcription Kit (ThermoFisher Scientific) and following the manufacturer’s instructions, cDNA was synthesized.

FMR1 CGG repeat size

CGG repeat analysis was determined using the AmplideX® PCR/CE FMR1 kit, following manufacturer’s recommendations (Asuragen).

FMR4 and FMR1 mRNA quantification

FMR1 mRNA and FMR4 expression levels were quantified by digital droplet PCR (ddPCR) The *FMR1* mRNA assay was performed using the QX200™ ddPCR™. Pre-design TaqMan *FMR1* gene expression assay-FAM labeled was used together with the housekeeping gene GUSβ assay-VIC labeled (ThermoFisher Scientific, Santa Clara, California) to be run in a duplex reaction. FMR4 expression analysis was performed as previously described [13]. Primer sequences for FMR4 were extracted from Elizur and coworkers [17]. In order to normalize FMR4 copies relative to nuclear DNA, the *GAPDH* gene was used as reference gene. Results were analyzed with Quantasoft™ Software (Bio-Rad). The Poisson statistics was used to calculate target RNA concentrations. The expression of FMR4 was reported as (copies/cell) corrected for the expression of the reference

gene *GAPDH*. Expression levels are shown as transcripts per ten thousand cells.

Statistical analysis

The IBM® SPSS® Statistics software version 25 (SPSS, Chicago, USA) and the open-source computing environment R version 4.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) were used to carry out statistical analysis. Results were expressed as mean±standard deviation (SD). Statistical significance of differences between means was examined using the parametric t-Test with Bonferroni correction. Significance was accepted for *P*-value<0.05.

Results

Determination of the AMH, AFC and FMR4 expression levels in FMR1 premutation carriers

The characteristics of the *FMR1* premutation carriers enrolled in the present study are presented in Table 1. The mean age was 31.9±4.4 years and the mean body mass index (BMI) 21.92±2.8 kg/m². The mean CGG repeat size for the *FMR1* allele carrying the premutation was 74.5±13.8 CGG repeats. Serum AMH levels and AFC were measured in all of them. In four cases AMH levels were <1.1 ng/ml, indicating women with diminished ovarian reserve (case 1, 6, 8 and 9). The remaining 6 cases showed high AMH levels>3 ng/ml, corresponding to normal ovarian reserves. Regarding AFC measurements among our samples, two participants showed very low AFC (<7) (case 8 and 9), three presented with normal values 7–20) and 5 showed high values (>20) (Table 1). FMR4 transcript and *FMR1* mRNA levels were also evaluated in total RNA extracted from peripheral blood by ddPCR (Table 1). The results obtained showed similar *FMR1* mRNA levels among all samples (1.03±0.3), whereas the FMR4 transcript levels were variable among samples (8.24±3.7), and within the previously reported ranges [13].

Table 1 Clinical and molecular characteristics of FMR1 premutation carriers cases included in the study

ID	Age (years)	BMI (kg/m²)	AFC	AMH (ng/ml)	CGG Repeat size	FMR1 mRNA/cell	FMR4/cell
Case_1	29	22.3	9	0.37	29/59	0.98	5.2
Case_2	35	22.4	> 20	3.7	32/58	0.54	5.8
Case_3	35	20	20	5.44	20/55	1	8.3
Case_4	35	28	16	3.09	29/78	1.39	5.6
Case_5	21	18.2	> 20	4.49	30/70	0.83	7.5
Case_6	33	18.7	9	0.9	31/89	1.35	5.6
Case_7	35	21	> 20	4.9	33/81	1	5.3
Case_8	32	24.1	3	0.02	17/73	0.55	14.6
Case_9	34	23.1	1	0.24	30/91	1.58	15.0
Case_10	30	21.4	> 20	3.4	53/91	1.1	9.8

BMI: body mass index; AFC, antral follicle count; AMH, anti-müllerian hormone

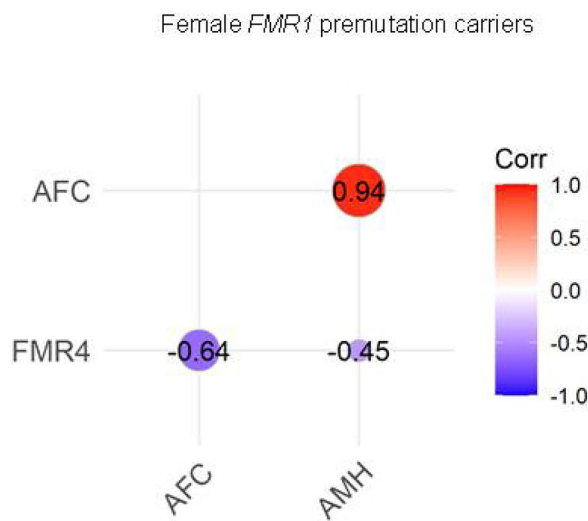


Fig. 1 Correlation between serum AMH levels, AFC and FMR4 expression levels. Correlations were evaluated among total *FMR1* premutation carriers

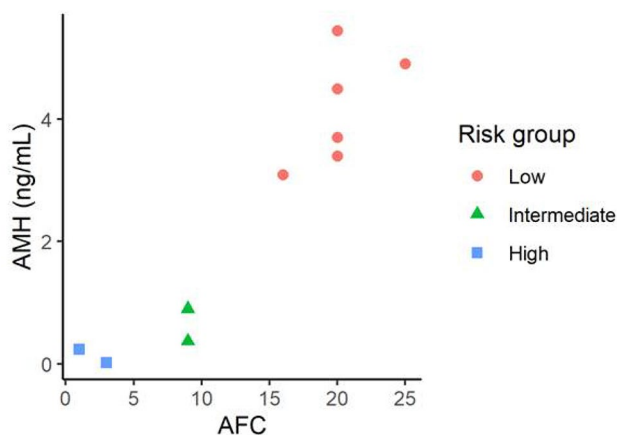


Fig. 2 Case samples categorization. Case samples categorized into low, intermediate or high FXPOI risk group according to the boundaries for the AMH levels and the AFC in the ovarian reserve test provided by the Bologna criteria" (Ferraretti et al., [18])

Association of FMR4 expression levels with AMH and AFC

Relations between AMH, AFC, and FMR4 transcript levels are shown in Fig. 1. As expected, high positive and significant correlation was found between AMH levels and AFC ($r=0.94$; $P<0.001$), meaning that patients with good ovarian reserve have high AMH and AFC values, while those with poor ovarian reserve have low levels. Contrary, a negative correlation was found between AMH, AFC and FMR4 ($r=0.45$ for AMH and $r=0.64$ for AFC). Although the correlation coefficients were moderate a barely significant correlation was found for FMR4 and AFC ($P=0.047$), suggesting that FMR4 might help as an additional biomarker for FXPOI.

Case samples were further categorized into three groups according to the boundaries for the AMH levels

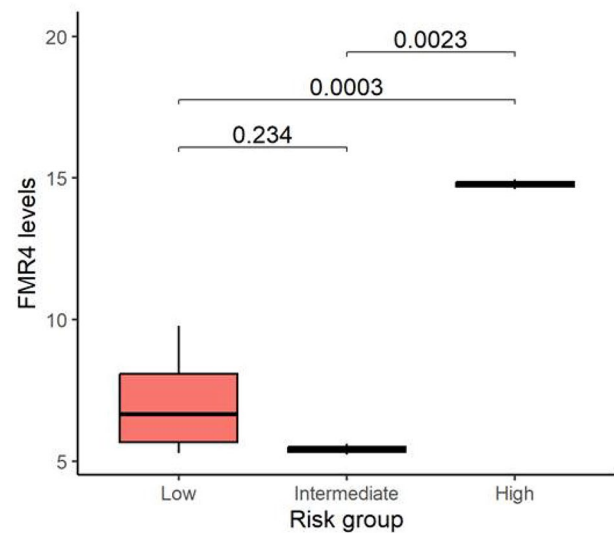


Fig. 3 Expression levels of FMR4. FMR4 expression levels compared between low, intermediate and high FXPOI risk groups. Comparisons were statistically significant between high and both intermediate and low risk groups ($P<0.05$)

and the AFC in the ovarian reserve test provided by the "Bologna criteria" to define low ovarian reserve [18]:

- Group A, $AFC \geq 7$ and $AMH \geq 1.1$ ng/ml, 6 women (both AFCs and AMH levels in the normal range);
- Group B, $AFC \geq 7$ and $AMH < 1.1$ ng/ml or $AFC < 7$ and $AMH \geq 1.1$ ng/ml, 2 women (normal AFCs and low AMH levels) or (low AFCs and normal AMH levels);
- Group C, $AFC < 7$ and $AMH < 1.1$ ng/ml, 2 women (low AFCs and low AMH levels).

While groups A and C showed concordant AMH levels and AFC, those within group B showed discordant values. In regard to the risk of developing FXPOI, group A could be considered as a low risk group, group B as an intermediate risk group, whereas group C could be considered as a high risk group (Fig. 2).

In order to assess whether FMR4 levels could provide further information on the risk of developing FXPOI, transcript levels were measured and compared between groups (Fig. 3). Statistically significant differences were obtained when comparing FMR4 transcripts levels of those with high risk to those with both an intermediate ($P=0.0023$) or low risk ($P=0.0003$). Interestingly, based on the cut-off of FMR4 levels (>12) for FXPOI described in our previous data [13], those women in group C who were at high risk based on AFC and AMH for FXPOI (cases 8 and 9) had FMR4 levels above this threshold.

Diagnostic value of FMR4 for FXPOI

Since we previously showed a good diagnostic value of FMR4 for FXPOI, we compared predictability of FXPOI based on the AFC and AMH levels and the added value of considering FMR4 expression levels. As shown in Table 2, in those cases with an intermediate FXPOI risk based on AMH level and AFC, the value of FMR4 expression added discriminatory effect and helped to reclassify them as low FXPOI risk since FMR4 expression levels were under the cutoff of 7.

Discussion

The combination of AFC and AMH levels has been postulated as the markers with highest predictive value for early detection of POI [19]. While AMH is released in females by the ovarian granulose cells and is involved in initial follicle development [20], the AFC measures the number of antral follicles in the ovary, reflecting the number of follicles that will mature. AMH serum levels together with AFC correlate with ovarian follicle number, making them a reliable marker of ovarian reserve [21, 22]. Ovarian insufficiency is a continuum of impaired ovarian function. When the ovarian dysfunction starts, these ovarian reserve markers begin to deteriorate, ending up to low or undetectable levels once entered the POI stage. Recently, Jiao and coworkers [19] described that the combination of both markers was highly promising to predict early ovarian decline, as they showed a high sensitivity and specificity to detect different stages of ovarian insufficiency (normal ovarian reserve, pre-POI, early POI and POI).

Apart from Turner’s syndrome, the *FMR1* premutation is the most common known congenital cause of POI. Women with the *FMR1* premutation have a 20% risk of FXPOI, but nowadays, there are no molecular indicators that aid to predict its occurrence, leaving young *FMR1* premutation carriers without a personalized reproductive

assessment. The causes of the incomplete penetrance of FXPOI are not well understood and, apart from the *FMR1* premutation, there are still some unknown genetic, epigenetic or environmental factors that might be influencing. In a previous study a significant association between FXPOI and high expression levels of FMR4 was revealed, suggesting a potential role of FMR4 as a possible biomarker for FXPOI. With a diagnostic power of 0.67, the ROC curve analysis showed that FMR4 can distinguish *FMR1* premutation carriers with FXPOI [13].

On the basis of these observations, in the current study, ovarian reserve indicators along with the FMR4 levels were characterized in young *FMR1* female premutation carriers in order to further evaluate their significance in predicting the risk of developing FXPOI. Pairwise correlations between AMH levels, AFC and FMR4 were assessed, and as expected, a strong significant correlation between AMH level and AFC was obtained (correlation coefficient=0.94). Interestingly, the pairwise correlation between AMH levels, AFC and FMR4 levels showed a moderate negative association (-0.64 and -0.45, respectively), suggesting the FMR4 might be further considered as an addition marker for predicting FXPOI (Fig. 1).

Although currently, no standardized AMH and AFC reference or cutoff value is available for pre-POI diagnosis we took the values described by Ferraretti et al. known as the “Bologna criteria” [18] and stratified the *FMR1* premutation carriers cohort into those with high, intermediate or low FXPOI risk based on serum AMH levels and AFC (Fig. 2). The majority of samples showed concordant AMH and AFC values, but 20% of them had discordant values. This percentage is in agreement with previously described data in clinical practice, where one in five women had discordance in the AFC and AMH level [23]. We further compared the mean FMR4 expression level among these 3 groups. Although caution must be taken due to the limited sample size, those with poor ovarian reserve markers, considered as the group with high FXPOI risk, showed statistically significant higher FMR4 levels and above the threshold determined in our previous study (Fig. 3). We further compared the risk of developing FXPOI obtained when considering AFC and AMH levels by the predicted probability of FXPOI based on our previously reported results that considered FMR4 expression levels [13]. Using a FMR4 expression levels cutoff of >12 for high FXPOI risk and <7 for low FXPOI risk, we can better discriminate those *FMR1* premutation carriers at risk of FXPOI (Table 2), especially in those cases where discordant AMH levels and AFC are detected. Nevertheless, a follow-up of this cohort is necessary in order to confirm our hypothesis.

In the general female population, *FMR1* premutation occurs with a relative high estimated frequency that range from 1 in 250 to 400 females [24]. The impact of

Table 2 Comparison of discrimination performance of risk models for predicting fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI)

ID	FXPOI Risk Group based on AFC and AMH levels	FXPOI prediction risk model (Alvarez-Mora et al., 2022)	FXPOI Risk Group based on Model
Case_2	Low	0.42	Low
Case_3	Low	0.55	Low
Case_4	Low	0.38	Low
Case_5	Low	0.47	Low
Case_7	Low	0.36	Low
Case_10	Low	0.56	Low
Case_1	Intermediate	0.40	Low
Case_6	Intermediate	0.37	Low
Case_8	High	0.76	High
Case_9	High	0.76	High

being a female *FMRI* premutation carrier is enormous, not only because it challenges women's fertility and life-long health, but also because it increases the risk of having and offspring with fragile X syndrome. Although, currently, there is no way to prevent or reverse the impaired ovarian function associated with FXPOI, the fertility preservation field has rapidly evolved, providing alternative solutions to preserve fertility. Therefore emphasis should be placed on early identification of those *FMRI* premutation women at risk of developing FXPOI that can take advantage of these solutions, such as embryo and oocyte cryopreservation.

Conclusions

In this study, we provide new evidences that, adding the *FMR4* expression levels along with ovarian reserve markers, might help to better identify *FMRI* premutation carriers at risk of FXPOI. The main weakness of our study is the low number of cases enrolled as well as the lack of follow-up. Moreover, lifestyle factors such as smoking, alcohol use or BMI, are known to influence reproductive health. Whether these factors are also affecting *FMR4* expression levels has not been explored. Nevertheless, the herein reported results warrant future prospective, longitudinal cohort studies to confirm the potential role of *FMR4* as a FXPOI biomarker and to develop strategies for fertility improvement. We hope that these results will help to improve the management of *FMRI* premutation carriers, promoting a tailored approach to patient handling.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01425-0>.

Supplementary Material 1

Acknowledgements

We would like to thank the Fragile X families, the "Associació Catalana Síndrome X fràgil", and the Federación Española del Síndrome X Frágil for their cooperation. This study was supported by Fundación Merck Salud (19-FE-011) and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), (through the project PI21/01085), co-funded by the European Union. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

Author contributions

I.A.: substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data. Final approval of the version to be published. M.I.A.M.: substantial contributions to conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data. Final approval of the version to be published. R.W.: substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data. Final approval of the version to be published. T.B.: acquisition, analysis and interpretation of data. Drafting the article. A.B., S.P., A.G. and M.G.: acquisition, analysis and interpretation of data. Final approval of the version to be published. D.M.: revising the work critically for important intellectual content and final approval of the version to be published. L.R.R.: drafting the work or revising it critically for important intellectual content and final approval of the version to be published.

Data availability

The analyzed data sets generated during the study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval

This protocol was agreed by the the Institutional Ethical Review Board of Hospital Clinic, Barcelona (HCB/2023/0024). All subjects had written the informed consent.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 9 November 2023 / Accepted: 25 April 2024

Published online: 17 May 2024

References

1. Anderson RA, Nelson SM. Anti-Müllerian hormone in the diagnosis and prediction of premature ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med*. 2020;38:263–9.
2. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*. 2009;360:606–14.
3. Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;97:189–94.
4. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 1991;65:905–14.
5. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 1991;252:1097–102.
6. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*. 1991;252:1179–81.
7. Avraham S, Almog B, Reches A, Zakar L, Malcov M, Sokolov A, et al. The ovarian response in fragile X patients and premutation carriers undergoing IVF-PGD: reappraisal. *Hum Reprod*. 2017;32:1508–11.
8. Galloway JN, Nelson DL. Evidence for RNA-mediated toxicity in the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Future Neurol*. 2009;4:785.
9. Hipp HS, Charen KH, Spencer JB, Allen EG, Sherman SL. Reproductive and gynecologic care of women with fragile X primary ovarian insufficiency (FXPOI). *Menopause*. 2016;23:993–9.
10. Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, et al. Association of *FMR1* repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod*. 2005;20:402–12.
11. Ennis S, Ward D, Murray A. Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in *FMR1* premutation carriers. *Eur J Hum Genet*. 2006;14:253–5.
12. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the *FMR1* premutation. *Hum Reprod*. 2007;22:2142–52.
13. Alvarez-Mora MI, Agusti I, Wijngaard R, Martinez-Barrios E, Barcos T, Borrás A, et al. Evaluation of *FMR4*, *FMR5* and *FMR6* expression levels as non-invasive biomarkers for the diagnosis of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). *J Clin Med*. 2022;11:2186.
14. Khalil AM, Faghihi MA, Modarresi F, Brothers SP, Wahlestedt C. A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS ONE*. 2008;3:e1486.
15. Pastori C, Peschansky VJ, Barbouth D, Mehta A, Silva JP, Wahlestedt C. Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human *FMR1* gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Hum Genet*. 2014;133:59–67.
16. Peschansky VJ, Pastori C, Zeier Z, Motti D, Wentzel K, Velmeshev D, et al. Changes in expression of the long non-coding RNA *FMR4* associate with altered gene expression during differentiation of human neural precursor cells. *Front Genet*. 2015;6:263.

17. Elizur SE, Dratviman-Storobinsky O, Derech-Haim S, Lebovitz O, Dor J, Orvieto R, et al. FMR6 may play a role in the pathogenesis of fragile X-associated premature ovarian insufficiency. *Gynecol Endocrinol*. 2016;32:334–7.
18. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, ESHRE working group on poor ovarian response definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011;26:1616–24.
19. Jiao X, Meng T, Zhai Y, Zhao L, Luo W, Liu P, et al. Ovarian Reserve markers in premature ovarian insufficiency: within different clinical stages and different etiologies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:601752.
20. di Clemente N, Racine C, Pierre A, Taieb J. Anti-Müllerian hormone in female reproduction. *Endocr Rev*. 2021;42:753–82.
21. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update*. 2014;20:370–85.
22. Granger E, Tal R. Anti-Müllerian hormone and its predictive utility in assisted reproductive technologies outcomes. *Clin Obstet Gynecol*. 2019;62:238–56.
23. Zhang Y, Xu Y, Xue Q, Shang J, Yang X, Shan X, et al. Discordance between antral follicle counts and anti-Müllerian hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019;17:51.
24. Tassone F, Long KP, Tong TH, Lo J, Gane LW, Berry-Kravis E, et al. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome Med*. 2012;4:100.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article 3

Prevalence of the *FMR1* Gene Premutation in Young Women with a Diminished Ovarian Reserve Included in an IVF Program: Implications for Clinical Practice

Agustí I, Méndez M, Borrás A, Goday A, Guimerà M, Peralta S, Ribera L, Rodriguez-Revenga L, Manau D

Genes. 2024; 15(8):1008. <https://doi.org/10.3390/genes15081008>

Estat: publicat. Factor d'impacte de la revista: 2.8, 2n quartil en Genètica

Resum

La relació entre la insuficiència ovàrica prematura i la premutació en el gen *FMR1* està ben establerta. En els darrers anys, però, s'ha suggerit una possible relació entre aquesta i una baixa reserva ovàrica (BRO).

Material i Mètodes: Estudi retrospectiu en un programa de fecundació in vitro (FIV) en un centre de referència terciari universitari a Barcelona. Es van obtenir dades d'un total de 385 dones derivades per a la prova del gen *FMR1* a la nostra institució des de gener de 2018 fins a desembre de 2021. Es va comparar la prevalença de la premutació del gen *FMR1* entre 93 d'elles, menors de 35 anys, amb una BRO, caracteritzada per nivells d'AMH < 1,1 ng/mL i RFA < 5; i 132 donants d'òvuls que formaven el grup control.



Resultats: els resultats mostren una major prevalença de premutació *FMR1* al grup BRO (7,69%) que al grup control (1,32%), (p-valor de la prova exacta de Fisher = 0,012).

Conclusió: La prevalença de la premutació del gen *FMR1* és més alta en pacients joves amb una BRO que es troben en un programa de FIV en comparació amb la població general.

Article

Prevalence of the *FMR1* Gene Premutation in Young Women with a Diminished Ovarian Reserve Included in an IVF Program: Implications for Clinical Practice

Inés Agustí ¹ , Marta Méndez ¹, Aina Borrás ^{1,2} , Anna Goday ¹ , Marta Guimerà ¹ , Sara Peralta ¹ , Laura Ribera ¹, Laia Rodriguez-Reventa ^{3,4}  and Dolors Manau ^{1,2,*}

- ¹ Assisted Human Reproduction Unit, Gynecology Service, Clinic Institute of Gynecology, Obstetrics, and Neonatology (ICGON), Hospital Clínic Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; iagustis@clinic.cat (I.A.); mamendez@clinic.cat (M.M.); aborras1@clinic.cat (A.B.); goday@clinic.cat (A.G.); mguimera@clinic.cat (M.G.); speralta@clinic.cat (S.P.); laribera@clinic.cat (L.R.)
- ² Fundacio Clinic de Recerca Biomedique-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain
- ³ Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic of Barcelona—Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; lbodi@clinic.cat
- ⁴ CIBER of Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: dmanau@clinic.cat

Abstract: The relationship between premature ovarian insufficiency (FXPOI) and premutation in the *FMR1* gene is well established. In recent years, though, a potential relationship between the latter and a low ovarian reserve has been suggested. To explore it, we conducted a retrospective study in an IVF program at a university tertiary referral center in Barcelona (Spain). Data were obtained retrospectively from a total of 385 women referred for *FMR1* gene testing at our institution from January 2018 to December 2021. We compared the prevalence of *FMR1* gene premutation between 93 of them, younger than 35 years, with a diminished ovarian reserve (DOR), characterized by levels of anti-Mullerian hormone < 1.1 ng/mL and antral follicle count < 5; and 132 egg donors screened by protocol that served as the controls. We found a higher prevalence of *FMR1* premutation in the DOR group (seven patients (7.69%)) than in the control group (one patient (1.32%)), Fisher-exact test p -value = 0.012). We concluded that compared with the general population represented by young egg donors, the prevalence of *FMR1* gene premutation is higher in young patients with a diminished ovarian reserve. Although these findings warrant further prospective validation in a larger cohort of patients within DOR, they suggest that, in clinical practice, *FMR1* premutation should be determined in infertile young patients with DOR in order to give them adequate genetic counselling.

Keywords: *FMR1* premutation; premature ovarian failure; POSEIDON 3



Citation: Agustí, I.; Méndez, M.; Borrás, A.; Goday, A.; Guimerà, M.; Peralta, S.; Ribera, L.; Rodriguez-Reventa, L.; Manau, D. Prevalence of the *FMR1* Gene Premutation in Young Women with a Diminished Ovarian Reserve Included in an IVF Program: Implications for Clinical Practice. *Genes* **2024**, *15*, 1008. <https://doi.org/10.3390/genes15081008>

Academic Editor: Xingguang Luo

Received: 7 July 2024

Revised: 29 July 2024

Accepted: 30 July 2024

Published: 1 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fragile X syndrome (FXS) (#MIM300624; ORPHA 908) is the most common cause of inherited intellectual disability, affecting 1 in 4000 men and 1 in 8000 women [1]. It is caused by silencing of the *FMR1* gene (fragile X messenger ribonucleoprotein 1), due to the presence of a full mutation (>200 CGG repeats) in the 5' untranslated region of the *FMR1* gene [2]. The *FMR1* gene is also the first single-gene cause of premature ovarian failure (fragile-X-associated premature ovarian insufficiency (FXPOI)) and one of the most common causes of ataxia (fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)). Both FXPOI and FXTAS are associated with the premutation of the *FMR1* gene (alleles within 55–200 CGG repeats) [3,4].

The association between *FMR1* gene premutation and premature ovarian insufficiency (POI) is well established [5]. Approximately 20% of women who carry *FMR1* gene premutation experience POI, whereas this occurs in only 1% of women in the general population [6].

Premature ovarian insufficiency (POI) is defined as the absence of menstruation (amenorrhea) due to the loss of ovarian function before the age of 40 years. Nevertheless, the guidelines of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) recommends the following, more specific, diagnostic criteria for POI: oligo/amenorrhea for at least four months and a follicle-stimulating hormone (FSH) level above 25 IU/l on two occasions separated by more than four weeks [7].

In the last decade, some studies have reported an association between the prevalence of *FMR1* premutation and a diminished ovarian reserve (DOR), but this is not well established because the results are controversial and mixed up by different *FMR1* repeat lengths [6,8–11].

The reception of donor oocytes is indicated for the treatment of ovarian failure. This assisted reproduction technique has high success rates, as indicated by high live birth rates. However, it entails relinquishing the gamete itself, which can be emotionally distressing for couples.

Recent reports from the World Health Organization reveal that 1 in 6 individuals will experience fertility issues throughout their lifetime [12]. This high prevalence is multifactorial, with a significant factor being the delay in women's age at first pregnancy, especially in Western countries, particularly Southern Europe, where Spain has the lowest birth rate (according to the latest report from the Spanish Society of Fertility, it is estimated that 11% of all births in Spain are through assisted reproduction techniques [13]), only surpassed by Malta. This is particularly important because there is a physiological decline in fertility associated with the depletion in the number of oocytes, but also a decrease in the quality of oocytes with age. This leads to a reduction in spontaneous fertility but also impacts the success rates of assisted reproductive technologies (ART), where age influences the probability of achieving pregnancy [14].

During the initial assessment for in vitro fertilization (IVF), markers of the ovarian reserve are typically requested (including anti-Müllerian hormone (AMH) levels and the antral follicle count (AFC)). These markers have been established and standardized in the evaluation of patients with infertility. These markers guide the stimulation protocol required to achieve optimal ovarian stimulation.

Based on all of the above, in this study, we sought to determine the prevalence of *FMR1* premutation at an assisted human reproduction unit at a university, tertiary referral hospital. Specifically, we tested the hypothesis that *FMR1* premutation study should be determined in infertile young patients with DOR in order to give them adequate genetic counselling.

2. Methods

2.1. Study Population

Data from 385 women referred for *FMR1* gene testing at our institution from January 2018 to December 2021 were collected retrospectively. Clinic Barcelona is a university hospital that belongs to the Catalan Public Hospital Network. All women were visited at the Assisted Reproduction Unit, and molecular genetic testing was performed via the Biochemistry and Molecular Genetics Service, an accredited reference laboratory for these tests. Information on the demographic and clinical markers for ovarian reserve (AFC and AMH) was registered. An *FMR1* premutation is defined between 55 and 200 CGG repeats, while those below 55 are considered normal [15].

We reviewed the requests for this genetic testing and grouped these 385 women into 5 different categories: family history, premature ovarian insufficiency, young patients with a diminished ovarian reserve, oocyte donors, and miscellaneous.

From this data base, we selected the group with a diminished ovarian reserve (DOR), which included 93 women younger than 35 years. DOR was defined as those who presented regular cycles and altered ovarian reserved markers (AFC < 5, AMH < 1.1 ng/mL), in line with the POSEIDON criteria [16] that aim to identify patients with a poor prognosis in ART. The POSEIDON criteria consider the number of oocytes retrieved in previous stimulations, the age-related aneuploidy rate, and the ovarian "sensitivity" to exogenous gonadotropins,

which impacts the total number of oocytes retrieved. These factors affect the final success rates of ART [17].

Additionally, we reviewed the various causes of infertility in the study group (such as male factor, tubal pathology or sterility of unknown origin among others).

As the control group, we used data from 132 cases of oocyte donors (who were screened for the *FMR1* gene by protocol).

2.2. Measurements

2.2.1. CGG and AGG Determination

A peripheral venous blood sample was obtained in each woman. Genomic DNA was isolated by standard methods (Puregene and Purescript kits, Gentra, Minneapolis, MN, USA). The CGG repeat number and AGG interruptions were determined by a triplet repeat primed PCR (TP-PCR) using Asuragen AmpliDeX[®] *FMR1* PCR Kit (Asuragen, Austin, TX, USA). Amplicons were evaluated on an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), and GeneMapper software version 4.1 (Applied Biosystems) was used to determine the different sizes.

2.2.2. Hormonal Determination

Biochemical parameters were measured in serum using standard methods in the Core Laboratory of our hospital, and the results were expressed according to female reference ranges. Anti-Mullerian hormone (AMH) was determined in the serum by a chemoluminescence immunoassay with paramagnetic particles for quantitative determination (AMH B13127 Beckman Coulter kit and in the ACCES2 device, Brea, CA, USA) (LOQ 0.02 ng/mL, interassay coefficient of variation < 5%; results expressed in ng/mL; normal female values between 1.0 and 4.5).

2.2.3. Antral Follicle Count Determination

A Voluson S6 unit, General Electrics Medical Systems (Tiefenbach, Austria), equipped with a 5–7 MHz vaginal probe, was used. In this examination, a baseline gynecological assessment was performed to exclude gynecological pathology together with the antral follicle count (AFC). The AFC was calculated by measuring all the follicles with a diameter between 2 and 9 mm by ultrasound.

2.2.4. Statistical Analysis

Continuous data are expressed as the mean and standard deviation, and categorical data as proportions. Normality was analyzed using the Shapiro–Wilk test. Groups were compared using Student's *t*-test, the Mann–Whitney U test, the Chi-square test or the Fischer exact test, depending on data type and distribution. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. Analyses were carried out with R (version 1.2).

3. Results

3.1. Study Population

A total of 385 women referred for *FMR1* gene testing were examined between January 2018 and December 2021. The genetic testing indications were as follows (Figure 1): 113 (29.3%) patients with POI (established amenorrhea/oligomenorrhea and FSH > 25); 12 patients (3.1%) with a family history of the *FMR1* mutation; 93 patients (24.2%) were infertile normo-ovulatory and young (≤ 35 years old) women with DOR, defined as antral follicle count (AFC) < 5 and anti-Mullerian hormone < 1.1 ng/mL (according to POSEIDON criteria); and 35 patients (9.1%) for other causes, including consanguinity cases, non-sterile patients in other endocrinological studies, request errors, or patients older than 40 years. In the control group, we included 132 (34.3%) cases of oocyte donors, in whom *FMR1* gene testing was determined by protocol.

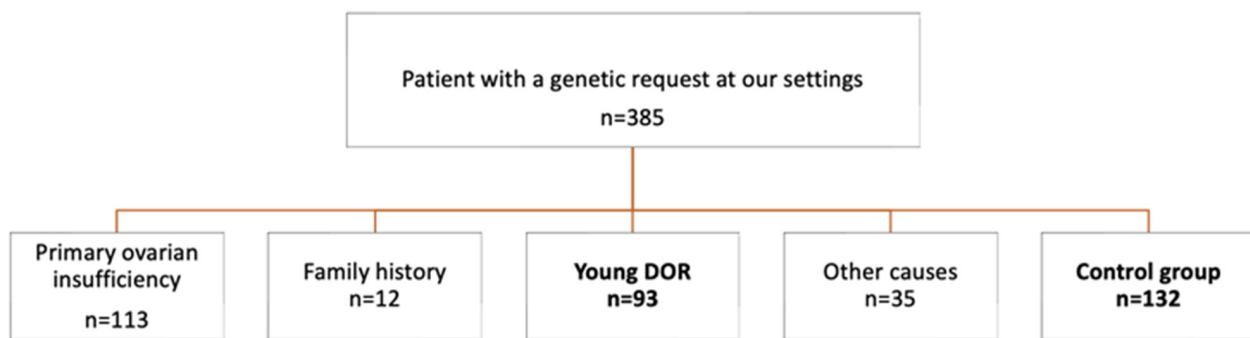


Figure 1. Consort diagram of the study. DOR: diminished ovarian reserve.

Regarding the study group, the causes of infertility were as follows: a total of 54 young DOR patients out of 93 (58.06%) came to our consultation due to infertility of unknown origin, followed by 14 (15.05%) due to a male cause; 11 patients from the total study population (11.83%) were diagnosed with endometriosis as a cause of sterility; and the tubal cause was present in 8 cases (8.60%). The rest of the patients (6 (6.45%)) attended for other reasons.

Figure 1 presents the consort diagram of the study and Table 1 the clinical characteristics of the study population. By focusing on the young DOR group (young patients who will undergo an IVF cycle), significant differences were observed in terms of age and ovarian reserve markers between the control group and the young DOR group. As expected, the young DOR group showed statistically significant decreased ovarian reserve markers, with low AMH levels (0.40 ± 0.29) and a lower AFC (4.9 ± 3.0) (Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of the women included in the study.

PATIENT GROUP	N	AGE	AMH	AFC
YOUNG DOR	93	31.813 ± 2.551	0.406 ± 0.291	4.988 ± 3.058
CONTROL	132	$25.705 \pm 0.4.704$	3.073 ± 0.993	21.724 ± 9.726

AMH: anti-Mullerian hormone levels; AFC: antral follicular count.

Figure 2 shows that seven patients carried the premutation in the young DOR group (7.69%), while only one patient (1.32%) did among the controls (Fisher's exact test p -value = 0.012).

We also compared the levels of AMH, AFC, and the number of oocytes retrieved during ovarian stimulation between non-premuted and premuted patients in the study group. It was observed that the premuted patients in this group had lower AMH and AFC levels compared to the non-premuted patients (AMH 0.25 ng/mL vs. 0.4 ng/mL and AFC 4.4 vs. 5.1, respectively), and a reduced oocyte recovery as well (2.25 vs. 4.45 oocytes retrieved, respectively) (Table 2).

Table 2. Comparison between premuted and non-premuted patients in the study group.

	AMH (ng/mL) (Mean)	AFC (Mean)	Number of Oocytes (Mean)
No premutation DOR ($n = 86$)	0.4	5.1	4.45
Premutation DOR ($n = 7$)	0.26	4.4	2.25

AMH: anti-Mullerian hormone levels; AFC: antral follicular count.

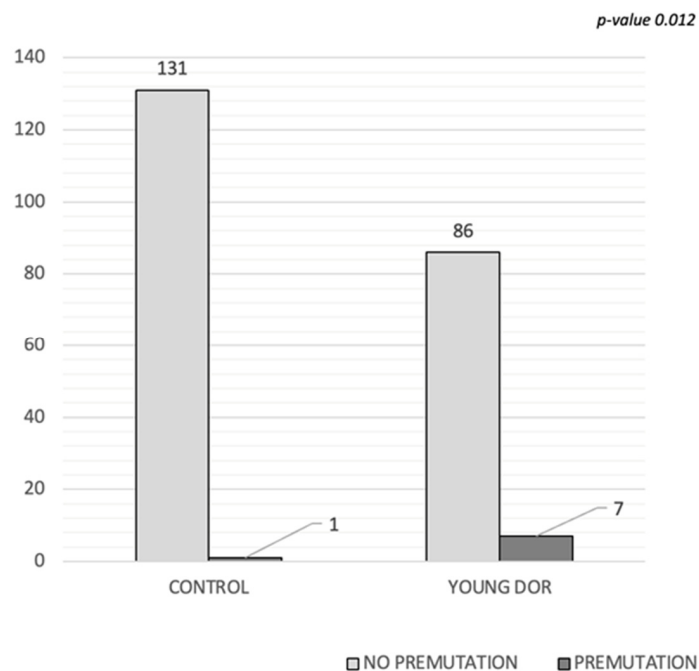


Figure 2. Fisher's exact test $p = 0.012$. DOR: diminished ovarian reserve.

3.2. Treatment Received by the Young DOR Population

Regarding the treatments received by the young DOR population, 26 of these patients attempted one or more cycles of artificial insemination (27.9% of the cases). Of these 26, 9 ended up undergoing an IVF cycle and 4 achieved pregnancies. Nineteen patients attempted a natural-cycle IVF (20.4%), and six of them subsequently underwent one or more IVF cycles, and two pregnancies were achieved. Forty-one patients attempted a direct IVF cycle (44.1% of the population), achieving 13 pregnancies. A total of seven patients carried out an egg donation treatment at a private center.

Regarding the seven premutated patients, two underwent IVF pre-implantation genetic testing for monogenic disorders (PGT-M), three attempted IVF during a natural cycle, and four underwent egg donation.

The AGG interruptions in the premutation carriers were also assessed and no interruptions were found in any case, except one young DOR patient.

3.3. FMR1 Allele Size

Based on allelic groups, we created a table (Table 3) displaying their distribution within our population. In the control group, 131 individuals did not carry the premutation, while only 1 was detected with the premutation in the low repetition range. Conversely, within the young DOR group, seven patients were diagnosed with the premutation: four in the low repetition range, two in the medium range, and one with over 100 repetitions.

Table 3. Frequency of different *FMR1* repeat sizes among the study groups. Fisher's exact test $p = 0.3032$.

Group	NON-CARRIER			PREMUTATION	
	COMMON < 45	INTERMEDIATE 45–54	LOW 55–79	MEDIUM 80–99	HIGH > 100
CONTROL	131 (99.24%)	-	1 (0.76%)	-	-
YOUNG DOR	84 (90.32%)	2 (2.15%)	4 (4.30%)	2 (2.15%)	1 (1.08%)

We looked at the occurrence of intermediate alleles (with 45 to 54 CGG repeats) independently. Among the study group, two exhibited an intermediate range of CGG

repeats. We compared the intermediate range of triples between both groups, but found no differences (p -value of 0.30).

We also reviewed the ovarian reserve markers in two subgroups of the non-premutation patient group. In the low-repeat group (<26 CGG repeats on both alleles), 7 women out of 84 were identified with a mean AMH level of 0.84 ng/mL and a mean AFC of 6.3. Additionally, there were two individuals in the intermediate (or gray) zone with a mean AMH level of 0.7 ng/mL and an AFC of 5. These findings are consistent with the expectations for the group characterized by a low ovarian reserve in young patients (POSEIDON Group 3). Unfortunately, the current sample size is insufficient to perform statistical tests and draw definitive conclusions from these two subgroups.

4. Discussion

This study shows that the prevalence of premutation of the *FMR1* gene in women younger than 35 years of age with infertility and low ovarian reserve markers according to POSEIDON criteria was higher (7.69%) than in the controls (oocyte donors; 1.32%, $p = 0.012$).

Approximately 1/250 females and 1/800 males carry premutation alleles in the range of 55–200 repeats. Among women who carry the premutation, 20–24% have POI, compared with only 1% in the general population [18]. Overall, premutation carriers go through menopause ~5 years earlier than non-carriers and, among those still cycling, have higher FSH levels [19–21].

The molecular basis of FXPOI has been poorly studied, and we still do not fully understand the role that the *FMR1* gene plays in ovarian function, or the molecular pathways involved in FXPOI.

Another important question is why ovarian dysfunction is limited only to women carrying the premutation. Several theories have been proposed to explain this, with one of the most accepted being that the messenger RNA (mRNA) levels of the *FMR1* gene in carriers are increased [22], leading to a gain-of-function of this mRNA, with toxic effects on the cell [23]. Another theory is that the expanded CGG repeat tract (expCGG mRNA) could be interfering with normal follicle development [24–26]. It has been shown that expCGG mRNA is capable of sequestering proteins and other transcripts, forming intranuclear inclusions detected in ovarian stromal cells and other tissues [27]. These inclusions contain toxic polypeptides (FMRpolyG), which, together with the inclusions and increased levels of expCGG mRNA, contribute to the development of various diseases associated with the premutation of the gene: FXPOI and FXTAS [28].

The association between the CGG repeat length in the *FMR1* gene and POI risk has also been a topic of interest, but the results from individual studies were inconsistent and sometimes contradictory, especially for idiopathic POI. Four allelic groups have been distinguished based on the number of *FMR1* CGG repeats: normal alleles range from 5 to 44 repeats; intermediate alleles (also called grey zone) span 44 to 54 repetitions; premutation alleles range from 55 to 200 repeats; and full mutations consist of over 200 repeats [15]. Intermediate and premutation alleles can be unstable when transmitted from the mother to the child, leading to a full mutation across several generations.

Regarding the premutation allelic group (55 to 200 repetitions), we can distinguish three subgroups: low number with repetitions from 55 to 79 reps., medium number with 80–99 reps., and high number with more than 100 reps. Interestingly, the association of the repeat size with the risk is non-linear. In 2007, a study showed a non-linear relationship among premutation carriers and ovarian insufficiency [18]. The mid-range repeat size group (80–99 repeats), not the highest group, had an increased risk for altered cycle traits (shortened cycle length, irregular cycles and skipped cycles), subfertility, and dizygotic twinning [18]. In our study, four patients in the young DOR group had premutation within the low range of CGG repeats and two were within the intermediate range. Only one was classified within the high range. We compared the intermediate range of triples between both groups, but found no differences (p -value of 0.30).

Although it is well known that *FMR1* premutation is associated with POI, the prevalence of premutation in a population of patients with a low ovarian reserve and its implications in routine clinical practice is unknown. Previous studies have demonstrated that the prevalence of *FMR1* premutation is increased in women with DOR compared with women with other causes of infertility and oocyte donors [6]. Other studies have suggested that the premutation, as well as the intermediate repeat length and high normal repeat length (35–44 repeats) are associated with POI. But the literature is inconsistent on the association between the *FMR1* trinucleotide repeat length and infertility [29–33]. However, in a population-based study, Murray et al. [33] revealed that premutation-sized *FMR1* repeats are substantial risk factors for POI, whereas intermediate alleles were not. Other studies reported a significant increase in the number of intermediate and premutation *FMR1* alleles in DOR patients compared with the controls [6,8,31,34]. On the other hand, De Geyter et al. [35], in their prospective cohort study, found that neither of the categories of *FMR1* CGG repeat length expansions (premutation, intermediate range) was more prevalent in infertile women with POI than control women, nor was the CGG repeat length correlated with the severity of premature ovarian insufficiency. In 2009, Streuli et al. published a retrospective study in which a group of women with infertility and BRO was compared with one of infertile women with a normal ovarian reserve (control). Their results suggested that there was a greater risk in the group of BRO women of presenting a number of repetitions in the intermediate or premutated range (>40 CGG repetitions) compared to the control group [8]. Pastore et al. have published extensively on this topic. In 2014, they reported that there appeared to be a higher rate of follicular loss beginning at older ages in women with BRO and ≥ 35 CGG repeats [36]. Subsequently, in 2017, they investigated whether associations between CGG repeat lengths differed between women diagnosed with BRO from population controls, and whether associations varied by racial/ethnic group. No significant differences were found in the normal/intermediate range between the cases and controls or by racial/ethnic group, and they concluded that the study rejected the association between BRO and high/normal/intermediate repetitions, and confirmed an association between BRO and low/normal repetitions in white women [10]. That same year, Man et al., in their review, proposed a new concept: a fragile-X-associated diminished ovarian reserve (FXDOR). This diagnosis will be a diagnosis of exclusion, after excluding all other known reasons for infertility (for instance, the male factor, endometriosis, mechanical factor, etc.) in a woman carrying a premutation allele with regular menstruations, regardless of the levels of ovarian markers, younger than 40 years of age. They also reported that there was a higher risk of FXPOI if the woman had between 80 and 100 CGG repetitions vs. >100 CGG repetitions. They proposed a phenotype in women with a premutation, which derived from the combination of different damages that occur in stages of development and maintenance of the follicular pool [37]. Eslami et al. recently published that the frequency of *FMR1* premutation in both DOR and POI patients was significantly higher than that in the control group, and presented high FSH levels and low AMH levels. Moreover, they concluded that intermediate-sized *FMR1* CGG repeat alleles should not be considered a high risk factor for POI and DOR [9]. These data are supported by a recently published meta-analysis that reported on the association between CGG repeat lengths of the *FMR1* gene and the severity of POI. Thirteen studies, comprising 2047 cases and 6912 controls, were included to assess premutation and intermediate repeat length in POI patients. Premutation of the *FMR1* gene showed a significant association with POI compared to the controls, while there was no significant correlation found between intermediate repeat length and POI. Additionally, six studies, involving 975 patients and 1749 controls, were eligible for evaluating premutation and intermediate repeat length in DOR. Premutation was significantly associated with DOR, whereas no significant correlation was found between an intermediate repeat length and DOR in the case–control comparison [5].

It is also important to consider the number of AGG interruptions. These trinucleotides typically appear at the 5' end of the CGG repeat sequence [38]. They are described within the *FMR1* gene as a marker contributing to gene stability and potentially associated with

the development of FXPOI, thereby implicating ovarian dysfunction in the process. Several studies have reported that premutation carriers, particularly those with at least one AGG interruption within the CGG repeat sequence, are less prone to experiencing an expansion of the CGG repeat length into a full mutation. Consequently, they are less likely to have a child with fragile X syndrome (FXS) in the following generation [39–42]. Lekovic et al. demonstrated a direct correlation between the number of AGG interruptions and ovarian reserve parameters a few years ago. Their findings indicated that patients with longer uninterrupted CGG repeats following AGG interruptions exhibited the lowest ovarian reserve [11]. In our assessment of AGG interruptions among premutation carriers, no interruptions were detected in any case, except for one young DOR patient.

There are few published studies on the outcomes of ART in these patients. Generally, a decreased response to ovarian stimulation has been suggested [43,44]. In 2010, a study was published to determine if there was a correlation between the number of CGG repeats and the number of retrieved oocytes, concluding that women with a number of repeats between 80 and 120 responded with fewer oocytes [45]. On the contrary, Geyter et al. found no correlation between the number of CGG repeats and markers of ovarian reserve parameters. Therefore, they concluded that infertility (even with a reduced ovarian reserve) is not suitable to identify the possible premutated patients [35]. Similarly, Friedman-Gohas also observed no associations between the number of CGG repeats or AGG interruptions and any of the controlled ovarian hyperstimulation variables [28]. Avraham et al., in their 2017 retrospective study, analyzed 309 fresh cycles overall (of 21 patients with a full mutation of the *FMR1* gene and 51 premutation carriers). The results suggested that the premutation carriers displayed a reduced ovarian response (fewer oocytes retrieved) and full-mutation patients had a normal response. There was no significant difference between premutation carriers and full-mutation patients with regards to the fertilization rate, cleavage rate or biopsy rate [43]. Elizur's group reported that this reduction in ovarian response to stimulation could be due to the accumulation of *FMR1* mRNA in ovarian granulosa cells [24]. In a review conducted by the Pastore group in 2019, they explored the outcomes of ART in relation to the premutation status of the *FMR1* gene, reporting that women with the premutation had a decreased pregnancy rate due to a lower number of retrieved oocytes compared to women without the premutation or with a full mutation [46]. In 2023, in a Chinese study pending publication, the researchers investigated whether CGG repeats affected the ovarian function or response during the IVF cycle, observing a negative correlation between CGG repeats and serum AMH, E2, AFC, and oocyte yield, but no significant differences were found between CGG repeats and the embryo quality or live birth rate [47].

On the other hand, different studies set 35 years as the cut-off age because from this age onwards, the ovarian reserve decreases markedly and the alteration in the ovarian reserve markers can be explained by the aging process of the woman [9,48].

Additionally, the use of POSEIDON criteria has allowed for not only optimizing the IVF cycle in a specific patient, but also guiding clinicians in assessing the need for complementary tests (including genetic), thus personalizing the treatment during a medical consultation. Along this line, our study has tried to find a patient profile that clusters the characteristics (POSEIDON Group 3) in order to assess the status of the fragile X gene, since it will modify the prognosis and the future of the patient. According to the latest literature, the patient population belonging to POSEIDON Group 3 constitutes approximately 10% of the POSEIDON population [16,49]. Based on these data, the prevalence of POSEIDON 3 patients in our center is 13%, with genetic testing for fragile X being conducted in 80% of these patients.

The diagnosis of a premutation implies several consequences in different areas such as at the reproductive level, because the patient with the premutation will be reoriented to IVF with an implantation genetic diagnosis in order to avoid the development of FXS in the offspring. The failure to diagnose it could lead to affected children, with a high economic and social impact. However, it is important to remember that professionals and patients

should be aware of the limitations of this procedure which, on one hand, are due to the quantity of fertile oocytes (which directly depends on the patient's response to stimulation), and on the other hand, the laboratory technique itself [50].

The American College of Medical Genetics and the American College of Obstetrics and Gynecology guidelines in 2010 [51] recommended the evaluation of women with infertility and/or elevated FSH for the *FMR1* premutation based on the phenotype in known carriers [18–20,52,53]. In 2008, Rajendra et al. [54] reported that half of newly diagnosed fragile X families were discovered due to the birth of an affected child. This reinforces the idea of studying women with DOR before having an affected child in the same generation (for premutation carriers). Currently, neither the European nor the American assisted human reproduction guidelines, in contrast to the two mentioned above, recommend screening for the fragile X gene in patients with low ovarian reserve markers.

Regarding the screening protocol for oocyte donors, the Spanish Fertility Society and the American Society for Reproductive Medicine have endorsed genetic testing for the *FMR1* gene in women willing to donate their eggs [55,56]. However, the European Society of Fertility keeps the option to request such a study open [57]. Regarding the Australian and New Zealand Fertility Society, relevant genetic studies are recommended according to the donor's ethnicity (<https://www.fertilitysociety.com.au/donor-programme-australia-new-zealand/#screening-egg>, accessed on 29 July 2024). Finally, the Canadian Fertility Society recommends genetic testing if a disease is suspected after completing a structured questionnaire (<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/publications/drugs-health-products/technical-directive-sperm-ova-donors.html#a2.1.2>, accessed on 29 July 2024).

Several strengths of our study are worth mentioning. First, it is the first study to investigate the prevalence of *FMR1* gene premutation among young patients with a diminished ovarian reserve undergoing IVF treatment, finding a higher prevalence of premutation. Additionally, regarding the prevalence of the premutation in young women with a diminished ovarian reserve, there is little published on this topic, and the results are inconsistent [6,9,11,31] and with little clinical translation. Moreover, in our clinical practice, young patients with DOR are frequent and they demand to continue with IVF cycles and have biologically related offspring. We consider that this group could be a good profile of patients eligible to perform the genetic study. On the other hand, we acknowledge several potential limitations, including that our study is a retrospective review of *FMR1* gene results, with limited determinations of *FMR1* studies, and that donor screening and young infertile patients with a significantly low ovarian reserve were the main indications to request the *FMR1* status gene, which might have led to selection bias.

5. Conclusions

We concluded that the prevalence of *FMR1* premutation is significantly higher in young women with DOR than in the general population. These results should be confirmed prospectively in a larger population of POSEIDON 3 patients to provide them adequate clinical and genetic counselling to minimize the impact and consequences that could arise from a late diagnosis.

Author Contributions: Conceptualization, all authors; writing original draft preparation, I.A., A.B., L.R.-R. and D.M.; figure preparation I.A. and M.M.; manuscript review and editing: all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Fundación Merck Salud (19-FE-011) and the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (through the project PI21/01085), co-funded by the European Union. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Hospital Clinic Barcelona (HCB/2021/1154).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Turner, G.; Webb, T.; Wake, S.; Robinson, H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **1996**, *64*, 196–197. [\[CrossRef\]](#)
2. Fu, Y.H.; Kuhl, D.P.; Pizzuti, A.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J.S.; Richards, S.; Verkerk, A.J.; Holden, J.J.; Fenwick, R.G., Jr.; Warren, S.T.; et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell* **1991**, *67*, 1047–1058. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Cronister, A.; Schreiner, R.; Wittenberger, M.; Amiri, K.; Harris, K.; Hagerman, R.J. Heterozygous fragile X female: Historical, physical, cognitive, and cytogenetic features. *Am. J. Med. Genet.* **1991**, *38*, 269–274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Hagerman, R.J.; Amiri, K.; Cronister, A. Fragile X checklist. *Am. J. Med. Genet.* **1991**, *38*, 283–287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Huang, J.; Zhang, W.; Liu, Y.; Liu, Y.; Wang, J.; Jiang, H. Association between the FMR1 CGG repeat lengths and the severity of idiopathic primary ovarian insufficiency: A meta analysis. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 3116–3122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Karimov, C.B.; Moragianni, V.A.; Cronister, A.; Srouji, S.; Petrozza, J.; Racowsky, C.; Ginsburg, E.; Thornton, K.L.; Welt, C.K. Increased frequency of occult fragile X-associated primary ovarian insufficiency in infertile women with evidence of impaired ovarian function. *Hum. Reprod.* **2011**, *26*, 2077–2083. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. European Society of Human Reproduction and Embryology, (ESHRE). Evidence-Based Guideline: Premature Ovarian Insufficiency. 2024, Draft for Review. Available online: https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.eshre.eu/-/media/sitecore-files/Guidelines/POI/2024/ESHRE-GUIDELINE_POI_DRAFT-FOR-REVIEW_2024.pdf&ved=2ahUKEwj1u8WJydCHAxWQzQIHHSBbELsQFnoECBgQAQ&usq=AOvVaw1PpYJ3qMrOFGvRf3ONVaKT (accessed on 29 July 2024).
8. Streuli, I.; Fraisse, T.; Ibecheole, V.; Moix, I.; Morris, M.A.; de Ziegler, D. Intermediate and premutation FMR1 alleles in women with occult primary ovarian insufficiency. *Fertil. Steril.* **2009**, *92*, 464–470. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Eslami, A.; Farahmand, K.; Totonchi, M.; Madani, T.; Asadpour, U.; Zari Moradi, S.; Gourabi, H.; Mohseni-Meybodi, A. FMR1 premutation: Not only important in premature ovarian failure but also in diminished ovarian reserve. *Hum. Fertil.* **2017**, *20*, 120–125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Pastore, L.M.; Young, S.L.; Manichaikul, A.; Baker, V.L.; Wang, X.Q.; Finkelstein, J.S. Distribution of the FMR1 gene in females by race/ethnicity: Women with diminished ovarian reserve versus women with normal fertility (SWAN study). *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 205–211.e1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Lekovich, J.; Man, L.; Xu, K.; Canon, C.; Lilienthal, D.; Stewart, J.D.; Pereira, N.; Rosenwaks, Z.; Gerhardt, J. CGG repeat length and AGG interruptions as indicators of fragile X-associated diminished ovarian reserve. *Genet. Med.* **2018**, *20*, 957–964. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. World Health Organization. *Infertility Prevalence Estimates*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2023; ISBN 978-92-4-006831-5.
13. Sociedad Española de Fertilidad. Registro Nacional de Actividad 2021. Registro SEF. 2021. Available online: https://www.registrosef.com/public/docs/sef2021_IAFIV.pdf (accessed on 29 July 2024).
14. Franasiak, J.M.; Forman, E.J.; Hong, K.H.; Werner, M.D.; Upham, K.M.; Treff, N.R.; Scott, R.T., Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil. Steril.* **2014**, *101*, 656–663.e1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Asadi, R.; Omrani, M.D.; Ghaedi, H.; Mirfakhraie, R.; Azargashb, E.; Habibi, M.; Pouresmaeli, F. Premutations of FMR1 CGG repeats are not related to idiopathic premature ovarian failure in Iranian patients: A case control study. *Gene* **2018**, *676*, 189–194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Drakopoulos, P.; Bardhi, E.; Boudry, L.; Vaiarelli, A.; Makrigiannakis, A.; Esteves, S.C.; Tournaye, H.; Blockeel, C. Update on the management of poor ovarian response in IVF: The shift from Bologna criteria to the Poseidon concept. *Ther. Adv. Reprod. Health* **2020**, *14*, 2633494120941480. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Esteves, S.C.; Yarali, H.; Vuong, L.N.; Conforti, A.; Humaidan, P.; Alviggi, C. POSEIDON groups and their distinct reproductive outcomes: Effectiveness and cost-effectiveness insights from real-world data research. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2022**, *85*, 159–187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Allen, E.G.; Sullivan, A.K.; Marcus, M.; Small, C.; Dominguez, C.; Epstein, M.P.; Charen, K.; He, W.; Taylor, K.C.; Sherman, S.L. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 2142–2152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Hundscheid, R.D.; Braat, D.D.; Kiemeny, L.A.; Smits, A.P.; Thomas, C.M. Increased serum FSH in female fragile X premutation carriers with either regular menstrual cycles or on oral contraceptives. *Hum. Reprod.* **2001**, *16*, 457–462. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Murray, A. Premature ovarian failure and the FMR1 gene. *Semin. Reprod. Med.* **2000**, *18*, 59–66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Sullivan, A.K.; Marcus, M.; Epstein, M.P.; Allen, E.G.; Anido, A.E.; Paquin, J.J.; Yadav-Shah, M.; Sherman, S.L. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 402–412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

22. Tassone, F.; Hagerman, R.J.; Taylor, A.K.; Mills, J.B.; Harris, S.W.; Gane, L.W.; Hagerman, P.J. Clinical involvement and protein expression in individuals with the FMR1 premutation. *Am. J. Med. Genet.* **2000**, *91*, 144–152. [\[CrossRef\]](#)
23. Mila, M.; Alvarez-Mora, M.I.; Madrigal, I.; Rodriguez-Revenga, L. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clin. Genet.* **2018**, *93*, 197–205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Elizur, S.E.; Lebovitz, O.; Derech-Haim, S.; Dratviman-Storobinsky, O.; Feldman, B.; Dor, J.; Orvieto, R.; Cohen, Y. Elevated levels of FMR1 mRNA in granulosa cells are associated with low ovarian reserve in FMR1 premutation carriers. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105121. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Sherman, S.L.; Curnow, E.C.; Easley, C.A.; Jin, P.; Hukema, R.K.; Tejada, M.I.; Willemsen, R.; Usdin, K. Use of model systems to understand the etiology of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). *J. Neurodev. Disord.* **2014**, *6*, 26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Hagerman, P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS): Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* **2013**, *126*, 1–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Buijsen, R.A.; Visser, J.A.; Kramer, P.; Severijnen, E.A.; Gearing, M.; Charlet-Berguerand, N.; Sherman, S.L.; Berman, R.F.; Willemsen, R.; Hukema, R.K. Presence of inclusions positive for polyglycine containing protein, FMRpolyG, indicates that repeat-associated non-AUG translation plays a role in fragile X-associated primary ovarian insufficiency. *Hum. Reprod.* **2016**, *31*, 158–168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Friedman-Gohas, M.; Elizur, S.E.; Dratviman-Storobinsky, O.; Aizer, A.; Haas, J.; Raanani, H.; Orvieto, R.; Cohen, Y. FMRpolyG accumulates in FMR1 premutation granulosa cells. *J. Ovarian Res.* **2020**, *13*, 22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Bretherick, K.L.; Fluker, M.R.; Robinson, W.P. FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum. Genet.* **2005**, *117*, 376–382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Bodega, B.; Bione, S.; Dalpra, L.; Toniolo, D.; Ornaghi, F.; Vegetti, W.; Ginelli, E.; Marozzi, A. Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum. Reprod.* **2006**, *21*, 952–957. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Gleicher, N.; Weghofer, A.; Barad, D.H. A pilot study of premature ovarian senescence: I. Correlation of triple CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Mullerian hormone. *Fertil. Steril.* **2009**, *91*, 1700–1706. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Bennett, C.E.; Conway, G.S.; Macpherson, J.N.; Jacobs, P.A.; Murray, A. Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 1335–1338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Murray, A.; Schoemaker, M.J.; Bennett, C.E.; Ennis, S.; Macpherson, J.N.; Jones, M.; Morris, D.H.; Orr, N.; Ashworth, A.; Jacobs, P.A.; et al. Population-based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency. *Genet. Med.* **2014**, *16*, 19–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Barasoain, M.; Barrenetxea, G.; Huerta, I.; Telez, M.; Carrillo, A.; Perez, C.; Criado, B.; Arrieta, I. Study of FMR1 gene association with ovarian dysfunction in a sample from the Basque Country. *Gene* **2013**, *521*, 145–149. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. De Geyter, C.; M'Rabet, N.; De Geyter, J.; Zurcher, S.; Moffat, R.; Bosch, N.; Zhang, H.; Heinimann, K. Similar prevalence of expanded CGG repeat lengths in the fragile X mental retardation I gene among infertile women and among women with proven fertility: A prospective study. *Genet. Med.* **2014**, *16*, 374–378. [\[CrossRef\]](#)
36. Pastore, L.M.; McMurry, T.L.; Williams, C.D.; Baker, V.L.; Young, S.L. AMH in women with diminished ovarian reserve: Potential differences by FMR1 CGG repeat level. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2014**, *31*, 1295–1301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Man, L.; Lekovich, J.; Rosenwaks, Z.; Gerhardt, J. Fragile X-Associated Diminished Ovarian Reserve and Primary Ovarian Insufficiency from Molecular Mechanisms to Clinical Manifestations. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 290. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Kunst, C.B.; Leeftang, E.P.; Iber, J.C.; Arnheim, N.; Warren, S.T. The effect of FMR1 CGG repeat interruptions on mutation frequency as measured by sperm typing. *J. Med. Genet.* **1997**, *34*, 627–631. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Nolin, S.L.; Glicksman, A.; Ersalesi, N.; Dobkin, C.; Brown, W.T.; Cao, R.; Blatt, E.; Sah, S.; Latham, G.J.; Hadd, A.G. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 358–364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Eichler, E.E.; Holden, J.J.; Popovich, B.W.; Reiss, A.L.; Snow, K.; Thibodeau, S.N.; Richards, C.S.; Ward, P.A.; Nelson, D.L. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat. Genet.* **1994**, *8*, 88–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Yrigollen, C.M.; Durbin-Johnson, B.; Gane, L.; Nelson, D.L.; Hagerman, R.; Hagerman, P.J.; Tassone, F. AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet. Med.* **2012**, *14*, 729–736. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Nolin, S.L.; Sah, S.; Glicksman, A.; Sherman, S.L.; Allen, E.; Berry-Kravis, E.; Tassone, F.; Yrigollen, C.; Cronister, A.; Jodah, M.; et al. Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45–69 repeat alleles. *Am. J. Med. Genet. A* **2013**, *161A*, 771–778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Avraham, S.; Almog, B.; Reches, A.; Zakar, L.; Malcov, M.; Sokolov, A.; Alpern, S.; Azem, F. The ovarian response in fragile X patients and premutation carriers undergoing IVF-PGD: Reappraisal. *Hum. Reprod.* **2017**, *32*, 1508–1511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. La Marca, A.; Mastellari, E. Fertility preservation for genetic diseases leading to premature ovarian insufficiency (POI). *J. Assist. Reprod. Genet.* **2021**, *38*, 759–777. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Bibi, G.; Malcov, M.; Yuval, Y.; Reches, A.; Ben-Yosef, D.; Almog, B.; Amit, A.; Azem, F. The effect of CGG repeat number on ovarian response among fragile X premutation carriers undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 869–874. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

46. Pastore, L.M.; Christianson, M.S.; McGuinness, B.; Vaught, K.C.; Maher, J.Y.; Kearns, W.G. Does the FMR1 gene affect IVF success? *Reprod. BioMedicine Online* **2019**, *38*, 560–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Jin, X.; Zeng, W.; Xu, Y.; Jin, P.; Dong, M. CGG repeats of FMR1 negatively affect ovarian reserve and response in Chinese women. *Reprod. BioMedicine Online* **2023**, *49*, 103779. [[CrossRef](#)]
48. Pastore, L.M.; Johnson, J. The FMR1 gene, infertility, and reproductive decision-making: A review. *Front. Genet.* **2014**, *5*, 195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Haahr, T.; Dosouto, C.; Alviggi, C.; Esteves, S.C.; Humaidan, P. Management Strategies for POSEIDON Groups 3 and 4. *Front. Endocrin.* **2019**, *10*, 614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Persico, T.; Tranquillo, M.L.; Seracchioli, R.; Zuccarello, D.; Sorrentino, U. PGT-M for Premature Ovarian Failure Related to CGG Repeat Expansion of the FMR1 Gene. *Genes* **2023**, *15*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. ACOG. Committee Opinion No. 469: Carrier screening for fragile X syndrome. *Obstet. Gynecol.* **2010**, *116*, 1008–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Welt, C.K.; Smith, P.C.; Taylor, A.E. Evidence of early ovarian aging in fragile X premutation carriers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 4569–4574. [[CrossRef](#)]
53. Rohr, J.; Allen, E.G.; Charen, K.; Giles, J.; He, W.; Dominguez, C.; Sherman, S.L. Anti-Mullerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: A preliminary study. *Hum. Reprod.* **2008**, *23*, 1220–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rajendra, K.; Bringman, J.J.; Ward, J.; Phillips, O.P. Who should be tested for fragile X carriership? A review of 1 center's pedigrees. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2008**, *198*, e51–e53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Castilla, J.A.; Abellán, F.; Alamá, P.; Aura, M.; Bassas, L.; Clúa, E.; Guillén, J.; Manau, D.; Rueda, J.; Ruiz, M.; et al. Genetic screening in gamete donation: Recommendations from SEF, ASES, AEBM-ML, ASEBIR and AEGH. *Med. Reprod. Embriol. Clínica* **2020**, *7*, 1–4. [[CrossRef](#)]
56. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee for the Society for Assisted Reproductive Technology. Guidance regarding gamete and embryo donation. *Fertil. Steril.* **2021**, *115*, 1395–1410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Dondorp, W.; De Wert, G.; Pennings, G.; Shenfield, F.; Devroey, P.; Tarlatzis, B.; Barri, P.; Diedrich, K.; Eichenlaub-Ritter, U.; Tuttelmann, F.; et al. ESHRE Task Force on Ethics and Law 21: Genetic screening of gamete donors: Ethical issues. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 1353–1359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

DISCUSSIÓ



En el context d'aquesta tesi doctoral s'explora la relació entre la premutació del gen *FMR1* i l'FXPOI, destacant la identificació de nous biomarcadors potencials associats a la fallida ovàrica. A més, s'ha analitzat la prevalença de la premutació *FMR1* en la subpoblació de dones joves amb BRO que participen en programes de FIV amb l'objectiu de millorar els criteris per a l'estudi genètic. Finalment, s'aborda la millora en el maneig reproductiu de les dones amb premutació *FMR1*, ajustant les estratègies terapèutiques per optimitzar els resultats reproductius.

Primerament, en els articles 1 i 2 s'ha investigat la possibilitat de descobrir nous biomarcadors o factors de risc que puguin ajudar en la identificació d'aquelles dones portadores de la premutació que desenvoluparan FXPOI.

En els últims anys, els ARNInc s'han postulat como a biomarcadors diagnòstics per diverses malalties com ara el càncer (87), trastorns cardiovasculars o neurodegeneratius (88, 89). Una de les avantatges que presenten respecte a altres molècules d'ARN és que, a causa de la seva petita mida, són altament estables en el torrent sanguini. Aquesta característica juntament amb el fet que la seva expressió pot presentar variacions en el transcurs de les malalties els posiciona com a candidats en el diagnòstic, seguiment i potencials dianes terapèutiques. Pel que refereix al gen *FMR1*, existeixen l'*FMR4*, *FMR5* i *FMR6* que constitueixen un grup de ARNInc derivats d'aquest gen que podrien participar en aspectes de la presentació clínica dels trastorns associats al X fràgil (29, 30, 90, 91). La rellevància potencial d'aquests ARNInc derivats d'*FMR1* es basa en la variació en els nivells d'expressió observats entre pacients amb SXF i pacients portadors de la premutació. En teixit cerebral de pacients amb SXF, s'ha observat que tant l'expressió de *FMR4* com de *FMR6* es troba



reduïda (29, 30). Al contrari que en els portadors de la premutació, on l'expressió d'FMR4 s'ha descrit augmentada (30).

A partir d'aquestes observacions, l'**estudi 1** va investigar els nivells d'expressió d'FMR4, FMR5 i FMR6 en sang perifèrica de dones portadores de la premutació del *FMR1* amb i sense FXPOI, per tal d'explorar la seva aplicabilitat com a possibles biomarcadors de l'FXPOI. En el primer anàlisi, els resultats no van demostrar una diferència significativa al comparar els nivells d'expressió dels 3 ARNlnc entre els dos grups de pacients estudiades. En canvi, si que es va obtenir una diferència estadísticament significativa per FMR4 ($p=0.039$) en comparar ambdós grups estratificats pels nivells d'expressió (baix, mitjà o alt) d'FMR4. És a dir, la distribució de portadores de la premutació amb FXPOI i sense FXPOI era diferent i significativa quan es tenien en compte diferents nivells d'expressió d'FMR4. De tal manera que el 86% (6/7) de les portadores de la premutació que presentaven nivells elevats d'FMR4 havien desenvolupat una FXPOI mentre que només el 14% (1/7) amb nivells alts d'expressió d'FMR4 no havien desenvolupat una FXPOI. Tot i que cal tenir precaució a causa de la mida limitada de la mostra, l'anàlisi de la corba ROC va revelar que FMR4 podia distingir modestament les portadores de la premutació a *FMR1* amb i sense FXPOI amb un AUC de 0,67 (OR 6,67, IC del 95% = 1,5–29,63, $p = 0,016$) i establint un punt de tall de 7.5 en els nivells d'FMR4 com a predictor de risc a desenvolupar FXPOI. Per tant, els nivells d'FMR4 per sobre d'aquest llindar conferiren un risc significativament augmentat de desenvolupar FXPOI (OR: 6.67 95% CI: 1.5–29.63, $p = 0.016$).

Actualment, només s'ha pogut demostrar que la mida de les repeticions CGG s'associa de manera no lineal amb el risc de desenvolupar FXPOI (45, 48, 92); és a dir, hi ha un risc més alt



d'FXPOI en l'interval de ~ 80 -99 CGG. En aquesta línia, els nostres resultats, també van mostrar una correlació no lineal entre els nivells d'expressió d'FMR4 i la mida del triplet CGG; obtenint nivells més alts d'expressió tant d'FMR4 en l'interval de ~ 80 -99 CGG.

De manera semblant al nostre estudi, en la literatura només hi ha un treball que analitzi els nivells de transcrits d'FMR4 i FMR6 en portadores de la premutació a *FMR1*. En aquest estudi, Elizur i col·laboradors l'any 2016, van analitzar els nivells de transcrits de FMR4 i FMR6 en cèl·lules de la granulosa ovàrica de portadores de la premutació de *FMR1* i en una població control (no portadores de la premutació). Els autors no van observar cap associació entre els nivells d'expressió de FMR4 en les cèl·lules de la granulosa i el nombre de repeticions CGG. D'altra banda, tot i que els nivells d'expressió de FMR6 tampoc van ser significativament diferents entre les portadores de la premutació de *FMR1* i els controls, van trobar una associació no lineal significativa entre el nombre de repeticions CGG i els nivells de FMR6 en aquestes cèl·lules (90). Cal tenir present que tant la metodologia com el tipus de teixit emprat per mesurar els nivells d'ARNInc eren diferents dels que hem utilitzat en el nostre estudi, la qual cosa podria explicar la diferència en els resultats de les dues publicacions.

Seguint la línia de la primera publicació, l'**estudi 2** es va centrar en el paper de l'FMR4 com a biomarcador en la detecció precoç de la fallida ovàrica en portadores de la premutació de *FMR1* joves (<35 anys). En aquest estudi, es van analitzar les possibles correlacions entre els marcadors de reserva ovàrica més utilitzats, com són els nivells d'AMH i el RFA, i els nivells d'expressió de FMR4 en un grup de dones joves portadores de la premutació de *FMR1*. Aquesta anàlisi buscava



ampliar la comprensió sobre el potencial de l'FMR4 com a marcador addicional per a predir la fallida ovàrica.

L'AMH i el RFA, són els marcadors de reserva ovàrica que actualment es fan servir, ja que han demostrat tenir un alt valor predictiu en la detecció precoç de la fallida ovàrica, tal com suggereixen diversos estudis. En particular, Jiao i col·laboradors van posar de manifest que la combinació d'aquests marcadors podria tenir un alt potencial per predir el declivi ovàric, ja que mostren una sensibilitat i especificitat elevada per detectar diferents estadis d'insuficiència ovàrica, incloent-hi la reserva ovàrica normal, pre-IOP, IOP inicial i IOP (93). Aquesta precisió permetria un seguiment i una intervenció més personalitzada segons el perfil de cada pacient, aspecte de gran rellevància en l'abordatge de l'FXPOI.

En un estudi publicat al 2011, es van analitzar la variació dels nivells intra-individuals d'AMH al llarg del temps en 240 dones (127 portadores de la premutació a *FMR1* i 113 controls). Utilitzant models lineals mixtos, van determinar que les portadores presentaven nivells d'AMH més baixos a totes les edats, amb una disminució del 10% anual, i que l'efecte de la premutació reduïa els nivells en un 54%. A més, la correlació entre els nivells d'AMH observats i els modelats va ser significativa, amb un coeficient de 0.36 per a les no portadores i de 0.69 per a les portadores (94). Per tant, l'estudi conclouïa que el seguiment dels nivells d'AMH al llarg dels anys en una dona portadora de la premutació pot ser utilitzat com a predictor d'FXPOI.

El nostre estudi és el primer estudi publicat en relacionar els MRO amb l'FMR4. Els resultats van mostrar una associació negativa entre els nivells d'AMH, RFA i FMR4 en portadores de la premutació de *FMR1*. Aquest tipus d'associació indicaria que nivells més elevats de



FMR4 podrien associar-se amb una reserva ovàrica més baixa, la qual cosa apuntaria a un possible paper del FMR4 com a biomarcador complementari en l'avaluació del risc d'FXPOI. Aixó seria especialment interessant en aquell grup de pacients on hi ha una discordança entre l'AMH i el RFA (Grup B dels criteris de Bolonga). Tot i que en la majoria de casos els nivells d'AMH i RFA son concordats, s'estima que 1 de cada 5 dones present valors discordants d'AMH i RFA (95). En el nostre estudi, les 10 portadores de la premutació estudiades es van estratificar en 3 grups tenint en comte els nivells d'AMH i RFA. Aquelles amb nivells elevat d'AMH i RFA es van considerar com a baix risc a presentar FXPOI, mentre que les que presentaven valors baixos de MRO es van considerar com a alt risc per FXPOI. En 2 dels casos es van trobar valors discordants entre els MRO. Aquests grup es va considerar com de risc intermedi a presentar FXPOI. Tenint en compte els nivells d'expressió d'FMR4, el risc a desenvolupar FXPOI en aquest dos casos va passar a risc baix ja que totes dues portadores presentaven nivells <7 . Per tant utilitzant un nivell de tall dels nivells d'expressió d'FMR4 de >12 per a un risc alt d'FXPOI i <7 per a un risc baix d'FXPOI, podem discriminar millor el risc de les portadores de premutació a *FMR1* a desenvolupar FXPOI (96).

Tot i que calen estudis addicionals per validar aquesta hipòtesi, la presència d'aquesta correlació suggereix que l'anàlisi combinada de FMR4 amb altres marcadors, com AMH i RFA, podria millorar la capacitat de predir el risc de fallida ovàrica en portadores de la premutació de *FMR1*, oferint una eina més precisa per identificar i monitoritzar aquestes pacients.

A banda, a l'**estudi 3** es va analitzar la prevalença de la premutació a un subgrup determinat (dona jove amb BRO) en un programa de FIV



i com aquestes pacients poden beneficiar-se de l'estudi genètic del gen *FMR1*. Aquest grup de dones dintre de la població que se sotmet a tècniques de reproducció assistida representa un desafiament en el maneig clínic

Aproximadament 1/250 dones i 1/800 homes són portadors d'un al·lel premutat al gen *FMR1* (55-200 repeticions CGG). Un 20% d'aquestes dones desenvoluparan FXPOI (en comparació amb un 1% en la població general) (47).

Tot i que l'associació entre premutació i FXPOI està ben establerta, la prevalença de la premutació en la població de pacients amb BRO, és actualment desconeguda. Estudis anteriors demostren que aquesta prevalença està augmentada en comparació amb dones amb altres causes d'infertilitat i amb donants d'oòcits (18), tot i que la literatura és diversa i sense arribar a un consens clar donat que les metodologies dels diferents estudis difereixen substancialment (97-101).

En un estudi retrospectiu publicat al 2009, Streuli i col.laboradors van descriure un risc major en el grup de dones estèrils amb BRO de presentar un rang de repeticions per sobre de 40 CGG comparat amb el grup control (dones amb reserva ovàrica normal) (56). De manera similar però tenint en compte el punt de tall de 35 repeticions CGG, Pastore *et al* l'any 2014, descrivien una major pèrdua fol·licular en dones amb BRO i ≥ 35 repeticions CGG (102). Els mateixos autors en un estudi l'any 2017, descrivien que les diferents associacions descrites no diferien segons el grup ètnic (59). Finalment, Eslami i col.laboradors, també publiquen un estudi on s'observa associació entre la premutació a *FMR1* tant en pacient IOP com BRO, així com amb nivells més elevats de FSH i AMH més baixes (61). Davant de



tots aquestes evidències, Man *et al.*, proposen un nou terme per fer referència a la BRO associada a la premutació (FXDOR, per les seves sigles en anglès), essent aquest un diagnòstic d'exclusió (103).

Recentment s'ha publicat un metanàlisi sobre l'associació entre premutació i FXPOI/BRO. L'objectiu era analitzar la relació entre la longitud de la repetició CGG en el gen *FMR1* i la gravetat de la IOP. Fins al gener de 2019, es van analitzar un total de 18 estudis de casos i controls o de cohorts, que implicaven 3022 pacients amb IOP idiopàtica i 8461 controls. Dels 18 estudis, 13 van complir els criteris necessaris per avaluar tant l'associació de la premutació com del rang intermig de repeticions (zona gris, 45-55 CGG) en pacients amb IOP, incloent 2047 casos i 6912 controls. Els resultats van mostrar que la premutació del gen *FMR1* estava significativament associada amb la IOP. En canvi, no es va trobar una correlació significativa entre la longitud de repetició intermèdia (zona gris) i la IOP. A més, 6 estudis que representaven 975 pacients i 1749 controls eren elegibles per a l'avaluació de la premutació i la longitud de repetició intermèdia en relació amb la BRO. Els resultats van indicar que l'associació entre la premutació del gen *FMR1* i la BRO era significativa. No obstant això, igual que amb la IOP, no es va trobar una correlació significativa entre la zona gris i la BRO en la comparació de casos i controls (42).

El nostre estudi va fer servir la classificació de Poseidon (63). Aquesta classificació es basa en l'edat de la dona, els MRO i el resultat del cicle previ d'estimulació, en el cas que s'hagi fet, per tal d'optimitzar el cicle de FIV (tant en la vessant de tractament mèdic com en proves complementàries com podrien ser les genètiques). En concret, es van estudiar pacients incloses en el subgrup Poseidon 3 (dona jove >35 anys amb AMH 1.1 ng/mL i/o RFA < 5). En la literatura publicada, el subgrup 3 constitueix aproximadament el 10% de la població de



Poseidon (109, 110). Els resultats descriuen un 13% de la nostra població de FIV, amb l'estudi molecular de l'expansió al gen *FMR1* realitzat en el 80% d'aquestes pacients. Es va observar una prevalença significativament més alta ($p = 0,012$) de la premutació del gen *FMR1* en el grup amb BRO (7,69%) en comparació amb el grup de control (1,32%). Per tant, els resultats recolzen la hipòtesi que la prevalença de dones portadores de la premutació a *FMR1* és superior en la població de pacients joves amb BRO.

També s'ha investigat la relació entre el número de AGG i els MRO. La funció de les interrupcions AGG que es troben dintre el tracte de repeticions CGG és la d'estabilitzar el seu nombre durant la replicació de l'ADN en les diferents divisions cel·lulars. Els resultats per una banda, descriuen que les pacients amb repeticions CGG més llargues sense interrupcions AGG presentaven la reserva ovàrica més baixa (104). També són varis els estudis que descriuen que aquelles pacients amb almenys una interrupció AGG dins la seqüència CGG, tenen menor risc d'expansió del gen de cara a la descendència (68, 69, 105, 106). Motiu per el qual, en el tercer estudi també es va fer referència a les interrupcions AGG. En concordança amb el que s'ha descrit, es va observar que, entre les portadores de la premutació identificades amb BRO, només una presentava interrupcions AGG en el tracte expandit.

En referència als resultats de les TRA en la pacient premutada, la bibliografia no és molt àmplia. Si analitzem els estudis publicats, generalment, es suggereix una resposta disminuïda a l'estimulació ovàrica (70, 71). Un estudi reporta que les pacients amb repeticions entre 80-120 CGG tenen una pitjor resposta a l'estimulació i per tant, un menor número de oòcits recuperats (72). Pel contrari, dos estudis



no van observar cap correlació entre el número de CGG i els marcadors de reserva ovàrica (107, 108).

Si comparem entre pacients amb la mutació completa i la premutació, en l'estudi retrospectiu on s'analitzaven 309 cicles de FIV, s'observava una resposta a l'estimulació disminuïda en les pacients premutades, però no s'observen diferències en termes de taxa de fertilització, taxa de clivatge o taxa de biòpsia (70). Aquesta resposta disminuïda podria ser causa per l'acumulació d'ARNm de *FMR1* en cèl·lules de la granulosa ovàrica (25).

És important tenir en compte que el diagnòstic de la premutació implica diverses conseqüències, tant a nivell reproductiu com de salut mental. Aquestes pacients tenen l'opció de realitzar una FIV amb un diagnòstic genètic d'implantació per evitar transmetre la SXF en la descendència, per tant, un error en el diagnòstic podria portar a tenir fills afectats, amb un alt impacte econòmic i social. Cal tenir present, tant pels professionals de la salut que poden atendre a la pacient com per ella mateixa, però, que aquesta tècnica té les seves limitacions, tant per la tècnica mateixa del laboratori, com per la necessitat d'obtenir un bon número d'oòcits de qualitat, per tant, directament relacionat amb la reserva ovàrica i l'edat de la pacient (111).

Un estudi revelava que la meitat dels diagnòstics de SXF es van realitzar després del naixement d'un nen afecte. Aquesta dada reforça la idea d'estudiar aquelles dones amb BRO, davant el risc de ser portadores de la premutació i poder transmetre la mutació completa en la següent generació (112).



Actualment, cap de les guies Europees ni Americanes de reproducció assistida recomanen el cribratge del gen *FMR1* en pacients amb marcadors de BRO. Pel contrari, en els protocols d'estudi de les donants d'òocits la Societat Espanyola de Fertilitat i la Societat Americana de Reproducció s'ha recolzat la prova genètica per al gen *FMR1* en dones que volen donar els seus òvuls (113, 114). En el cas de la societat Europea de Reproducció, en la guia publicada, es manté la possibilitat oberta de realitzar o no aquest l'estudi (115).

En conjunt, aquestes investigacions pretenen no només aprofundir en el coneixement científic sinó també traduir aquest coneixement en pràctiques clíniques millorades.



Limitacions i fortaleeses

Entre les fortaleeses dels **estudis 1 i 2**, destaca que ambdós estudis han seleccionat acuradament la població d'estudi, centrant-se en dones portadores de la premutació de *FMR1* amb criteris clars, fet que aporta robustesa als resultats per a la població d'interès. A més, el segon estudi valida els resultats del primer, reforçant la hipòtesi que el FMR4 podria actuar com un biomarcadors associat a major risc de desenvolupar FXPOI.

Tanmateix, aquests estudis també presenten limitacions. En primer lloc, la mida de la mostra és relativament petita, amb 36 participants en el primer estudi i 10 pacients en el segon. Això compromet la capacitat de generalitzar els resultats. A més, tot i que s'ha identificat l'ARNInc FMR4 com un possible biomarcador potencial d'FXPOI, el poder diagnòstic que ofereix en l'estudi és modest, amb un AUC de 0,67, i no s'ha validat àmpliament en altres cohorts.

Pel que fa a l'**estudi 3**, aquest presenta diverses fortaleeses. En primer lloc, és el primer estudi que investiga la prevalença de la premutació del gen *FMR1* entre pacients joves amb reserva ovàrica disminuïda sotmeses a tractament de FIV, trobant una prevalença més alta de la premutació. Això és especialment rellevant, ja que, fins al moment, hi ha poques publicacions en aquesta subpoblació en un programa de FIV.

A la pràctica clínica, aquest grup de pacients és freqüent, per tant, el maneig personalitzat amb la possibilitat de realitzar un estudi genètic s'ha de tenir present. A més, aquest estudi compta amb una mida de mostra considerable, amb un total de 385 dones, de les quals 93 tenen reserva ovàrica disminuïda i 132 són donants d'òvuls, proporcionant una base de dades suficient per a l'anàlisi estadístic. El



disseny de l'estudi és sòlid, amb una comparació clara entre pacients amb BRO i el grup control, basant-se en criteris clínics establerts (nivells d'AMH i RFA). Així mateix, es recullen dades clíniques detallades i es tenen en compte altres causes d'infertilitat, oferint una visió clínica més completa.

No obstant això, també es reconeixen diverses limitacions. En primer lloc, es tracta d'un estudi retrospectiu, fet que limita l'estudi per la disponibilitat de les dades i pel risc de biaix de selecció.

En resum, tot i que aquests estudis ofereixen informació rellevant sobre el paper potencial de l'ARNInc FMR4 en la patogènesi d'FXPOI, i sobre la prevalença de la premutació en una subpoblació de dones joves amb BRO que es troben en un programa de FIV, caldrà realitzar estudis amb mostres més grans, amb major diversitat en les poblacions estudiades i amb una validació externa més extensa per consolidar els resultats i establir la seva aplicabilitat clínica.



Investigacions futures

Els estudis actuals ofereixen una base sòlida per a comprendre la relació entre la premutació del gen *FMR1* i l'FXPOI, tant a nivell fisiopatològic amb un potencial biomarcadors proposat així com la proposta d'un subgrup de pacients per a la realització de l'estudi genètic. No obstant això, hi ha diverses direccions que podrien ser explorades en futures investigacions per a millorar la comprensió i la gestió clínica d'aquestes condicions.

1. Estudi de les Inclusions Intranuclears

- Aquesta és una línia d'investigació actual del nostre equip. Amb mostres de cèl·lules de la granulosa d'aquestes pacients, estem realitzant un estudi anatomo-patològic per estudiar si existeixen les inclusions intranuclears descrites en el FXTAS a nivell neuronal. Actualment s'està optimitzant la tècnica de tinció p62 (la especifica de les inclusions en teixit neuronal) en teixit fresc de cèl·lules de la granulosa.

2. Estudis Prospectius i Validació de Biomarcadors:

- Ampliar la mida de la mostra: Per augmentar la robustesa dels resultats, es necessita realitzar estudis amb una mida de mostra més gran. Això permetria una millor generalització dels resultats i una avaluació més precisa del valor predictiu del biomarcador FMR4 amb la fallida ovàrica.
- Validació externa: La realització d'estudis en cohorts independents i diverses regions geogràfiques podria confirmar la validesa dels resultats obtinguts i assegurar que les conclusions siguin aplicables a una població més amplia.



3. Investigació de Mecanismes Patogènics:

- Cal aprofundir en la comprensió dels mecanismes moleculars a través dels quals les alteracions en l'expressió de ARNInc com l'FMR4 podrien estar alterant la reserva ovàrica de la dona.

4. Estudis Clínics i Estratègies de Diagnòstic:

- Estratègies de Diagnòstic precoç: Investigar l'eficàcia de la detecció precoç de la premutació *FMR1* en dones amb reserva ovàrica disminuïda o a risc d'FXPOI per establir estratègies de diagnòstic i assessorament genètic més precoces.

5. Diversificació de la Població d'Estudi:

- Incloure diversos grups demogràfics i estudi de factors ambientals: Les futures investigacions haurien d'incloure una població més diversa com l'ètnia i factors de l'estil de vida i com aquestes variables poden interactuar amb la reserva ovàrica, o si hi ha un impacte en el risc a desenvolupar FXPOI.

6. Estudi de Perfils Hormonals:

- Una direcció futura interessant també seria l'estudi dels perfils hormonals a nivell de líquid fol·licular en pacients amb FXPOI, per tal d'aprofundir en la comprensió dels mecanismes hormonals subjacents i la seva relació amb la premutació del gen *FMR1*.



En resum, les perspectives futures en aquesta àrea haurien d'incloure una combinació d'estudis prospectius més amplis, investigacions profundes sobre els mecanismes moleculars, i l'avaluació de noves estratègies diagnòstiques i terapèutiques. Això permetria no només confirmar els resultats actuals, sinó també millorar les opcions de diagnòstic i tractament per a les dones amb FXPOI i reserva ovàrica disminuïda.

CONCLUSIONS



1. Els resultats mostren una associació moderada entre els nivells elevats d'FMR4 i el risc de desenvolupar FXPOI en portadores de la premutació *FMR1*.
2. Els nivells elevats d'FMR4 en una portadora de la premutació confereixen un risc 6.67 vegades superior a desenvolupar FXPOI.
3. Els MRO juntament amb els nivells d'expressió d'FMR4 en sang perifèrica poden ser d'ajuda en l'assessorament reproductiu de la dona portadora de la premutació abans del desenvolupament de l'FXPOI.
4. La prevalença de la premutació del gen *FMR1* és més alta en pacients joves amb una reserva ovàrica baixa que es troben en un programa de FIV en comparació amb la població general.
5. L'assessorament genètic i el seguiment mèdic adequat són fonamentals per a les dones amb la premutació de *FMR1*, ja que poden beneficiar-se d'intervencions precoces i opcions de planificació familiar personalitzades, sent la principal, la FIV amb biòpsia per selecció embrionària.

BIBLIOGRAFIA



1. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*. 1991;66(4):817-22.
2. Darnell JC, Richter JD. Cytoplasmic RNA-binding proteins and the control of complex brain function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(8):a012344.
3. Seltzer MM, Baker MW, Hong J, Maenner M, Greenberg J, Mandel D. Prevalence of CGG expansions of the FMR1 gene in a US population-based sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2012;159B(5):589-97.
4. Noto V, Harrity C, Walsh D, Marron K. The impact of FMR1 gene mutations on human reproduction and development: a systematic review. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(9):1135-47.
5. Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Pagonabarraga J, Xuncla M, Badenas C, Kulisevsky J, et al. Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(10):1359-62.
6. Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(7):1648-58.
7. Cronister A, Teicher J, Rohlfes EM, Donnenfeld A, Hallam S. Prevalence and instability of fragile X alleles: implications for offering fragile X prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol*. 2008;111(3):596-601.
8. Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*. 1995;57(5):1006-18.
9. Toledano-Alhadeef H, Basel-Vanagaite L, Magal N, Davidov B, Ehrlich S, Drasinover V, et al. Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. *Am J Hum Genet*. 2001;69(2):351-60.
10. Tzeng CC, Tsai LP, Hwu WL, Lin SJ, Chao MC, Jong YJ, et al. Prevalence of the FMR1 mutation in Taiwan assessed by large-scale screening of newborn boys and analysis of DXS548-FRAXAC1 haplotype. *Am J Med Genet A*. 2005;133A(1):37-43.
11. Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clin Genet*. 2018;93(2):197-205.
12. Hagerman RJ, Hagerman P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome - features, mechanisms and management. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(7):403-12.
13. Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 1996;64(1):196-7.
14. Tassanakijpanich N, Hagerman RJ, Worachotekamjorn J. Fragile X premutation and associated health conditions: A review. *Clin Genet*. 2021;99(6):751-60.
15. Johnson K, Herring J, Richstein J. Fragile X Premutation Associated Conditions (FXPAC). *Front Pediatr*. 2020;8:266.
16. Mila M, Rodriguez-Revenga L, Matilla-Duenas A. FMR1 Premutation: Basic Mechanisms and Clinical Involvement. *Cerebellum*. 2016;15(5):543-5.
17. Hagerman RJ, Protic D, Rajaratnam A, Salcedo-Arellano MJ, Aydin EY, Schneider A. Fragile X-Associated Neuropsychiatric Disorders (FXAND). *Front Psychiatry*. 2018;9:564.
18. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Mills JB, Harris SW, Gane LW, et al. Clinical involvement and protein expression in individuals with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet*. 2000;91(2):144-52.



19. Galloway JN, Nelson DL. Evidence for RNA-mediated toxicity in the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Future Neurol.* 2009;4(6):785.
20. Oostra BA, Willemsen R. A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet.* 2003;12 Spec No 2:R249-57.
21. Zumwalt M, Ludwig A, Hagerman PJ, Dieckmann T. Secondary structure and dynamics of the r(CGG) repeat in the mRNA of the fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene. *RNA Biol.* 2007;4(2):93-100.
22. Fernandez JJ, Martinez R, Andujar E, Perez-Alegre M, Costa A, Bonilla-Henao V, et al. Gene expression profiles in the cerebellum of transgenic mice over expressing the human FMR1 gene with CGG repeats in the normal range. *Genet Mol Res.* 2012;11(1):467-83.
23. Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman SL, Gao F, et al. Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. *Hum Mol Genet.* 2012;21(23):5039-47.
24. Sherman SL, Curnow EC, Easley CA, Jin P, Hukema RK, Tejada MI, et al. Use of model systems to understand the etiology of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). *J Neurodev Disord.* 2014;6(1):26.
25. Elizur SE, Lebovitz O, Derech-Haim S, Dratviman-Storobinsky O, Feldman B, Dor J, et al. Elevated levels of FMR1 mRNA in granulosa cells are associated with low ovarian reserve in FMR1 premutation carriers. *PLoS One.* 2014;9(8):e105121.
26. Hagerman P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS): pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013;126(1):1-19.
27. Glineburg MR, Todd PK, Charlet-Berguerand N, Sellier C. Repeat-associated non-AUG (RAN) translation and other molecular mechanisms in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Brain Res.* 2018;1693(Pt A):43-54.
28. Rosario R, Anderson R. The molecular mechanisms that underlie fragile X-associated premature ovarian insufficiency: is it RNA or protein based? *Mol Hum Reprod.* 2020;26(10):727-37.
29. Khalil AM, Faghihi MA, Modarresi F, Brothers SP, Wahlestedt C. A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS One.* 2008;3(1):e1486.
30. Pastori C, Peschansky VJ, Barbouth D, Mehta A, Silva JP, Wahlestedt C. Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human FMR1 gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Hum Genet.* 2014;133(1):59-67.
31. Huang G, Zhu H, Wu S, Cui M, Xu T. Long Noncoding RNA Can Be a Probable Mechanism and a Novel Target for Diagnosis and Therapy in Fragile X Syndrome. *Front Genet.* 2019;10:446.
32. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(13):2491-509.
33. Malecki C, Hambly BD, Jeremy RW, Robertson EN. The RNA-binding fragile-X mental retardation protein and its role beyond the brain. *Biophys Rev.* 2020;12(4):903-16.
34. Todd PK, Oh SY, Krans A, He F, Sellier C, Frazer M, et al. CGG repeat-associated translation mediates neurodegeneration in fragile X tremor ataxia syndrome. *Neuron.* 2013;78(3):440-55.



35. Embryology ESfHRa, (ESHRE). Evidence-based Guideline: Premature ovarian insufficiency Draft for review 2024.
36. Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod*. 2003;18(1):199-206.
37. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*. 2005;11(4):391-410.
38. Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update*. 2015;21(6):787-808.
39. Ke H, Tang S, Guo T, Hou D, Jiao X, Li S, et al. Landscape of pathogenic mutations in premature ovarian insufficiency. *Nat Med*. 2023;29(2):483-92.
40. Sullivan SD, Welt C, Sherman S. FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med*. 2011;29(4):299-307.
41. Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;97(3):189-94.
42. Huang J, Zhang W, Liu Y, Liu Y, Wang J, Jiang H. Association between the FMR1 CGG repeat lengths and the severity of idiopathic primary ovarian insufficiency: a meta analysis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):3116-22.
43. Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Badenas C, Xuncla M, Jimenez L, Mila M. Premature ovarian failure and fragile X female premutation carriers: no evidence for a skewed X-chromosome inactivation pattern. *Menopause*. 2009;16(5):944-9.
44. Alvarez-Mora MI, Rodriguez-Revenga L, Feliu A, Badenas C, Madrigal I, Mila M. Skewed X Inactivation in Women Carrying the FMR1 Premutation and Its Relation with Fragile-X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome. *Neurodegener Dis*. 2016;16(3-4):290-2.
45. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod*. 2007;22(8):2142-52.
46. Tejada MI, Garcia-Alegria E, Bilbao A, Martinez-Bouzas C, Beristain E, Poch M, et al. Analysis of the molecular parameters that could predict the risk of manifesting premature ovarian failure in female premutation carriers of fragile X syndrome. *Menopause*. 2008;15(5):945-9.
47. Mailick MR, Hong J, Greenberg J, Smith L, Sherman S. Curvilinear association of CGG repeats and age at menopause in women with FMR1 premutation expansions. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2014;165B(8):705-11.
48. Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, et al. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod*. 2005;20(2):402-12.
49. Spath MA, Feuth TB, Smits AP, Yntema HG, Braat DD, Thomas CM, et al. Predictors and risk model development for menopausal age in fragile X premutation carriers. *Genet Med*. 2011;13(7):643-50.
50. Allen EG, Grus WE, Narayan S, Espinel W, Sherman SL. Approaches to identify genetic variants that influence the risk for onset of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI): a preliminary study. *Front Genet*. 2014;5:260.
51. Hunter JE, Epstein MP, Tinker SW, Charen KH, Sherman SL. Fragile X-associated primary ovarian insufficiency: evidence for additional genetic contributions to severity. *Genet Epidemiol*. 2008;32(6):553-9.



52. Stolk L, Perry JR, Chasman DI, He C, Mangino M, Sulem P, et al. Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways. *Nat Genet.* 2012;44(3):260-8.
53. Katari S, Aarabi M, Kintigh A, Mann S, Yatsenko SA, Sanfilippo JS, et al. Chromosomal instability in women with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2018;33(3):531-8.
54. Jiao X, Ke H, Qin Y, Chen ZJ. Molecular Genetics of Premature Ovarian Insufficiency. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(11):795-807.
55. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS, Table ESIGfRE--AR. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod.* 2009;24(9):2264-75.
56. Streuli I, Fraisse T, Ibecheole V, Moix I, Morris MA, de Ziegler D. Intermediate and premutation FMR1 alleles in women with occult primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2009;92(2):464-70.
57. Karimov CB, Moragianni VA, Cronister A, Srouji S, Petrozza J, Racowsky C, et al. Increased frequency of occult fragile X-associated primary ovarian insufficiency in infertile women with evidence of impaired ovarian function. *Hum Reprod.* 2011;26(8):2077-83.
58. Pastore LM, Young SL, Baker VL, Karns LB, Williams CD, Silverman LM. Elevated prevalence of 35-44 FMR1 trinucleotide repeats in women with diminished ovarian reserve. *Reprod Sci.* 2012;19(11):1226-31.
59. Pastore LM, Young SL, Manichaikul A, Baker VL, Wang XQ, Finkelstein JS. Distribution of the FMR1 gene in females by race/ethnicity: women with diminished ovarian reserve versus women with normal fertility (SWAN study). *Fertil Steril.* 2017;107(1):205-11 e1.
60. Barasoain M, Barrenetxea G, Huerta I, Telez M, Carrillo A, Perez C, et al. Study of FMR1 gene association with ovarian dysfunction in a sample from the Basque Country. *Gene.* 2013;521(1):145-9.
61. Eslami A, Farahmand K, Totonchi M, Madani T, Asadpour U, Zari Moradi S, et al. FMR1 premutation: not only important in premature ovarian failure but also in diminished ovarian reserve. *Hum Fertil (Camb).* 2017;20(2):120-5.
62. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1616-24.
63. Poseidon G, Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, Conforti A, De Placido G, et al. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril.* 2016;105(6):1452-3.
64. Esteves SC, Yarali H, Vuong LN, Conforti A, Humaidan P, Alviggi C. POSEIDON groups and their distinct reproductive outcomes: Effectiveness and cost-effectiveness insights from real-world data research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2022;85(Pt B):159-87.
65. Zhu Q, Ma H, Wang J, Liang X. Understanding the Mechanisms of Diminished Ovarian Reserve: Insights from Genetic Variants and Regulatory Factors. *Reprod Sci.* 2024;31(6):1521-32.
66. Welt CK, Smith PC, Taylor AE. Evidence of early ovarian aging in fragile X premutation carriers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4569-74.



67. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE, Jr., Gargano AD, Sullivan A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.* 2003;72(2):454-64.
68. Yrigollen CM, Durbin-Johnson B, Gane L, Nelson DL, Hagerman R, Hagerman PJ, et al. AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet Med.* 2012;14(8):729-36.
69. Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Cao R, et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet Med.* 2015;17(5):358-64.
70. Avraham S, Almog B, Reches A, Zakar L, Malcov M, Sokolov A, et al. The ovarian response in fragile X patients and premutation carriers undergoing IVF-PGD: reappraisal. *Hum Reprod.* 2017;32(7):1508-11.
71. La Marca A, Mastellari E. Fertility preservation for genetic diseases leading to premature ovarian insufficiency (POI). *J Assist Reprod Genet.* 2021;38(4):759-77.
72. Bibi G, Malcov M, Yuval Y, Reches A, Ben-Yosef D, Almog B, et al. The effect of CGG repeat number on ovarian response among fragile X premutation carriers undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 2010;94(3):869-74.
73. Pastore LM, Christianson MS, McGuinness B, Vaught KC, Maher JY, Kearns WG. Does the FMR1 gene affect IVF success? *Reprod Biomed Online.* 2019;38(4):560-9.
74. ACOG Committee Opinion No. 469: Carrier screening for fragile X syndrome. *Obstet Gynecol.* 2010;116(4):1008-10.
75. European Society for Human R, Embryology Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2016;31(5):926-37.
76. Hipp HS, Charen KH, Spencer JB, Allen EG, Sherman SL. Reproductive and gynecologic care of women with fragile X primary ovarian insufficiency (FXPOI). *Menopause.* 2016;23(9):993-9.
77. Santulli P, Blockeel C, Bourdon M, Coticchio G, Campbell A, De Vos M, et al. Fertility preservation in women with benign gynaecological conditions. *Hum Reprod Open.* 2023;2023(2):hoad012.
78. Dolmans MM, Donnez J. Fertility preservation in women for medical and social reasons: Oocytes vs ovarian tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2021;70:63-80.
79. Cobo A, Garcia-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohi J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril.* 2016;105(3):755-64 e8.
80. Cobo A, Garcia-Velasco J, Domingo J, Pellicer A, Remohi J. Elective and Onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Hum Reprod.* 2018;33(12):2222-31.
81. Diaz-Garcia C, Domingo J, Garcia-Velasco JA, Herraiz S, Mirabet V, Iniesta I, et al. Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. *Fertil Steril.* 2018;109(3):478-85 e2.
82. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG, Bay-Bjorn AM, Ernst E, Yding Andersen C. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(4):561-70.



83. Paradisi R, Macciocca M, Vicenti R, Rossi S, Morselli-Labate AM, Mastroroberto M, et al. New insights in the selection and management of cancer patients applicants for ovarian tissue cryopreservation. *Gynecol Endocrinol.* 2016;32(11):881-5.
84. Preservation EGGoff, Anderson RA, Amant F, Braat D, D'Angelo A, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. ESHRE guideline: female fertility preservation. *Hum Reprod Open.* 2020;2020(4):hoaa052.
85. Dolmans MM, von Wolff M, Poirot C, Diaz-Garcia C, Cacciottola L, Boissel N, et al. Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers. *Fertil Steril.* 2021;115(5):1102-15.
86. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(12):735-49.
87. Yan X, Hu Z, Feng Y, Hu X, Yuan J, Zhao SD, et al. Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. *Cancer Cell.* 2015;28(4):529-40.
88. Haemmig S, Feinberg MW. Targeting LncRNAs in Cardiovascular Disease: Options and Expeditions. *Circ Res.* 2017;120(4):620-3.
89. Zhang M, He P, Bian Z. Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases: Pathogenesis and Potential Implications as Clinical Biomarkers. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:685143.
90. Elizur SE, Dratviman-Storobinsky O, Derech-Haim S, Lebovitz O, Dor J, Orvieto R, et al. FMR6 may play a role in the pathogenesis of fragile X-associated premature ovarian insufficiency. *Gynecol Endocrinol.* 2016;32(4):334-7.
91. Peschansky VJ, Pastori C, Zeier Z, Motti D, Wentzel K, Velmeshev D, et al. Changes in expression of the long non-coding RNA FMR4 associate with altered gene expression during differentiation of human neural precursor cells. *Front Genet.* 2015;6:263.
92. Ennis S, Ward D, Murray A. Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(2):253-5.
93. Jiao X, Meng T, Zhai Y, Zhao L, Luo W, Liu P, et al. Ovarian Reserve Markers in Premature Ovarian Insufficiency: Within Different Clinical Stages and Different Etiologies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:601752.
94. Spath MA, Feuth TB, Allen EG, Smits AP, Yntema HG, van Kessel AG, et al. Intra-individual stability over time of standardized anti-Mullerian hormone in FMR1 premutation carriers. *Hum Reprod.* 2011;26(8):2185-91.
95. Zhang Y, Xu Y, Xue Q, Shang J, Yang X, Shan X, et al. Discordance between antral follicle counts and anti-Mullerian hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019;17(1):51.
96. Agusti I, Alvarez-Mora MI, Wijngaard R, Borrás A, Barcos T, Peralta S, et al. Correlation of FMR4 expression levels to ovarian reserve markers in FMR1 premutation carriers. *J Ovarian Res.* 2024;17(1):103.
97. Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP. FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum Genet.* 2005;117(4):376-82.
98. Bodega B, Bione S, Dalpra L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, et al. Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod.* 2006;21(4):952-7.



99. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. A pilot study of premature ovarian senescence: I. Correlation of triple CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Mullerian hormone. *Fertil Steril*. 2009;91(5):1700-6.
100. Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN, Jacobs PA, Murray A. Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2010;25(5):1335-8.
101. Murray A, Schoemaker MJ, Bennett CE, Ennis S, Macpherson JN, Jones M, et al. Population-based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency. *Genet Med*. 2014;16(1):19-24.
102. Pastore LM, McMurry TL, Williams CD, Baker VL, Young SL. AMH in women with diminished ovarian reserve: potential differences by FMR1 CGG repeat level. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(10):1295-301.
103. Man L, Lekovich J, Rosenwaks Z, Gerhardt J. Fragile X-Associated Diminished Ovarian Reserve and Primary Ovarian Insufficiency from Molecular Mechanisms to Clinical Manifestations. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:290.
104. Lekovich J, Man L, Xu K, Canon C, Lilienthal D, Stewart JD, et al. CGG repeat length and AGG interruptions as indicators of fragile X-associated diminished ovarian reserve. *Genet Med*. 2018;20(9):957-64.
105. Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet*. 1994;8(1):88-94.
106. Nolin SL, Sah S, Glicksman A, Sherman SL, Allen E, Berry-Kravis E, et al. Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(4):771-8.
107. De Geyter C, M'Rabet N, De Geyter J, Zurcher S, Moffat R, Bosch N, et al. Similar prevalence of expanded CGG repeat lengths in the fragile X mental retardation I gene among infertile women and among women with proven fertility: a prospective study. *Genet Med*. 2014;16(5):374-8.
108. Friedman-Gohas M, Elizur SE, Dratviman-Storobinsky O, Aizer A, Haas J, Raanani H, et al. FMRpolyG accumulates in FMR1 premutation granulosa cells. *J Ovarian Res*. 2020;13(1):22.
109. Drakopoulos P, Bardhi E, Boudry L, Vaiarelli A, Makrigiannakis A, Esteves SC, et al. Update on the management of poor ovarian response in IVF: the shift from Bologna criteria to the Poseidon concept. *Ther Adv Reprod Health*. 2020;14:2633494120941480.
110. Berntsen S, Söderström-Anttila V, Wennerholm UB, Laivuori H, Loft A, Oldereid NB, et al. The health of children conceived by ART: 'the chicken or the egg?'. *Hum Reprod Update*. 2019;25(2):137-58.
111. Persico T, Tranquillo ML, Seracchioli R, Zuccarello D, Sorrentino U. PGT-M for Premature Ovarian Failure Related to CGG Repeat Expansion of the FMR1 Gene. *Genes (Basel)*. 2023;15(1).
112. Rajendra K, Bringman JJ, Ward J, Phillips OP. Who should be tested for fragile X carriership? A review of 1 center's pedigrees. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(5):e51-3.
113. Jose A. Castilla FA, Pilar Alamá, Mónica Aura, Lluís Bassas,, Eli Clúa ADIF, Juanjo Guillén, Dolors Manau, Joaquin Rueda, Miguel Ruiz, Xavier Vendrell. Genetic screening



in gamete donation: Recommendations from SEF, ASES, AEBM-ML, ASEBIR and AEGH. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica* 2020;7:1-4.

114. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, the Practice Committee for the Society for Assisted Reproductive Technology. Electronic address Aao. Guidance regarding gamete and embryo donation. *Fertil Steril*. 2021;115(6):1395-410.

115. Dondorp W, De Wert G, Pennings G, Shenfield F, Devroey P, Tarlatzis B, et al. ESHRE Task Force on Ethics and Law 21: genetic screening of gamete donors: ethical issues. *Hum Reprod*. 2014;29(7):1353-9.

